

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif secara *in silico*, karena pada penelitian ini tidak ada perlakuan khusus yang diberikan pada *Anguilla bicolor*.

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Gedung B FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia pada bulan Februari – Maret 2020. Kemudian penelitian dilanjutkan di rumah untuk analisis *in silico*.

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat bahan yang terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi, Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat bahan yang digunakan terdapat pada Lampiran 1.

3.4 Prosedur Penelitian

3.5.1 Desain Primer

Pada penelitian Yulianti (2019) telah berhasil mendapatkan sekuen spesifik *housekeeping gene* yaitu 18S Ribosomal RNA (18S rRNA), *beta Actin* (β aktin), *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1 α) dan Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) pada ikan sidat (*Anguilla bicolor*). Ke empat *housekeeping gene* tersebut dipilih oleh Yulianti karena memiliki ketersediaan sekuen yang cukup banyak pada beberapa spesies ikan khususnya spesies ikan yang sekerabat dengan ikan sidat pada class Actinopterygii. Sekuen spesifik gen *housekeeping* yang dipilih pada penelitian ini adalah 18S rRNA, β aktin, dan EF1 α , dikarenakan pada saat dilakukan uji homologi BLAST pada laman NCBI, sekuen gen Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) tidak homolog dengan gen target pada ikan sidat maupun pada spesies ikan yang berkerabat dekat dengan ikan sidat.

Sekuen spesifik yang telah didapatkan oleh Yulianti (2019) akan didesain kembali untuk RT-PCR menggunakan metode yang dilakukan oleh Thornton &

Basu (2011). Terdapat beberapa kriteria dalam mendesain primer agar primer yang dihasilkan dapat mengamplifikasi DNA/RNA target dengan baik, yaitu: Panjang optimal primer yang dapat diterima berukuran 18-24 bp. Primer dengan ukuran lebih panjang akan memperlambat proses PCR, karena membutuhkan waktu lebih lama. *Melting Temperature* (T_m) yang optimal untuk *Real Time* PCR adalah 55-64°C dan tidak lebih dari 68°C. Sementara nilai T_a (*Annealing Temperature*) yang optimal adalah 59°C atau 60°C. Nilai perbandingan antara T_m dan T_a tidak boleh lebih besar dari 5°C. Produk PCR dengan nilai T_m dan konten GC yang berukuran pendek lebih efisien diamplifikasikan pada suhu *annealing* (T_a) selama proses PCR, daripada produk yang berukuran panjang. Ukuran ampikon yang ideal berkisar antara 80-150 bp. Konten GC berkisar dari 40-60% dengan nilai ideal $\pm 50\%$. Nilai GC *clamp* tidak boleh lebih dari 2. G dan C harus dalam 5 basis pada 3'akhir primer. Toleransi nilai ΔG *hairpin* tidak lebih negatif dari -3.5 kkal/mol. Toleransi nilai optimal ΔG *self dimer* dan *cross dimer* adalah -5 hingga -6 kkal/ mol. Jumlah maksimal run (pengulangan) yang diterima adalah 3-4 bp untuk menghindari mispriming, misalnya TAAAAGC. Pengulangan adalah urutan nukleotida (dinukleotida) yang diulang (mis. TCTCTCTCTC) harus dihindari, jumlah maksimum yang diterima adalah 4 di-nukleotida. Nilai maksimum untuk "setiap" komplementer (*hairpins or self primers*) adalah 2 dan *self 3' complementarity* adalah 0. Namun menurut Yulianti (2019) dan (Sasmito *et al*, 2014) nilai *self complementarity* dan *self 3' complementarity* masih dapat ditoleransi adalah 4.

Sekuen primer spesifik 18S Ribosomal RNA (18S rRNA), *beta Actin* (β aktin) dan *Elongation Factor 1-Alpha* (EF1 α) dari penelitian Yulianti (2019) digunakan untuk mendesain primer untuk RT-PCR sesuai dengan protokol (Thornton & Basu, 2011). Pada laman primer3 akan terlihat sekuen *forward & reverse*, letak start pos, panjang primer, ukuran ampikon, nilai T_m (°C), persentase GC, nilai *self complementarity* dan nilai *self 3' complementarity*.

Primer yang terpilih kemudian dicek struktur sekunder nya pada laman *Beacon Designer* (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Analysis.jsp>). Pada laman ini akan terlihat nilai *hairpins*, *self dimer*, *cross dimer*, GC *clamp persentase* GC, T_m (°C) dan panjang primer. Kemudian dilakukan uji homologi pada laman BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)

untuk mengetahui primer tersebut homolog pada ikan sidat (*Anguilla*) ataupun ikan pada *class* Actinopterygii yang berkerabat dekat dengan ikan sidat.

3. 5. 2 Pengujian Primer *Multiplex* Secara *In Silico*

Analisis *multiplex* pada perangkat lunak melakukan pemeriksaan pada ukuran produk, deltaG (ΔG) dan pembentukan primer *dimer*. Nilai tinggi atau rendah deltaG (ΔG) mempengaruhi suatu primer akan membentuk *dimer* atau tidak. Pasangan primer yang menunjukkan deltaG (ΔG) lebih negatif dari -6 kkal/mol cenderung membentuk dimer dan menghasilkan amplifikasi yang lemah (Lepais *et al.*, 2020). Struktur dimer terbagi menjadi 2 yaitu *self dimer* dan *cross dimer*. *Self dimer* merupakan primer yang berikatan dengan primer yang sejenis. Sementara *cross dimer* adalah primer yang berikatan dengan pasangan primer lain. Primer *dimer* adalah produk dari primer anneal yang tidak spesifik. Pembentukan *dimer* primer berlangsung saat proses PCR, adanya dimer pada primer membuat efisiensi amplifikasi PCR menurun atau rendah dan menyebabkan hasil dari PCR yang kurang baik. Hal tersebut dikarenakan persaingan antara dimer dan produk PCR selama pembentukan (Roche, 2020). Analisis *in silico* primer *multiplex* dilakukan dengan program *FastPCR* berdasarkan metode Kalendar *et al.* (2014). Primer yang telah dirancang dianalisis untuk mengetahui apakah primer teramplifikasi pada ikan sidat. Sekuen genome ikan sidat yang didapat pada laman NCBI digunakan sebagai kontrol positif.

3. 5. 3 Isolasi mRNA Total dari Organ

Ikan sidat dibedah dan diambil organnya: hati, ginjal dan usus. Organ segera dimasukkan kedalam 1 ml larutan RNA *later*. Lalu simpan pada suhu 4°C selama 24 jam sebelum disimpan pada suhu -20°C . Tahapan ini tidak dilakukan dikarenakan adanya pandemi COVID-19 sehingga organ yang dipakai adalah organ ikan sidat yang telah diambil oleh Yulianti (2019). Organ ikan sidat yang berada di dalam *tube falcon* berisi 1 ml larutan RNA *later* digunakan dalam tahapan isolasi RNA.

Tahapan isolasi RNA dilakukan dengan metode Trizol peqGOLD TriFast™ berdasarkan metode yang dilakukan pada penelitian Chomezynski & Sacchi (1986) dan telah dimodifikasi (Kusumawaty, 2015; Endah, 2018). Sampel sebanyak 25 mg

dimasukkan ke dalam tabung 2 ml yang berisi 250 μ l trizol. Sampel dihancurkan dan dihomogenkan selama 6 x 10 detik menggunakan alat *homogenizer* yang telah dibersihkan menggunakan DEPC. Setelah homogen ditambahkan lagi 250 μ l trizol, kemudian didiamkan pada suhu ruangan selama 5 menit. Sampel ditambahkan kloroform sebanyak 100 μ l dan dikocok kuat selama 30-60 detik untuk memisahkan antara trizol dengan RNA pada sampel atau bisa juga menggunakan alat vortex, kemudian simpan di suhu ruang selama 3 menit. Sebelum disentrifugasi sampel disimpan terlebih dahulu di dalam *coolbox* selama 15 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 20 menit. *Supernatant* sebanyak \pm 200 μ l dipindahkan ke tabung 1.5 ml yang baru dan steril lalu ditambahkan isopropanol sebanyak \pm 200 μ l dengan perbandingan 1:1 dan dihomogenkan menggunakan tangan membentuk angka 8 lalu disimpan pada suhu ruang selama 10 menit. Lalu simpan di dalam *coolbox* selama 15 menit. Sentrifugasi kembali dengan kecepatan 10000 rpm selama 20 menit, *supernatant* dibuang dan tersisa pelet. Pada tabung yang berisi pelet ditambahkan alkohol 70% sebanyak 1 mL, disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. *Supernatant* dibuang dan pelet dikeringkan menggunakan tisu steril selama 15-30 menit. Setelah kering pelet dilarutkan menggunakan DEPC sebanyak 20-30 μ l. mRNA langsung diuji kualitatif dan kuantitatif dikarenakan laboratorium riset tidak memiliki lemari pendingin -80°C .

3. 5. 4 Uji Kualitatif dan Kuantitatif mRNA Total

Uji kualitatif kualitas mRNA dilakukan menggunakan alat elektroforesis. Pembuatan gel agarose 1% dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,3 gram agarose lalu dimasukkan kedalam botol duran yang berisi 30 mL 2x buffer TAE. Kemudian panaskan dengan microwave selama 1 menit. Diamkan sampai hangat-hangat kuku lalu tambahkan larutan *peggreen* 1 μ l, dihomogenkan dan tuangkan ke alam tray. Kemudian pasang *well-forming combs*, setelah mengeras lepas *well-forming combs* secara perlahan. Tempatkan gel agarose pada tank elektroforesis, kemudian larutan 2x buffer TAE dimasukkan hingga menutupi permukaan gel agarose. Pada plat tetes dimasukkan sampel sebanyak 4 μ l, *loading dye* 1 μ l, dan formamide 1 μ l lalu dihomogenisasi. Sampel yang telah homogen dengan *loading dye* dan formamide dimasukkan ke dalam sumur gel agarose, lalu masukkan marker

ladder sebanyak 3 µl. Kemudian *running* selama 30 menit pada tegangan 50 voltase. Setelah selesai hasil diamati menggunakan alat *UV-Transilluminator* (Endah, 2018).

Uji kuantitatif kemurnian RNA menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis (*Milton Roy Spectronic*). Pertama siapkan tabung 1,5 mL yang berisi 495 ddH₂O, kemudian ditambahkan 5 µl sampel RNA dan dihomogenisasi menggunakan vortex (pengenceran 100x). Siapkan *cuvette*, bilas dengan DEPC untuk menghindari kontaminasi RNase, lalu keringkan dengan kertas lensa. Larutan sampel dimasukkan ke dalam *cuvette*. *Cuvette* dimasukkan ke *compartment* dalam alat spektrofotometer. Lalu tekan *measure sample* pada alat, dan hasil absorbansi rasio akan muncul (Endah, 2018). Tingkat kemurnian RNA berbanding lurus dengan nilai absorbansi dan berkorelasi positif, apabila nilai rasio absorbansi 1.8-2.0, maka sampel tidak terkontaminasi dan memiliki nilai kemurnian yang baik. Konsentrasi RNA diukur pada panjang gelombang 260 nm. Nilai absorbansi merupakan nilai yang diukur menggunakan panjang gelombang 260 nm, sehingga nilai absorbansi merupakan acuan banyaknya RNA pada suatu sampel (Nurhayati & Darmawati, 2017). Pengukuran konsentrasi RNA dapat dihitung menggunakan rumus berikut, yaitu:

$$[\text{RNA}] = \text{Å}260 \times 40 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

Å260: Nilai absorbansi pada λ 260 nm

40 : larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 40 µg RNA per mL

3. 5. 5 Sintesis cDNA

Sintesis komplementer DNA (cDNA) dilakukan sesuai dengan prosedur dari *KIT* Thermoscientific (Thermofisher, USA). RNA sebanyak 1 µg (maksimum dalam 10 µl) dimasukkan ke dalam tabung 0.2 mL bebas RNase yang berisi campuran dari 2 µl primer dT18, 5µl buffer, 1 µl *Ribolock*, 2 µl 10 mM dNTPs, 1 µl enzim MuLV (200U/µl) dan air ddH₂O yang bebas RNase hingga volume total reaksi adalah 20 µl. Kemudian tabung di inkubasi menggunakan alat PCR pada suhu 42°C selama 60 menit dan dilanjutkan pada suhu 70°C selama 5 menit. Hasil sintesis cDNA disimpan pada suhu -20°C (Kusumawaty, 2015).

Komplementer DNA (cDNA) dianalisis kualitatif dengan elektroforesis gel agarose, pita harus terbentuk dua yaitu pita 28S dan 18S, pita 28S harus dua kali

lipat lebih kuat daripada 18S. Analisis kuantitatif dilakukan menggunakan spektrofotometer, nilai absorbansi $\lambda 260/\lambda 280$ yang dapat diterima yaitu berkisar 1.9-2.0 (Peterson & Freeman, 2009).

3. 5. 6 Optimasi Primer *Multiplex*

Amplifikasi *multiplex* PCR dijalankan menggunakan 10-15 ng *template* cDNA dalam volume total 25 μL yang mengandung buffer PCR (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 320 nmol dari masing-masing primer, 100 nmol dari setiap dNTP, 2,5 mM MgCl_2 , dan 0,6 unit *AmpliTaq Gold* (*Applied Biosystems*). Kondisi siklus PCR adalah sebagai berikut: langkah denaturasi awal pada 95°C selama 5 menit dan kemudian 20 siklus denaturasi pada 95°C (30 detik), suhu *annealing* (T_a) yang digunakan sesuai primer yang didesain, dan ekstensi pada 72°C (20 detik), dengan perpanjangan akhir 7 menit pada 72°C. Pada putaran kedua, *Taq polimerase* tambahan ditambahkan dengan tujuan untuk menggunakan primer yang tersisa sepenuhnya. Campuran PCR dari volume akhir 5 atau 10 μL terdiri dari 2,5 atau 5 μL dari kit *Qiagen Multiplex*, 1,5 atau 3 μL amplicon murni dan 1 atau 2 air ddH₂O. Siklus PCR identik seperti di babak pertama. Babak ketiga adalah pengindeksan PCR (Trotta *et al*, 2005; Lepais *et al.*, 2020). Primer spesifik dirancang untuk menghasilkan amplicon tunggal dengan ukuran berbeda untuk diidentifikasi setelah migrasi elektroforesis. Produk amplifikasi PCR (5 μL) dianalisis dengan pemisahan elektroforesis dalam gel agarose 1,5% yang diwarnai dengan etidium bromida dalam buffer TAE. Selanjutnya dilakukan running menggunakan alat elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 100 V. Hasil yang didapatkan kemudian dilihat di sinar UV (Tris, asam asetat, EDTA, pH 8) (Trotta *et al*, 2005).

3. 5. 7 Real Time PCR

Sistem deteksi *sekuens* ABI PRISM 7000 (*Applied Biosystems*) digunakan untuk RT-PCR, menggunakan primer yang telah didesain. Deteksi fluoresens amplicon digunakan *Master Mix SYBR Green PCR* (*Applied Biosystems*). Kondisi PCR yang digunakan untuk semua RT-PCR adalah: pre inkubasi 2 menit pada 50°C, inkubasi 10 menit pada 95°C, dan diikuti 40 siklus 15 menit pada 95°C dan 1 menit pada 63°C. Sinyal fluoresens diukur satu kali dalam setiap siklus di akhir langkah ekstensi. Setelah amplifikasi PCR, dilakukan analisis kurva T_m . Produk PCR

duplex didinginkan hingga 60°C dan kemudian dipanaskan hingga 90°C pada laju 0,2°C/s. Puncak T_m produk dihitung untuk 10 atau lebih pengujian pada sampel yang berbeda untuk masing-masing spesies dan didasarkan pada kurva fluoresens awal (F/T) dengan memplot turunan negatif dari fluoresens pada suhu versus suhu ($-dF/dT$ versus T). Analisis kurva lebur setiap qPCR dilakukan setelah setiap siklus selesai (Trotta *et al.*, 2005; Sinha *et al.*, 2015)..

Pada akhir reaksi, sinyal fluoresens, terus menerus dipantau selama gradien pemanasan lambat, menghasilkan kurva dengan puncak tajam dalam plot turunan negatif ganda sesuai dengan suhu denaturasi ampikon (*melting temperature*, T_m). Analisis T_m (*melting temperature*) dari fragmen yang diamplifikasi pada setiap sampel dijadikan acuan hasil RT-PCR. Validasi spesifisitas PCR real-time, produk amplifikasi diperiksa oleh elektroforesis gel agarose dan analisis kurva disosiasi (Trotta *et al.*, 2015). Kurva standar diturunkan dari nilai E dengan rumus $E = 10^{-1/\text{slope}}$. Nilai efisiensi rata-rata diperoleh untuk setiap sampel jaringan dan digunakan untuk menyesuaikan nilai siklus kuantitatif (C_t) untuk analisis lebih lanjut (Mahanty *et al.*, 2017). Signifikansi statistik tingkat ekspresi gen pada jaringan yang berbeda ditentukan dengan analisis varian satu arah (ANOVA) diikuti dengan uji HSD Tukey. Tingkat perbedaan yang signifikan secara statistik ditetapkan pada nilai $P > 0.05$. Stabilitas nilai C_t dapat dianalisis dengan beberapa metode yaitu metode komparatif ($\Delta\Delta C_t$), Bestkeeper, GeNorm, dan NormFinder. Stabilitas nilai C_t pada penelitian ini dianalisis menggunakan metode komparatif ($\Delta\Delta C_t$). Hal tersebut dikarenakan metode C_t komparatif ($\Delta\Delta C_t$) banyak digunakan pada beberapa penelitian dan telah disitasi sebanyak 112.078 (Livak & Schmittge, 2001). Nilai rata-rata C_t yang telah diubah dengan rumus menjadi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ digunakan sebagai indikator gen yang paling stabil dalam mengekspresikan gen target. Nilai $\Delta\Delta C_t$ yang paling rendah menunjukkan hasil gen referensi yang paling stabil.

3.5 Analisis Data

3.6.1 Analisis *In Silico* Primer Multiplex

Analisis primer *multiplex* secara *in silico* menggunakan aplikasi *FastPCR*. Pada aplikasi ini akan menunjukkan nilai T_a (*Annealing Temperature*), nilai ΔG ,

terbentuk atau tidaknya *dimer* (*self dimer* atau *cross dimer*) dan terbentuk atau tidak amplicon gen spesifik (Kalendar *et al.*, 2014).

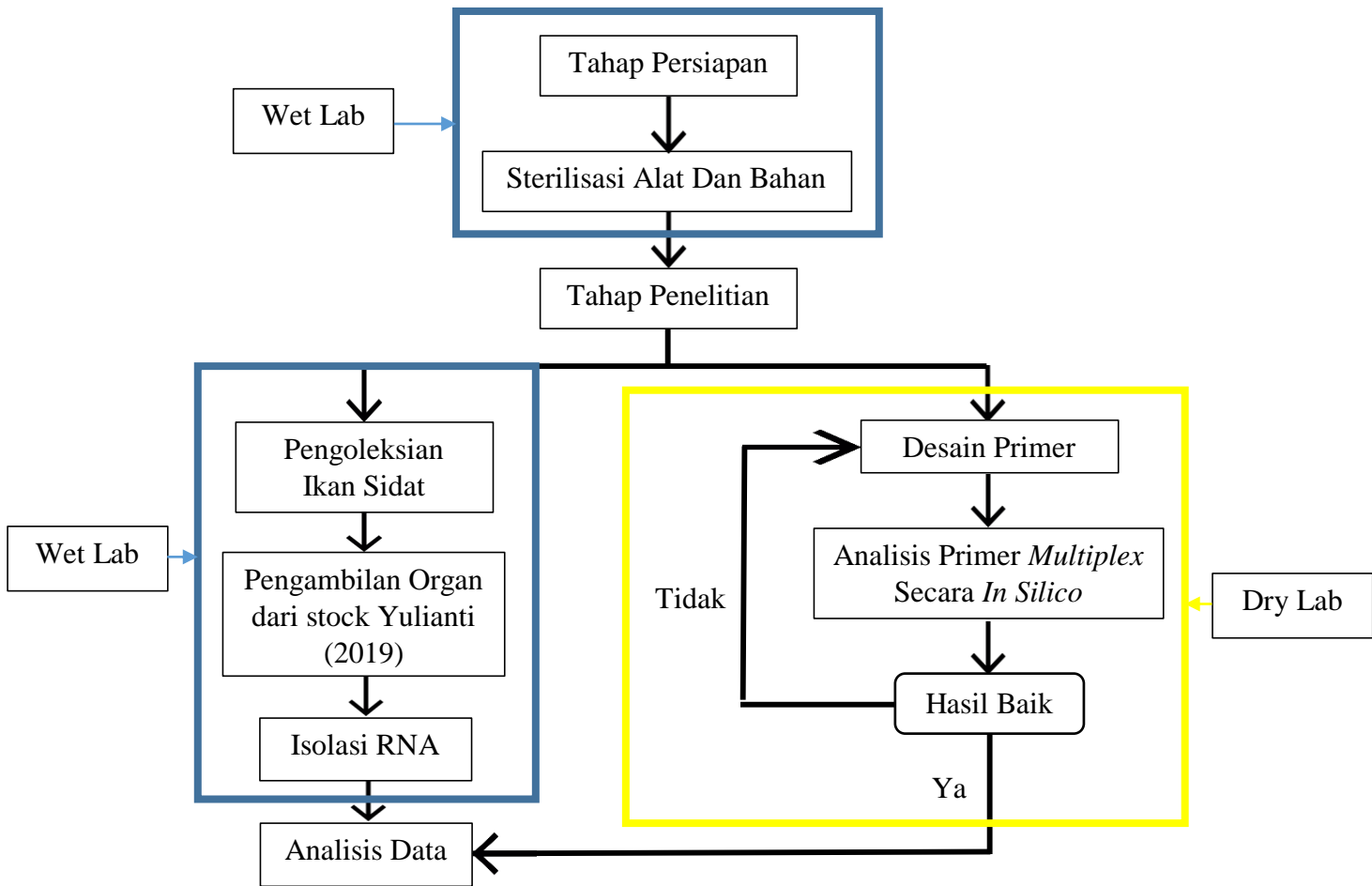
3.6.2 Studi Pustaka Seleksi Gen *Housekeeping* dengan Metode *Real Time PCR*

Analisis data dilakukan dengan cara kajian literatur yaitu membandingkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya kemudian dijadikan data hasil. Beberapa penelitian dipilih berdasarkan gen *housekeeping* dan jaringan yang juga digunakan pada penelitian ini. Gen yang digunakan yaitu 18S rRNA, β aktin dan EF1 α . Jaringan yang digunakan adalah hati, ginjal dan usus.

3.6 Alur Penelitian

Tahapan pada penelitian terbagi menjadi dua tahap yaitu tahap persiapan dan tahap penelitian. Tahap penelitian dibagi lagi menjadi dua, yaitu pengerjaan pada *dry lab* dan *wet lab*. *Dry lab* adalah penelitian dilakukan secara *in silico* melalui komputer, sedangkan *wet lab* adalah penelitian yang dilakukan secara *in vitro* di laboratorium. Penelitian *wet lab* tidak dapat dilakukan di laboratorium sebagaimana mestinya. Penelitian menjadi terbatas hanya dapat dilakukan sampai tahap isolasi RNA. Penelitian *dry lab* pun hanya dapat dilakukan sampai tahap analisis *in silico*, dikarenakan kendala pada saat pengiriman primer ke Macrogen, Inc. Korea Selatan. Hal tersebut terjadi akibat pandemi COVID-19 yang melanda seluruh dunia pada awal tahun 2020 dan adanya Pembatasan Sosial Berskala Besar (PSBB) di Indonesia sehingga perkantoran, sekolah dan universitas ditutup atau diliburkan untuk sementara waktu.

Tahap persiapan dilakukan sterilisasi alat dan pembuatan larutan stok. Kemudian pada tahap penelitian secara *wet lab* dilakukan isolasi RNA dan uji RNA secara kualitatif & kuantitatif. Pengerjaan secara *dry lab* dilakukan perancangan primer Real Time PCR, analisis primer *multiplex* secara *in silico*. Keseluruhan tahapan pada penelitian yang telah diuraikan tersebut ditunjukkan pada Gambar 3.1



Gambar 3.1. Bagan Alur Penelitian