

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian tentang “Karakterisasi genetik Udang Jari (*Metapenaeus elegans* De Man, 1907) hasil tangkapan dari Laguna Segara Anakan berdasarkan haplotipe DNA mitokondria dengan menggunakan metode PCR-RFLP”, merupakan penelitian eksperimental dengan 7 sampel dari 7 individu Udang Jari (*Metapenaeus elegans*).

3.2 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini meliputi:

1. Variabel bebas: enzim restriksi endonuklease *Nla* III.
2. Variabel terikat: pola pemotongan band mtDNA hasil analisis dengan menggunakan metode PCR-RFLP.
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 Desember 2013 – April 2014. Penelitian bertempat di Laboratorium Genetika Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Populasi dan Sampel

Hewan uji yang dipakai adalah udang jari (*Metapenaeus elegans*) bagian ekor dan kaki jalan (*pleopod*). Untuk dianalisis dengan menggunakan metode PCR-RFLP sehingga dapat diketahui karakter genetik mtDNA udang jari (*Metapenaeus elegans*).

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *vortex mixer*, sentrifuge, mikropipet, mikrotube, *micropastle*, hand glove, masker, tube ependorf volume 1,5 ml, alat elektroforesis, UV transiluminator, spektrofotometer dan PCR *thermal cycler*.

3.5.2 Bahan

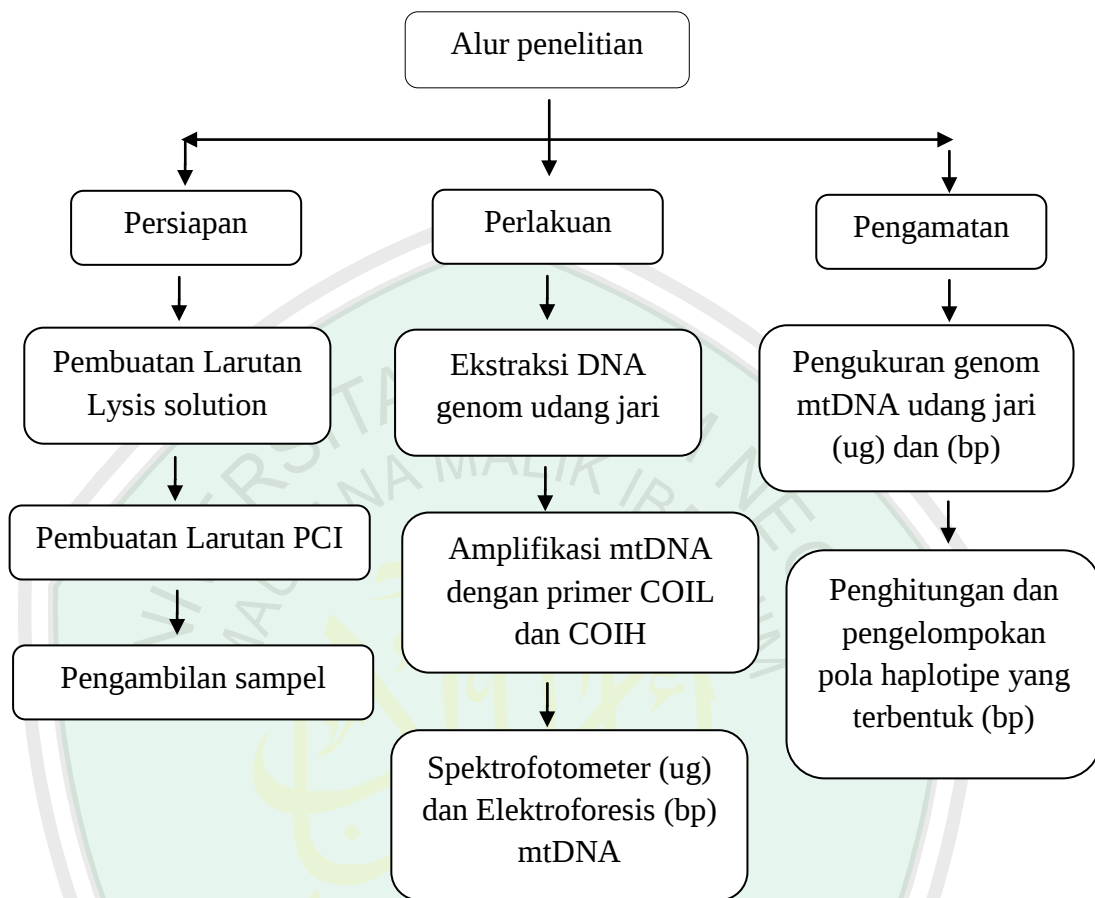
Bahan-bahan yang digunakan adalah spesimen udang jari (*Metapenaeus elegans*) bagian ekor dan kaki jalan (*pleopod*), larutan EDTA (etilen diamin trichloro asetat), larutan PCI (fenol:kloroform:isoamilalkohol; 25:24:1), *Nuclei Lysis Solution*, larutan Proteinase-K, Triton-X, ethanol absolute, aquabides (ddH₂O), PCR mix, larutan TBE (TrisBoratEDTA) 1x, gel agarose 0,8% - 2%, primer COIL dan COIH serta enzim restriksi endonuklease yang digunakan ialah *Nla* III.

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, Triton X, dan PCI), 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, spektrofotometer, elektroforesis gel agarose, amplifikasi PCR DNA dengan menggunakan primer COIL dan COIH, dan pemotongan mtDNA dengan menggunakan enzim restriksi *Nla III*.
3. Tahap pengambilan data, yaitu tahap yang meliputi kadar DNA genom (ug) udang jari hasil isolasi DNA yang diukur dengan spektrofotometer, pengukuran DNA total (bp) *M. elegans* dari hasil elektroforesis, ukuran mtDNA (bp) *M. elegans* dari hasil PCR, ukuran mtDNA (bp) *M. elegans* dari hasil pemotongan enzim restriksi *Nla III*, dan tipe haplotipe *M. elegans*.

3.7 Kerangka Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka 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 PCI (phenol:chloroform:isoamilalkohol) yang telah dikembangkan pada udang galah (Mandayasa, 2007) dengan sedikit modifikasi. Ekstraksi DNA terdiri dari beberapa tahap yaitu penghancuran sel, tahap eliminasi RNA, tahap pengendapan DNA, dan tahap hidrasi DNA.

Sampel organ kaki jalan dan ekor udang jari (*Metapenaeus elegans*) diambil sebanyak 20-25 mg per sampel, kemudian dimasukkan ke dalam tube ependrof 1,5 ml untuk digerus menggunakan *micropastle* sampai halus. Ekstrak kemudian diberi 700 µl larutan lisis yang mengandung 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,5, 0,5% SDS dan 4 M Urea. Selanjutnya sampel ditambahkan 5 µl proteinase-K dan 20 µl Triton-X kemudian disentrifus selama 10 detik dan diinkubasi pada suhu 37°C selama ±20 jam untuk mempercepat proses lisis sel.

Pada tahap eliminasi RNA larutan sel hasil inkubasi ditambah dengan 700 µl larutan PCI (fenol:kloroform:isoamilalkohol dengan perbandingan 25:24:1) lalu rotamix (dikocok) 20 rpm selama 10 menit agar menjadi homogen dan disentrifuge pada kecepatan 7000 rpm selama 10 menit. Setelah itu larutan supernatan (lapisan paling atas) diambil ±300 µl, kemudian dimasukkan ke dalam tube ependorf 1,5 ml yang baru.

Selanjutnya supernatan ditambahkan chlorofom/isoamil aklohol (24:1) sesuai dengan volume total supernatan kemudian dirotamix 20 rpm selama 10 menit lalu sentrifuge 7000 rpm selama 10 menit. Kemudian akan terbentuk kembali supernatan berupa benang-benang putih supernatan, lalu supernatan dimasukkan ke dalam tube *ependorf* 1,5 ml yang baru. Kegiatan ini dilakukan sebanyak tiga kali.

Tahap selanjutnya yaitu tahap pengendapan DNA. Supernatan yang diperoleh ditambahkan 1000 µl ethanol absolute dingin dan 100 µl larutan natrium asetat 3M. Selanjutnya tube ependorf yang berisi larutan sampel disentrifus

dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. 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 40 µl Aquabides, kemudian di vortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu disimpan genom pada suhu 2°C - 8°C sebelum dilakukan pengecekan hasil ekstraksi melalui elektroforesis pada gel Agarose 0,8% dan UV transiluminator.

3.7.2 Analisa PCR – mtDNA

Prinsip dasar analisa PCR-mtDNA 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. Sekuens mtDNA yang akan diamplifikasi pada penelitian ini adalah sekuens mitokondria. Primer yang digunakan pada penelitian ini adalah primer COIL dan COIH.

Sekuens mtDNA dari udang jari diamplifikasi mengikuti protokol PCR yang mengacu pada Nugroho (1997) dengan sedikit modifikasi. Komposisi reaksi PCR dalam satu mikrotube PCR antara lain, 2,75 µl PCR Mix, DNA genom 3,0 µl; 2 µl primer **COIL**, 2 µl primer **COIH**, , dan ddH₂O sampai 25 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 suhu 48°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.

Sekuens mtDNA yang diperoleh kemudian direstriksi menggunakan enzim endonuklease *Nla* III dengan mencampur 3,5 µl ddH₂O, 1 µl buffer enzim, 0,5 µl enzim restriksi dan 5 µl DNA *template* dalam tube *ependorf*. Campuran kemudian diinkubasi pada suhu aktivasi enzim 37°C selama ± 4 jam.

3.7.3 Pengukuran Kuantitas DNA dengan Spektrofotometer

Prinsip kerja dari spektrofotometer adalah iradiasi 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 OD₂₆₀ dengan OD₂₈₀. Molekul DNA dikatakan murni jika rasio kedua nilai tersebut berkisar antara 1,8 - 2,0 µg/µl. Jika nilai rasio lebih kecil dari 1,8 maka diindikasikan masih ada kontaminasi protein atau phenol di dalam larutan.

Pengukuran konsentrasi DNA dengan spektrofotometer dilakukan dengan mengambil sampel DNA yang akan diukur konsentrasinya sebanyak 2 µl, masukkan ke dalam tube *eppendorf* 1,5 ml. Kemudian ditambahkan 498 µl

aquabides. 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 aquabides sebanyak 500 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, A 280 dan ratio A260 dengan 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 mtDNA hasil restriksi 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* kemudian diletakan pada alat elektroforesis (*Bio-Rad*), kemudian tambahkan larutan TBE 1x pada alat elektroforesis sampai tanda batas atau sampai gel tenggelam. Sekuens mtDNA 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 ± 30 menit pada tegangan 100 volt, suhu ruang. Selanjutnya gel *Agarose* dideteksi dengan UV transiluminator.

3.8 Analisa Data

Jenis data yang didapatkan dalam penelitian ini adalah data deskriptif terkait:

1. Kadar DNA genom ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) *M. elegans* dari hasil metode ekstraksi DNA yang didapat dari pengukuran dengan spektrofotometer pada rasio absorpsi 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280}).
2. Ukuran DNA total (bp) *M. elegans* hasil ekstraksi DNA yang didapat dari elektroforesis gel agarose 0,8% dan divisualisasikan dengan UV transiluminator.
3. Ukuran mtDNA (bp) *M. elegans* hasil PCR dengan menggunakan primer COIL dan COIH.
4. Ukuran mtDNA (bp) *M. elegans* hasil metode RFLP yang didapat dari pemotongan enzim restriksi *Nla* III.
5. Pengelompokan tipe fragmen DNA (tipe haplotipe) yang dihasilkan dari pemotongan enzim restriksi dilakukan dengan cara scoring tipe haplotipe, sebagai berikut (Annisa, 2008):
 - a. Pita/band mtDNA yang memiliki 1 pola pemotongan dimasukkan kedalam tipe haplotipe A.
 - b. Pita/band mtDNA yang memiliki 2 pola pemotongan dimasukkan kedalam tipe haplotipe B.
 - c. Pita/band mtDNA yang memiliki lebih dari 2 pola pemotongan dimasukkan kedalam tipe haplotipe C.