

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan 7 sampel dari 7 individu udang Jari yang diambil dari Segara Anakan Kabupaten Cilacap Jawa Tengah. Analisis molekuler dilakukan terhadap DNA mitokondria menggunakan metode RFLP dengan enzim restriksi *Hind* III.

#### **3.2 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni – September 2014. Sampel udang Jari diambil di laguna Segara Anakan, Kabupaten Cilacap Provinsi Jawa Tengah. Analisis molekuler akan dilakukan di laboratorium Genetika dan Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

#### **3.3 Variabel Penelitian**

Variabel dari penelitian ini yaitu:

1. Variabel bebas: enzim restriksi *Hind* III.
2. Variabel terikat: pola pemotongan oleh enzim restriksi *Hind* III terhadap DNA mitokondria.
3. Variabel terkontrol: spesimen udang Jari di Segara Anakan Kabupaten Cilacap Jawa Tengah.

### 3.4 Alat dan Bahan

#### 3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: *vortex*, *hot plate and stirer*, *centrifuge*, *microtube*, *micropastle*, sarung tangan, masker, tabung ependorf 1,5 ml, tabung PCR, alat elektroforesis, UV transiluminator, spektrofotometer, mesin PCR, dan *freezer*.

#### 3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spesimen udang Jari bagian ekor dan kaki jalan, alkohol 70%, larutan *lysis buffer* (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 7.5, 0,5% SDS, 4 M urea), *TE buffer*, larutan NaCl, isopropanol, etanol 70%, PCR mix, TBE buffer 1x, gel agarose 0,8%-2%, *aquabides*, *loading dye*, *ethidium bromide*, primer COIL dan COIH dan enzim restriksi *Hind III*.

### 3.5 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam 4 tahapan, yaitu:

1. Tahap persiapan, yaitu tahap yang meliputi pengambilan sampel udang Jari di Segara Anakan, pembuatan larutan ekstraksi, dan penyiapan alat dan bahan untuk amplifikasi PCR dan elektroforesis.
2. Tahap pelaksanaan, yaitu tahap yang meliputi isolasi DNA, pengukuran kuantitas DNA genom dengan spektrofotometer, pengukuran kualitas

DNA genom dengan elektroforesis, amplifikasi DNA mitokondria dengan PCR, dan pemotongan DNA target dengan enzim restriksi *Hind* III.

3. Tahap pengambilan data, yaitu meliputi konsentrasi DNA genom hasil isolasi ( $\mu\text{g/ml}$ ), kemurnian DNA genom hasil isolasi (A260/A280), ukuran DNA genom hasil isolasi (bp), ukuran DNA mitokondria hasil amplifikasi dengan PCR (bp), ukuran DNA mitokondria hasil pemotongan enzim restriksi (bp) dan tipe haplotipe DNA mitokondria hasil pemotongan enzim restriksi *Hind* III (tipe A, tipe B, tipe C dan seterusnya).

### 3.5.1 Isolasi DNA

Sumber DNA pada udang Jari adalah bagian ekor dan kaki jalan dan ekor seberat 20-25 mg. Isolasi DNA menggunakan metode yang digunakan oleh Tamayo (2006) untuk udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang dimodifikasi.

Sampel organ kaki jalan dan ekor diambil seberat 20-25 mg dimasukkan dalam tabung eppendorf, lalu ditambahkan nitrogen cair untuk penggerusan sampel agar dapat hancur. Ditambahkan dengan 300  $\mu\text{L}$  TE buffer untuk menghilangkan etanol. Dibuang kembali TE buffer, dan ditambahkan 650  $\mu\text{L}$  *lysis buffer*, 8  $\mu\text{L}$  Proteinase K dan 30  $\mu\text{L}$  SDS 20% (1 sampel) dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  selama 14 -16 jam.

Selanjutnya ditambahkan 350  $\mu\text{L}$  larutan NaCl, divortex selama 10 menit. Sampel disentrifus pada 12.000 rpm selama 10 menit. Diambil supernatan dan dipindahkan ke tabung eppendorf 2 ml yang baru. Ditambahkan 1 mL isopropanol pada setiap tabung eppendorf 2 ml, dicampurkan dan disentrifus pada 12.000 rpm

selama 10 menit. Dibuang supernatan dan ditambahkan 250 uL etanol 70% ke dalam tabung berisi pelet, lalu disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Dibuang etanol serta dikeringkan pelet DNA. Dilarutkan pelet dengan 50 ul TE buffer. Kemudian diencerkan sesuai konsentrasi yang diperlukan untuk langkah amplifikasi dengan mesin PCR. Terakhir, disimpan pada suhu 4<sup>0</sup> C atau -70<sup>0</sup> C.

### **3.5.2 Pengukuran Kuantitas DNA dengan Spektrofotometer**

Prinsip kerja spektrofotometer adalah iradiasi sinar UV yang diserap oleh nukleotida dalam larutan. Kemurnian DNA dilihat dengan membagi nilai OD260 dengan OD280. DNA isolat dikatakan murni jika rasio kedua OD tersebut berkisar antara 1,8-2,0. Jika nilai rasio <1,8 atau >2,0 maka isolat DNA tidak murni dan kemungkinan mengandung kontaminasi berupa larutan fenol, protein, ataupun jumlah DNA terlarut sangat sedikit.

Pertama, pengukuran dilakukan dengan 500 µl aquades pada tabung cuvet. Alat spektrofotometer dihidupkan, ditekan tombol DNA/RNA, kemudian ditekan tombol ENTER dan pilih OK. Kemudian, cuvet diletakkan di dalam spektrofotometer dan ditekan tombol READ BLANK. Jika, hasil pembacaan 0,00 maka cuvet dapat digunakan, jika tidak maka masih terdapat kontaminasi pada cuvet dan harus dibersihkan terlebih dahulu. Dibuang kembali aquades didalam cuvet.

Kedua, pengukuran kemurnian DNA dengan mencampurkan 2 µl DNA dengan 400 µl aquades kedalam tabung cuvet. Dimasukkan kedalam alat

spektrofotometer dan ditekan tombol READ SAMPLE. Dicatat data konsentrasi dan juga kemurnian hasil pengukuran..

### 3.5.3 Amplifikasi DNA Mitokondria

Urutan DNA mitokondria target diamplifikasi menggunakan metode Jackson dan Bert (2004) yang dimodifikasi. Komposisi reaksi PCR dalam 1 tabung PCR yaitu; 7,5 µl PCR mix (Intron), 1 µl DNA isolat, 1,5 µl primer COIL, 1,5 µl primer COIH dan ditambahkan ddH<sub>2</sub>O hingga volume total 1 tabung PCR 15 µl.

Reaksi amplifikasi pada mesin PCR dibagi menjadi 3 tahapan; *pertama*, 1 siklus predenaturasi pada suhu 94° C selama 3 menit. *Kedua*, dilanjutkan 35 siklus denaturasi pada suhu 94° C selama 20 detik, penempelan pada suhu 44° C selama 30 detik, pemanjangan pada suhu 72° C selama 90 detik. *Ketiga*, 1 siklus pemanjangan akhir pada suhu 72° C selama 7 menit. Kemudian, dipindahkan sampel ke dalam *freezer* -70<sup>0</sup> C atau 4<sup>0</sup> C.

DNA ampikon hasil PCR kemudian dielektroforesis. Jika hasil visualisasi DNA berkualitas bagus (pita DNA terlihat jelas, tidak membentuk *smear*), maka dilanjutkan pada tahap pemotongan DNA target oleh enzim restriksi *Hind* III. Jika tidak bagus (pita DNA tidak terlihat jelas, terdapat *smear*), maka hasil visualisasi dianalisis untuk diperbaiki pada tahapan yang belum sempurna.

Pemotongan dengan enzim restriksi *Hind* III dilakukan sesuai protokol yang disarankan pihak yang mengeluarkan produk enzim restriksi (Promega) Volume total 50 µl terdiri dari 40,75 µl ddH<sub>2</sub>O, 5 µl RE 10X buffer, 0,5 µl

Acetylated BSA 10µg/µl, 2,5 µl DNA 1µg/µl dan 1,25 µl enzim restriksi *HindIII* 10U/µl. Campuran tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 4 jam.

#### 3.5.4 Elektroforesis

Elektroforesis merupakan suatu metode pemisahan molekul bermuatan dengan menggunakan medan listrik (elektro) dan matriks penyangga berpori (foresis). Pemisahan molekul berdasarkan muatan, bentuk dan ukuran. DNA genom hasil isolat, DNA mitokondria hasil amplifikasi dan DNA mitokondria hasil pemotongan oleh enzim restriksi merupakan molekul yang bermuatan negatif, sehingga dapat dipisahkan dengan menggunakan metode elektroforesis.

Metode elektroforesis dilakukan dengan membuat gel agarose (TBE 1x dan agarose). Campuran tersebut dipanaskan diatas *hot plate and stirer* hingga mendidih. Kemudian dituangkan dalam cetakan elektroforesis, dipasang sisir dan diletakkan kedalam alat elektroforesis. Selanjutnya, TBE buffer dituangkan kedalam alat elektroforesis sampai tanda batas atau sampai gel agarose tenggelam. Gel agarose yang digunakan untuk DNA hasil isolasi adalah gel agarose 0,8%, untuk DNA hasil amplifikasi adalah 1% dan untuk hasil restriksi 2%.

Dicampurkan 3 µl DNA hasil isolasi dengan 1 µl *loading dye*, lalu dimasukkan ke dalam sumuran dan marker sebanyak 3 µl. Untuk DNA hasil amplifikasi dan restriksi dimasukkan 3 ul ke dalam sumuran gel elektroforesis.. *Running* untuk DNA hasil isolasi, amplifikasi ataupun restriksi diatur pada tegangan 60 V selama 70 menit.

Hasil elektroforesis kemudian dilihat dengan menggunakan alat UV transiluminator. Gel agarose direndam terlebih dahulu didalam *ethidium bromide* selama 15 menit. Kemudian gel agarose dimasukkan kedalam alat UV transiluminator. Dihidupkan alat UV transiluminator dan komputer, lalu dibuka program *gel doc* pada dekstop komputer. Ditekan tombol UV pada alat UV transiluminator. Disimpan gambar hasil pembacaan pada komputer untuk dianalisis.

### 3.5.5 Analisis Data

Jenis data yang didapatkan dari penelitian ini adalah data deskriptif yang meliputi:

1. Konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ) dan kemurnian ( $A_{260}/A_{280}$ ) DNA genom udang Jari hasil isolasi menggunakan alat spektrofotometer.
2. Ukuran DNA genom (bp) hasil isolasi.
3. Ukuran DNA mitokondria (bp) hasil amplifikasi menggunakan mesin PCR dengan primer COIL-COIH.
4. Ukuran DNA mitokondria (bp) hasil pemotongan menggunakan enzim restriksi *Hind* III.
5. Pola haplotipe DNA mitokondria oleh enzim restriksi *Hind* III (polimorfik atau monomorfik).