

#### IV. METODE PENELITIAN

Ikan Lais diperoleh dari hasil penangkapan ikan oleh nelayan dari sungai-sungai di Propinsi Riau yaitu S. Kampar dan S. Indragiri. Identifikasi jenis sampel dilakukan dengan menggunakan kunci identifikasi Weber dan Beaufort (1913), dan Kottelat *et al.* (1993).

##### 4.1. Alat dan Bahan Penelitian

###### a. Alat Penelitian

No.	URAIAN	ALAT
A. Pengambilan sampel		
1.	Pengambilan sampel otot ikan Lais	Gunting yang tajam dan bersih
2.	Penyimpanan sampel	Dalam ependorf 1,5 ml berisi larutan alkohol absolut, disimpan pada suhu kamar
B. Isolasi, purifikasi dan amplifikasi DNA		
1.	Isolasi dan purifikasi DNA	<i>Ependorf</i> 1,5 ml, <i>pestle</i> , rak <i>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, rak <i>ependorf</i> , mesin sentrifus, pipetor berbagai ukuran volume, tip pipet.
C. Elektroforesis dan peruntan 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.	Peruntan DNA	Kolom GFX, mesin peruntan DNA

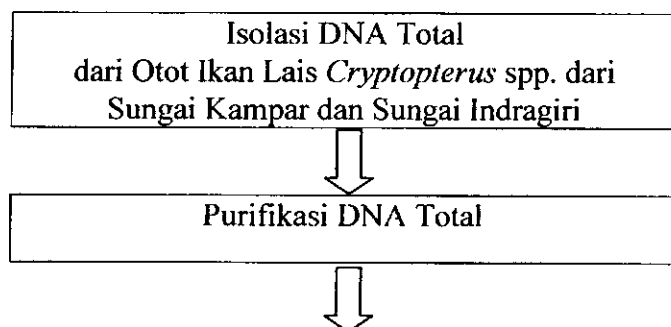
###### b. Bahan Penelitian

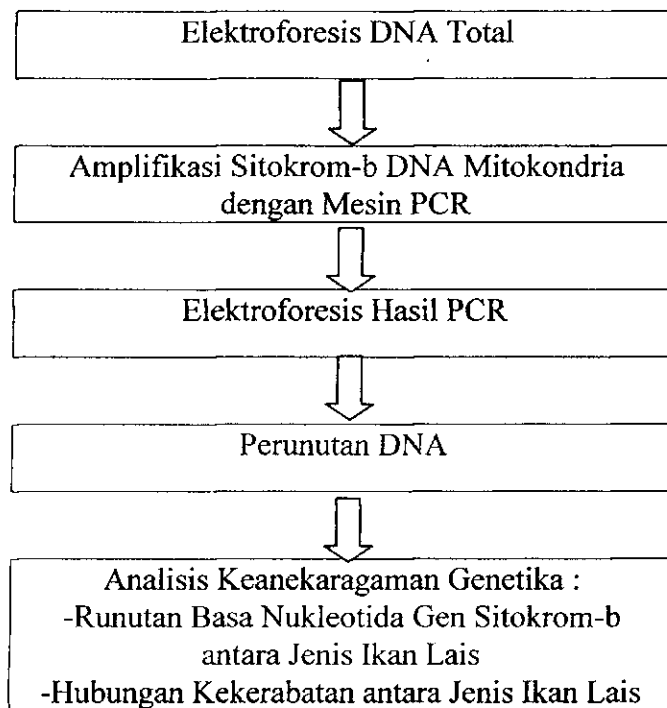
No.	BAHAN	URAIAN
A. Bahan untuk isolasi dan purifikasi DNA		
1.	<i>Digestion Buffer</i>	Komposisi : 1% (W/V) SDS (Sodium Dodecyl Sulphate), 0,5 mM Tris-HCl pH 9,0, 0,5 M EDTA pH 8,0, 1 M NaCl, 20 mg/ml Proteinase K

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 absolut	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>B. Bahan untuk amplifikasi dengan PCR</b>		
1.	PCR Kit	Disimpan pada suhu -20°C
2.	Primer	Disimpan pada suhu -20°C
3.	ddH <sub>2</sub> O steril	Disimpan pada suhu kamar
<b>C. Bahan pembuatan gel agarose dan buffer</b>		
1.	1x buffer TBE	Komposisi : 89 mM Tris, 89 mM asam borat, 2 mM 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 TBE
4.	<i>Loading Dye</i>	Disimpan pada suhu -20°C
5.	<i>DNA ladder</i>	Disimpan pada suhu -20°C
7.	Aqua destilata steril	Disimpan pada suhu kamar
<b>D. Perunutan DNA</b>		
1.	Kit purifikasi	Disimpan pada suhu -20°C
2.	Kit perunutan DNA	Disimpan pada suhu -20°C

#### 4.2. Alur Penelitian

Alur penelitian yang akan dilakukan diperlihatkan pada Gambar 2 : (a) isolasi DNA total, (b) purifikasi DNA total, (c) elektroforesis DNA total, (d) amplifikasi sitokrom-b dengan PCR, (e) elektroforesis hasil PCR, (f) Perunutan DNA, (g) analisis keanekaragaman genetica.





Gambar 2. Alur Penelitian

#### 4.3. Pelaksanaan Penelitian

##### a. Isolasi DNA Total

Otot ikan Lais *Cryptopterus* sp. diambil dalam bentuk potongan kecil dan dicacah halus. Sampel otot tersebut dimasukkan ke dalam tabung ependorf, kemudian ditambahkan dengan larutan *digestion buffer* {1% (W/V) SDS; 0,5 M Tris-HCl, pH 9,0; 0,5 M EDTA, pH 8,0; 1 M NaCl; 20 mg/ml Proteinase K} sebanyak 500  $\mu$ l, selanjutnya sampel dihancurkan sampai halus dengan pengaduk gelas di dalam tabung ependorf. Setelah sampel cukup halus, tambahkan lagi larutan *digestion buffer* 250  $\mu$ l, digoyang sebentar, dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 55 C, selama semalam (Duryadi, 1993).

##### b. Purifikasi DNA Total

Sampel yang sudah diinkubasi ditambahkan dengan fenol sebanyak 500  $\mu$ l, digoyang sampai tercampur rata, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 3 menit. Pindahkan supernatan ke ependorf baru, kemudian ditambahkan kloroform iso amil alkohol sebanyak 500  $\mu$ l, digoyang sampai tercampur rata dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm selama 3 menit.

Pindahkan supernatan (cairan bagian atas) ke ependorf 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 ependorf tersebut dibuang, endapan (pelet) yang tinggal dalam ependorf ditambahkan dengan etanol 70 % sebanyak 500  $\mu$ l, 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  $\mu$ l, digoyang sebentar, selanjutnya diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37 C selama 15 menit. Sampel DNA disimpan dalam *freezer* (Duryadi, 1993).

#### c. Elektroforesis Hasil Purifikasi DNA Total

Hasil purifikasi dimigrasikan pada gel agarose 1,2 % dalam larutan 1xTBE dengan menggunakan alat elektroforesis. DNA total divisualisasikan dengan menggunakan UV transluminator.

#### d. Amplifikasi Gen Sitokrom-b DNA Mitokondria dengan Mesin PCR

DNA total hasil purifikasi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen sitokrom b DNA mitokondria ikan lais adalah primer universal yaitu primer *forward* L14841 (5'AAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA3') dan primer *reverse* H15149 (5'AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA3') (Kocher *et al*, 1989). Kondisi *PCR* yang digunakan adalah: *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.

### e. Elektroforesis Hasil Amplifikasi PCR

Hasil amplifikasi dilihat menggunakan elektroforesis dengan penanda standar DNA pada gel agarose 1,2 % dalam larutan 1xTBE. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan menggunakan UV transluminator.

### f. Perunutan DNA

1. DNA produk PCR dipurifikasi dengan kolom GFX dan kit purifikasi, kemudian dipergunakan sebagai cetakan (*template*) untuk perunutan.
2. Amplifikasi untuk perunutan menggunakan primer *forward* L14841 dan primer *reverse* H15149. Kondisi PCR yang digunakan 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.
3. Perunutan sampel DNA menggunakan kit perunutan (*sequencing*) DNA, Perunutan DNA dilakukan di PT. Charoen Pokphand Indonesia dengan menggunakan mesin perunut DNA otomatis *ABI Prism* versi 3,7 (USA).

### g. Analisis data

1. Sisi homolog dari runutan basa nukleotida gen sitokrom-b DNA mitokondria yang diperoleh kemudian disejajarkan.
2. Data pembandingan yang digunakan adalah data runutan gen sitokrom-b utuh *C. minor* dari *GenBank* (Nomor akses AY458895); gen sitokrom-b parsial dari *GenBank* yaitu data runutan *C. cryptopterus* (DQ119434), *C. macrocephalus* (DQ119483), *C. bicirrhis* (DQ119480), *C. limpok* (DQ119431) dan *C. schilbeides* (DQ119482).
3. Data nukleotida yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan program *Mega* versi 3,0 (Kumar *et al*, 2004) dengan metode *Bootstrap Neighbor-Joining* 1000 kali pengulangan.