

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian dasar dengan metode penelitian deskriptif.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika, Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

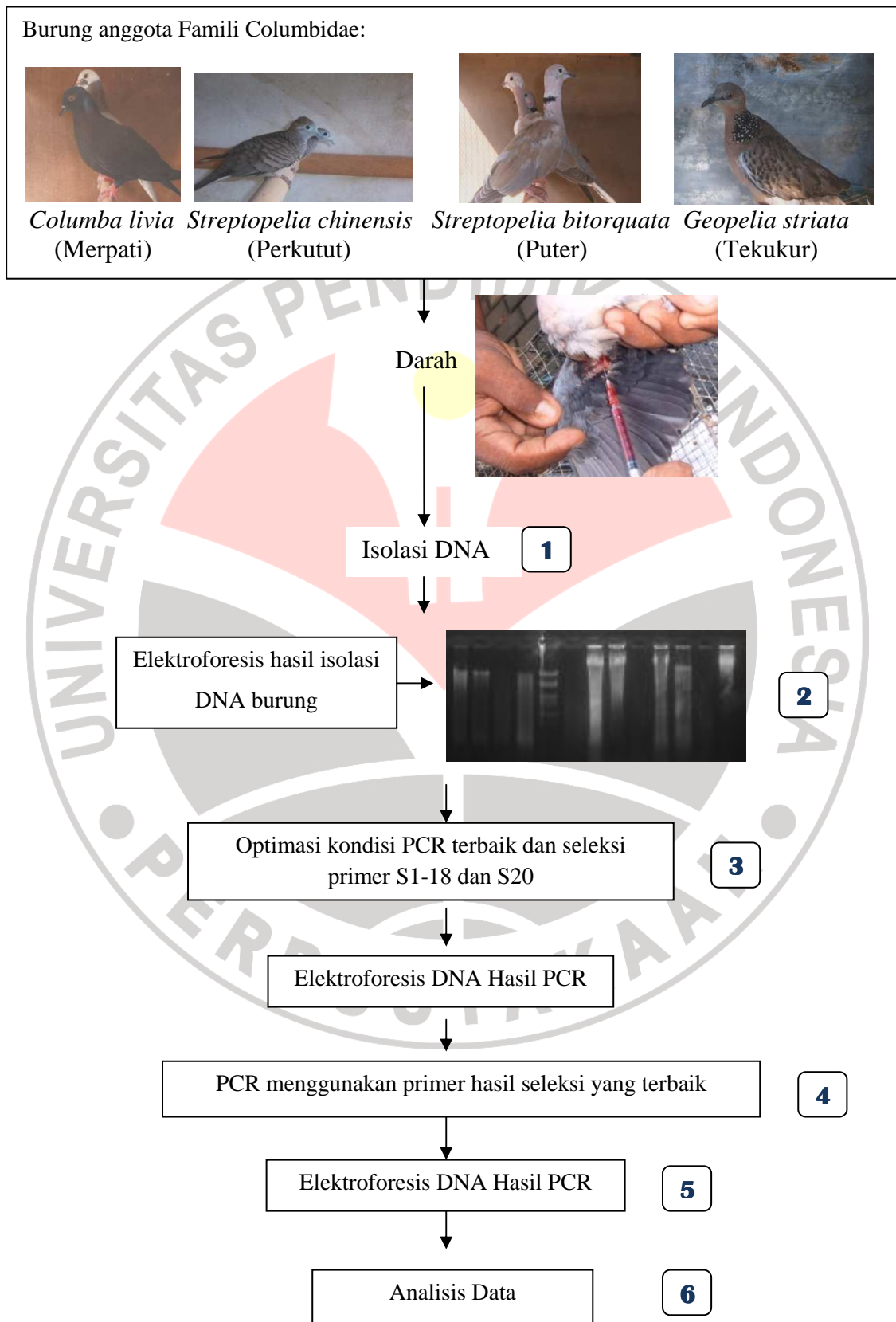
2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2008 sampai bulan September 2009.

C. Objek Penelitian

Sampel DNA yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari darah burung anggota Famili Columbidae, yaitu merpati (*Columba livia*), perkutut (*Geopelia striata.*), tekukur (*Streptopelia chinensis*) dan puter (*Streptopelia bitorquata*). Setiap jenis burung terdiri dari enam individu.

D. Alur Dan Metode Penelitian



Gambar 3.1. Alur Penelitian

1. Isolasi DNA

Metode isolasi DNA dari darah ini menggunakan metode Kusumawaty (2005) yang dimodifikasi. Pada hari pertama disiapkan sebanyak 300-500 μL sampel darah dari masing-masing anggota burung Famili Columbidae. Darah yang telah siap tersebut kemudian 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, SDS 10%, β -mercapethanol 20%, CTAB 2%) sebanyak 1x volume. Setelah itu, sampel diinkubasi pada *waterbath* pada suhu 65°C selama 1 jam. Selanjutnya, ditambahkan proteinase K sebanyak 10 μL dan kemudian diinkubasi kembali pada *waterbath* dengan suhu yang sama selama 2 jam. Sampel kemudian diangkat dan ditambahkan 5 μL proteinase K. Tahapan terakhir isolasi hari pertama adalah sampel diinkubasi *overnight* pada *waterbath* pada suhu 65°C .

Pada hari berikutnya (hari kedua), sampel diangkat dari *waterbath* dan ditambahkan potasium asetat 5 M sebanyak 1/10 volume total larutan, dikocok hingga homogen. Setelah itu diinkubasi selama 20 menit pada *freezer* suhu -20°C . Lalu disentrifugasi dengan kecepatan 15000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Setelah disentrifugasi akan dihasilkan supernatan, kemudian supernatan tersebut dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 mL baru dan dimurnikan dengan kloroform-isoamilalkohol (24:1 v/v) yang ditambahkan sebanyak 1/2 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 dalam tabung yang baru, lalu ditambahkan sodium asetat 3 M sebanyak 1/10

volume larutan. Campuran tersebut dihomogenkan kembali dengan cara dibolak-balik sebanyak 50x. Untuk akhir dari hari kedua dilakukan presipitasi DNA, ditambahkan etanol absolut sebanyak dua kali volume larutan lalu disimpan selama satu malam pada suhu -20°C .

Berikutnya untuk hari ketiga, sampel hasil inkubasi *overnight* disentrifugasi kembali dengan kecepatan 15000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya etanol dibuang. Kemudian dilakukan pencucian dengan alkohol dingin 70% dan setelah kering ditambahkan TE sebanyak 100 μL . Selanjutnya ditambahkan enzim RNase (bebas DNase) sebanyak 1/100 dari volume larutan, dan larutan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C untuk mengoptimalkan kerja enzim. Stok DNA disimpan pada suhu -20°C untuk selanjutnya menjadi DNA stok untuk analisis lebih lanjut.

2. Karakterisasi DNA Hasil Isolasi

Sebelum larutan DNA hasil isolasi dijadikan sebagai DNA cetakan 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. Setelah selesai elektroforesis, pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan ethidium bromida (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) selama 5 menit kemudian dibilas dengan akuades selama 3 menit. Selanjutnya gel diamati pada “UV-Transiluminator” dengan panjang gelombang 512 nm dan didokumentasikan menggunakan kamera digital. Untuk penanda

ukuran DNA hasil amplifikasi digunakan DNA *marker* yaitu DNA λ yang dipotong dengan enzim *EcoRI* dan *HindIII*.

3. Amplifikasi DNA untuk Optimasi dan Seleksi Primer RAPD

Tahapan optimasi kondisi amplifikasi dilakukan untuk mendapatkan suhu dan konsentrasi bahan PCR yang tepat agar memperlancar proses amplifikasi selanjutnya. Optimasi kondisi konsentrasi bahan PCR dilakukan dengan melakukan optimasi deoksinukleotida (dNTPs) mulai dari konsentrasi 200 μM dan 400 μM dan optimasi MgCl_2 dengan konsentrasi 2-8 mM. Optimasi kondisi PCR ini dilakukan dengan menggunakan primer yang disintesis oleh Invitrogen yang dipilih acak yaitu S14 dan menggunakan DNA darah burung merpati (sampel no.4). Suhu PCR yang digunakan saat optimasi merupakan modifikasi dari Williams *et al.* (1990).

Untuk mengamplifikasi sampel DNA yang berasal empat jenis burung anggota Famili Columbidae, dilakukan dengan menggunakan penanda RAPD. Seleksi primer dilakukan terhadap 19 dekamer primer set-S (Invitrogen *Life Technologies*). Tabel 3.1. merupakan urutan Primer RAPD S1-18 dan S20. Primer RAPD yang dipilih untuk amplifikasi DNA adalah primer yang dapat mengamplifikasi DNA darah keempat jenis burung anggota Famili Columbidae.

Tabel 3.1. Urutan nukleotida primer RAPD S1-18 dan S20

Kode	Urutan nukleotida 5' → 3'
S1	GTTTCGCTCC
S2	TGATCCCTGG
S3	CATCCCCCTG
S4	GGACTGGAGT
S5	TGCGCCCTTC
S6	TGCTCTGCC
S7	GGTGACGCAG
S8	GTCCACACGG
S9	TGGGGGACTC
S10	CTGCTGGGAC
S11	GTAGACCCGT
S12	CCTTGACGCA
S13	AGTCAGCCAC
S14	AATCGGGCTG
S15	GGAGGGTGTT
S16	TTTGCCCGGA
S17	AGGGAACGAG
S18	CCACAGCAGT
S20	GGACCCTTAC

4. Amplifikasi DNA dengan Primer Terbaik Hasil Seleksi

Sampel DNA darah dari 24 sampel burung Columbidae diamplifikasi melalui proses PCR dengan komposisi reaksi berdasarkan metode Williams *et al.* (1990) yang dimodifikasi. Primer RAPD yang digunakan adalah primer terbaik hasil seleksi primer sebelumnya. Bahan PCR dalam setiap *tube* PCR 0,2 mL mengandung: 400 μ M untuk masing-masing dATP, dGTP, dCTP, dan dTTP, 32

ng/ μ L primer, 0,5 Unit, *Dream Taq DNA Polymerase* (Fermentas), 2 mM $MgCl_2$ dalam 1 x *buffer* PCR, 1 μ L DNA dan air deion steril hingga volume akhir yaitu 10 μ L.

Amplifikasi dilakukan pada mesin PCR (*Gene Amplified PCR System* 9700) yang harus dipanaskan dahulu sebelumnya selama 30 menit dan telah diprogram untuk melaksanakan beberapa kondisi, yaitu tahap awal amplifikasi pada suhu 94°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus. Selanjutnya pemecahan rantai ganda DNA menjadi rantai tunggal (*denaturation*) selama 1 menit pada suhu 94°C, kemudian 1 menit untuk tahap penempelan primer pada DNA cetakan (*annealing*) pada suhu 37°C kemudian tahap pembentukan kopi DNA cetakan yang diawali dari daerah primer (*ekstension*) pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik. Ketiga tahapan tersebut dilakukan sebanyak 35 siklus. Tahap akhir amplifikasi pada suhu 72°C selama 10 menit sebanyak 1 siklus.

5. Elektroforesis DNA Hasil PCR

Sampel-sampel DNA yang telah diperbanyak melalui proses PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa. Sampel DNA dielektroforesis pada gel agarosa 2% dalam *buffer* TBE 1x selama 65 menit pada tegangan 75 volt. Setelah selesai elektroforesis, pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan ethidium bromida (10 μ g/mL) selama 5 menit, kemudian dibilas dengan akuades selama 3 menit. Selanjutnya gel diamati pada “UV-Transiluminator” dengan panjang gelombang 512 nm dan didokumentasikan

menggunakan kamera digital Casio Exilm. Untuk penanda ukuran DNA hasil amplifikasi digunakan DNA *marker* yaitu *Ladder Mix Plus* “1 Kb” (Fermentas).

6. Analisis Data

Hasil amplifikasi DNA dengan penanda RAPD diinterpretasikan sebagai data kualitatif dengan cara melihat kehadiran atau ketidakhadiran larik-larik (pita-pita) DNA. Kehadiran larik DNA dilambangkan dengan angka satu (1), sedangkan ketidakhadiran larik DNA dilambangkan dengan angka nol (0). Dalam interpretasi tersebut, seleksi primer ditentukan berdasarkan:

1. Menghasilkan produk PCR yang polimorfik
2. Jumlah larik yang dihasilkan untuk setiap genotip tidak lebih dari 10 larik
3. Larik yang dihasilkan dapat dibaca

Pada penelitian ini, larik yang dianalisis adalah larik yang hadir dan jelas terlihat oleh mata, tanpa memperhitungkan intensitasnya. Analisis kluster kesamaan genetik antar individu dihitung berdasarkan formula Nei & Li (1979). Matriks kesamaan genetik antar individu tersebut digunakan dalam analisis kluster UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic average*) dengan menggunakan program MVSP (*multi variate software package*) 3.1.

Koefisien kesamaan yang digunakan untuk menguji pasangan objek yang dibandingkan sesuai koefisien Nei & Li (1979) dengan rumus:

$$S_{xy} = 2n_{xy}/n_x+n_y$$

Keterangan :

S_{xy} = Koefisien kesamaan genetik (Nei & Li)

n_{xy} = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu x dan y

n_x = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu x

n_y = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu y

Perhitungan nilai PIC (*polymorphism information content*) dilakukan untuk mengetahui tinggi rendahnya tingkat informasi dan memberikan perkiraan kekuatan pembeda dari penanda RAPD yang digunakan. Perhitungan nilai PIC menurut Lynch & Walsh (1998) (Garcia *et al.*, 2004) dengan persamaan:

$$PIC = 1 - \sum pi^2$$

Keterangan:

pi = frekuensi alel ke-i.

i = 1, 2, 3,n

