

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai dengan bulan November 2024. Sampel dikoleksi dari Kelurahan Tanjung Leidong, Kecamatan Kualuh Leidong, Labuhanbatu Utara, Sumatera Utara. Pengerjaan proses DNA metode RAPD dilaksanakan di laboratorium Biologi, Universitas Islam Negeri Sumatera Utara.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian DNA metode RAPD pada udang genus *Penaeus*.

1. Alat

No	Nama Alat
1	Labu Erlenmeyer 500 ml
2	Gelas Ukur 100 ml
3	Sentrifuge (<i>Eppendorf</i>)
4	Gelas Kimia 1000ml
5	Hotplate (<i>Benchmark</i>)
6	Ice Box
7	Timbangan Analitik
8	Mikro Pipet (Volume 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, Dan 1000 μ l)
9	Freezer
10	Kamera Digital
11	Rak Tube
12	Vortex (<i>Biosan Multi-Vortex V-32</i>)
13	Autoclave
14	Spin Column
15	Mesin PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
16	Alat Gel Documentation (BIOSTEP)
17	Mortal & Alu
18	Spatula

2. Bahan

No	Nama Bahan
1	sampel jaringan Pleiopod (kaki renang) udang yang diambil dari Kelurahan Tanjung Leidong, Kecamatan Kualuh Leidong, Labuhanbatu Utara, Sumatera Utara
2	Primer OPD20, OPC2, OPA13, OPA2, UBC456, UBC101
3	Etanol PA 96%
4	Larutan TBE Buffer
5	Agarose bubuk
6	<i>Nucleace water free</i>
7	ddh ₂ O (akuabides)
8	spidol permanen
9	<i>Taq Polymerase</i>
10	Aquades Steril
11	Ice Gel
12	Aluminium Foil
13	Tisu
14	Gloves
15	DNA Extraction Kit (Favorgen)
16	Tube PCR 0,2 ml, Tube 1,5 ml
17	collection tube
18	tip mikro pipet
19	alkohol 70%
20	fluorovuee (nucleic acid gel stain)
21	kit PCR with day

Table 3.1 Data Primer

Identifikasi Primer	Sequence	Refrensi
OPD 20	ACCCGGTCAC	Upadhye & Ujwala,2010
OPC 2	GTGAGGCGTC	Iskandariah dkk, 2015
OPA 13	CAGCACCCAC	Upadhye & Ujwala,2010
OPA 2	TGCCGAGCTG	Ekadanti dkk, 2023
UBC 456	GCGGAGGTCC	Mamesah,2018
UBC 101	GCGCCTGGAG	Mamesah, 2018

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan :

- Pengoleksian Sampel Udang
- Isolasi Dan Ekstraksi DNA,
- PCR (*Polymerase Chain Reaction*),
- Elektroforesis
- Dan Analisis Data Hasil elektroforesis gel.

3.3.1 Koleksi Sampel

Penelitian DNA Metode RAPD pada udang genus *Penaeus* menggunakan sampel jaringan kaki renang (pleiopod) pada udang genus *Penaeus* yang diambil dari Perairan Kelurahan Tanjung Leidong, Kecamatan Kualuh Leidong, Labuhanbatu Utara, Sumatera Utara. Bagian hewan yang digunakan adalah pada bagian kaki renang udang yang masih segar dan dewasa. Sampel kaki renang udang dipotong menggunakan pisau bedah, kemudian sampel dimasukkan ke dalam tabung mikro sentrifugasi 1,5 ml yang telah diisi dengan etanol 96% sebanyak 1 ml dan diberi label.

3.3.2 Isolasi DNA

Proses isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan DNA *extraction kit* (Favorgen) dengan tahapan mula-mula Ditimbang sampel jaringan udang sebanyak 0,5 gram Kemudian sampel digerus dengan mortal dan alu lalu dipindahkan kedalam tube 1,5. Kemudian tambahkan 200 µl FATG1 Buffer dan aduk rata dengan ujung pipet. Selanjutnya tambahkan 20 µl Proteinase K ke dalam campuran sampel lalu divorteks. Kemudian Inkubasi pada suhu 60°C hingga jaringan lisis sempurna (1-3 jam) Vortex sesekali selama inkubasi. Setelah itu Tambahkan 200 µl FATG2 Buffer ke dalam campuran sampel, lalu di vortex dan inkubasi kembali pada suhu 70°C selama 10 menit. Kemudian Tambahkan 200 µl etanol (96-100%) ke dalam campuran sampel. Lalu di vortex, Putar tabung sebentar untuk menghilangkan tetesan yang ada di dalam tutupnya. Selanjutnya Tempatkan Kolom Mini FATG di Tabung Pengumpul. Pindahkan campuran (termasuk endapan apa pun) dengan hati-hati ke Kolom Mini FATG. Centrifuge dengan kecepatan penuh (18.000 x g) selama 1 menit lalu letakkan Mini column FATG ke tempat yang baru Tabung koleksi. Kemudian tambahkan 400 µl W1 Buffer ke Kolom Mini FATG. Centrifuge dengan kecepatan penuh selama 1 menit lalu buang flow-through. Pastikan etanol telah ditambahkan ke dalam W1 Buffer pada pembukaan pertama. Tambahkan 750 µl Wash Buffer ke Kolom Mini FATG lalu Centrifuge dengan kecepatan penuh selama 3 menit lagi untuk mengeringkan kolom, kemudian tambahkan 100 µl Elution Buffer atau ddH₂O (pH 7,5,9,0) yang telah dipanaskan sebelumnya ke membran Kolom Mini FATG. Berdirikan Kolom Mini FATG selama 3 menit lalu Centrifuge dengan kecepatan penuh selama 2 menit untuk melulusi DNA.

3.3.3 Amplifikasi PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Primer OPD20, OPC2, OPA13, OPA2, UBC456 dan UBC101 yang digunakan untuk amplifikasi sekuens nukleotida dengan total keseluruhan larutan yang digunakan yaitu 10µl, dengan komposisi: 5 µl kit, 1 µl sampel, 1 µl primer dan Nfw sebanyak 3 µl kedalam tube 0,2. Setelah itu dimasukkan tube kedalam mesin PCR. Amplifikasi dilakukan tahap awal dengan dimasukkan larutan kedalam mesin PCR untuk proses hot start yang dilakukan selama 2 menit dengan suhu 95°C. Kemudian dilakukan proses denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit sebanyak 30 siklus. Kemudian proses annealing (penempelan primer) pada suhu 41°C (OPD20, UBC 456, UBC 101) dan pada suhu 40°C (OPA 13, OPA 2, OPC 2) selama 1 menit sebanyak 35 siklus. Proses selanjutnya ekstensi awal pada suhu 72°C selama 1 menit sebanyak 30 siklus, selanjutnya proses ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. yang dihasilkan dari amplifikasi dengan ketentuan proses amplifikasi PCR yang dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2. Ketentuan Proses Amplifikasi DNA

Tahapan		Suhu (°C)	Waktu (detik)	Siklus
Hot start		95	120	1
Denaturasi		94	60	30
Annealing	OPD20	41	60	35
	OPC2	40		
	OPA13	40		
	OPA2	40		
	UBC456	41		
	UBC101	41		
Ekstensi Awal		72	60	30
Ekstensi Akhir		72	600	1

3.3.4 Elektroforesis

Uji kualitatif DNA menggunakan alat elektroforesis gel agarosa yang dilengkapi dengan *Mini Horizontal Electrophoresis* DNA dengan agarose 1% dan divisualisasikan menggunakan UV transiluminator. Tujuan Uji kualitatif DNA dilakukan guna mengetahui kualitas dari hasil isolasi DNA genom total atau pun pengamplifikasian DNA. Proses uji kualitatif DNA diawali dengan:

- Pembuatan gel agarosa yaitu dengan tahap awal penimbangan bubuk agarose sebanyak 0,4 gr menggunakan timbangan digital.

- Dilarutkan bubuk agarosa ke dalam larutan TBE 10× buffer sebanyak 40 ml di dalam tabung erlenmayer dan ditutup menggunakan aluminium foil. Sebelum dicampurkan larutan dipanaskan diatas hot plate sampai homogenkan terlebih dahulu, kemudian larutan dipanaskan diatas hot plate hingga mendidih. Pada proses pelarutan agarosa kedalam larutan TBE buffer dipastikan harus larut dan warna larutan dalam keadaan tetap bening.
- Agarosa yang telah larut dengan sempurna dicampurkan dengan larutan red gel stain 2 µl lalu dihomogenkan. Larutan gel yang terbentuk dituang kedalam cetakan yang telah dilengkapi dengan sisir, dan didiamkan hingga mengeras.
- Dilepas Sisir yang berada dicetakan secara perlahan dan selanjutnya gel yang telah mengeras dimasukkan ke dalam Mini Horizontal Electrophoresis lalu direndam dengan campuran larutan buffer TBE serta akuades hingga gel terendam.
- Dimasukkan kedalam masing-masing sumuran yang telah ditentukan menggunakan mikro pipet marker dan Sampel DNA hasil PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 8 µl dengan masing- masing kode yang telah ditetapkan. Kemudian proses elektroforesis dimulai hingga perpindahan sampel yang di uji terjadi dalam waktu 45 menit dengan tegangan listrik 70 volt.
- Terakhir hasil uji kualitatif DNA menggunakan gel documentation dan dianalisis langsung gambarnya dengan UV transilluminator untuk menampilkan urutan pita DNA yang dihasilkan

3.3.5 Analisis Data

Analisis data molekuler dilakukan dengan memeriksa fragmen DNA yang diperoleh dari hasil PCR pada elektroforesis gel. Ada dua kategori hasil fragmen DNA: monomorfik dan polimorfik. Ada tidaknya fragmen dalam setiap sampel merupakan nilai data yang dicatat langsung dalam format matriks. Jika ada fragmen DNA, ia mendapat nilai 1, jika tidak, ia mendapat nilai 0. Pita DNA antar sampel dibuat dengan membentuk cluster menggunakan UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) dan direpresentasikan dalam bentuk dendrogram. Pengelompokan dan kompilasi dendrogram dilakukan dengan menginput data biner ke dalam program NTSYS pc-2.00.