

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang “Pengaruh Suhu *Annealing* pada Program PCR terhadap Keberhasilan Amplifikasi DNA Udang Jari (*Metapenaeus elegans*) Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah”, merupakan penelitian eksperimental dengan 5 sampel dari 5 individu Udang Jari (*Metapenaeus elegans*). Percobaan yang dilakukan dirancang perlakuan suhu *annealing* yang berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) dengan primer DNA yang digunakan adalah primer spesifik COIL *reverse* dengan untai (5' TCG AGG TAT TCC ATT AAG TA 3') dan COIH *forward* dengan untai (5' ATA TTA GCC ATT GGT GTC TTA 3').

3.2 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas: perlakuan suhu *annealing* yang berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C)
2. Variabel terikat: pita/band genom (bp) *Metapenaeus elegans* dari hasil ekstraksi dan amplifikasi PCR dengan menggunakan elektroforesis, kadar DNA genom (μg) udang jari hasil isolasi DNA yang diukur dengan spektrofotometer
3. Variabel terkontrol adalah spesimen udang jari (*Metapenaeus elegans*) di Laguna Segara Anakan, Cilacap, Jawa Tengah.

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2014. Penelitian bertempat di Laboratorium Genetika Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Sampel

Sampel yang dipakai dalam penelitian ini adalah udang jari (*Metapenaeus elegans*) yang diperoleh dari Segara Anakan, bagian ekor dan kaki jalan (*pleopod*) diambil untuk kemudian diisolasi DNANYa.

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *vortex mixer*, sentrifuge, mikropipet BioRad (1000 ul, 200 ul, 10 ul), mikrotube PCR, sarung tangan, tube ependorf volume 1,5 ml dan 2 ml, alat elektroforesis BioRad, UV transiluminator BioRad, spektrofotometer BioRad dan PCR BioRad konvensional.

3.5.2 Bahan

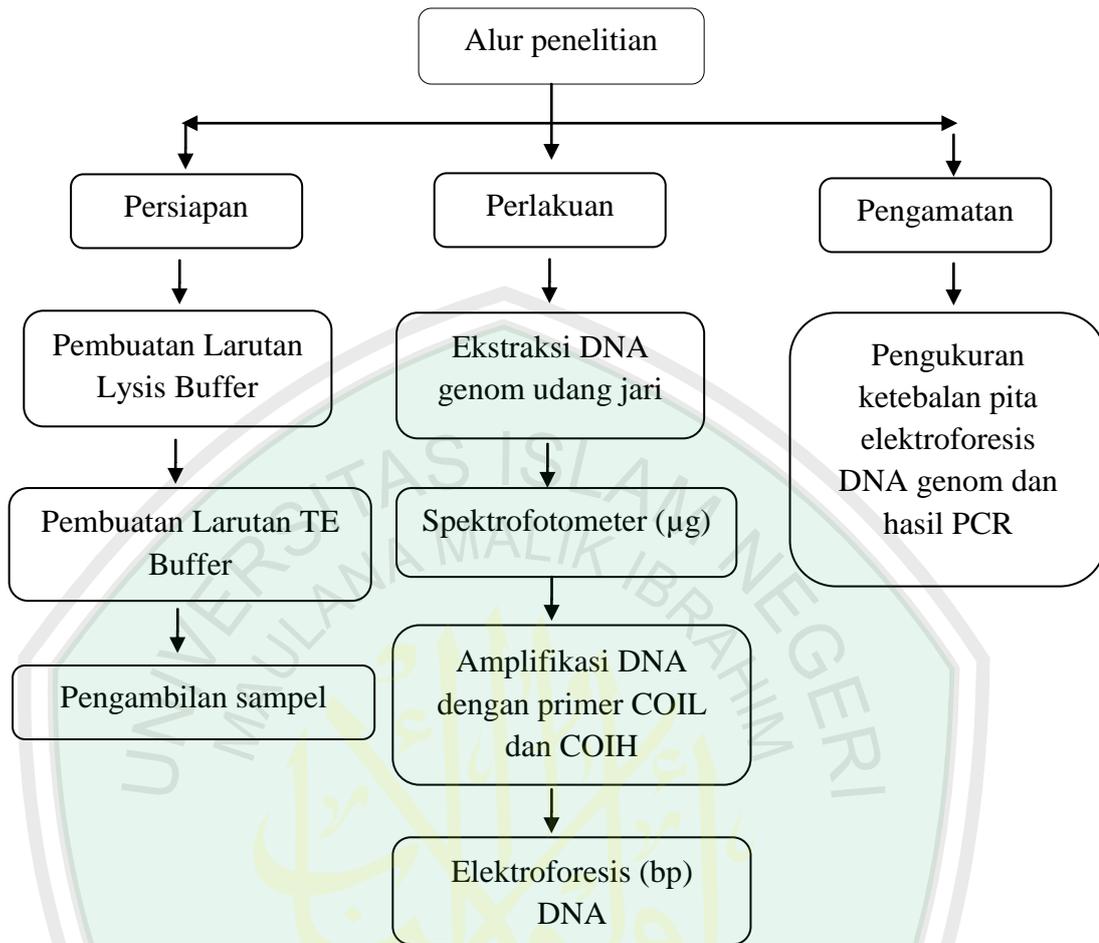
Bahan-bahan yang digunakan adalah spesimen udang jari (*Metapenaeus elegans*) bagian ekor dan kaki jalan (*pleopod*), larutan EDTA (etilen diamin trichloro asetat), *Nuclei Lysis Solution*, larutan Proteinase-K, isopropanol, ethanol 70%, TE buffer, DNA Rehydration Solution, enzim *Taq polymerase*, larutan TBE (TrisBoratEDTA) 1x, gel agarose 0,8%, primer *forward* COIH (5') TCG AGG TAT TCC ATT AAG TA yang memiliki *melting temperature* 48,8⁰C dan *reverse* COIL (5') ATA TTA GCC ATT GGT GTC TAA yang memiliki *melting temperature* 47,4⁰C.

3.6 Prosedur Penelitian

Penelitian yang dilakukan meliputi 3 tahap, yaitu:

1. Tahap persiapan, yaitu tahap yang meliputi pembuatan larutan-larutan ekstraksi DNA (Lysis solution), dan pengambilan sampel udang jari (*Metapenaeus elegans*) bagian ekor dan kaki jalan (*pleopod*) di Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah.
2. Tahap pelaksanaan, yaitu tahap yang meliputi tahap ekstraksi DNA, amplifikasi DNA dengan perlakuan suhu *annealing* yang berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) dan menggunakan primer COIL dan COIH, uji kualitatif elektroforesis, uji kuantitatif spektrofotometer.
3. Tahap pengambilan data, yaitu tahap yang meliputi pengukuran pita/band genom (bp) *Metapenaeus elegans* dari hasil ekstraksi dan amplifikasi PCR dengan menggunakan elektroforesis, kadar DNA genom (μg) udang jari hasil isolasi DNA yang diukur dengan spektrofotometer.

3.7 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Operasional Penelitian

3.7.1 Ekstraksi DNA

Sumber sel yang digunakan untuk ekstraksi DNA adalah bagian ekor dan kaki jalan (*pleopod*) dari udang jari dengan masing-masing sampel yang digunakan sebanyak 20-25 mg dengan menggunakan metode lysis solution yang telah dikembangkan pada udang vannamei (Tamayo, 2006). Ekstraksi DNA terdiri dari beberapa tahap yaitu penghancuran sel, tahap eliminasi RNA, tahap pengendapan DNA, dan tahap hidrasi DNA.

Sampel organ diambil sebanyak 20-25 mg per sampel, kemudian dimasukkan ke dalam tube ependof 1,5 ml yang sudah berisi 300 µl larutan TE buffer untuk menghilangkan etanol dan dibuang kembali TE buffer. Selanjutnya

sampel ditambahkan 8µl proteinase-K, lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,5 dan 4 M Urea), 20% SDS lalu diinkubasi 50°C selama ±24 jam untuk mempercepat proses lisis sel.

Pada tahap eliminasi RNA selanjutnya larutan sel hasil inkubasi ditambah dengan 350 µl larutan NaCl kemudian sentrifus pada kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Setelah itu larutan supernatan (lapisan paling atas) diambil ±300 µl, kemudian dimasukkan ke dalam tube ependorf 2 ml yang baru dan ditambah 1ml isopropanol kembali disentrifus.

Tahap selanjutnya yaitu tahap pengendapan DNA. Supernatan yang diperoleh ditambahkan 250 µl ethanol 70% dingin. Selanjutnya tube ependorf yang berisi larutan sampel disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 10 menit. Hal tersebut dilakukan sampai lapisan putih terlihat, lapisan tersebut adalah endapan DNA yang kemudian dikeringkan dengan membuang cairan dan selanjutnya dikeringkan dengan cara meletakkan di atas kertas hisap atau tisu di dalam suhu ruangan.

Setelah kering tambahkan 50-100µl buffer TE, kemudian disimpan genom pada suhu 2°C - 8°C (untuk penyimpanan jangka pendek) atau -70°C (untuk penyimpanan jangka panjang) sebelum dilakukan pengecekan hasil ekstraksi melalui elektroforesis pada gel Agarose 1% dan UV transiluminator.

3.7.2 Analisa PCR

Prinsip dasar analisa PCR adalah menggunakan reaksi berantai polimerase (PCR) dalam mengamplifikasi sekuens DNA dengan bantuan oligonukleotida tertentu sebagai primer. Suatu primer akan memberikan pita amplifikasi dan akan

digunakan untuk mengamplifikasi seluruh genom udang jari. Primer yang digunakan pada penelitian ini adalah primer COIL dan COIH.

Sekuens DNA dari udang jari diamplifikasi mengikuti protokol PCR yang mengacu pada Nugroho (1997) dengan sedikit modifikasi. Komposisi reaksi PCR dalam satu mikrotube PCR antara lain 7,5 Master Mix; DNA genom 1,0 µl; 1,5 µl primer COIL, 1,5 µl primer COIH, dan ddH₂O sampai 15 µl. Jumlah komponen dapat diubah-ubah tergantung pada keperluan analisa.

Reaksi amplifikasi pada mesin PCR berlangsung sebanyak 35 siklus setelah pra-PCR selama 5 menit pada suhu 94°C. Masing-masing siklus terdiri dari : 1 menit dengan suhu 94°C untuk denaturasi, 1 menit dengan beberapa suhu (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) untuk penempelan DNA (*annealing*), dan 1 menit pada suhu 72°C untuk pemanjangan fragmen DNA (*ekstensi*). Reaksi amplifikasi diakhiri dengan pasca PCR selama 10 menit dengan suhu 72°C dan normalisasi pada suhu 4°C selama 5 menit.

3.7.3 Pengukuran Kuantitas DNA dengan Spektrofotometer

Prinsip kerja dari spektrofotometer adalah radiasi sinar ultra violet yang diserap oleh nukleotida dalam larutan. Penyerapan sinar tersebut oleh nukleotida secara maksimal dicapai pada gelombang 260 nm. Kemurnian DNA ditentukan oleh tingkat kontaminasi protein dalam larutan. Kemurnian larutan DNA dapat dilihat dengan membagi nilai A₂₆₀ dengan A₂₈₀. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8-2,0. Jika nilai rasio lebih kecil dari 1,8 maka diindikasikan masih ada kontaminasi protein atau phenol di dalam larutan (Fatchiyah, 2011).

Pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometer dilakukan dengan mengambil sampel DNA yang akan diukur konsentrasinya sebanyak 1 μl , masukkan ke dalam tube eppendorf 1,5 ml. Kemudian ditambahkan 49 μl *buffer* TE. Vortex hingga homogen dan sentrifus dengan kecepatan rendah. Hidupkan alat spektrofotometer. Pilih **analysis mode** dari main window dan **klik DNA** (application progame). Setelah itu, letakkan cuvet yang telah berisi *buffer* TE sebanyak 50 μl pada tempat cuvet (*cuvette compartement*) dalam spektrofotometer dan **klik Blank**. Spektrofotometer siap digunakan untuk mengukur konsentrasi sampel DNA.

Masukkan larutan sampel DNA yang telah diencerkan ke dalam cuvet. Kemudian letakkan cuvet yang berisi sampel DNA tersebut pada tempat cuvet (*cuvette compartement*) dalam spektrofotometer. **Klik Reading Sample**, maka akan keluar data A260, A280 dan ratio A260/A280.

3.7.4 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu metode untuk memisahkan fraksi suatu zat berdasarkan migrasi partikel bermuatan atau ion-ion makromolekul di bawah pengaruh medan listrik dengan media *gel Agarose*. Sekuens DNA hasil amplifikasi merupakan partikel bermuatan negatif yang dapat dipisahkan melalui elektroforesis pada *gel Agarose*. *Gel Agarose* merupakan campuran dari larutan TBE 1x, bubuk *Agarose*, dan larutan ethidium bromida yang kemudian dituangkan ke dalam cetakan yang berlubang.

Gel Agarose (0,8%) kemudian diletakan pada alat elektroforesis (*Bio-Rad*), kemudian tambahkan larutan TBE 1x pada alat elektroforesis sampai tanda batas atau sampai *gel* tenggelam. Sekuen DNA ditambahkan larutan Loading Dye

(50 mM EDTA, 30% Glycerol, 0,25% bromophenol biru, dan 0,25% xylene cyanol) kemudian dimasukkan ke dalam cetakan sumuran pada gel. Elektroforesis berlangsung selama 100 menit pada tegangan 40 volt untuk mengetahui hasil ekstraksi dan 60 menit pada tegangan 50 volt untuk mengetahui hasil PCR, suhu ruang. Selanjutnya gel *Agarose* dideteksi dengan UV transiluminator.

3.8 Analisa Data

Jenis data yang didapatkan dalam penelitian ini adalah data deskriptif dengan cara membandingkan hasil elektroforesis pada setiap perlakuan :

1. Kadar DNA genom (μg) *Metapenaeus elegans* hasil ekstraksi DNA yang didapat dari pengukuran dengan spektrofotometer pada rasio absorbansi 260 nm dan 280 nm.
2. Pita/band DNA genom (bp) *Metapenaeus elegans* hasil ekstraksi DNA yang didapat dari elektroforesis gel agarose 0,8% dan divisualisasikan dengan UV transiluminator.
3. Pita/band (bp) *Metapenaeus elegans* hasil amplifikasi PCR dengan perlakuan suhu *annealing* yang berbeda (41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C) dengan jumlah siklus 35 siklus dengan menggunakan primer COIL dan COIH.