

## PENERAPAN TEKNIK ANALISIS DNA DENGAN PCR-SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) PADA UDANG WINDU, *Penaeus monodon*

Ni Luh Tati Aryani<sup>1)</sup> dan Sri Suratmi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Teknisi Litkayasa Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut, Gondol

### ABSTRAK

SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) merupakan suatu metode analisis molekuler yang bertujuan untuk melihat perbedaan jumlah basa antar fragmen, dengan menggunakan gel poliakrilamid, yang masing-masing dapat memisahkan 6--8 basa Template DNA pada poliakrilamid gel di fragmentasi dengan elektroforesis terkontrol yang disebut *GenePhor*. *GenePhor* merupakan horizontal elektroforesis kering, dengan suhu yang dapat diatur sedemikian rupa, sehingga dapat memisahkan DNA pada tegangan tinggi tanpa menimbulkan panas yang berlebihan pada poliakrilamid gel. Metode *staining* menggunakan *silver staining kit*. Hasil dari SSCP sangat dipengaruhi dan ditentukan oleh konsentrasi DNA sampel serta proses ekstraksi, amplifikasi, purifikasi dan restriksi, dan optimasi dalam pelaksanaan *staining*. Teknik ini merupakan salah satu teknik analisis polimorfisme dan banyak diterapkan pada bidang akuakultur (ikan, udang) untuk *genotyping* dengan hasil cukup akurat.

**KATA KUNCI:** DNA, gel Poliakrilamid, *GenePhor*, *silver staining*, SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*)

### PENDAHULUAN

Dengan perkembangan ilmu pengetahuan yang sangat pesat, maka memungkinkan berbagai disiplin ilmu saling berkaitan termasuk bidang perikanan. Kemajuan dan perkembangan ilmu biologi molekuler dengan penemuan suatu marka (penanda) gen yang mengendalikan karakter target, akan sangat berguna dalam program perbaikan pemuliaan. Gupta *et al.*, 2002 menyatakan, bahwa penemuan teknik perolehan gen yang mengendalikan suatu karakter sebagai penanda atau marker molekuler, sangat membantu pada proses seleksi dalam hal efektifitas maupun efisiensi dari pelaksanaan seleksi yang akan dilakukan.

Penampakan (ekspresi) dari suatu karakter gen (fenotip) ditentukan oleh faktor genetik dan faktor lingkungan, bahkan kadang-kadang ditentukan pula oleh interaksi antara genetik dan lingkungan. Sementara ekspresi genotip diindikasikan dengan keragaman (polimorfisme) gen pada tiap individu atau populasi ikan uji yang dianalisis.

Salah satu teknik analisis yang mempunyai keunggulan dalam menghasilkan polimorfisme adalah PCR-SSCP. Teknik ini merupakan pemisahan asam nukleat rantai tunggal (*single-stranded nucleic acids*) hasil amplifikasi PCR dengan elektroforesis (*GenePhor*) melalui gel poliakrilamid dan berdasarkan pada perbedaan berat molekul pasangan basa, sehingga dapat menghasilkan perbedaan struktur sekunder gen. (Gupta *et al.*, 1999).

Tujuan dari analisis SSCP adalah untuk melihat perbedaan keragaan dan jumlah fragmen serta berat molekul pasangan basa dari sampel uji dalam hal ini adalah udang melalui gel poliakrilamid (*Genegel Clean Excel 15/24*) elektroforesis (*GenePhor*) yang dioperasikan secara terkontrol.

### BAHAN DAN METODE

#### Bahan dan Alat

Analisis DNA memerlukan beberapa bahan dan alat antara lain: sentrifus, *autoclave*, mikropipet, *ependorf tube*, tip, mesin PCR, dan mesin elektroforesis *GenePhor*. Sedangkan

bahan yang digunakan adalah; genom DNA, genom hasil amplifikasi (PCR produk), kit untuk purifikasi (*QIAquick purification*), *Genegal Clean* poliakrilamid, Qiagen kit, Agarose 1%, Enzim restriksi, dan DNA *silver staining kit* (Gambar 1).

### Persiapan Sampel

#### Ekstraksi sampel udang

Sampel udang (daging, mata, kaki renang atau PL ) diambil  $\pm$  20 mg dan dimasukkan ke dalam *eppendorf tube* yang telah berisi chelex 100 sebanyak 10% dalam TE *buffer*, pH 8,0 sebanyak 250  $\mu$ L, selanjutnya digerus dan diisi dengan PK (Proteinase K) sebanyak 5  $\mu$ L serta di-*flushing*. Kemudian sampel diinkubasi selama 2,5 jam pada suhu 55°C, dan diinkubasi lagi pada suhu 89°C selama 8 menit. Setelah inkubasi sampel disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 7 menit. Supernatan yang terbentuk dilapisan atas diambil sebanyak  $\pm$  200  $\mu$ L dan supernatan ini yang merupakan genom DNA.

#### Purifikasi

Purifikasi genom DNA dengan menggunakan *Kit QIAquick Purification* (Cat. No. 28104 QIAGEN) dan metode mengikuti manual yang ada dalam kit (kemasan). Genom DNA hasil ekstraksi diambil sebanyak 100  $\mu$ L dimasukkan ke dalam *eppendorf tube*, ditambah 500  $\mu$ L *binding buffer* (PBI). Dengan *finger vortex*, larutan akan tercampur dan di-*flushing*, selanjutnya dibiarkan selama 5 menit pada suhu ruang. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam *column QIAquick purification* dan disentrifus (1 menit) dengan kecepatan 13.000

rpm. Larutan yang ter-*filter* dibuang dan ke dalam *column* ditambahkan larutan *wash buffer* (PE) sebanyak 750  $\mu$ L, selanjutnya disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Larutan yang ter-*filter* dibuang dan disentrifus lagi dengan waktu dan kecepatan yang sama. Angkat *column* yang berisi *filter QIAquick* dan dimasukkan ke dalam *eppendorf tube* yang telah *steril*. Tahap selanjutnya menambahkan larutan *elution buffer* (EB) sebanyak 30  $\mu$ L yang diteteskan pada bagian tengah *filter column* dan disentrifus dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Larutan yang telah terfilter merupakan genom DNA yang murni dengan konsentrasi tinggi sebagai bahan amplifikasi PCR.

#### Amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR dapat menggunakan metode Taq PCR Core kit atau *Ready To Go* (RTG) *beads*. Pada metode Taq PCR Core kit komposisi larutannya terdiri atas H<sub>2</sub>O, 10x *buffer*, dNTP, primer (*Foward dan Reverse*), *Q-solution*, Tag polimerase, dan genom DNA, sedangkan dengan metode *Ready To Go beads* hanya terdiri atas H<sub>2</sub>O, primer (*Foward dan Reverse*) dan genom DNA. Genom DNA yang telah dicampur dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan 32 siklus dan memerlukan waktu  $\pm$  2 jam. Hasil PCR amplifikasi di-fragmentasi dengan agarose gel 1% dalam elektroforesis Mupid-2 dengan arus listrik sebesar 50 volt selama 25 menit. Untuk memperjelas fragmen DNA dilakukan perendaman dengan pewarnaan *ethidium bromide* selama 10 menit. Hasil didokumentasi dengan polaroid gel kamera di bawah penyinaran UV transilluminator.



Gambar 1. (A) Elektroforesis *GenePhor*, (B). bahan-bahan yang digunakan dalam analisis SSCP

### Pemotongan DNA dengan Enzim Restriksi

Hasil amplifikasi PCR yang sudah di-fragmentasi dan menunjukkan pita tunggal dipotong dengan enzim restriksi *Hae* III dan *Hinf*I dengan komposisi larutan seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi larutan enzim restriksi yang digunakan untuk pemotongan template DNA hasil amplifikasi PCR

Bahan	Jenis enzim restriksi (pemotong) (µL)	
	<i>Hae</i> III	<i>Hinf</i> I
H <sub>2</sub> O	0,6	0,6
Buffer (Ne 2)	1,2	1,2
Enzim restriksi	0,2	0,2
Template DNA	4	4

Template DNA hasil amplifikasi PCR diambil sebanyak 4 µL dan dimasukkan ke dalam *ependorf tube* volume 600 µL, ditambahkan 2 µL RE dan di-*flushing* kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 3,5 jam dengan suhu 37°C. Setelah selesai proses inkubasi, *ependorf tube* dimasukkan ke dalam *freezer* -20°C untuk menghentikan aktifitas enzim dalam pemotongan.

### Gel elektroforesis

1. Gel poliakrilamid (*Genegel Clean Excel* 15/24), dibuka bungkusnya, selanjutnya gel diambil dan direndam selama satu (1) jam

dalam larutan *gel rehydration buffer* dalam wadah *staining (dish containing)*.

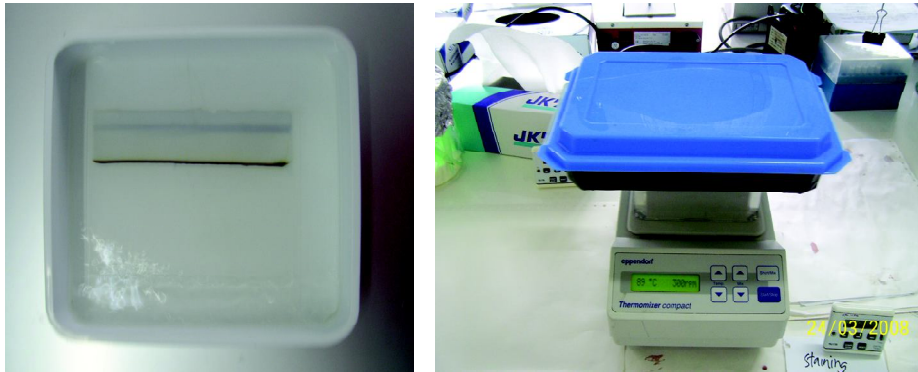
2. Setelah gel rehydrasi (warna agak kebiruan), gel diangkat dan dibersihkan cairan yang masih menempel dengan menggunakan tisu tidak berserabut (*kimwrap*).
3. Gel ditempatkan pada mesin *GenePhor* yang dimediasi oleh larutan ddH<sub>2</sub>O (± 3 mL) agar gel tidak melekat langsung pada *chamber GenePhor*.
4. Sebelum sampel uji dielektroforesis, ke dalam *restriction tube* (hasil pemotongan DNA) ditambahkan 4 µL *loading dye* dan di-*flushing*. Selanjutnya sampel uji dimasukkan ke dalam sumuran yang ada pada polyakrilamid gel (6—7 µL).
5. *Buffer strip* disiapkan 2 lembar dan dibasahi dengan larutan *gel electrode buffer* ± 1,5 mL setiap strip, selanjutnya dimasukkan pada tempatnya yang berfungsi sebagai jembatan (*bridge*) *buffer* yang dapat mengalirkan arus listrik dari positif ke negatif.
6. *GenePhor* ditutup dengan sempurna sehingga elektrode menyentuh *buffer strip* dengan baik.
7. Fragmentasi gen dalam polyakrilamid gel dikondisikan pada suhu 15°C selama 45 menit. Alat yang digunakan dalam *running* gel elektroforesis adalah *GenePhor* seperti yang terlihat pada Gambar 2.

### Pewarnaan polyakrilamid gel dengan *silver staining*

Pada proses pewarnaan dengan *silver staining* (Gambar 3), setiap tahap perendaman gel polyakrilamid dilakukan dengan meng-



Gambar 2. Proses elektroforesis dengan menggunakan *GenePhor*



Gambar 3. Pewarnaan polyakrilamid gel dengan *silver staining kit*

gunakan alat untuk menggoyang (*shaking*) agar larutan merendam seluruh permukaan gel polyakrilamid.

1. Gel polyakrilamid hasil elektroforesis direndam dalam larutan *fixing* selama 90 menit. Larutan *fixing* merupakan campuran 24 mL ethanol absolut dengan 76 mL MilliQue (MQ) *water steril* dan ditambah 25 mL larutan *fixing 5x*.
2. Selanjutnya pewarnaan dengan larutan *staining* yang merupakan campuran 100 mL MQ *water steril* dan 25 mL larutan *staining* selama 30 menit.
3. Perendaman dengan larutan *developing* selama 8—10 menit dengan sistem menggoyang (*shaking*). Larutan terdiri atas 100 mL MQ *water steril*, 25 mL sodium karbonat, 125  $\mu$ L sodium thiosulfat dan 125  $\mu$ L formaldehyde. Campuran larutan *developing* ini sangat peka terhadap cahaya sehingga perlu dilakukan penutupan dengan *aluminum foil*.
4. Untuk menghentikan proses pewarnaan dilakukan perendaman dalam larutan *stopping* (100 mL MQ *water* dan 25 mL larutan *stopping*) selama 30 menit. Campuran larutan ini juga sangat peka terhadap cahaya sehingga harus ditutup dengan *aluminum foil*.
5. Preservasi gel dilakukan dengan cara gel polyakrilamid dikering-anginkan pada suhu ruang dengan posisi vertikal. Setelah gel kering dilakukan *scoring* atau pembacaan pita.

## HASIL DAN BAHASAN

### Ekstraksi genom DNA

Hasil dari ekstraksi sampel udang adalah

genom yang relatif bervariasi kualitas maupun kuantitasnya. Seringkali pada sampel dari organ mata dan kaki renang menghasilkan genom DNA yang berwarna (merah muda atau kehitaman) oleh adanya pigmen sel. Secara kuantitas ekstraksi genom DNA menghasilkan nilai yang cukup tinggi 150—600 ng/ $\mu$ L yang merupakan genom DNA total. Hal ini sudah sangat cukup untuk amplifikasi PCR karena dalam reaksi hanya diperlukan sekitar 15—50 ng/ $\mu$ L. Genom adalah keseluruhan bahan genetik yang membawa semua informasi pendukung kehidupan pada suatu makhluk hidup, baik yang merupakan gen atau bukan. Pada semua makhluk hidup, genom mencakup semua informasi genetik yang dibawa DNA, baik di inti sel (nukleus), mitokondria, maupun plastida (Gupta et al., 2002). Dengan demikian, ekstraksi genom DNA merupakan langkah awal yang sangat menentukan keberhasilan dari analisis PCR.

### Purifikasi dengan menggunakan kit *QIAquick purification*

Proses purifikasi genom DNA menggunakan kit *QIAquick purification* dihasilkan genom DNA murni dengan konsentrasi DNA yang tinggi yang akan dipergunakan sebagai *template* untuk amplifikasi.

### Amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR menggunakan larutan dari metode *Taq PCR Core kit* atau *Ready To Go (RTG) beads* menghasilkan pita tunggal yang selanjutnya dapat dipotong dengan beberapa enzim restriksi. Pita tunggal dari hasil amplifikasi PCR mempunyai berat molekul yang bervariasi, sesuai dengan target region dari primer yang digunakan. Penggunaan masing-

masing metode pada dasarnya sama, hanya pertimbangan efisiensi waktu dan biaya. Pada metode *Taq PCR Core kit*, proses penyiapan reaksi lebih lama tetapi biaya murah, sedangkan dengan *RTG beads*, proses penyiapan reaksi cepat namun mahal.

### Pemotongan DNA dengan Enzim Restriksi

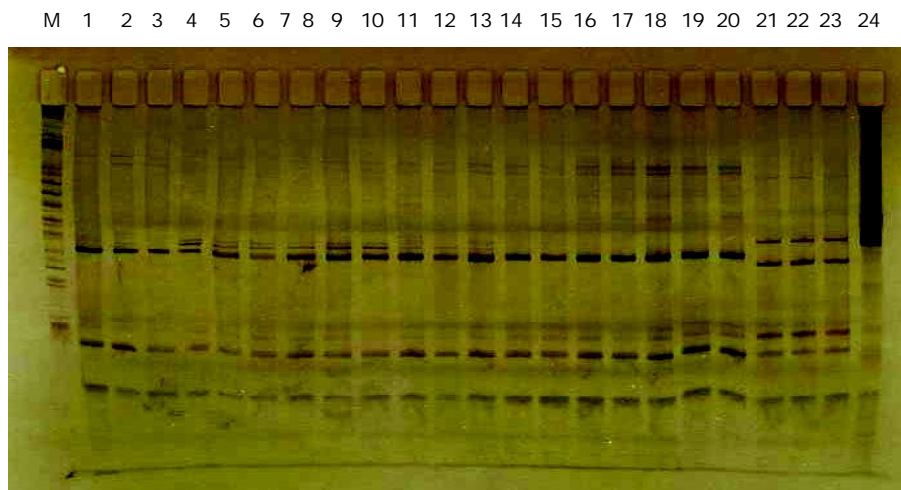
Enzim restriksi yang digunakan untuk memotong DNA adalah *Hae* III dan *Hinf*I. Dari pemotongan tersebut, sampel genom DNA udang yang digunakan dapat diketahui polimorfisme DNA dari masing-masing sampel seperti terlihat pada Gambar 4. Dari Gambar 4 terlihat bahwa penggunaan enzim restriksi berbeda memberikan daerah pemotongan yang berbeda pula. Pada pemotongan dengan enzim *Hae* III (*line* 1--20) nampak adanya polimorfisme pada *line* 4--12, sedangkan lainnya bersifat monomorfis. Pada pemotongan dengan enzim *Hinf*I (*line* 20--24) menunjukkan pola monomorfis.

### Gel elektroporesis dan pewarnaan polyakrilamid gel dengan *silver staining*

Hasil analisis SSCP pada udang windu, *Penaeus monodon* terlihat pada Gambar 4. Fragmentasi pita DNA pada polyakrilamid cenderung lebih banyak dan bervariasi, sehingga memudahkan dalam mencirikan sifat

polimorfisme. Hal ini berhubungan dengan susunan molekul pada yang sangat kecil dan tersusun sangat kompak dalam lembaran gel sehingga polyakrilamid dapat memfragmentasi DNA lebih sensitif dibandingkan dengan agarose gel.

Pita DNA yang telah mengalami pemotongan dengan enzim restriksi terlihat sangat jelas dalam fragmentasi pada polyakrilamid. Mobilitas dari DNA *double-stranded* di dalam gel elektroforesis bergantung pada ukuran rantai dan panjangnya tetapi secara relatif tidak terikat pada *nucleotide* urutan tertentu (Melcher, 2000). Analisis DNA dengan metode *Single Strand Conformation Polymorphism* mempunyai keuntungan untuk mengetahui DNA polimorfisme, demikian pula variasi urutan gen yang lebih spesifik dapat dipisahkan atau lebih sensitif (Sunnucks *et al.*, 2000). Sedangkan beberapa faktor lainnya yang berpengaruh terhadap pola pita DNA yang terekspresi dengan baik pada teknik SSCP ini di antaranya adalah (1) Konsentrasi DNA sampel yang berkualitas dari proses ekstraksi dan purifikasi, hasil amplifikasi PCR dan pemotongan dengan enzim restriksi, (2) Optimasi penggunaan buffer, baik dalam proses polyakrilamid gel *rehydrasi* dan proses *running* dengan *electrode buffer*, (3) Proses penyiapan larutan untuk pewarnaan dengan *silver staining kit* yang harus sesuai dengan prosedur yang ada, karena ada tahapan penggunaan larutan yang peka terhadap sinar/



Gambar 4. Hasil analisis PCR-SSCP pada udang windu, *Penaeus monodon*. (M: marker 100 bp; 1--20: pemotongan dengan enzim restriksi *Hae* III; 21--23; pemotongan dengan enzim restriksi *Hinf*I; 24: *undigest*; 4--10: polimorfik)

cahaya. Dengan demikian tahapan pelaksanaan analisis dengan SSCP harus dilakukan dengan teliti dan cermat untuk mendapatkan hasil yang optimal.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Teknik analisis DNA menggunakan metode SSCP dengan gel polyakrilamid untuk udang dapat menghasilkan fragmentasi yang cukup jelas; perbedaan jumlah fragmen dan berat molekul pasangan basa antar fragmen. Pemotongan dengan enzim restriksi *Hae* III menunjukkan perbedaan polymorfisme pada udang windu, *P. monodon*

### Saran

Disarankan agar kecermatan dalam pelaksanaan dan akurasi penggunaan bahan kimia dalam pewarnaan (*staining*) diperhatikan karena bahan untuk analisis dengan SSCP hanya sekali pakai dan mengingat harga bahan-bahan yang relatif mahal.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada Dr. Haryanti dan peneliti Kelompok Bioteknologi BBRPBL, Gondol atas bimbingannya, dan seluruh rekan-rekan teknisi atas kerja samanya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Gonzales, J.M. and J.I. Cubero. 1993. Selection Strategies and Choice of Breeding Methods. *In: Hayward, M.D., N.O. Bosemark, and I. Romagosa (Eds.) Plant Breeding: Principles and Prospects.* Chapman & Hall. London. p. 281—313.
- Gupta, P.K., R.K. Varshney, P.C. Sharma, and B. Ramesh, 1999. Molecular Markers and Their Application in Wheat Breeding. *Plant Breeding.* 118: 369—390.
- Gupta, P.K., R.K. Varshney, and M. Prasad. 2002. Molecular Markers: Principles and Methodology. *In: Jain, S.M., D.S. Brar, and B.S. Ahloowalia (Eds.) Molecular Techniques in Crop Improvement.* p. 9—54.
- Kukita, Y., T. Tahira, S.S. Sommer, K. Hayashi. 1997. SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low pH Gel. *Human Mutation.* (10): 400-7.
- Melcher, U. SSCP. <http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW1/MG11129.html>. Accessed 2003 February 17.
- Sunnucks, P.M.A. Sloane, D.L. Alpers, L.B. Beheregaray, A.C. Tailor. 2000. SSCP Is Not So Difficult: The Application and Utility of Single-Stranded Conformation Polymorphism in Evolutionary Biology and Molecular Ecology. *Molecular Ecology.* (9): 1,699-710.