

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Juni sampai dengan November 2010. Tempat pengambilan sampel ikan adalah Kaliprogeno, Yogyakarta. Pengambilan sampel dilakukan setiap bulan selama 6 bulan berturut-turut. Pengamatan morfologi dan pewarnaan cacing dilakukan di Laboratorium Patologi dan Parasitologi Universitas Gadjah Mada. Pemeriksaan molekuler dengan PCR dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan dan Laboratorium Bioteknologi Pusat Antar Universitas (PAU) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

#### 3.2. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ikan air tawar yaitu mas (*Cyprinus carpio*), gurami (*Osporonemus gouramy*), nila (*Oreochromis niloticus*), lele (*Clarias gariepinus*), betok (*Anabas testudineus*), sepat (*Trichogaster trichopterus*) dengan ukuran 8 - 15 cm. Bahan yang digunakan untuk mengawetkan parasit adalah larutan etanol absolut, Formalin, AFA (*alcohol-formalin-acetic-acid*), *glacial acetic acid*, glycerol, larutan fisiologis dan akuades. Bahan untuk ekstraksi, amplifikasi dan elektroforesis DNA: etanol absolut, akuades, primer universal, ekstraksi kit (Qiagen), PCR *Master Mix* (Qiagen), QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), TE Buffer, Larutan penyangga *Tris Acetic Acid* EDTA (TAE), *Electrophoresis buffer*, pewarna Ethidium bromide (ETB), *loading buffer*, 1 % Agarose gel (PMC Bioproduct), enzim *Rsa*, *HaeIII*.

Peralatan untuk pengumpulan dan pemeriksaan parasit adalah *dissecting microscope*, mikroskop binokuler, *camera lucida*, *micrometer*, gunting bedah, *forsep*, jarum, cawan petri, gelas Becker ukuran 500 ml, pipet, kuas kecil, botol berbagai ukuran, penggaris, pencil dan

kantung plastik. Peralatan amplifikasi DNA: *Thermal Cycler* merk Infinigen dengan spesifikasi *fit* 0,2 ml dilengkapi dengan *walled tube*, *Microcentrifuge* merk *Sorvall Biofuge fresco-Kendro* dengan spesifikasi maksimum *high-speed* nmax mencapai 13.000 rpm. Peralatan Elektroforesis DNA terdiri dari: power supply merk *PowerPac Basic Bio Rad* dan dilengkapi dengan *Sub-Cell Agarose Gel Electrophoresis System Bio-Rad*. UV Transilluminator merk *DigiDoc-It Imaging System Ultra-Violet Products*, Cambridge 600, 75 KV, Kodak Tri-xpan, film ASA 400.

### **3.3. PROSEDUR PENELITIAN**

#### **3.3.1. Pengambilan Ikan Sampel**

Ikan sampel diperoleh dari Kaliprogo, Yogyakarta dengan menggunakan metode sensus, sampling dilakukan sekali dalam sebulan 6 bulan sesuai dengan Kabata (1985). Ikan tersebut dimasukkan kedalam *cool box* dan dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemeriksaan parasit. Parasit pada tubuh ikan yang ditemukan akan diawetkan dalam Formalin 10 % untuk pemeriksaan morfologi dan histopatologi, sedangkan untuk pemeriksaan PCR diawetkan dalam etanol absolut.

#### **3.3.2. Pemeriksaan Morfologi**

Pemeriksaan morfologi dilakukan terhadap metaserkaria *C. complanatum* yang terdapat di bagian tubuh dan di organ-organ viscera ikan air tawar. Meteserkaria yang mengkista di dalam tubuh ikan diambil dengan menggunakan 2 jarum yang tajam. Metaserkaria yang ditemukan dikeluarkan, dipindahkan ke dalam larutan garam dan difiksasi dengan AFA selama 24 jam, di cuci dengan akuades selama 15 menit dan dimasukkan kedalam larutan alkohol bertingkat 35%, 50% dan 70% masing-masing selama 15 menit, diwarnai dengan *Semichon's acetocarmin* selama 1 jam, kemudian dicuci dengan larutan

alkohol 70% selama 30 menit, di pindahkan ke dalam alkohol 70%, 80%, 90%, 100% masing-masing selama 15 menit. Cacing dipindahkan ke dalam larutan xylol 2 kali masing-masing selama 15 menit, diletakkan diatas *objek glass* dan ditutupi dengan *entellan* dan diamati di bawah mikroskop binokuler. Pengukuran *ventral dan oral sucker, pharynx*, testis, ovarium, telur dengan menggunakan mikrometer. Identifikasi parasit dilakukan sampai tingkat spesies dan metaserkaria dari *C. complanatum* yang ditemukan akan di gambar dengan menggunakan *camera Lucida* (McAllister *et al.*, 2007). Identifikasi dilakukan sesuai dengan Bykhovskaya-Pavlovskaya *et al.*, 1964.

### 3.3.3. Pengamatan dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Permukaan parasit diamati dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dengan prosedur sebagai berikut: parasit didehidrasi di dalam etanol bertingkat, kemudian dimasukkan ke dalam amyl asetat dan dikeringkan dalam suatu *critical drying system*. Spesimen dilapisi dengan emas dan di *scan* dengan alat Cambridge 600, 75 KV (Dzikowski *et al.*, 2004). Pengambilan foto dilakukan dengan Kodak Tri-x pan, film ASA 400.

### 3.3.4. Pemeriksaan Molekuler

Pemeriksaan secara molekuler (DNA) dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang terdiri dari ekstraksi, amplifikasi, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), elektroforesis (Levy *et al.*, 2002).

#### a. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan terhadap 4 individu cacing asal Yogyakarta dan 1 individu cacing berasal dari Riau. Metaserkaria *C. complanatum* yang ditemukan dimasukkan ke

dalam tabung ependorf, ditambahkan ATL sebanyak 90  $\mu$ l, digerus dengan menggunakan *paste* hingga hancur. Hasil gerusan ditambahkan Proteinase K sebanyak 15  $\mu$ l, diaduk sampai merata dan diinkubasi pada suhu 56 °C selama 1,5 jam, kemudian di vortex selama 15 detik, ditambahkan Buffer A1 sebanyak 100  $\mu$ l dan ditambahkan etanol absolut sebanyak 100  $\mu$ l. Selanjutnya supernatan dipindahkan ke *spinn column tube*, di sentrifuse selama 1 menit pada 8.000 rpm. Supernatan dibuang, dipindahkan ke *spinn column tube* baru dan ditambahkan Buffer AW1 sebanyak 250  $\mu$ l, disentrifuse selama 1 menit pada 8.000 rpm, kemudian supernatan dibuang. Pellet dipindahkan ke *spinn column tube* baru, ditambahkan Buffer AW2 sebanyak 250  $\mu$ l dan di sentrifuse selama 3 menit pada 13.000 rpm, supernatan dibuang. Pellet dipindahkan lagi ke *spin column tube* baru ditambahkan AE1 sebanyak 100  $\mu$ l, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit dan di sentrifuse selama 1 menit pada 8.000 rpm. Selanjutnya pellet dipindahkan ke *spinn column tube* ditambahkan AE2 sebanyak 100  $\mu$ l, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit dan di sentrifuse selama 1 menit pada 8.000 rpm. Hasil DNA stock dapat disimpan pada suhu -20°C atau langsung digunakan untuk amplifikasi DNA dengan *Thermal cycler*.

## **b. Amplifikasi rDNA**

Amplifikasi DNA dilakukan dengan DNA sebanyak 3  $\mu$ l kemudian ditambahkan Mix Blue sebanyak 18  $\mu$ l dalam mikrotube, kemudian dicampur hingga homogen, primer masing-masing 2  $\mu$ l forward primer (5'- GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TC-3') dan reverse primer (5'- CCT TGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC-3') konsentrasi akhir 25  $\mu$ l, di sentrifuse selama 30 detik. Program PCR untuk amplifikasi rDNA sebagai berikut: denaturasi awal suhu 95°C selama 5 menit, *annealing* pada suhu 60°C selama 5 menit dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit 20 detik selama 26 siklus, ekstensi akhir 72°C selama 5 menit suhu

akhir 4°C. Hasil PCR dielektroforesis pada gel agarose 1,5% selama 30 menit pada 100 volt, kemudian diamati diatas *UV transilluminator* dan hasilnya didokumentasi.

### c. Elektroforesis

Hasil ekstraksi DNA diperiksa dengan Elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 1 % dengan cara sebagai berikut: timbang agarose sebanyak 0.40 g dilarutkan ke dalam 40 ml TAE buffer 1 x dengan cara didihkan diatas *hotplate magnetic stirrer* atau *microwave* dalam botol sampel berukuran 100 ml. Larutan didinginkan di dalam *waterbath* pada suhu 60°C selama 10 menit dan ditambahkan 5 µl Ethidium bromide, dicampur merata. Agarose dituang ke dalam cetakan elektroforesis yang telah dipasang *comb*. Setelah 20 menit, larutan agarose akan mengeras (membentuk gel). Selanjutnya ambil *comb* sehingga terbentuk sumur sebanyak 8 atau 12 buah, tergantung jenis *comb* yang dipakai. TAE buffer dituang ke dalam cetakan. Lubang ini diisi dengan produk PCR.

Sebanyak 5 µl produk PCR dicampur dengan 5 µl *loading buffer* diatas parafilm. Selanjutnya 10 µl larutan tersebut dimasukkan ke masing-masing sumur pada gel agarose. Sumur terakhir dengan 5 µl penanda molekuler (*marker*). Elektroforesis dijalankan pada voltase 100 volt selama 30-45 menit. Gel diangkat dari tangki elektroforesis. Pengamatan pita DNA divisualisasikan diatas *Uv transilluminator* dan hasilnya akan didokumentasi.

### d. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

*Restriction Fragment Length polymorphism* (RFLP) dilakukan dengan enzim restriksi Rsa dan HaeIII. Untuk enzim Rsa dan HaeIII, reaksi dilakukan dengan volume reaksi 8 µl yang didalamnya terdiri dari 4 µl produk PCR, 2 µl enzim 2 µl buffer. Hasil campuran reaksi diinkubasikan selama 2 jam dan 24 jam (Enzim Rsa) dan 2 jam (enzim HaeIII) pada suhu 37°C. Hasil pemotongan semuanya dielektroforesis pada gel agarose 2,5% dalam buffer TAE

1x. Elektroforesis dilakukan pada beda potensial 100 volt selama 1 jam. Untuk mengetahui proses pemotongan digunakan penanda 1 kb DNA ladder. Hasil elektroforesis divisualisaikan pada *UV transilluminator* dan hasilnya didokumentasi.

### **3.3.5. Pengukuran Kualitas Air**

Pengukuran kualitas air dilakukan secara in situ dengan menggunakan Water Quality Checker (WQC)-20) untuk mengukur suhu, oksigen terlarut, pH sedangkan karbondioksida bebas, nitrat dan amonia diukur dengan Spectrofotometer ((Boyd, 1990). Pengukuran dilakukan pada setiap hari selama 4 bulan.

### **3.3.6. Analisis data**

Data yang diperoleh dan hasil pemeriksaan morfologi cacing dan molekuler RFLP dianalisis secara deskriptif.