

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian penanda genetik spesifik dilakukan terhadap jenis-jenis ikan endemik sungai paparan banjir Riau yaitu dari Genus *Kryopterus* dan *Ompok*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan penanda genetik spesifik sebagai *barcode* yang mencirikan spesies, dan juga mencirikan lokasi asal sampel, berdasarkan runutan nukleotida dan asam amino gen *COX-1* dan runutan nukleotida *D-loop region* DNA mitokondria.

Ikan-ikan diperoleh dari hasil tangkapan nelayan dari sungai-sungai di Provinsi Riau yaitu dari Sungai Kampar, Sungai Indragiri dan Sungai Tapung. Identifikasi jenis sampel dilakukan dengan menggunakan kunci identifikasi Kottelat *et al.* (1993).

4.1. Alat dan Bahan Penelitian

a. Alat Penelitian

No	URAIAN	ALAT
A. Pengambilan sampel		
1.	Pengambilan sampel otot ikan	Gunting yang tajam dan bersih
2.	Penyimpanan sampel	Dalam ependorf 1,5 ml berisi larutan preservatif alkohol absolut : gliserol (4 : 1), disimpan pada suhu kamar
B. Isolasi, purifikasi dan amplifikasi DNA		
1.	Isolasi dan purifikasi DNA	<i>Ependorf</i> 1,5 ml, <i>pestle</i> , <i>rak ependorf</i> , mesin sentrifus, vortex, pipetor berbagai ukuran volume, tip pipet, inkubator, gunting, pinset
2.	Amplifikasi DNA	Mesin <i>thermal cycler</i> , <i>ependorf</i> 0,2 ml, <i>rak ependorf</i> , mesin sentrifus, pipetor berbagai ukuran volume, tip pipet.
C. Elektroforesis dan perunutan DNA		
1.	Elektroforesis	Mesin elektroforesis horizontal, sisir dan cetakan agarose, gelas ukur, timbangan analitis, <i>hot plate</i> , stirer, UV transluminator, pipetor, tip pipet.
2.	Purifikasi untuk perunutan DNA	Kit purifikasi, mesin perunutan DNA

b. Bahan Penelitian

No.	BAHAN	URAIAN
A. Bahan untuk isolasi dan purifikasi DNA		
1.	<i>Digestion</i> Buffer	Komposisi : 1% (W/V) SDS (Sodium Dodecyl Sulphate), 50 mM Tris-HCl pH 9,0, 0,1 M EDTA pH 8,0, 0,2 M NaCl, 40 mg/ml RNase
2.	Fenol	Disimpan pada suhu 4°C, botolnya dibungkus dengan aluminium foil
3.	CIAA	Kloroform : Iso Amil Alkohol (24 : 1), disimpan dalam suhu kamar dan ruang asap
4.	Etanol absolute	Disimpan pada suhu -20°C
5.	Alkohol 70 %	Disimpan pada suhu -20°C
6.	TE	1 mM EDTA pH 8, 10 mM Tris-HCl pH 8, 40 mg/ml RNase
7.	Aqua destilata steril	Disimpan pada suhu kamar
B. Bahan untuk amplifikasi dengan PCR		
1.	PCR Kit	Disimpan pada suhu -20°C
2.	Primer	Disimpan pada suhu -20°C
3.	ddH ₂ O steril	Disimpan pada suhu kamar
C. Bahan pembuatan gel agarose dan buffer		
1.	1x buffer TAE/TBE	Komposisi : Tris base, glacial acetic acid, 0,5 M EDTA pH 8
2.	Ethydium Bromide	10 mg Ethidium bromide dilarutkan sampai volume 10 ml, distirer
3.	Agarose 1,2 %	0,6 g untuk setiap 50 ml 1 x TAE/TBE
4.	Loading Dye	Disimpan pada suhu -20°C
5.	DNA ladder	Disimpan pada suhu -20°C
7.	Aqua destilata steril	Disimpan pada suhu kamar

4.2. Alur Penelitian

Alur penelitian yang dilakukan adalah: (1) isolasi DNA total, (2) purifikasi DNA total, (3) elektroforesis DNA total, (4) amplifikasi dengan PCR, (5) elektroforesis hasil PCR, (6) Perunutan DNA, (7) analisis data.

4.2.1. Isolasi DNA Total

Otot ikan diambil dalam bentuk potongan kecil dan dicacah halus. Sampel otot tersebut dimasukkan ke dalam tabung polietilen, kemudian ditambahkan dengan larutan *digestion buffer* {1% (W/V) SDS; 50mM Tris-HCl, pH 9,0; 0,1 M EDTA, pH 8,0; 0,2 M NaCl; 0,5 mg/ml Proteinase K} sebanyak 500 µl, selanjutnya sampel dihancurkan sampai halus dengan pengaduk gelas di dalam tabung polietilen. Setelah sampel cukup halus, ditambahkan lagi larutan *digestion buffer* 250 µl, digoyang sebentar, dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 55°C selama semalam, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 6500 rpm selama beberapa detik, kemudian supernatannya dipindahkan ke tabung polietilen baru (Duryadi, 1993).

4.2.2. Purifikasi DNA Total

Sampel yang sudah diinkubasi ditambah fenol sebanyak 500 µl, digoyang sampai tercampur rata, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung polietilen baru, kemudian ditambahkan kloroform iso amil alkohol sebanyak 500 µl, digoyang sampai tercampur rata dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 3 menit. Supernatan (cairan bagian atas) dipindahkan ke tabung polietilen baru dan ditambahkan etanol absolut dingin sebanyak 2 kali volume sampel, digoyang sebentar, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya etanol absolut dalam tabung polietilen tersebut dibuang, endapan (pelet) yang tinggal dalam tabung polietilen ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 500 µl, digoyang sebentar dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 5 menit, kemudian DNA yang diperoleh dikeringkan di udara terbuka.

Setelah itu DNA ditambahkan dengan larutan TE {10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8,0} sebanyak 100 µl, digoyang sebentar, selanjutnya diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 15 menit. Sampel DNA disimpan pada suhu 4°C (Duryadi, 1993).

4.2.3. Elektroforesis Hasil Purifikasi DNA Total

Hasil purifikasi dimigrasikan pada gel agarose 1,2% dalam larutan 1xTBE (*Tris base - Boric acid - EDTA*) dengan menggunakan piranti *Submarine Electrophoresis* (Hoefer, USA). DNA total divisualisasikan dengan bantuan UV transluminator ($\lambda = 300$ nm), menggunakan gel yang diwarnai dengan etidium bromida (0,5 µg/ml).

4.2.4. Amplifikasi Gen *Cox-1* dan *D-loop Region* DNA Mitokondria

DNA total hasil purifikasi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *COX-1* DNA mitokondria adalah primer untuk penanda jenis ikan (*fish barcoding*) universal yaitu *Fish F2* - 5' TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC 3' dan *Fish R2* - 5' TAG ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA 3' (Ward *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2007). Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi *D-loop region* DNA mitokondria adalah primer *D-loop* universal yaitu L15926 - 5' TCAAAGCTTACACCAGTCTTGTAAC 3' dan H00651 - 5' TAACTGCAGAAGGCTAGGACCAAACCT 3' (Kocher *et al.*, 1989). Strategi amplifikasi dan komposisi campuran larutan menggunakan metode Duryadi (1993). Kondisi *PCR* yang digunakan menurut Elvyra dan Duryadi (2007) dengan modifikasi pada suhu penempelan; yaitu *pra PCR* dengan suhu 94°C selama 5 menit, *PCR*: denaturasi dengan suhu 94°C selama 30 detik, penempelan dengan suhu 55°C selama 45 detik, pemanjangan dengan suhu 72°C selama 1 menit (sebanyak 35 siklus); dan *post PCR* dengan suhu 72°C selama 5 menit.

4.2.5. Elektroforesis Hasil PCR

Hasil PCR dimigrasikan pada gel agarose 1,2% dalam larutan 1xTBE (*Tris base - Boric acid - EDTA*) dengan menggunakan piranti *Submarine*

Electrophoresis (Hoefler, USA). Hasil PCR divisualisasikan dengan bantuan UV transluminator ($\lambda = 300$ nm), menggunakan gel yang diwarnai dengan etidium bromida (0,5 $\mu\text{g/ml}$).

4.2.6. Perunutan DNA

- a) DNA produk *PCR* dipurifikasi dengan kit purifikasi, kemudian digunakan sebagai cetakan untuk perunutan.
- b) Amplifikasi untuk perunutan sesuai dengan kondisi *PCR* menurut Elvyra dan Duryadi (2007) dengan modifikasi pada suhu penempelan; yaitu *pra PCR* (denaturasi) dengan suhu 94°C selama 5 menit; *PCR*: denaturasi dengan suhu 94°C selama 30 detik, penempelan dengan suhu 55°C selama 45 detik, pemanjangan dengan suhu 60°C selama 60 detik (sebanyak 35 siklus); dan *post PCR* dengan suhu 60°C selama 5 menit.
- c) Perunutan sampel DNA dengan kit perunutan DNA, menggunakan mesin perunut DNA otomatis *Bio Trace* model 3100 (USA).

4.2.7. Analisis Data Penanda Genetik Spesifik

- a) Sisi homolog dari runutan-runutan basa nukleotida maupun runutan asam amino gen *COXI* dan *D-loop región* DNA mitokondria individu-individu dari masing-masing jenis dan lokasi penelitian yang diperoleh, kemudian disejajarkan (*multiple allignment*) yang dibandingkan dengan runutan-runutan gen *COXI* dan *D-loop region* genus-genus lain yang ada dalam famili Siluridae, maupun yang ada dalam ordo Siluriformes. Runutan asam amino diterjemahkan mengikuti kode genetik DNA mitokondria untuk vertebrata dengan menggunakan program *MEGA* versi 4,0 (Tamura *et al.*, 2007).
- b) Analisis penanda genetik spesifik, dianalisis dari data komposisi runutan nukleotida dan asam amino, situs kekal, situs sinonimous dan non sinonimous, substitusi transisi dan transversasi nukleotida, serta hubungan kekerabatan, menggunakan program *MEGA* versi 4,0 (Tamura *et al.*, 2007).

Luaran Tahun Pertama Penelitian:

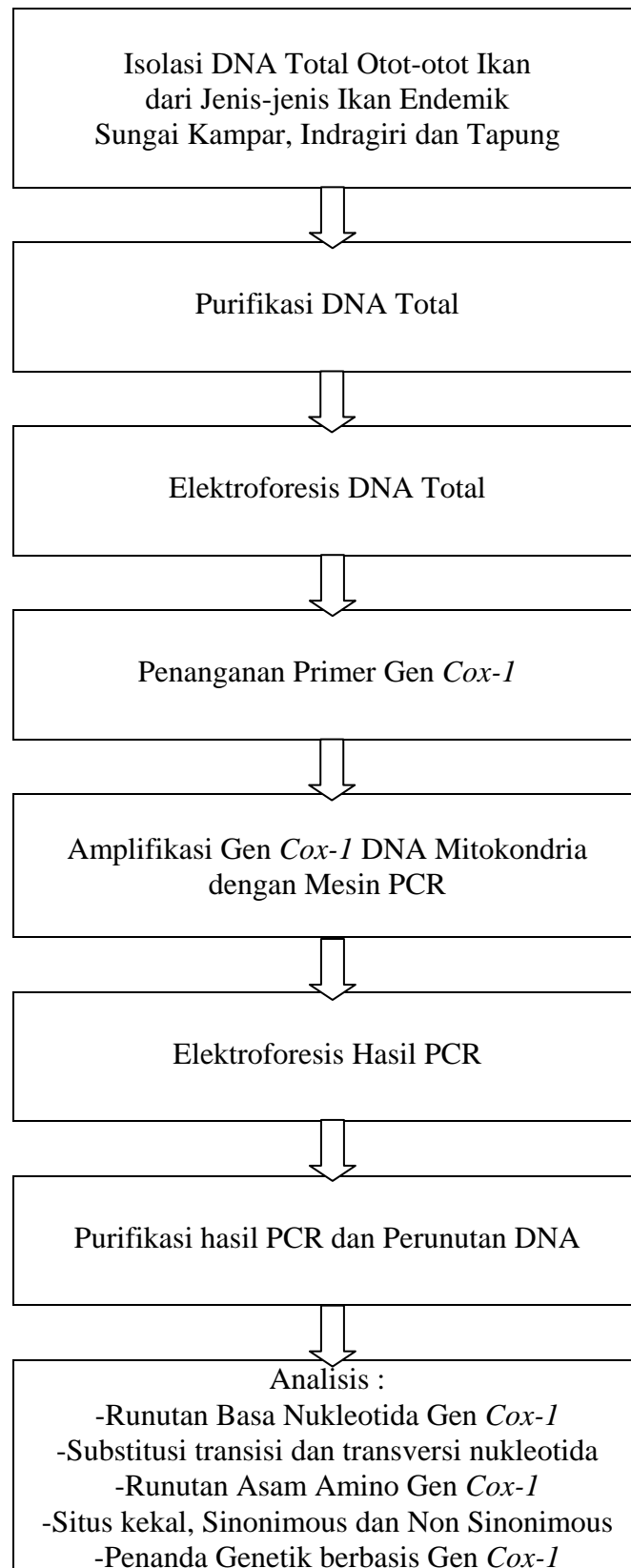
Luaran: artikel nasional terakreditasi / internasional mengenai penanda genetik spesifik sebagai *barcode* yang mencirikan identitas spesies dan juga mencirikan lokasi asal pengambilan sampelnya, berdasarkan runutan nukleotida meliputi substitusi transisi maupun transversi nukleotida, dan berdasarkan asam amino gen *COX-I* mitokondria meliputi situs kekal, sinonimous dan non sinonimous dari gen *COX-I*.

Luaran Tahun Kedua Penelitian:

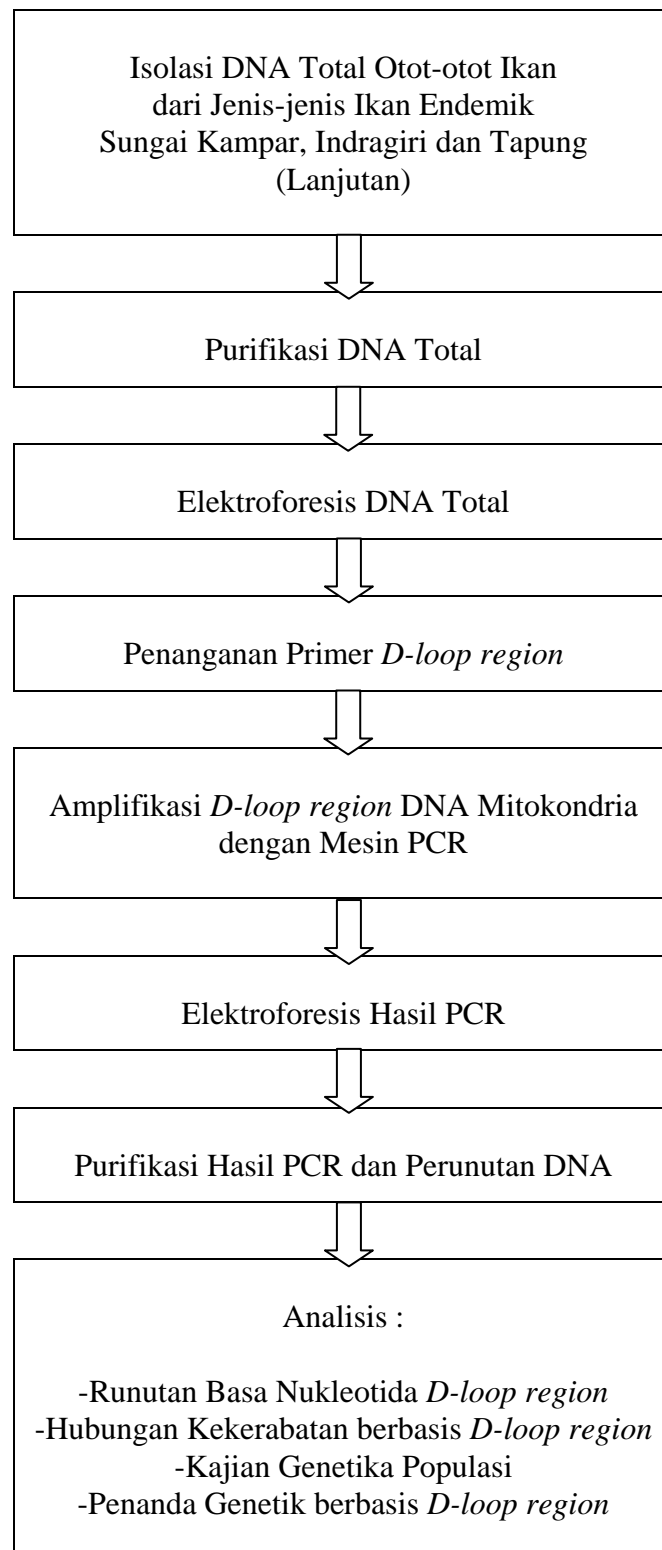
Luaran: artikel nasional terakreditasi / internasional mengenai penanda genetik spesifik sebagai *barcode* yang mencirikan spesies dan juga mencirikan habitat asalnya, runutan nukleotida bukan penyandi, hubungan kekerabatan, dan kajian genetika populasi berdasarkan *D-loop region* DNA mitokondria.

4.3. Metode Kegiatan Secara Keseluruhan

Secara keseluruhan, metode kegiatan disajikan dalam bentuk alur penelitian tahun pertama dengan tahun kedua pada Gambar 2 dan Gambar 3.



Gambar 2. Alur Penelitian Tahun Pertama



Gambar 3. Alur Penelitian Tahun Kedua