

400006554



**PENGEKSTRAKAN DNA DARIPADA IKAN AIR
TAWAR SABAH**

RAZMAH BINTI MAIDIN

**DISERTASI INI DIKEMUKAKAN UNTUK MEMENUHI
SEBAHAGIAN DARIPADA SYARAT MEMPEROLEHI IJAZAH
SARJANA MUDA SAINS DENGAN KEPUJIAN**

**PERPUSTAKAAN
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH**

**PROGRAM BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH
KOTA KINABALU**

MAC 2005

PERPUSTAKAAN UMS



1400006554



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

BORANG PENGESAHAN STATUS TESIS@

JUDUL: PENGEKSTRAKAN DNA DARIPADA IKAN AIRTAWAR SABAHIjazah: SARJANA MUDA SAINSSESI PENGAJIAN: MAY 2002 - APRIL 2005Saya RAZMAH BINTI MAIDIN

(HURUF BESAR)

mengaku membenarkan tesis (LPS/Sarjana/Doktor Falsafah)* ini disimpan di Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dengan syarat-syarat kegunaan seperti berikut:

1. Tesis adalah hak milik Universiti Malaysia Sabah.
2. Perpustakaan Universiti Malaysia Sabah dibenarkan membuat salinan untuk tujuan pengajian sabaja.
3. Perpustakaan dibenarkan membuat salinan tesis ini sebagai bahan pertukaran antara institusi pengajian tinggi.
4. **Sila tandakan (/)

SULIT

(Mengandungi maklumat yang berdarjah keselamatan atau kepentingan Malaysia seperti yang termaktub di dalam AKTA RAHSIA RASMI 1972)

TERHAD

(Mengandungi maklumat TERHAD yang telah ditentukan oleh organisasi/badan di mana penyelidikan dijalankan)

TIDAK TERHAD

Disahkan oleh



(TANDATANGAN PENULIS)

Alamat Tetap: KG BHAIH TENGAH
9/5 2470;89008 KENINGAU, SARAWAKTarikh: 31/3/05

(TANDATANGAN PUSTAKAWAN)

DR ROZIAH KAMBOL

Nama Penyelia

Tarikh: 31/3/05

CATATAN: * Potong yang tidak berkenaan.

** Jika tesis ini SULIT atau TERHAD, sila lampirkan surat daripada pihak berkuasa/organisasi berkenaan dengan menyatakan sekali sebab dan tempoh tesis ini perlu dikelaskan sebagai SULIT dan TERHAD.

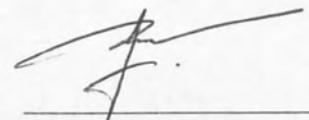
@ Tesis dimaksudkan sebagai tesis bagi Ijazah Doktor Falsafah dan Sarjana secara penyelidikan, atau disertasi bagi pengajian secara kerja kursus dan penyelidikan, atau Laporan Projek Sarjana Muda (LPSM).



PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang setiap satunya telah dijelaskan sumbernya.

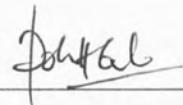
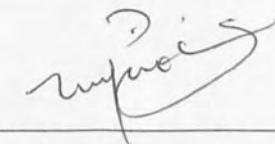
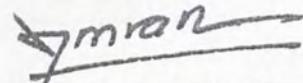
31 MAC 2005



RAZMAH BINTI MAIDIN
HS 2002-3106



UMS
UNIVERSITI MALAYSIA SABAH

DIPERAKUKAN OLEH**Tandatangan****1. PENYELIA****(DR. ROZIAH KAMBOL)****2. PEMERIKSA 1****(DR. VIJAY KUMAR)****3. PEMERIKSA 2****(MISS TEOH PEIK LIN)****4. DEKAN****(PROF MADYA DR. AMRAN AHMED)****UMS**
UNIVERSITI MALAYSIA SARAWAK

PENGHARGAAN

Bismillahirrahmanirrahim....

Dengan nama Allah Yang Maha Pemurah Lagi Maha Pengasih.

Alhamdullilah, bersyukur saya ke atas hadrat Ilahi kerana dengan izin dan rahmatNya, maka dapatlah disertasi ini disiapkan dan dibukukan.

Terlebih dahulu, saya ingin merakamkan jutaan terima kasih kepada Dr. Roziah Kambol selaku penyelia bagi kajian yang saya jalankan ini, kerana banyak memberikan bimbingan dan tunjuk ajar sepanjang tempoh kajian ini dijalankan.

Terima kasih dan setinggi-tinggi penghargaan saya tujukan kepada para pembantu makmal, rakan-rakan seperjuangan di bawah seliaan Dr. Roziah iaitu Norhayati, Hanafi dan Hisham kerana banyak membantu saya serta rakan-rakan Bioteknologi terutamanya Sujiyati yang terlibat secara langsung mahupun tidak langsung dalam kajian ini.

Khas buat ibu dan bapa tersayang (Theresa Kilat dan Maidin Bokusut) serta ahli keluarga, jutaan terima kasih di atas segala doa, nasihat, sokongan dan jasa yang telah dicurahkan kepada saya bagi melaksanakan segala amanah dan tanggungjawab saya sebagai seorang pelajar.

Akhir kata, segala jasa dan budi anda semua akan tetap dikenang dan semoga Allah dapat membalasnya. Insya-Allah.

Sekian, terima kasih. Wassalam.

Razmah Binti Maidin



ABSTRAK

Kajian ini bertujuan mengekstrak DNA daripada ikan air tawar menggunakan dua kaedah; kaedah lisis secara fizikal yang melibatkan proses-proses mekanikal dan kaedah lisis secara kimia yang melibatkan enzim Proteinase K. DNA yang diekstrak daripada kedua-dua kaedah kemudian dianalisis dari segi kualiti dan kuantitinya menggunakan analisis elektroforesis gel agaros dan spektrofotometer UV. Kedua-dua kaedah lisis berupaya memencarkan DNA daripada ikan air tawar. Berdasarkan keputusan analisis elektroforesis gel agaros dan spektrofotometer UV yang diperolehi, didapati kualiti DNA yang diekstrak menggunakan kaedah lisis secara kimia adalah lebih baik berbanding kaedah lisis secara fizikal yang mana 9 sampel daripada kaedah lisis secara kimia mempunyai jalur DNA manakala hanya 7 sampel daripada kaedah lisis secara fizikal untuk elektroforesis gel agaros, dan dua sampel daripada kaedah lisis secara kimia ialah DNA tulen manakala hanya satu sampel kaedah lisis secara fizikal adalah DNA tulen bagi spektrofotometer UV. Kuantiti DNA yang diekstrak menggunakan kaedah lisis secara kimia juga lebih banyak berbanding kaedah lisis secara fizikal jika tidak berlaku kuantifikasi DNA yang berlebihan daripada nilai absorban $A_{260\text{nm}}$ spektrofotometer UV. Keputusan-keputusan ini menunjukkan bahawa pengekstrakan DNA menggunakan kaedah lisis secara kimia lebih baik berbanding kaedah lisis secara fizikal dari segi kualiti dan kuantiti DNA yang diperolehi.



ABSTRACT

The purpose of this research is to extract DNA from freshwater fish using two method; physically lysis which involves mechanical processes and chemically lysis which involves Proteinase K enzyme. The quality and quantity of DNA extracted from these methods then were analysed by using agarose gel electrophoresis analysis and UV spectrophotometer. Both lysis methods are able to isolate DNA from freshwater fish. Based on the results of agarose gel electrophoresis analysis and UV spectrophotometer, DNA quality extracted using chemically lysis method is better compare to physically lysis method, where 9 samples from chemically lysis has band while only 7 samples from physically lysis method for agarose gel electrophoresis, and two samples from chemically lysis method are pure DNA while only one sample from physically lysis method is pure DNA for UV spectrophotometer. DNA quantity extracted from chemically lysis method also more than DNA quantity extracted from physically lysis method if no overquantitation of DNA occur from the absorbance $A_{260\text{nm}}$ UV spectrophotometer. These results show that DNA extraction by using physically lysis method gives better result for DNA quality and quantity compare to physically lysis method.



SENARAI KANDUNGAN

	Muka Surat
PENGAKUAN	ii
PERAKUAN PEMERIKSA	iii
PENGHARGAAN	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
SENARAI KANDUNGAN	vii
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	x
SENARAI SINGKATAN DAN SIMBOL	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Pengenalan	1
1.2 Objektif	2
BAB 2 ULASAN PERPUSTAKAAN	3
2.1 Ikan Air Tawar di Sabah	3
2.2 Asid Deoksiribonukleik (DNA)	5
2.3 Pengekstrakan DNA	6
2.4 Kuantitasi DNA	7
2.4.1 Spektrofotometer UV	7
2.4.2 Elektroforesis Gel	9
BAB 3 METODOLOGI	11
3.1 Persampelan	11
3.2 Pengekstrakan DNA	13
3.2.1 Kaedah Lisis secara Fizikal	13



3.2.2	Kaedah Lisis secara Kimia	14
3.3	Kuantifikasi DNA (Spektrofotometer UV)	15
3.4	Visualisasi DNA (Elektroforesis Gel Agaros)	18
BAB 4 KEPUTUSAN DAN ANALISIS DATA		20
4.1	Jalur DNA pada Gel Agaros hasil daripada Kaedah Lisis secara Fizikal	20
4.2	Jalur DNA pada Gel Agaros hasil daripada Kaedah Lisis secara Kimia	23
4.3	Nilai bacaan Spektrofotometer bagi kaedah lisis secara fizikal	26
4.4	Nilai bacaan Spektrofotometer bagi kaedah lisis secara kimia	28
BAB 5 PERBINCANGAN		32
5.1	Pengekstrakan DNA Ikan	32
5.1.1	Kaedah Lisis secara Fizikal	32
5.1.2	Kaedah Lisis secara Kimia	35
5.2	Nilai Bacaan Spektrofotometer UV	38
5.3	Elektroforesis Gel Agaros	40
5.4	Perbandingan Kepekatan DNA dan Purata kepekatan DNA bagi kedua-dua kaedah lisis	42
5.4.1	Elektroforesis Gel Agaros	42
5.4.2	Spektrofotometer UV	43
BAB 6 KESIMPULAN		44
RUJUKAN		46
LAMPIRAN		50



SENARAI JADUAL

No. Jadual	Muka Surat
3.1 Senarai spesies sampel ikan air tawar.	12
4.1 Intensiti jalur DNA dan kepekatan akhir setiap sampel bagi kaedah lisis secara fizikal.	24
4.2 Intensiti jalur DNA dan kepekatan akhir setiap sampel bagi kaedah lisis secara kimia.	25
4.3 Bacaan absorban $A_{260\text{nm}}$ dan $A_{280\text{nm}}$ serta jumlah keseluruhan kepekatan akhir DNA sampel bagi kaedah lisis secara fizikal.	27
4.4 Bacaan absorban $A_{260\text{nm}}$ dan $A_{280\text{nm}}$ serta jumlah keseluruhan kepekatan akhir DNA sampel bagi kaedah lisis secara kimia.	28
4.5 Kualiti DNA sampel berdasarkan nilai $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$	30
4.6 Jumlah keseluruhan kepekatan dan nilai purata kepekatan DNA bagi elektroforesis gel agaros dan spektrofotometer daripada kedua-dua kaedah lisis.	31



SENARAI RAJAH

No. Rajah	Muka Surat
4.1 Jalur DNA daripada kaedah lisis secara fizikal.	20
4.2 Jalur DNA daripada kaedah lisis secara kimia.	23

**UMS**

SENARAI SINGKATAN DAN SIMBOL

μL	mikroliter
ml	mililiter
μg	mikrogram
mg	miligram
g	gram
DNA	asid deoksiribonukleik
r.p.m	<i>rotation per minute</i>
%	peratus
mM	milimolar
M	molar
$^{\circ}\text{C}$	darjah Celsius
Mg^{2+}	ion magnesium
Ca^{2+}	ion kalsium
V	Volt
bp	<i>base pair</i>
<i>Hind</i> III	enzim yang diperoleh daripada bakteria <i>Haemophilus influenzae</i>
MgCl_2	magnesium klorida
NaCl	natrium klorida
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
HCl	asid hidroklorik
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 PENGENALAN

Ikan merupakan vertebrat yang mempunyai julat kepelbagaian yang paling luas (Russell, 2003). Hampir separuh daripada bilangan keseluruhan vertebrata adalah terdiri daripada ikan. Daripada 39,900 spesies vertebrata yang dikenal pasti di seluruh dunia, sebanyak 21,723 merupakan spesies ikan yang mana 8411 adalah spesies ikan air tawar (Jayaram, 1999). Namun, secara amnya, bilangan spesies ikan air tawar kurang diketahui berbanding kumpulan-kumpulan taksonomi lain seperti burung dan mamalia (Earth Trend, 2003).

Selain digunakan sebagai sumber makanan dan haiwan peliharaan, ikan juga sering digunakan sebagai model penyelidikan dalam eksplorasi dan manipulasi biologi asas kerana kepelbagaianya dari segi genotip dan fenotip. Kajian ke atas DNA ikan membolehkan penyakit pada ikan yang disebabkan oleh virus dapat dikesan. Antara virus



tersebut adalah *Walleye dermal sarcoma virus* (WDSV) dan *Walleye epidermal hyperplasia virus* (WEHV) yang mula dikesan pada ikan air tawar daripada Tasik Oneida di New York apabila simptom-simptom penyakit ini dijumpai oleh Walker (Holzschu *et al.*, 2003). Penemuan retrovirus eksogenous *snakehead fish retrovirus* (SnRV) pada spesies ikan *Ophichthophalus striatus* (Hart *et al.*, 1996) dan retrovirus endogenous daripada ikan *Zebrafish*, *Dario rerio* (Ching dan Steiner, 2003) memerlukan kajian lanjut ke atas DNA spesies ikan air tawar lain memandangkan penternakan ikan air tawar merupakan salah satu industri yang penting di Malaysia amnya dan di Sabah khususnya. Maka, kualiti yang baik dan kuantiti DNA yang diekstrak daripada sampel ikan amatlah penting bagi tujuan penyelidikan ini.

1.2 OBJEKTIF KAJIAN

1. Mengekstrak DNA daripada beberapa spesies ikan air tawar menggunakan kaedah lisis secara fizikal dan kaedah lisis secara kimia/enzim.
2. Menentukan kualiti dan kuantiti DNA dari beberapa spesis ikan air tawar dengan menggunakan analisis spektrofotometer UV dan elektroforesis gel agaros.

Dalam kajian ilmiah ini, kedua-dua kaedah lisis digunakan untuk menilai keefisienannya bagi mendapatkan hasil yang terbaik dengan membandingkan hasil dari segi kualiti dan kuantiti DNA yang diperolehi bagi kedua-dua kaedah lisis.



UMS
UNIVERSITI
MALAYSIA
SABAH

BAB 2

ULASAN PERPUSTAKAAN

2.1 Ikan Air Tawar di Sabah

Ikan merupakan salah satu sumber protein yang paling murah utama dalam diet pemakanan penduduk negeri Sabah (Inger dan Chin, 1990). Sungguhpun keluasan Sabah hanya merangkumi kira-kira satu per sepuluh daripada keluasan Pulau Borneo, lebih daripada satu pertiga spesies ikan air tawar di Borneo diketahui terdapat di Sabah (Nyanti, 1995) yang didominasi oleh famili ikan ostariophysi (*cyprinids* dan *siluroids*) dan relatifnya (Inger dan Chin, 1990).

Dokumentasi bagi majoriti spesies ikan yang ditemui di Sabah bermula hasil daripada tinjauan awal oleh Leon Vaillant pada tahun 1983 serta Weber dan de Beaufort pada tahun 1913-1922 (Rahim *et al.*, 2002). Pada tahun 1962, kajian komprehensif tentang ikan air tawar di Sabah telah dilakukan oleh Inger dan Chin yang merangkumi 141 spesies ikan air tawar (Inger dan Chin, 1990).



Pada tahun 1990, Chin melaporkan bilangan spesies ikan air tawar yang dikenal pasti di Sabah adalah sebanyak 155 spesies, termasuk 3 subspesies dan 12 spesies ikan yang diimport untuk tujuan pengkulturan ikan (Inger dan Chin, 1990). Pada tahun 2002 pula, bilangan ikan air tawar di Sabah dilaporkan sebanyak 168 spesies yang mana 62 spesies ikan bersifat endemik di Borneo, 29 spesies bersifat endemik di Sabah manakala 16 spesies lagi adalah spesies ikan yang diimport untuk tujuan pengkulturan ikan (Inger dan Chin, 1990).

Terdapat beberapa spesies ikan yang direkodkan oleh Inger dan Chin bersifat endemik di Sabah. Antaranya adalah spesies ikan dari famili *Gastromyzon* (6 spesies), *Glariopsis* (4 spesies) dan *Protomyzon* (4 spesies) yang ditemui di sungai-sungai pergunungan, terutamanya di Taman Kinabalu; serta spesies *Elxis sabamus*, dari Mendolong, Sipitang. Beberapa spesies khususnya *cyprinids* mempunyai potensi untuk dikomersialkan manakala spesies daripada genus *Nematabramis* dan *Puntius* pula telah sekian lama didagangkan sebagai ikan perhiasan (Rahim *et al.*, 2002).

Kepelbagaiannya spesies ikan air tawar di sungai-sungai negeri Sabah tersebar secara seragam kecuali di bahagian timur dan barat daya negeri ini. Namun, pengagihan dan komposisi spesies ikan pada sesuatu habitat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kebolehdapatan makanan, kawasan pembiakan, aliran air, kedalaman, topografi dan keadaan kimia air. Ikan yang mendiami kawasan sungai beraliran deras cenderung untuk tidak menunjukkan variasi yang banyak akibat daripada kepelbagaiian sumber makanan yang sedikit dalam kawasan tersebut (Nyanti, 1998).

Oleh kerana kawasan pedalaman Sabah terletak jauh dari laut maka pengkulturan ikan air tawar menjadi penting di kawasan ini bagi membekalkan sumber protein. Pengkulturan ikan air tawar menjadi penting di kawasan pedalaman sejak Perang Dunia kedua lagi. Kolam-kolam ikan tertumpu pada kawasan Tenom, Keningau, Tambunan, dan Ranau, dan biasanya dibina berhampiran atau di pinggir sungai yang mana air mudah diperolehi (Inger dan Chin, 1990). Ikan yang diperolehi daripada kolam ikan air tawar mempunyai rasa yang lebih kurang sama dengan dengan ikan laut.

Statistik daripada Jabatan Perikanan menunjukkan pada hujung tahun 2000, Sabah mempunyai 16,475 kolam ikan air tawar yang meliputi 1,491 hektar kawasan Jumlah pengeluaran ikan air tawar dari kolam-kolam ikan air tawar ini adalah 5,220 tan (Inger dan Chin, 1990).

2.2 Asid Deoksiribonukleik (DNA)

Asid deoksiribonukleik (DNA) merupakan sistem penyimpanan maklumat dalam semua sel. Sebagaimana yang dicadangkan oleh Watson dan Crick pada tahun 1953, DNA terdiri daripada dua rantai jujukan bes yang membentuk struktur heliks.

Sumber DNA boleh diperoleh daripada rambut, najis, air kencing, bulu pelepah dan kulit telur. Namun, kuantiti DNA yang diperoleh daripada sumber-sumber ini adalah sedikit manakala kualiti DNanya pula rendah. Ini boleh menyebabkan potensi DNA tersebut untuk kajian seperti pengenalpastian individu terhad (Wasko *et al.*, 2003). Oleh



itu, penggunaan tisu (darah, kulit, sisik dan otot) yang tidak rosak sebagai sumber DNA amat penting agar ia dapat dieksplotasi untuk analisis DNA, termasuklah pengenalpastian individu dan jantinanya serta pengenalpastian tahap polimorfisma genetik di dalam dan di antara populasi (Taberlet *et al.*, 1999).

Bagi ikan, hati dan tisu otot merupakan sumber DNA yang paling lazim digunakan. Namun, sumber ini sebenarnya kurang efektif bagi spesies ikan yang bersaiz kecil. Oleh itu, alternatif telah dilakukan oleh Wasko dan rakan-rakannya (2003) dengan menggunakan sisik dan sirip untuk mendapatkan DNA ikan. Strategi ini berkesan hasil daripada penggunaan larutan penimbal yang mengandungi kepekatan urea (sebagaimana yang dicadangkan oleh Asahida *et al.*, 1996) yang tinggi dan seterusnya penulenan DNA menggunakan fenol:kloroform seperti yang dicadangkan oleh Taggart *et al.* (1992).

2.3 Pengekstrakan DNA

Proses pengekstrakan DNA daripada sel adalah langkah pertama bagi kebanyakan prosedur makmal dalam bioteknologi. Kaedah pengekstrakan asid nukleik (tertakluk pada sumbernya) melibatkan pengambilan sel atau tisu, pemecahan dinding luar sel dengan menggunakan enzim dan/atau detergen, pemisahan asid nukleik daripada biomolekul-biomolekul lain dan debris selular, dan pemekatan dan/atau pengeringan asid nukleik (Burden dan Whitney, 1995).

Kaedah yang digunakan untuk memisahkan DNA daripada bahan-bahan yang tidak diingini mestilah cukup lembut agar DNA tersebut tidak rosak. Terdapat beberapa kaedah yang boleh digunakan untuk tujuan pengekstrakan DNA, antaranya kaedah lisis secara fizikal dan kaedah lisis secara kimia. Kaedah lisis secara fizikal melibatkan proses-proses mekanikal yang mana tisu sampel dihancurkan secara fizikal untuk mengeluarkan DNA dari sel sampel berkenaan. Kaedah lisis secara kimia pula melibatkan penggunaan enzim protease untuk memecahkan membran sel sampel bagi mengeluarkan DNA sampel berkenaan.

2.4 Kuantitasi DNA

Penganggaran kepekatan DNA yang betul amat penting untuk pelbagai aplikasi dalam biologi molekul. Lazimnya, kuantitasi DNA dilakukan melalui dua cara iaitu penganggaran secara spektroskopik dengan menggunakan absorban pada panjang gelombang 260nm (A_{260}) (Giache *et al.*, 1994) atau melalui analisis gel agaros (Sauer *et al.*, 1998).

2.4.1 Spektrofotometer UV

Spektroskopi UV boleh digunakan untuk menentukan kuantiti DNA yang hadir dalam sampel kerana asid-asid nukleik dan protein mempunyai absorban spektra yang berbeza antara satu sama lain. Secara umumnya, prinsip yang digunakan dalam spektrofotometer adalah menghitung kesan sampel ke atas alur cahaya (Seidman dan Moore, 1995). Bahan

yang berlainan berbeza antara satu dengan yang lain dari segi panjang gelombang cahaya yang diserap oleh bahan tersebut. DNA dan RNA menyerap cahaya UV dengan absorban yang maksimum pada 260 nm manakala protein menyerap cahaya ultra lembayung secara maksimum pada 280 nm (Winfrey *et al.*, 1997). Struktur aromatik purine dan pirimidine yang membina bes nukleosida bes bagi DNA dan RNA bertanggungjawab terhadap absorban ultra lembayung pada 260 nm (PrathapKumar dan Sureshkumar).

Nisbah $A_{260}:A_{280}$ sering digunakan untuk menentukan kontaminasi protein atau pun RNA. Nilai di antara 1.8-2.0 menunjukkan DNA sampel adalah tulen. Jika nilai nisbah $A_{260}:A_{280}$ lebih daripada 2.0, ia menunjukkan DNA mengalami kontaminasi daripada RNA manakala nilai nisbah yang kurang daripada 1.8 menunjukkan kehadiran protein (Winfrey *et al.*, 1997).

Walaupun kaedah spektroskopi ini merupakan kaedah yang lazim digunakan, namun ia masih mempunyai kelemahan. Amaun DNA yang banyak amat diperlukan bagi analisis spektroskopik. Selain itu, penganggaran secara spektrofotometrik tidak dapat tidak dapat membezakan antara DNA dan RNA, maka kontaminasi RNA boleh menyebabkan DNA menghadapi masalah kuantitasi yang berlebihan (Sauer *et al.*, 1998). Garam-garam yang merupakan bahan-bahan kontaminasi DNA juga boleh menyebabkan penganggaran kepekatan DNA meningkat. Kaedah ini juga tidak dapat membezakan antara bebenang tunggal dan ganda dua DNA dalam larutan (Haque *et al.*, 2003). Kaedah A_{260} tepat jika sampel cukup tulen dan amaun yang mencukupi diperolehi. Walau bagaimanapun, teknik ini kurang memuaskan bagi pengesanan bebenang ganda dua DNA

kerana ia tidak dapat membezakan nukleotida, bebenang tunggal DNA, setengah-setengah bahan kontaminasi dan RNA (Giache *et al.*, 1994). Bagi bebenang ganda dua DNA, pemilihan kaedah untuk menganggarkan DNA tersebut bergantung kepada beberapa faktor yang perlu dipertimbangkan iaitu sensitiviti, diskriminasi, keperluan khas penyelidikan dan kos (Rengarajan *et al.*, 2002)

2.4.2 Elektroforesis Gel

Elektroforesis DNA telah menjadi teknik dominan dalam biologi molekul selama 30 tahun yang mana prinsipnya adalah berasaskan beberapa prinsip elektrokimia ringkas. Dalam tempoh 30 tahun ini, media konduktif biasa bagi elektroforesis DNA masih kekal digunakan dan tidak berubah, iaitu Tris sebagai kation utama. Elektroforesis DNA bergantung pada cas negatif pada kumpulan fosfat DNA dan keupayaan pengagihan kecerunan voltan dalam matriks penapisan. Selain itu, pemilihan voltan, arus elektrik, konduktiviti, suhu serta kepekatan dan jenis ion yang hadir turut mempengaruhi sifat-sifat konduktif elektroforesis DNA (Brody dan Kern, 2004).

Proses pemisahan dicapai dalam elektroforesis apabila wujudnya perbezaan relatif kadar pergerakan komponen-komponen bercas sampel melalui medium seragam yang dikenakan medan elektrik tetap (Ahmad dan Khadum, 1992). Pemilihan matriks pemisahan, saiz liang (kepekatannya), dan medium konduktif yang digunakan juga adalah ciri-ciri yang amat penting untuk memisahkan DNA berdasarkan saiznya manakala kekuatan medan elektrik akan menentukan pergerakan ion-ion dalam larutan, arus yang

dihasilkan dan pergerakan DNA yang bercas negatif (Brody dan Kern, 2004). Selain itu, sifat-sifat larutan penimbal elektroforesis seperti pH, kekuatan ion dan komposoisinya turut mempengaruhi keupayaan elektroforesis (Liu *et al.*, 1999).

Terdapat dua jenis larutan penimbal bagi elektroforesis iaitu larutan penimbal Tris-acetate-EDTA (TAE) dan Tris-borat-EDTA (TBE). Larutan TAE merupakan larutan yang sering digunakan untuk elektroforesis DNA (Masek *et al.*, 2004). Ujian melalui arus, penghasilan suhu dan resolusi gel menunjukkan bahawa TBE adalah medium konduktif yang lebih baik berbanding TAE. Namun, pemisahan fragmen-fragmen besar DNA yang dilakukan oleh ion asetat adalah lebih baik berbanding ion borat. Oleh kerana itu, setengah-setengah penyelidik cenderung menggunakan TAE bagi resolusi fragmen-fragmen besar DNA manakala TBE digunakan untuk fragmen-fragmen DNA yang lebih kecil (2 kb dan ke bawah) (Brody dan Kern, 2004).

Poliakrilamida, agaros dan kanji ialah jenis-jenis gel yang digunakan untuk elektroforesis (Ahmad dan Khadum, 1992). Elektroforesis gel agaros adalah kaedah piawai yang digunakan untuk menganalisis molekul DNA yang lebih besar daripada 200 pasangan bes. DNA dalam buffer alkali bercas negatif akibat kumpulan fosfatnya. Oleh itu DNA akan berhijrah dari katod ke anod dalam medan elektrik apabila elektrik dikenakan. Penghijrahan DNA ini dipengaruhi oleh beberapa faktor iaitu saiz DNA, kepekatan DNA, kepekatan agaros, dan kekuatan medan elektrik (Brody dan Kern, 2004).



BAB 3

METODOLOGI

3.1 Persampelan

Sampel ikan diperoleh dari beberapa tempat di Keningau dan di sekitar bandaraya Kota Kinabalu. Antaranya adalah:

1. Anak sungai di Kg. Biah Tengah, Keningau iaitu sebanyak empat sampel.
2. Kolam penternakan ikan air tawar persendirian di Keningau iaitu sebanyak tiga sampel.
3. Pasar Minggu (Tamu) Keningau iaitu sebanyak dua sampel.
4. Pasar Minggu (Tamu) di Kota Kinabalu iaitu sebanyak satu sampel.

Sampel-sampel yang diperoleh dari Keningau disimpan di dalam kotak ais sepanjang perjalanan dari Keningau ke Kota Kinabalu untuk menjaga kesegaran ikan. Selepas itu, sampel-sampel tersebut disimpan di dalam peti sejuk yang bersuhu -80°C di Makmal Biokimia Tumbuhan, Sekolah Sains dan Teknologi. Sebanyak sepuluh spesies ikan air tawar telah digunakan dalam kajian ilmiah ini sebagai sampel kajian. Nama tempatan dan



nama saintifik bagi setiap spesies ikan adalah berdasarkan maklumat daripada Inger dan Chin (1990) dan Jayaram (1999) dan dinyatakan di dalam Jadual 3.1 dan gambar-gambar ikan air tawar ini dinyatakan dalam Lampiran 5-14.

No. sampel	Famili	Nama saintifik	Nama tempatan	Lokasi sampel diperolehi
S 1	Cyprinidae	<i>Puntius sealei</i>	Turungau	1
S 2	Anabantidae	<i>Trichogaster trichopterus</i>	Sepat-sepat	1
S 3	Cyprinidae	<i>Nematabramis everetti</i>	Dumpis	1
S 4	Anabantidae	<i>Trichogaster pectoralis</i>	Sepat siam	4
S 5	Anabantidae	<i>Anabas testudineus</i>	Karok	2
S 6	Mastacembelidae	<i>Mastacembelus armatus</i>	Lindung	3
S 7	Ophicephalidae	<i>Ophicephalus sp.</i>	Aruan	1
S 8	Cichlidae	<i>Tilapia mossambica</i>	Tilapia hitam	2
S 9	Cyprinidae	<i>Puntius bramoides</i>	Selap	3
S 10	Balitoridae	<i>Gasytromyzon punctulatus</i>	Rokot	2

Jadual 3.1 Senarai spesies sampel ikan air tawar .

- Lokasi sampel diperolehi: 1. Anak sungai di Kg. Biah Tengah, Keningau.
 2. Kolam penternakan ikan air tawar persendirian di Keningau. 3. Pasar Minggu (Tamu) Keningau. 4. Pasar Minggu (Tamu) di Kota Kinabalu.



3.2 Pengekstrakan DNA

Dua kaedah telah digunakan dalam kajian ini untuk melisiskan tisu ikan iaitu kaedah lisis secara fizikal dan kaedah lisis secara kimia.

3.2.1 Kaedah Lisis secara Fizikal

Bagi kaedah lisis secara fizikal, sebanyak 50 mg tisu ikan diambil daripada sampel dan dimasukkan ke dalam tiub mikroemparan. Sebanyak 600 μ l buffer pengekstrakan dimasukkan ke dalam tiub mikroemparan dan tisu dihancurkan menggunakan mikropestle. Ekstrak tisu kemudian dieram pada suhu 65°C selama lebih kurang satu jam atau sehingga tisu benar-benar hancur dan larut dalam larutan penimbang pengekstrakan TNES (Rujuk Lampiran 1- Penyediaan Larutan Penimbang Pengekstrakan TNES).

Sebanyak 200 μ l kalium asetat (5M) ditambah ke dalam sampel dan digoncang dengan kuat. Selepas itu, sampel dieramkan di dalam ketulan ais selama 5 minit. Kemudian, sampel diempar pada kelajuan 11,000 r.p.m selama 25 minit pada suhu 4°C. Supernatan dipindahkan ke dalam tiub mikroemparan yang baru dan sebanyak 400 μ l isopropanol 100 % dimasukkan ke dalam tiub tersebut. Larutan kemudian diempar pada kelajuan 11,000 r.p.m selama 15 minit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dengan berhati-hati untuk mengelakkan pelet turut terbuang bersama-sama supernatan. Pelet dibiarkan mengering. Selepas itu sampel DNA dieram dalam 500 μ l larutan TE pada suhu

RUJUKAN

- Ahmad, R., dan Khadum, A.H., 1992. *Kimia Analisis Kaedah Pemisahan*. Dewan Bahasa dan Pustaka, Kuala Lumpur.
- Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K., dan Nakayama, I., 1996. Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fisheries Science* **62**, 727-730
- Bergen, A.W., 2003. Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnology* **3**:20
- Brody, J.R., dan Kern, S.E., 2004. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **333**, 1-13
- Burden, B.W. dan Whitney, D.B., 1995. *Biotechnology Proteins to PCR, A Course in Strategies and Lab Technique*. Birkhauser, Bolton.
- Ching, H.S. dan Steiner, L.A., 2003. *Genome Structure and Thymic Expression of an Endogenous Retrovirus in Zebrafish*. Department of Biology. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Massachusetts.
- Dixon, M., dan Webb, E.C., 1979. *Enzymes*. N.Y.:Academic Press. Flournoy. New York.
- Dessauer, H.C., Cole, C.J., dan Haiher, M.S. 1995. Collection and storage of tissues. dlm: Hulls, D.M., dan Moritz, C. (eds.). *Molecular Systematics*, 2nd ed. Sunderland, Mass.:Sinauer.
- EarthTrends, 2003. Water Resources and Freshwater Ecosystems - Malaysia,. *EarthTrends Country Profiles*.

- Giache V, Pirami L, Becciolini A., 1994. A method for measuring microquantities of DNA. *J Biolumin Chemilumin* **9**, 229-32.
- Haque, K.A., Pfeiffer, R.M., Beerman, M.B., Struewing, J.P., Chanock, S.J., dan Bergen, A.W., 2003. Performance of high-throughput DNA quantification methods. *BMC Biotechnology* **3**, 20.
- Hart, D., Frerichs, G.N., Rambaut, A., Onions, D.E., 1996. Complete Nucleotide Sequence and Transcriptional Analysis of the Snakehead Fish Retrovirus. *Journal of Virology* **70**, 3606-3616.
- Holzschu, D., LaPierre, L.A, Lairmore, M.D., 2003. Comparative Pathogenesis of Epsilonretroviruses. *Journal of Virology* **77**, 12385-12391.
- Inger, R.F., dan Chin, P.K., 1990. The fresh-water fishes of North Borneo; [With supplementary chapter by P. K. Chin, 2002]. Sabah Zoological Society, Kota Kinabalu Sabah.
- Jayaram, K.C., 1999. *The Fresh Water Fishes of The Indian Region*. Narendra Publishing House. India.
- Liu, Q., Li, X., dan Sommer, S.S., 1999. pK-Matched Running Buffers for Gel Electrophoresis *Analytical Biochemistry* **270**, 112-122
- Masek, T., Vopalensky, V., Suchomelova, P., dan Pospisek, M., 2005. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry* **336**, 46–50
- Nyanti, L., 1995. Fish fauna of Sayap-Kinabalu Park, Sabah. m/s.189-199 dlmGhazally, I., and Laily, D., (eds). *A scientific Journey Through Borneo: Sayap-Kinabalu Park, Sabah*. Pelanduk Publication, Kuala Lumpur.

- Nyanti, L., 1998. Fish Fauna of Sayap Kinabalu Park, Sabah. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)*.
- Pinto, S.M., Fernandes-Matioli, F.M.C., dan Schlenz, E., 2000. DNA extraction from sea anemone (Cnidaria: Actiniaria) tissues for molecular analyses. *Genetics and Molecular Biology* **23**, 601-604.
- Poinar, H.N., Hoss, M., Bada, J.L., dan Palibo, 1996. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* **272**, 864-866.
- PrathapKumar, S., dan Sureshkumar, B.V., *Rapid and Simple Approach to Determine Nucleic Acid Purity by Ratio method (A260/280) using Bio-Spectrophotometer* ELICO LTD., B-90, A.P.I.E., Sanathnagar, Hyderabad, India.
- QIAGEN, 2002. For isolation of genomic DNA-free BAC, PAC, P1, and cosmid DNA. *Large-Construct Kit Handbook*. QIAGEN.
- Rahim, K.A.A., Long, S.M., Abang, F., 2002. A Survey of Freshwater Fish Fauna in The Upper Rivers of Crocker Range National Park, Malaysia. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation (ARBEC)*.
- Rengarajan, K., Cristol, S.M., Mehta, M., dan Nickerson, J.M., 2002. Quantifying DNA concentrations using fluorometry: A comparison of fluorophores. *Molecular Vision* **8**, 416-421.
- Russell, S.T, 2003, Evolution of intrinsic post-zygotic reproductive isolation in fish. *Ann. Zool. Fennichi* **40**, 321-329.
- Sauer, P., Müller, M., dan Kang, J., 1998. Quantitation of DNA, *Qiagen News Issue 2*, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany.
- Seidman, L.A., dan Moore, C.J., 1995. *Basic Lab Biotechnology*. Prentice Hall, USA.



- Taberlet, P., Waits, L. P., dan Luikart, G., 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* **14**, 323–327.
- Taggart, J. B., Hynes, R. A., Prodohol, P. A. dan Ferguson, A. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *J. Fish Biology* **40**, 963–965.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C., dan Foresti, F., 2003. Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* **138**, 161-165.
- Watson, J. D., dan Crick, F. H. C., 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737.
- Winfrey, M.R., Rott, M.A., dan Wortman, A.T., 1997. *Unraveling DNA: Molecular Biology for the Laboratory*. NJ: Prentice Hall.

