

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian dasar dengan metode deskriptif.

B. Objek Penelitian

Objek penelitian ini adalah sampel DNA koleksi hasil isolasi DNA darah dari: burung merpati (*Columba livia*), burung tekukur (*Streptopelia chinensis*), burung puter (*Streptopelia bitorquata*) dan burung perkutut (*Geopelia striata*) (Nurtikasari, 2009 dan Pertiwi, 2009).

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Agustus 2010 hingga Juni 2011.

2. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No. 229 Bandung.

D. Cara Kerja

1. Isolasi DNA darah

Materi DNA burung diekstraksi dari darah berdasarkan metode Kusumawaty (2005) yang dimodifikasi dan berhasil dicobakan untuk isolasi burung oleh Aryani & Kusumawaty (2009). Sebanyak 300-500 μ L darah diambil dari sampel burung yang digunakan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga ukuran 1,5 mL. Secara berturut-turut ditambahkan 500 μ L buffer lisis 2x CTAB (1 M Tris-HCl pH 8.0, 6 M NaCl, 0.5 M EDTA pH 8.0, air deion steril, CTAB 2%, SDS 2%, β -mercaptoethanol) dan dihomogenkan. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam pada *waterbath*. Setelah inkubasi, ditambahkan 10 μ L protease K, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 65°C selama 2 jam. Setelah inkubasi selesai, ditambahkan lagi 5 μ L protease K, dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 65°C selama satu malam.

Pada hari berikutnya, ditambahkan potassium asetat 5 M sebanyak 1/10 volume total larutan, dikocok hingga homogen, kemudian diinkubasi dalam *freezer* -20°C selama 20 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1.5 mL baru steril. Pemurnian DNA dilakukan dengan menggunakan bahan kloroform-isoamilalkohol (CIAA) (2:1 v/v) yang ditambahkan sebanyak 1/2 volume larutan. Kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak-balik sebanyak 50x hingga berwarna seperti susu, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 10 menit. Setelah itu supernatan dipindahkan ke dalam tabung yang baru, lalu ditambahkan sodium

asetat 3 M sebanyak 1/10 volume larutan. Campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 10 menit. Etanol dibuang secara hati-hati, kemudian dilakukan pencucian dengan alkohol dingin 70%, tunggu hingga pelet DNA kering. Setelah pelet DNA kering, ditambahkan TE sebanyak 100 μ 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.

2. Karakterisasi DNA hasil isolasi

Sebelum DNA hasil isolasi dijadikan sebagai DNA *template* pada proses PCR, 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. Pewarnaan DNA dilakukan dengan cara memindahkan gel agarosa pada larutan ethidium bromida sambil digoyang dengan menggunakan *shaker* selama 7 menit kemudian dibilas dengan akuades steril selama 2 menit. Selanjutnya gel diamati pada *UV-Transilluminator* dengan panjang gelombang 512 nm dan didokumentasikan menggunakan kamera digital.

3. Identifikasi burung merpati kontrol secara anatomi

Burung merpati kontrol yang telah diisolasi darahnya, kemudian dibedah sebagai data anatomi burung merpati kontrol. Apabila burung merpati mempunyai ovarium berarti burung tersebut burung betina dan jika burung merpati mempunyai testis berarti burung tersebut burung merpati jantan.

4. Pengukuran konsentrasi DNA sampel dengan spektrofotometer

Untuk mempermudah amplifikasi DNA sampel, terlebih dahulu dilakukan pengukuran konsentrasi DNA untuk memudahkan pada saat amplifikasi. Tabel 3.1 memperlihatkan konsentrasi DNA yang digunakan saat PCR.

Tabel 3.1 Konsentrasi DNA yang digunakan pada saat PCR beserta besar pengencerannya

Spesies	No.	Pengenceran DNA	[DNA] yang digunakan (ng/ul)
Kontrol	♂	5x	275
	♀	2x	200
Merpati (MI)	1	5x	240
	2	3x	208
	3	5x	215
	4	5x	265
	5	5x	215
	6	5x	235
Puter (PR)	1	5x	325
	2	2x	237
	3	5x	310
	4	5x	340
	6	5x	260
	7	10x	202
Perkutut (PT)	1	5x	260
	2	4x	212
	3	3x	225
	4	5x	200
	5	4x	218
	6	5x	200
Tekukur (TR)	1	5x	205
	2	2x	212
	3	3x	200
	4	7x	132
	5	3x	233
	6	3x	200

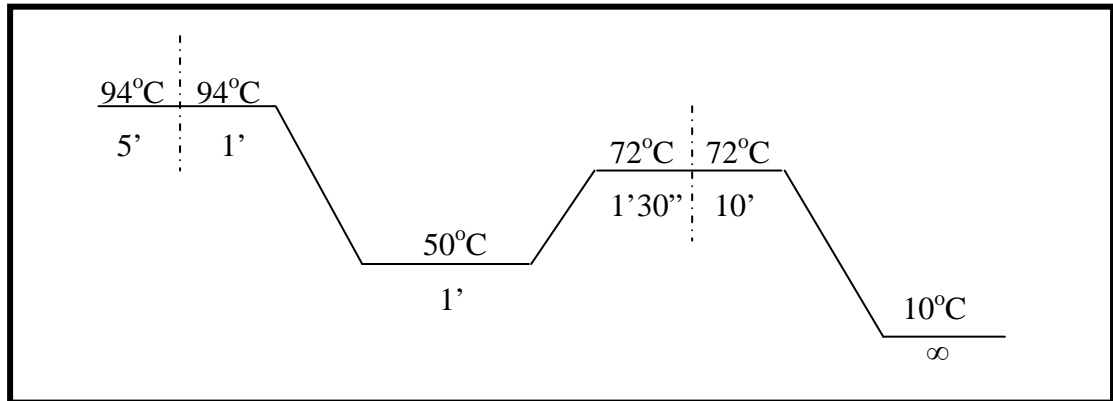
5. Amplifikasi DNA dengan primer spesifik betina TurSexOPAV17-F & TurSexOPAV17-R

Amplifikasi sampel DNA yang berasal dari darah burung merpati, perkutut, puter, dan tekukur dilakukan dengan menggunakan primer TurSexOPAV17-F (5'-GTC TCG TTT GCT AAC ACC TCC CTT G-3') & TurSexOPAV17-R (5'-ACT GAA GGG CAT TCC CAT GTC CAT C-3').

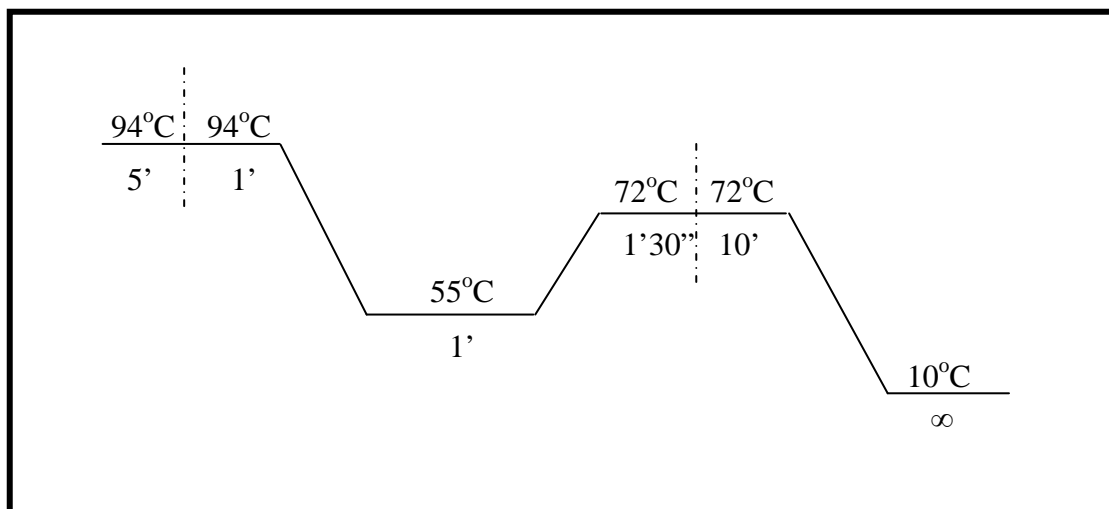
Sampel DNA diamplifikasi melalui proses PCR dengan komposisi yang terdiri atas: 25 µl PCR *master mix* (Fermentas) , 0,5 µL primer TurSexOPAV17-F, 0,5 primer TurSexOPAV17-R, dan 23 µL *waternuclease free*. Semua bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung PCR 0.5 mL secara berurutan, diawali dengan PCR *master mix*, primer, kemudian *waternuclease free*, lalu disentrifuge dengan kecepatan 10000 selama 15 detik. Kemudian ditambahkan 1 µL DNA sampel, sehingga volume total adalah 50 µL/sampel. Tabung PCR diberi kode sesuai sampel DNA yang digunakan. Pembuatan komponen reaksi PCR tersebut dilakukan dalam keadaan dingin untuk menjaga kinerja beberapa zat yang mudah rusak yaitu enzim *Taq polymerase*.

Amplifikasi dilakukan pada alat PCR *Eppendorf Master Cycler* yang diprogram untuk melakukan beberapa kondisi, yaitu: tahap pre denaturasi selama 5 menit pada suhu 94°C sebanyak 1 siklus, pemecahan rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal (*denaturation*) selama 1 menit pada suhu 94°C, tahap penempelan primer pada DNA *template* (*annealing*) selama 1-1 menit 30 detik pada suhu 50-55°C, tahap pembentukan *copy* DNA *template* yang diawali dari daerah primer (*extension*) selama 1 menit 30 detik – 2 menit pada suhu 72°C. Ketiga tahap

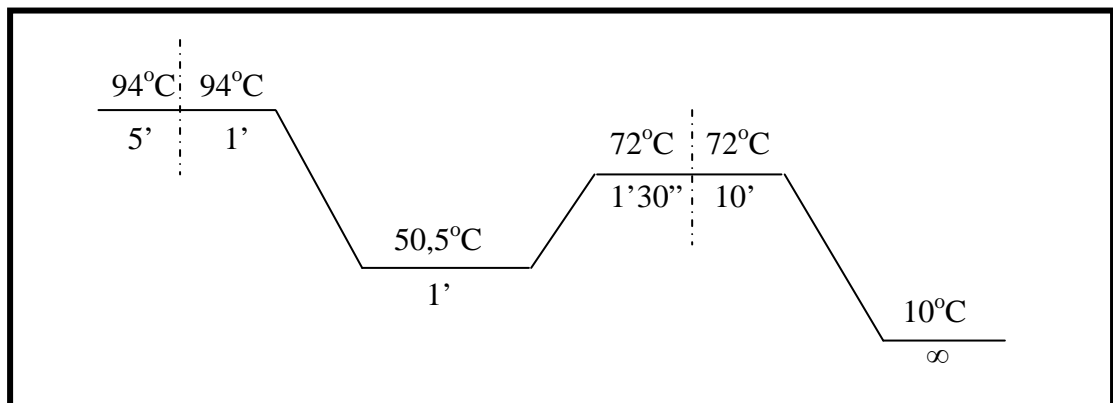
tersebut dilakukan sebanyak 35 siklus dan tahap *post extension* selama 10 menit pada suhu 72°C sebanyak 1 siklus. Agar terlihat lebih jelas perbedaan kondisi suhu pada saat PCR, ditampilkan pada Gambar 3.1, 3.2, 3.3 dan 3.4.



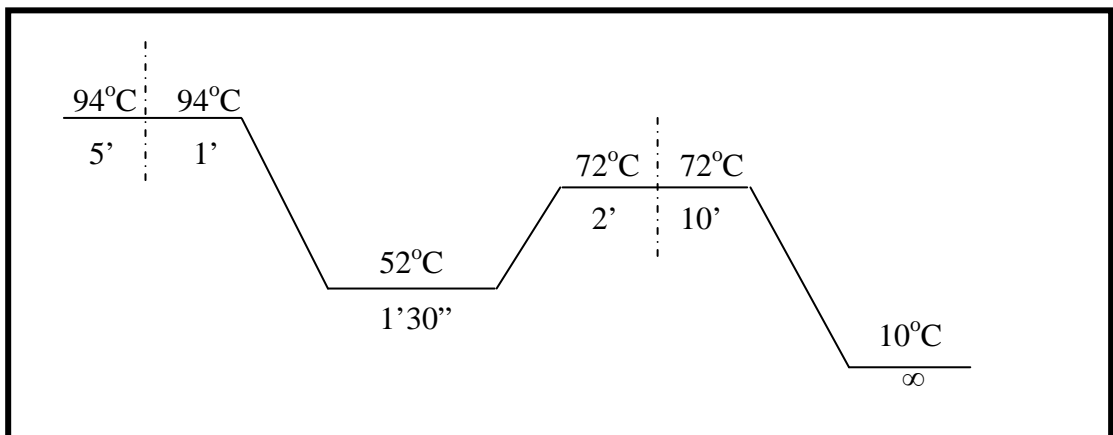
Gambar3.1 Profil suhu pada mesin PCR pada proses amplifikasi sampel DNA perkutut



Gambar3.2 Profil suhu pada mesin PCR pada saat proses amplifikasi sampel DNA merpati



Gambar3.3 Profil suhu pada mesin PCR pada saat proses amplifikasi sampel DNA puter



Gambar3.4 Profil suhu pada mesin PCR pada saat proses amplifikasi sampel DNA tekukur

Apabila DNA hasil amplifikasi belum sesuai dengan yang diharapkan, maka akan dilakukan amplifikasi ulang melalui proses PCR dengan primer yang sama pada seluruh sampel DNA untuk menentukan apakah fragmen spesifik tersebut merupakan target fragmen DNA spesifik yang terdapat pada sampel DNA burung hasil pengujian.

6. Elektroforesis DNA hasil PCR

Materi DNA yang telah diperbanyak melalui proses PCR selanjutnya dielektroforesis pada alat BIORAD *mini Sub Cell Power Pac Basic*. Sampel DNA dielektroforesis pada gel agarosa 2% dalam *buffer* TBE 1x selama 120 menit pada tegangan 50 volt. Sampel DNA sebanyak 5 uL dicampurkan dengan *loading dye* 2 µL dengan perbandingan 5:2 (v/v) kemudian dimasukkan ke dalam tiap sumur di dalam gel, selain itu dimasukkan pula marker *DNA Ladder Mix plus* “100 bp” (Fermentas) sebanyak 1,5 µL.

Pewarnaan DNA dilakukan dengan cara memindahkan gel agarosa pada larutan ethidium bromide (10 µg/mL) sambil digoyang dengan menggunakan *shaker* selama 7 menit kemudian dibilas dengan akuades selama 3 menit. Selanjutnya gel diamati pada *UV-transiluminator* dengan panjang gelombang 512 nm dan didokumentasikan menggunakan kamera digital.

7. Analisis data

Hasil amplifikasi DNA dengan menggunakan primer ini diinterpretasikan sebagai data kualitatif dengan cara melihat kehadiran atau ketidakhadiran pita DNA target. Fragmen DNA hasil amplifikasi yang telah dielektroforesis dan didokumentasikan, dihitung dengan menggunakan perbandingan *marker* yang disertakan pada saat elektroforesis sebagai acuan perhitungan jarak migrasi.

8. Alur penelitian

