

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian yang dilakukan termasuk penelitian dasar dengan metode penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif adalah metode penelitian yang bertujuan membuat gambaran secara sistematis, faktual dan akurat mengenai fakta, sifat serta hubungan antar fenomena yang diselidiki, sehingga metode ini berkehendak untuk mengadakan akumulasi data`dasar semata (Nazir, 1988: 64).

#### **B. Objek Penelitian**

DNA yang digunakan adalah DNA hasil isolasi Nurtikasari (2009) dan Pertiwi (2009) dari burung Familia Columbidae yaitu, merpati (*Columba livia*), puter (*Streptopelia bitorquata*), tekukur (*Streptopelia chinensis*) dan perkutut (*Geopelia striata*).

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilakukan mulai bulan April 2010 sampai Juli 2011 yang dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI Jalan Dr. Setiabudhi No.229 Bandung.

#### **D. Langkah Penelitian**

Urutan metode penelitian yang dilakukan sebagai berikut :

## 1. Tahap persiapan alat dan bahan

Sebelum melakukan penelitian, dilakukan persiapan alat dan bahan yang akan digunakan. Persiapan meliputi pembuatan bahan, pencucian botol-botol Duran, sterilisasi tabung mikrosentrifuga 1,5 ml dan tips, kalibrasi tips dan penataan letak bahan-bahan baik dalam lemari maupun di lemari es.

## 2. Penentuan jenis kelamin DNA kontrol

### a. Analisis secara anatomi

Penentuan jenis kelamin yang DNA-nya dijadikan kontrol pada penelitian ini dilakukan dengan melakukan identifikasi secara anatomi yaitu dengan pembedahan dan dilihat organ reproduksi jantan dan betina dari burung merpati tersebut.

### b. Isolasi DNA kontrol

Cara isolasi DNA kontrol dengan DNA sampel adalah sama yaitu menggunakan metode isolasi DNA dari darah Kusumawaty (2005) yang dimodifikasi. Hari pertama disiapkan sampel darah dari burung merpati (*Columba livia*) yang dijadikan sebagai kontrol sebanyak 300-500  $\mu$ L. Darah dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 mL dan ditambahkan *buffer* lisis 2x CTAB (Tris-HCl 1 M pH 8.0, NaCl 4 M, EDTA 0,5 M pH 8.0, air deion, SDS 10%,  $\beta$ -mercapethanol 20%, CTAB 2%) sebanyak 1x volume. Setelah itu, sampel diinkubasi dengan menggunakan *waterbath* pada suhu 65°C selama 1 jam. Selanjutnya, ditambahkan proteinase K sebanyak 10  $\mu$ L dan kemudian diinkubasi kembali pada *waterbath* dengan suhu yang sama selama 2 jam. Sampel diangkat

kemudian ditambahkan 5  $\mu$ L proteinase K. Dan tahapan terakhir pada hari pertama adalah sampel diinkubasi *overnight* dalam *waterbath* pada suhu 65°C.

Pada hari kedua, sampel diangkat dari *waterbath* dan ditambahkan potasium asetat 5 M sebanyak 1/10 volume total larutan, dikocok hingga homogen. Kemudian diinkubasi selama 20 menit pada *freezer* bersuhu -20°C. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatan yang dihasilkan dari sentrifugasi tersebut dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 mL baru dan dimurnikan dengan kloroform-isoamilalkohol (24:1 v/v) yang ditambahkan sebanyak ½ volume larutan. Kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak-balik sebanyak 50 kali hingga berwarna seperti susu, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 10 menit. Setelah itu, supernatan dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan sodium asetat 3 M sebanyak 1/10 volume larutan, kemudian dihomogenkan kembali dengan cara dibolak-balik sebanyak 50 kali. Akhir dari hari kedua yaitu dilakukan presipitasi DNA, ditambahkan etanol absolut sebanyak dua kali volume total larutan dan disimpan selama semalam pada suhu -20°C.

Untuk hari ketiga, sampel yang telah diinkubasi *overnight* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya etanol dibuang. Lalu dilakukan pencucian dengan alkohol 70% dingin, tunggu hingga pelet DNA kering. Setelah itu, ditambahkan TE sebanyak 100  $\mu$ L. Selanjutnya ditambahkan enzim RNase (bebas DNase) sebanyak 1/100 dari volume larutan. Larutan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C untuk mengoptimalkan kerja enzim. Stok DNA disimpan pada suhu -20°C untuk analisis lebih lanjut.

### 3. Karakterisasi DNA hasil isolasi

Sebelum DNA hasil isolasi tersebut dijadikan sebagai DNA *template* pada proses PCR, terlebih dahulu dilakukan karakterisasi secara kualitatif dengan cara elektroforesis. Sampel DNA dielektroforesis pada gel agarosa 1% dalam buffer TAE 1x selama 30 menit pada tegangan 100 volt.

Setelah proses elektroforesis selesai, pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan ethidium bromida (10 µg/mL) selama 7 menit kemudian dibilas dengan air deion selama 2 menit. Selanjutnya gel diamati menggunakan “UV-transiluminator” dengan panjang gelombang 512 nm dan didokumentasikan menggunakan kamera digital. Penanda ukuran DNA digunakan DNA *marker* yaitu DNA  $\lambda$  yang dipotong dengan enzim *EcoRI* dan *HindIII*.

### 4. Elektroforesis DNA sampel

DNA sampel yang digunakan adalah DNA hasil isolasi Nurtikasari (2009) dan Pertiwi (2009). Sampel DNA yang digunakan dikoleksi dari darah burung Familia Columbidae yaitu *Columba livia* (merpati), *Streptopelia chinensis* (tekukur), *Streptopelia bitorquata* (puter) dan perkutut (*Geopelia striata*) yang masing-masingnya terdiri dari 6 sampel.

### 5. Amplifikasi DNA burung Familia Columbidae dengan *primer sexing*

Tahapan optimasi kondisi PCR sebelumnya dilakukan untuk mendapatkan suhu dan konsentrasi bahan PCR yang tepat agar memperlancar proses amplifikasi selanjutnya. Optimasi kondisi PCR ini dilakukan dengan menggunakan primer P2

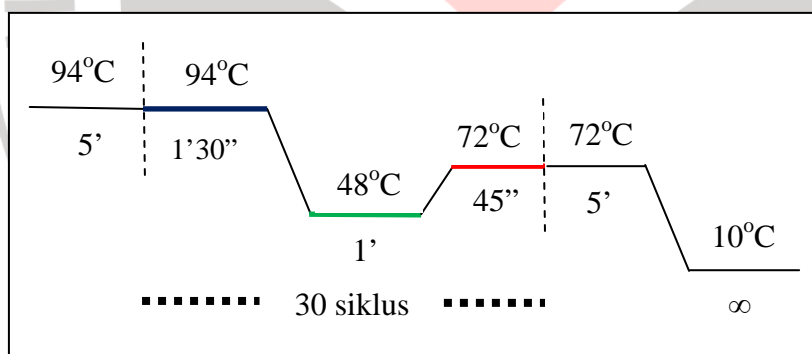
dan P8. Suhu PCR yang digunakan saat optimasi merupakan modifikasi dari Griffiths *et al* (1998). DNA yang digunakan adalah perwakilan dari keempat jenis burung anggota Familia Columbidae.

Selanjutnya, amplifikasi sampel DNA yang berasal dari merpati, perkutut, puter dan tekukur dilakukan dengan menggunakan *primer sexing*. *Primer sexing* yang digunakan adalah primer P2 dan P8. selanjutnya DNA akan diamplifikasi melalui proses PCR dengan kondisi berdasarkan metode Griffiths *et al* (1998) yang dimodifikasi. Dalam penelitian ini digunakan PCR kit 2X (Fermentas), volume larutan mix PCR yang dibuat yaitu sebanyak 50  $\mu$ L dalam tabung 0,2 mL yang terdiri dari DNA sebanyak 1  $\mu$ L, PCR kit 2X sebanyak 25  $\mu$ L *primer forward* (P8 5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3') dan *reverse* (P2 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') masing-masing 0,5  $\mu$ L serta *water nuclease free* sebanyak 23  $\mu$ L.

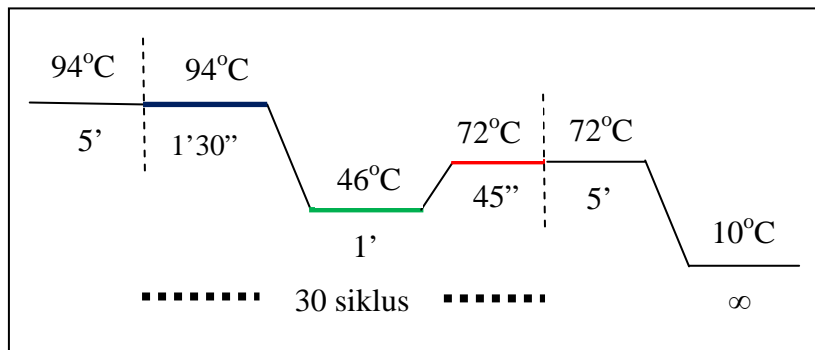
Semua bahan tersebut dicampurkan dalam tabung 1,5 mL secara berurutan, diawali dengan PCR kit 2X (Fermentas) dan *water nuclease free* kemudian dihomogenkan dengan cara dijentik-jentik. Tahapan yang terakhir yaitu dicampurkannya *primer forward* (P8 5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3') dan *reverse* (P2 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'). Setelah semua bahan dimasukan ke dalam tabung kemudian dihomogenkan dengan cara dijentik-jentik dan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 detik. Lalu disiapkan tabung-tabung 0,2 mL yang telah diberi kode sesuai sampel DNA yang digunakan. Kemudian campuran bahan yang telah homogen dimasukan ke dalam masing-masing tabung 0,2 mL yang telah berisi DNA sampel. Pembuatan

komponen reaksi PCR tersebut dilakukan dalam keadaan dingin untuk menjaga kinerja beberapa zat yang mudah rusak.

*Eppendorf Mastercycler Personal* merupakan alat yang digunakan untuk amplifikasi DNA sampel dan diprogram untuk beberapa kondisi, yaitu: tahap *pre denaturation* selama 5 menit pada suhu 94°C sebanyak 1 siklus, *denaturation* selama 1 menit 30 detik pada suhu 94°C, *annealing* selama 1 menit pada suhu 48°C pada sampel merpati; puter dan tekukur sedangkan pada perkutut pada suhu 46°C, *ekstension* selama 45 detik pada suhu 72°C. Ketiga tahap tersebut dilakukan sebanyak 30 siklus dan yang terakhir adalah tahap *post ekstension* selama 5 menit pada suhu 72°C sebanyak 1 siklus. Kondisi PCR lengkapnya dapat dilihat pada Gambar 3.1 dan 3.2.



**Gambar 3.1. Kondisi PCR primer sexing P2 dan P8. (a) Kondisi PCR pada DNA sampel *Columba livia* (merpati), *Streptopelia bitorquata* (puter) dan *Streptopelia chinensis* (tekukur) (Modifikasi Griffith *et al.*, 1998)**



**Gambar 3.2. Kondisi PCR primer *sexing* P2 dan P8. (b) Kondisi PCR pada DNA sampel *Geopelia striata* (perkutut) (Modifikasi Griffith *et al.*, 1998)**

## 6. Elektroforesis DNA hasil PCR

Sampel-sampel DNA yang telah diamplifikasi dengan menggunakan alat PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa. Sampel DNA dielektroforesis pada gel agarosa 3% dalam *buffer* TBE 1x selama 120 menit pada tegangan 50 volt. Setelah elektroforesis selesai, kemudian dilakukan pewarnaan DNA dengan cara merendam agar pada larutan ethidium bromida (10  $\mu\text{g/mL}$ ) selama 7 menit, kemudian dibilas dengan air deion steril selama 2 menit. Selanjutnya gel diamati pada "UV-Transluminator" dengan panjang gelombang 512 nm dan didokumentasikan menggunakan kamera digital Kodak EasyShare C813. Untuk penanda ukuran DNA hasil amplifikasi digunakan DNA *marker* yaitu *Ladder Mix Plus* (Fermentas).

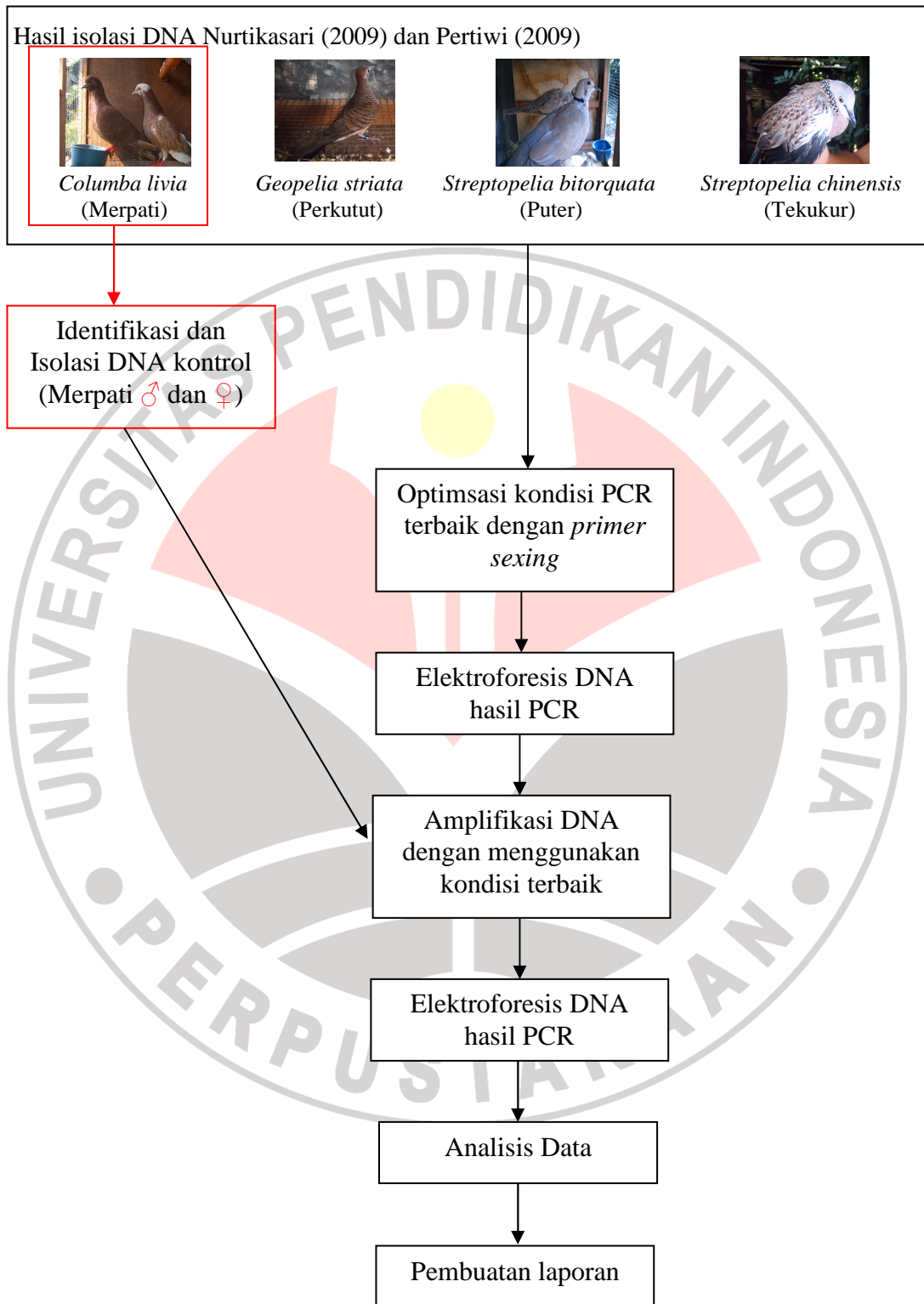
## 7. Analisis Data

Pada penelitian ini, larik yang dianalisis adalah larik yang hadir dan terlihat jelas oleh mata, tanpa memperhitungkan intensitasnya. Panjang larik DNA hasil amplifikasi *primer sexing* dihitung dengan berpatokan pada jarak migrasi standar (*marker*). Perhitungan ukuran larik DNA hasil amplifikasi dilakukan dengan mengukur perbandingan antara jarak migrasi standar (*marker*) dengan larik yang muncul.





## 8. Alur Penelitian



**Gambar 3.3. Alur Penelitian**