

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian dan Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan menggunakan DNA dari koleksi Aryani *et al.* (2019). Penelitian ini dilakukan dengan tahapan *Polymerase Chain Reaction*, Elektrofesis, *Sequencing*, dan Analisi data dengan Bioedit dan MEGA

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Pada penelitian ini populasi yang digunakan merupakan ayam KUB dengan menggunakan DNA koleksi Aryani *et al* (2019) sebanyak 10 sampel. DNA ayam tersebut berasal dari darah ayam pada sayap ayam KUB yang berasal dari Balitnak Ciawi Bogor

3.3 Waktu dan Lokasi

Pada Penelitian ini dilaksanakan selama kurun waktu tiga bulan pada bulan Februari 2023 hingga Mei 2023. Lokasi penelitian yaitu di Laboratorium Riset, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

3.4 Alat dan Bahan

Pada Penelitian ini menggunakan alat dan bahan seperti pada Tabel 3.1 dan 3.2

Tabel 3.1 Alat yang Digunakan

No	Nama Alat	Jumlah
1.	Sarung tangan medis	1 Paket
2.	Tip putih	1 Paket
3.	Tip kuning	1 Paket
4.	Tube 1,5 μ L	1 Paket

No	Nama Alat	Jumlah
5.	Plastik anti panas	1 Bungkus
6.	Parafilm	2 Gulung
7.	Mikropipet	2-3 Unit
8.	Vortex	1 Unit
9.	Botol duran 1 L	2 Unit
10.	Botol duran 250 ml	2 Unit
11.	<i>Hotplate</i>	1 Unit
12.	<i>Centrifuge</i>	1 Unit
13.	Mesin PCR	1 Unit
14.	Rak tube	3 Unit
15.	Seperangkat Mesin elektroforesis	1 Unit
16.	Cetakan well	1 Unit
17.	Transimulator UV	1 Unit
18.	<i>Freezer</i>	1 Unit
19.	Jerigen	1 Unit
20.	Mesin Spektronanodrop	1 Unit
21.	Gunting	1 Unit
22.	Software bioedit	1 Unit
23.	Software MEGA	1 Unit
24.	Laptop	1 Unit

Tabel 3 2. Bahan yang Digunakan

No	Nama Bahan	Jumlah
1.	Agarosa	3 gram
2.	Gel red	200 C
3.	Go taq green master mix	1 Paket
4.	Primer <i>forward</i> dan <i>reverse</i>	4 Unit
5.	ddH ₂ O	1 Paket
6.	Air aquades steril	2 L
7.	TBE 10 x	1 L

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Alat dan Bahan

Pada penelitian ini dipersiapkan alat dan bahan yang sesuai dengan kebutuhan yang dipergunakan untuk melakukan penelitian serta jumlahnya sesuai dengan keperluan.

3.5.2 Amplifikasi Ayam KUB

Pada amplifikasi ini dilakukan dengan menggunakan dua pasang primer (Primer 2 dan 3). Tahap awal Amplifikasi dilakukan dengan primer 2 dan 3 dengan 10 sampel ayam KUB. Amplifikasi PCR menggunakan Formula MIX PCR menggunakan GoTaq *Green Master Mix* 2x sebanyak 25 μL , yang ditambahkan 17 μL ddh₂O, ditambahkan 1 μL primer *forward*, 1 μL primer *reverse* kemudian tahapan selanjutnya yaitu masukkan 2 μL DNA *template*.

Rancangan dari Primer yang dipergunakan dalam penelitian ini berdasarkan Fauziah (2022) dan Hanifa (2022) seperti yang tercantum pada (Tabel 3.3)

Tabel 3.3 Pasangan Primer dan Suhu *Annealing*

No	Primer	Suhu Annealing	DNA Target
1.	F2. 5'-GGTGCTCACCAAGATGAAGG-3'(20) R2. 5'-TGGACGAGGACACTGCTCTG-3'(20)	60°C	963 bp
2.	F3. 5'-CTCGTCCAGGTGTATGAAGG-3'(20) R3. 5'-TGCACTTGGCATTCTCATC-3'(20)	58°C	934 bp

Tahap amplifikasi PCR dilakukan denaturasi: pertama atau awal pada suhu 95°C selama lima menit, diikuti melalui 35 siklus, denaturasi pada suhu 95°C selama tiga puluh detik, selanjutnya akan dilakukan *annealing* pada suhu 58-60°C selama 45 detik, dilanjutkan dengan tahap elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit, dan tahap terakhir yaitu tahap ekstensi pada 72 °C selama 5 menit.

```

1 ttgaaatcga ctgaggggag tgggcagcg tagaaagcga gaagatcga gaaaaaacg
61 gaa F1 gatctgctg caactacgg gaggggttg gactagagag tgggcctac
121 gct aggcagggg caaggggcg ggcctcttg gctagtccg gaggcgatt
181 cgg cggcactcg gtgtctgat tggctccag cgtctccga ggttccaga
241 gaagctaac cgtactata agagggcgg aggcctaac cggagatcg cgcgcagc
301 agagcaga agggggga ggaagctga ctggagcga gaagtact gggagcga
361 gtgctgact gaccaagag cctctctga cctctcggc aaagggccg ccatgycat
421 cgtatggc acccgtat PRIMER-1 cctctcggc catgccaag tggagctac
481 tgcacagc cagggaacc gaccacacc cagtatgtg gorttccag atacagcgg
541 cctcatcgg gctgtgcca agaaccaag ggcattgac ccccccaca ccatcttga
601 tgcacagc cctctcggc cagctatga taccacacc gtcagtcag actgaaga

721 tgaatgag acctcttc cagagagat c F2 g atgtccacc agatgaaag
781 gatgtgag gctctctg gaaaaagc ad R1 g gttatcacc tggcgtta
841 cttcaaac tcccagcgc aggcaccaca agatgctgc accatcac taactt
901 gatggtatt atcaatgag ccaagcagc tgcattgoc tatgctt R1 gaaagg
961 taccgggct ggaagaaga atgtgtcat cttgacttg gaggggcca cttttgatg
1021 gtctactt accattgag atgcatct tgggtgag tccacactg ggcaccaca
1081 cctagttgg gaggacttg acacccgat gtaaacctt tttgtgag agttcaagg
1141 taagcaca cgtgacaatg ctcacata ccaagcactg aggcctcgc gtaacgctt
1201 tgaagcgg aggcactc ctcacata ccaagcactg aggcctcgc gtaacgctt
1261 ctttggggc atgactct acatctcat cctctcggc cgtttgag aactcaatg
1321 gactcttc cgtgtacc tggagcag ggaagcgc ctgctgat ccaacttga
1381 taagggcag atccagaga ttgtgttg gggggcttc actcgtatc ctgaactca
1441 gaagtgtc caagtctt tcaagcga aggtgagc agagcactc atccagatg
1501 agctgtgtc tatgtcgg ctgtgcaag agctatctc atcaactca agctgaaaa
1561 tgtgaaagt ctgctctgt tggatgac cccctctgc R1 g agacacttg
1621 tggatgat actgtctca tcaagcga caccacact c R1 c aaacagac
1681 cttccacc tactcagaca ccagagcag tctctctga caagtatag aggc gaga
1741 gctatgca aaggacaaca actgtgtgg c R2 c tcaacgca tcccctcgg
1801 acccgtgag gttccgga tccagcgc t R2 g gatctaatg atctctgaa
1861 cgtcagct ctggaaga gtaagggaa g R2 g ataccctca ccaatgaca
1921 ggttcctt agcaaatg atattgacg tatgtaca gaagcaga aatcaaacg
1981 agagtgaa gccacagag ataggctgg agccaaagc tccctgag cgtactact
2041 caactgag cagcagtg agatgaaa actgaagga aagctcag accagacaa
2101 gcaagaatg ctgacaagt gccagaggt gatcagttg ctgacoga accagatgc
2161 agaaagaa gactgagc tccagaaa tccagag aaactctga accagatgt
2221 cacaactg taccagga tccagaaa tccagag aaactctga accagatgt
2281 tgaagaata gattaaaag PRIMER-3 tccagag aaactctga accagatgt
2341 tcttctgt atattttt ctaagttta agaaaagc tcttctga taacagatt
2401 tctctgtg gttgtata aagcaaatc taccagttg tggttgat aaagagag
2461 gcaactct cttataag ttgtaatg acaagtttg taactcga tacagctct
2521 tnatctgg atgttgtt ctgttaaat gctcttcta R2 c tccagag aaactctga
2581 cagtgcac gtttaagt atgtaggaa aaaaaact R2 c tccagag aaactctga
2641 caagtgcac tctggaat ttgttaata aataaact atttgggt cc

```

Gambar 3.1. Amplifikasi Gen HSP70 Pada Ayam Lokal Berdasarkan Sekuen Gen HSP70 *Gallus gallus* J02579 dengan Primer 2 dan 3 (Dokumentasi, Aryani et al ., 2022)

3.5.3 Elektroforesis

Pada proses elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 1,2-2%, dan diberi warna dengan menggunakan *Gel Red*. Sesuai dengan volume dari agarose. Terdapat untuk proses pembuatan dari agarose 1%, dengan menggunakan volume sebesar 100 ml, sebagai berikut: Timbang agarose 1 gram terlebih dahulu kemudian tahapan selanjutnya yaitu masukan ke dalam botol durham. Kemudian tahap berikutnya TBE 1x ditambahkan sebanyak 100 ml dan dihomogenkan terlebih dahulu. Panaskan agarose sampai agarose homogen dengan menggunakan magnetic stirer selama 10-15 menit atau hingga larutnya agarose serta TBE 1x , kemudian diamkan sampai suhu hangat pada kuku. Tambahkan *gel red* 3 μ L Penurunan suhu pada agarose dapat dipercepat dengan merendam botol duran ke dalam air dengan kondisi tidak terlalu panas, sehingga tidak akan menimbulkan kerusakan pada botol duran. Tunggu agar sampai hangat-hangat kuku, lalu tuangkan agarose pada cetakan agarose serta pasang bagian sisir pada bagian gel agarose, ditunggu agarose hingga membeku sempurna, sehingga agarose dapat untuk dipergunakan. Selanjutnya elektroforesis, pertama persiapkan yaitu alat elektroforesis kemudian, pastikan jika bagian kutub listrik positif dan negatifnya

Ridhwan Ahmad Karyana, 2023

IDENTIFIKASI SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) PADA GEN HEAT SHOCK PROTEIN 70 (HSP70) AYAM KUB (KAMPUNG UNGGUL BALITBANGTAN)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi

tidak tertukar. Kemudian masukan TBE1x ke dalam *chamber* hingga dapat merendam bagian agarose (kurang lebih 400-500 ml), lalu simpan gel agarose pada *chamber* dan pastikan sudah terendam oleh larutan TBE 1x. Tahap berikutnya yaitu dimasukkannya sampel yang telah dicampurkan *loading dye* dengan formulasi perbandingan pada sampel DNA (5): *loading dye* (1), 1 DNA *ladder* kemudian pada tahap akhir dilakukan *running* jika dilakukan dengan waktu 20-25 menit untuk besar volt 100, dan 45 menit untuk besar volt 50. Terdapat kriteria dari keberhasilan amplifikasi menggunakan metode PCR, sebagai berikut: bagian pita dari DNA dapat terlihat pada UV, ukuran pita pada ampikon sesuai dengan target, dan pita DNA tidak *smear*

3.5.4 Sequencing

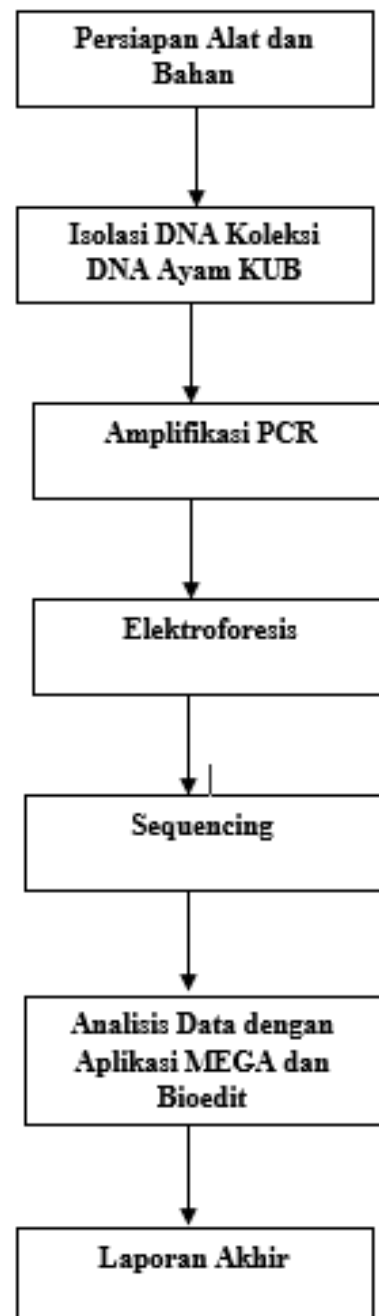
Berdasarkan hasil amplifikasi PCR dari 10 sampel ayam KUB, hanya dipilih 3 sampel terbaik untuk *disequencing*. Tahapan *sequencing* dilakukan dengan menggunakan tiga sampel dari ayam KUB dan paket pengurutan basa nukleotida dilakukan dengan mengirimkan hasil PCR ke *First BASE Laboratories* yang terletak di Selangor, Malaysia.

3.5.5 Analisis data

Hasil *sequencing* DNA ayam KUB dianalisis dengan Bioedit, kemudian di BLAST dengan data gen HSP70 pada ayam J09725, AY143691, AY143692, dan AY143693 kemudian, di *aligment* MEGA X

3.6 Alur Penelitian

Pada penelitian ini terdapat alur penelitian sebagai berikut (Gambar 3.2):



Gambar 3.2. Alur Penelitian
(Dokumentasi Pribadi, 2022)