

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

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

#### B. Objek Penelitian

Empat spesies burung anggota Famili Columbidae yang terdiri dari: *Columba livia* (Merpati), *Geopelia striata* (Perkutut), *Streptopelia bitorquata* (Puter) dan *Streptopelia chinensis* (Tekukur). Masing-masing spesies terdiri dari enam individu.

#### C. Lokasi dan Waktu Penelitian

##### a. Lokasi Penelitian

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

##### b. Waktu Penelitian

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

## D. Langkah Penelitian

Urutan metode penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

### 1. Isolasi DNA darah

Materi DNA burung diekstraksi dari darah berdasarkan metode Kusumawaty (2005) yang dimodifikasi. Sebanyak 300-500  $\mu\text{L}$  darah diambil dari sampel burung yang digunakan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga ukuran 1,5 mL. Secara berturut-turut ditambahkan 500  $\mu\text{L}$  *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%,  $\beta$ -mercaptoethanol) dan dihomogenkan. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam pada *waterbath*. Setelah inkubasi, ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  proteinase K, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 65°C selama 2 jam. Setelah inkubasi selesai, ditambahkan lagi 5  $\mu\text{L}$  proteinase K, dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 65°C selama satu malam.

Pada hari berikutnya, ditambahkan potasium 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 (24:1 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 dihomogenkan kembali dengan cara dibolak-balik sebanyak 50x. Untuk presipitasi DNA, ditambahkan etanol absolut sebanyak 2x volume larutan lalu disimpan selama satu malam pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Pada hari berikutnya, 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  $\mu\text{l}$ . Selanjutnya ditambahkan enzim RNase (bebas DNase) sebanyak 1/100 dari volume larutan. Larutan diinkubasi selama 1 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  untuk mengoptimalkan kerja enzim. Stok DNA disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **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 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.

### 3. Optimasi Kondisi PCR

Optimasi dilakukan pada kandungan dNTPs dan  $MgCl_2$  dalam larutan mix PCR. Dalam penelitian ini, optimasi dilakukan dengan menggunakan dNTPs sebesar 200  $\mu M$  dan 400  $\mu M$ , sedangkan konsentrasi  $MgCl_2$  yang digunakan yaitu 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM dan 8 mM.

### 4. Seleksi Primer

Seleksi primer dilakukan terhadap 20 primer set-A (Invitrogen Life Tech) yang masing-masing terdiri dari 10 mer (Tabel 3.1). Seleksi primer ini dilakukan untuk mendapatkan primer yang dapat mengamplifikasi semua sampel DNA dari empat spesies burung Famili Columbidae yang digunakan.

**Tabel 3.1. Urutan Primer RAPD Kit A1-A20**

Kode	Sekuen basa 5' → 3'	Kode	Sekuen basa 5' → 3'
A1	CAGGCCCTTC	A11	CAATCGCCGT
A2	TGCCGAGCTG	A12	TCGGCGATAG
A3	AGTCAGCCAC	A13	CAGCACCCAC
A4	AATCGGGCTG	A14	TCTGTGCTGG
A5	AGGGGTCTTG	A15	TTCCGAACCC
A6	GGTCCCTGAC	A16	AGCCAGCGAA
A7	GAAACGGGTG	A17	GACCGCTTGT
A8	GTGACGTAGG	A18	AGGTGACCGT
A9	GGGTAACGCC	A19	CAAACGTCGG
A10	GTGATCGCAG	A20	GTTGCGATCC

## 5. Amplifikasi DNA dengan Penanda RAPD

Amplifikasi sampel DNA yang berasal dari merpati, perkutut, puter dan tekukur dilakukan dengan menggunakan penanda RAPD. Primer yang digunakan adalah primer hasil seleksi yang telah dilakukan sebelumnya. Selanjutnya DNA diamplifikasi melalui proses PCR dengan komposisi reaksi berdasarkan metode Williams *et al.* (1990) yang dimodifikasi. Dalam penelitian ini, volume larutan mix PCR dibuat sebanyak 10  $\mu$ l dalam tabung PCR 0,2 mL yang terdiri atas DNA sebanyak 1  $\mu$ L, 32 ng/ $\mu$ L primer RAPD, 0,5 U/ $\mu$ L *Dream Taq Polymerase* (Fermentas), 1x *Dream Taq Buffer* (Fermentas) yang mengandung 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dNTPs dan ditambahkan air deion steril hingga volume akhir 10  $\mu$ L.

Semua bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung PCR 0,2 mL secara berurutan, diawali dengan air deion steril dan *Dream Taq Buffer* (Fermentas) kemudian dihomogenkan dengan cara dijentik-jentik. Setelah itu, baru diambil dNTPs dan *Dream Taq Polymerase* (Fermentas) dari dalam *freezer* kemudian ditambahkan ke dalam tabung PCR yang telah berisi campuran bahan sebelumnya. 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 PCR yang telah diberi kode sesuai sampel DNA yang digunakan. Campuran bahan yang telah homogen dimasukkan ke dalam tabung-tabung PCR dengan volume yang sama sebanyak 8  $\mu$ L, kemudian ditambahkan DNA sampel dan primer ke dalam masing-masing tabung. Pembuatan komponen reaksi PCR tersebut dilakukan dalam keadaan

dingin untuk menjaga kinerja beberapa zat yang mudah rusak yaitu dNTPs dan *Dream Taq Polymerase* (Fermentas).

Amplifikasi dilakukan pada alat *Gene Amplified PCR System 9700* (PE *Applied Biosystem*) yang diprogram untuk melaksanakan beberapa kondisi, yaitu: tahap *pre denaturation* 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 menit pada suhu 37°C, tahap pembentukan kopi DNA *template* yang diawali dari daerah primer (*ekstension*) selama 1 menit 30 detik pada suhu 72°C. Ketiga tahap tersebut dilakukan sebanyak 35 siklus dan tahap *post ekstension* selama 10 menit pada suhu 72°C sebanyak 1 siklus.

Apabila hasil yang diperoleh adalah fragmen DNA yang berbeda dan terdapat fragmen yang spesifik, maka akan dilakukan amplifikasi ulang melalui proses PCR dengan primer yang sama pada seluruh sampel DNA untuk menentukan apakah fragmen spesifik tersebut merupakan larik DNA spesifik yang dominan terdapat pada salah satu kelompok 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 65 menit pada tegangan 75 volt. Sampel DNA dicampurkan dengan *loading dye* dengan perbandingan 5:2 (v/v) kemudian dimasukkan ke dalam tiap sumur di dalam gel,

selain itu dimasukkan pula marker *DNA Ladder Mix Plus* “1 Kb” (Fermentas) sebanyak 1,5  $\mu$ L.

Pewarnaan DNA dilakukan dengan cara memindahkan gel agarosa pada larutan ethidium bromide (10  $\mu$ g/mL) sambil digoyang dengan menggunakan shaker 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.

## 7. 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 1, sedangkan ketidakhadiran larik DNA dilambangkan dengan angka 0. Dalam interpretasi tersebut, seleksi primer ditentukan berdasarkan:

1. Menghasilkan produk PCR yang polimorfik.
2. Jumlah larik yang dihasilkan untuk setiap genotip kurang lebih terdiri 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. Panjang larik DNA hasil amplifikasi yang akan menjadi penanda RAPD dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier  $y = a + bx$  yang diperoleh dari perhitungan jarak migrasi standar (*marker*).

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*) versi 3.1.

Koefisien kesamaan yang digunakan untuk menguji pasangan objek yang dibandingkan sesuai koefisien Nei dan Li (1979). Rumus kesamaan Nei dan Li :

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

Keterangan :

$S_{xy}$  = Koefisien kesamaan genetik (Nei dan 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

Untuk mengetahui tinggi rendahnya tingkat informasi dan memberikan perkiraan kekuatan pembeda dari penanda RAPD yang digunakan, dilakukan perhitungan nilai PIC (*polymorphism information content*). Persamaan untuk perhitungan nilai PIC menurut Smith *et al.* (Antonio *et al.*, 2004) yaitu:

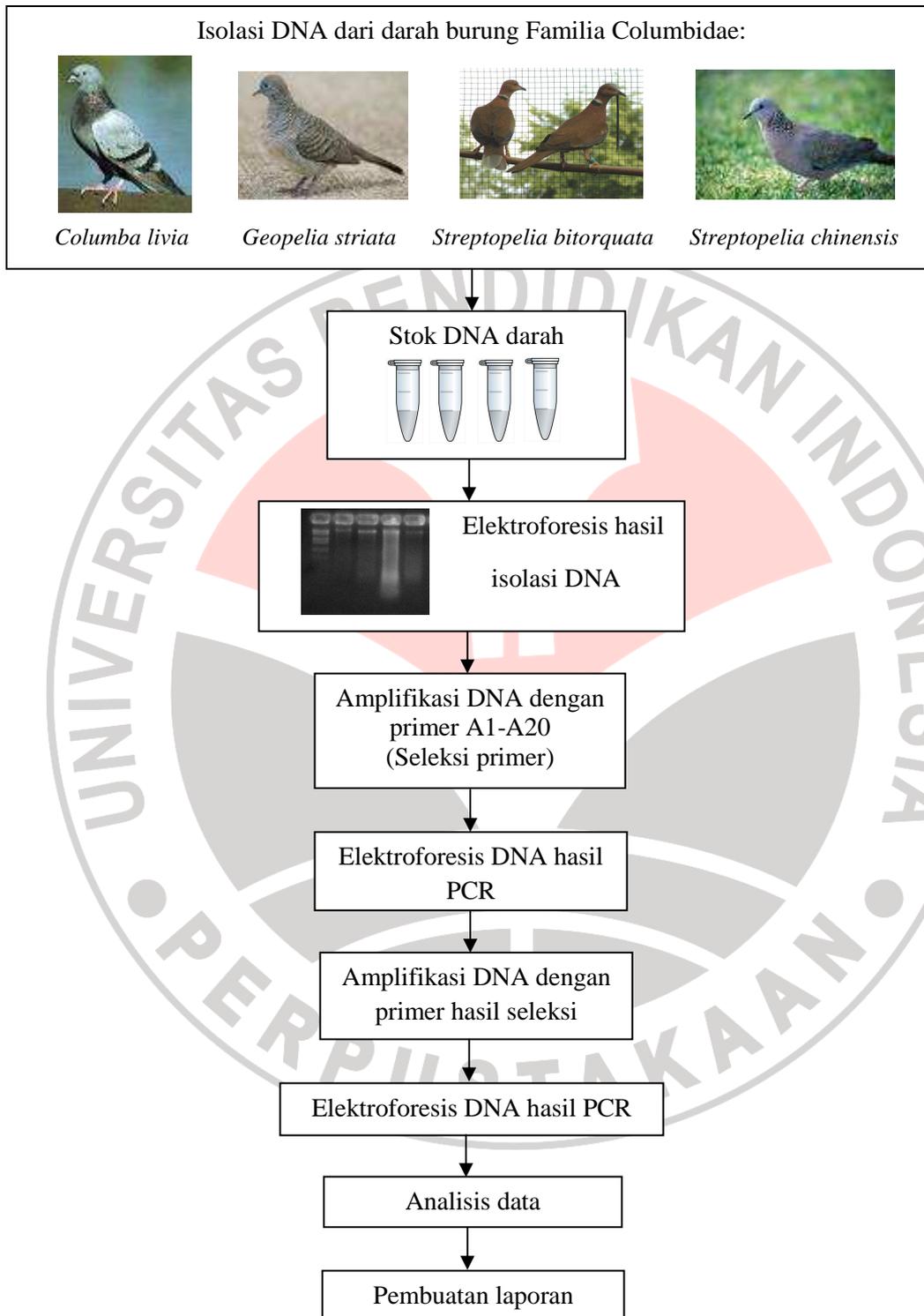
$$PIC = 1 - \sum pi^2$$

Keterangan:

$pi$  adalah frekuensi alel ke-i.

$i = 1, 2, 3, \dots, n$ .

## 8. Alur Penelitian



**Gambar 3.1. Alur Penelitian**

