

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif adalah penelitian yang bertujuan untuk menyajikan gejala, fakta, atau peristiwa secara sistematis dan akurat, serta menggambarkan sifat dan hubungan antar fenomena yang diteliti (Nazir, 1988; Hardani *et al.*, 2020). Penelitian deskriptif umumnya tidak perlu mencari atau menjelaskan hubungan antar variabel maupun menguji hipotesis (Hardani *et al.*, 2020). Pada penelitian ini mendeskripsikan analisis perkembangan kloaka jantan dan betina (*vent sexing*), analisis morfometrik, dan analisis secara anatomi pada organ reproduksi itik jantan dan betina dengan cara dilakukan pembedahan, serta mendeskripsikan dua pasang primer, yaitu P2/P8 dan InSex-(F)/InSex-(R) yang mengamplifikasi gen *Chromodomain Helicase DNA-binding* (CHD) itik alabio untuk melihat perbedaan jenis kelamin jantan dan betina yang ditunjukkan dengan satu pita pada jantan dan dua pita pada betina.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian ini adalah itik alabio jantan dan betina yang diperoleh dari Pasar Burung Sukahaji Bandung dengan usia satu minggu. Pengamatan perkembangan kloaka (*vent sexing*) diamati saat itik berusia tiga minggu, empat minggu, dan 23 minggu, sedangkan morfometrik diamati saat itik berusia 20 minggu dan pengamatan organ reproduksi jantan dan betina diamati saat itik berusia 23 minggu. Sampel penelitian terdiri dari enam buah DNA itik alabio (tiga DNA itik alabio jantan dan tiga DNA itik alabio betina) hasil isolasi DNA yang diperoleh dari pembuluh darah *vena brachialis* pada sayap itik alabio jantan dan betina, kemudian digunakan lima buah DNA ayam cemani (empat DNA ayam cemani jantan dan satu DNA ayam cemani betina) koleksi Aryani (2016) sebagai pembanding.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan kurang lebih selama lima bulan. Pengamatan perkembangan kloaka (*vent sexing*), morfometrik, dan pembedahan dilakukan dari

bulan Februari hingga Juni 2024 yang berlokasi di Sumedang Jawa Barat, sedangkan penelitian berbasis *molecular sexing* dilaksanakan dari bulan Maret hingga Juni 2024 yang berlokasi di Laboratorium Riset, Departemen Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Secara Non-molekuler

a. Analisis Perkembangan Kloaka (*Vent Sexing*) Jantan dan Betina

Analisis perkembangan kloaka dilakukan untuk mengetahui jenis kelamin itik alabio, diamati pada saat berusia tiga minggu, empat minggu, dan 23 minggu. Pengamatan kloaka dilakukan dengan cara membuka atau melebarkan bagian luar kloaka dengan hati-hati menggunakan ibu jari, hingga *phallus* terlihat. Perbedaan jantan dan betina dicirikan dengan kloaka jantan yang lebih menonjol dan runcing, sedangkan kloaka betina lebih datar/rata dan lebar (O'Dwyer *et al.*, 2006; Bazzano *et al.*, 2012).

b. Analisis Morfometrik

Analisis morfometrik dilakukan untuk mengetahui perbedaan jantan dan betina berdasarkan morfometrik eksternal atau pengukuran tubuh itik saat mencapai fase dewasa. Itik mencapai fase dewasa (*layer*) saat berusia 18-27 minggu (Rositawati *et al.*, 2010). Analisis ini dilakukan satu kali saat itik berusia 20 minggu yang meliputi pengukuran panjang kepala (A), tinggi kepala (B), lebar kepala (C), lebar tubuh (D), panjang tubuh (F), tinggi badan (G), panjang leher (H), dan lebar leher (I) (Livolsi *et al.*, 2015) (Gambar 3.1.).



Gambar 3.1. Pengukuran Morfometrik pada Itik
(Livolsi *et al.*, 2015)

c. Analisis Secara Anatomi pada Organ Reproduksi (Pembedahan)

Pada tahap akhir penelitian, dilakukan pengamatan anatomi organ reproduksi pada enam ekor itik alabio yang terdiri dari tiga jantan dan tiga betina yang berusia 23 minggu (Ahiagbe *et al.*, 2018). Itik dikorbankan dengan memotong *vena* dan *arteri jugularis*, esofagus, serta trakea. Setelah itu, bulu pada bagian perut itik dicabut untuk memudahkan proses pembedahan. Observasi anatomi organ reproduksi itik alabio dilakukan dengan mengidentifikasi testis pada itik jantan dan ovarium pada itik betina.

d. Analisis Data

Pada penelitian ini, yang dianalisis adalah perkembangan kloaka dari yang belum bisa dibedakan hingga bisa dibedakan antara kloaka jantan dan betina, kemudian dilakukan analisis morfometrik sebanyak satu kali saat itik dewasa (sebelum dilakukan pembedahan) untuk mengetahui perbedaan ukuran tubuh itik jantan dan betina, dan mengamati anatomi organ reproduksi itik alabio jantan dan betina untuk memastikan bahwa hasil PCR sesuai dengan objek (itik) yang digunakan, yang ditandai dengan adanya testis pada itik jantan dan ovarium pada itik betina.

3.4.2 Secara Molekuler

a. Persiapan Alat dan Bahan

Sebelum melakukan penelitian, alat dan bahan yang akan digunakan perlu dipersiapkan terlebih dahulu. Alat yang sudah tersedia perlu dibersihkan melalui tahap pencucian, kemudian dibungkus menggunakan kertas, dan disterilisasikan menggunakan autoklaf selama sekitar 15-20 menit pada suhu 121°C.

b. Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah itik alabio yang diperoleh dari Pasar Burung Sukahaji Bandung dengan usia satu minggu, kemudian dilakukan aklimatisasi atau adaptasi terhadap lingkungan baru pada itik alabio selama empat minggu. Sampel darah itik alabio jantan dan betina yang akan digunakan diperoleh saat itik berusia sekitar tujuh minggu, darah diambil pada bagian *vena brachialis* pada sayap itik menggunakan spuit atau *syringe* 1 ml yang telah disiapkan sebelumnya. Langkah pertama yang perlu dilakukan adalah pada bagian kulit itik yang akan disuntik atau diambil darahnya dibersihkan terlebih

dahulu menggunakan alkohol dan kapas. Darah itik alabio jantan dan betina masing-masing diambil sebanyak 0.5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung MicroTube EDTA K3 0.5 ml agar tidak terjadi penggumpalan pada darah itik yang telah diambil. Kemudian, sampel darah disimpan ke dalam *freezer* pada suhu -20°C sebelum digunakan untuk tahap selanjutnya.

Sampel diperoleh dari darah hasil isolasi DNA itik alabio jantan dan betina sebanyak enam sampel (terdiri dari tiga sampel jantan dan tiga sampel betina) dan stok isolasi DNA ayam cemani koleksi Aryani (2016) sebagai pembanding sebanyak lima sampel (terdiri dari empat sampel jantan dan satu sampel betina) yang telah diketahui jenis kelaminnya. Satu pita DNA jantan dengan target ukuran sekitar 600-500 bp dan dua pita DNA betina dengan target ukuran 500 bp dan 350 bp (Vera *et al.*, 2021), serta satu pita DNA jantan dan dua pita DNA betina dengan target ukuran 300-400 bp dengan perbedaan jarak ukuran pita DNA jantan dan betina antara 10-80 bp (Griffiths *et al.*, 1998).

c. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan acuan Aryani *et al.* (2019). Enam sampel darah itik alabio (tiga jantan dan tiga betina) diisolasi menggunakan protokol Qiagen *DNeasy Blood and Tissue Kit* yang dimodifikasi oleh Aryani *et al.* (2019). Pertama-tama, sebanyak 20 µL Proteinase K dimasukkan ke dalam *microtube* Eppendorf 1.5 ml. Kemudian, tambahkan sebanyak 20 µL sampel darah itik dan 180 µL Buffer ATL. Laurantan dihomogenkan menggunakan *microcentrifuge* dan diinkubasi pada *waterbath* pada suhu 56°C selama 60 menit. Setelah itu, tambahkan 200 µL Buffer AL, homogenkan menggunakan *microcentrifuge*, dan inkubasi lagi pada suhu 56°C selama sepuluh menit. Tahap selanjutnya, masukkan 200 µL etanol absolut dingin, homogenkan dengan *microcentrifuge*, dan kemudian larutan dipindahkan ke *DNeasy mini spin column* yang telah ditempatkan pada *collection tube*. Setelah itu, sampel disentrifugasi menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 8.000 rpm selama satu menit, kemudian supernatant dan *collection tube* dibuang, dan *DNeasy mini spin column* dipindahkan ke *collection tube* yang baru. Sebanyak 500 µL buffer AW1 ditambahkan dan disentrifugasi menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 8.000 rpm selama satu menit, kemudian supernatant dan *collection tube* dibuang, dan *DNeasy mini spin*

column dipindahkan ke *collection tube* yang baru. Setelah itu, sebanyak 500 μL buffer AW2 ditambahkan dan disentrifugasi menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 14.000 rpm selama tiga menit, kemudian supernatant dan *collection tube* dibuang, dan *DNeasy mini spin column* diletakkan pada *microtube* 1.5 ml yang baru. Tahap akhir, sebanyak 100 μL buffer AE ditambahkan, inkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian disentrifugasi menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 8.000 rpm selama satu menit. Ulangi langkah ini untuk mendapatkan enam stok isolasi DNA. Simpan DNA pada suhu -20°C . Hasil yang diharapkan adalah terdapat pita yang bersih dari setiap sampel.

d. Elektroforesis Sampel Hasil Isolasi DNA/Uji Kualitatif DNA

Sebelum DNA yang telah diisolasi digunakan sebagai *DNA template* dalam proses PCR, DNA tersebut terlebih dahulu dikarakterisasi secara kualitatif menggunakan mesin elektroforesis. Pada uji kualitatif DNA ini menggunakan gel agarose 1% yang dilarutkan dalam *buffer* TBE 1X. Langkah pertama yang perlu dilakukan dalam pembuatan gel agarose 1% adalah bubuk agarose ditimbang menggunakan timbangan analitik sebanyak 0,5 gram dan dimasukkan ke dalam botol duran 100 ml. *Buffer* TBE 1X ditambahkan sebanyak 50 ml dan dihomogenkan terlebih dahulu sebelum dipanaskan. Botol duran yang telah berisi bubuk agarose dan *buffer* dipanaskan di atas *hot plate* hingga bubuk agarose larut dan gel terlihat berwarna bening, kemudian botol diangkat dan ditunggu hingga hangat. Apabila gel agarose sudah hangat, pewarna *Gel Red Nucleic Acid* ditambahkan sebanyak 2-3 μL dan dihomogenkan secara perlahan. Gel agarose kemudian dituangkan ke dalam cetakan (*tray*) dan dipasang sisiran (*comb*), kemudian ditunggu hingga gel membeku/padat dengan sempurna. Setelah gel agarose membeku/padat, sisiran (*comb*) dilepaskan, dan gel agarose dapat digunakan.

Selanjutnya untuk *running* elektroforesis, langkah pertama yang perlu dilakukan adalah alat elektroforesis disiapkan terlebih dahulu. Kemudian *gel tank* disambungkan dengan *power supply* sesuai dengan kutub positif dan kutub negatifnya. Setelah itu, *buffer* TBE 1X dituangkan pada *gel tank* hingga dapat merendam gel agarose yang akan digunakan. Sampel hasil isolasi DNA yang akan dimasukkan ke dalam sumur gel agarose perlu dicampurkan dengan *loading dye*

terlebih dahulu. Sampel hasil isolasi DNA yang diperlukan sebanyak 5 μL dan *loading dye* sebanyak 1 μL , kemudian dihomogenkan, sehingga total volume yang perlu dimasukkan ke dalam sumur adalah 6 μL . Setelah semua sampel dimasukkan ke dalam sumur gel agarose, mesin elektroforesis dapat di-*running* pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis dapat divisualisasikan menggunakan alat LED Transilluminator.

e. Uji Kuantitatif DNA

Uji kuantitatif DNA dilakukan untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA dengan menggunakan alat Spektrofotometer Genesys 10-S UV-Vis. Faktor pengenceran yang digunakan adalah 50x pengenceran. Tahapan untuk mengukur kemurnian DNA adalah dari setiap sampel DNA hasil isolasi dimasukkan ke dalam *cuvette* kaca sebanyak 5 μL , kemudian ditambahkan ddH₂O sebanyak 245 μL menggunakan mikropipet. Setelah itu, sisi-sisi *cuvette* kaca dibersihkan menggunakan tisu dan diletakkan pada *cuvette compartment* pada alat spektrofotometer. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm ($\text{Å}260/\text{Å}280$), adapun nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0 (Utaminingsih & Sophian, 2022). Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$[\text{DNA}] = \text{Å} 260 \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

$\text{Å} 260$ = Nilai absorbansi pada 260 nm

50 = Larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 μg untai ganda DNA per ml

f. Amplifikasi DNA dengan *Sexing Primer*

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan mesin GeneAmp PCR System 9700 Fast Thermal Cycler dan menggunakan dua pasang primer, yaitu primer P2/P8 dan InSex-(F)/InSex-(R) pada enam sampel itik (tiga jantan dan tiga betina) dan lima sampel ayam cemani (empat jantan dan satu betina) sebagai pembanding. Pertama, bahan-bahan untuk *running polymerase chain reaction* (PCR) disiapkan terlebih dahulu yang terdiri dari *nuclease-free water* sebanyak

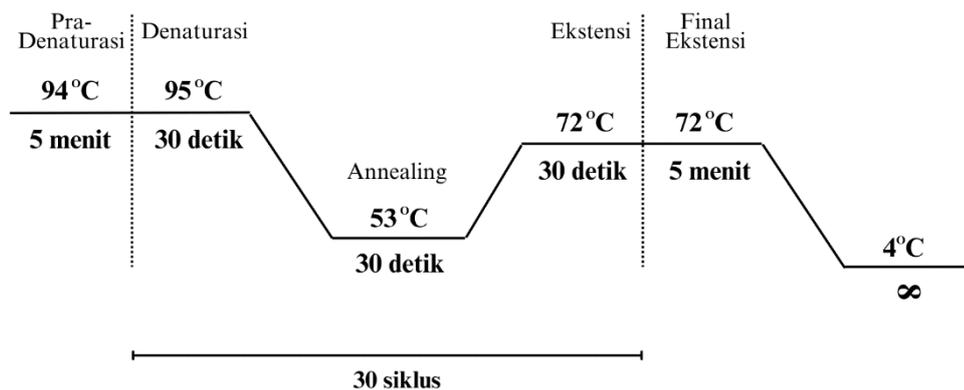
Zeranita Ageng Nur Anisa, 2024

PENENTUAN JENIS KELAMIN ITIK ALABIO (*Anas platyrhynchos* Borneo) BERDASARKAN VENT SEXING, MORFOMETRIK, PEMBEDAHAN, DAN MOLECULAR SEXING

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

4.75 μL , GoTaq Green Master Mix 2X sebanyak 6.25 μL , primer *forward* P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') sebanyak 0.25 μL , primer *reverse* P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') sebanyak 0.25 μL , dan DNA sebanyak 2 μL . Total volume akhir *mix* PCR yang digunakan adalah 13.5 μL untuk setiap *tube* sampel. Komposisi ini berlaku juga untuk *mix* PCR yang menggunakan primer *forward* InSex-(F) (5'-TTT CTC TCA GAT GGT GAG GAT G-3') dan primer *reverse* InSex-(R) (5'-TGA TCC ATC AAG TCT CTA AAG AG -3'). Semua bahan yang telah dimasukkan ke dalam *tube* 1.5 ml kemudian dihomogenkan dengan disentrifugasi menggunakan *microcentrifuge* selama 15 detik. Lalu disiapkan tabung PCR 0.2 ml yang telah diberi kode sesuai sampel DNA yang digunakan dan pindahkan ke dalam masing-masing *tube*.

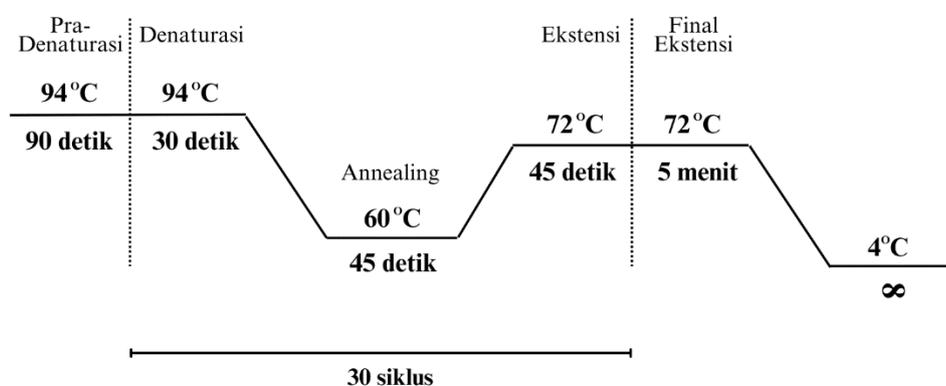
Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR dengan primer P2/P8 dilakukan mulai dari tahapan *pre-denaturation* dengan suhu 94°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus, *denaturation* dengan suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* dengan suhu 53°C selama 30 detik, *extension* dengan suhu 72°C selama 30 detik. Ketiga tahap tersebut dilakukan sebanyak 30 siklus dan yang terakhir adalah tahap *final extension* dengan suhu 72°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus. Kondisi PCR menggunakan primer P2/P8 lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Program PCR Menggunakan *Sexing* Primer P2/P8
(Dok. Pribadi, 2024)

Amplifikasi DNA menggunakan PCR dengan primer InSex-(F)/InSex-(R) dilakukan mulai dari tahapan *pre-denaturation* dengan suhu 94°C selama 90 detik sebanyak 1 siklus, *denaturation* dengan suhu 94°C selama 30 detik, *annealing*

dengan suhu 60°C selama 45 detik, *extension* dengan suhu 72°C selama 45 detik. Ketiga tahap tersebut dilakukan sebanyak 30 siklus dan yang terakhir adalah tahap *final extension* dengan suhu 72°C selama 5 menit sebanyak 1 siklus. Kondisi PCR menggunakan primer InSex-(F)/InSex-(R) lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3. Program PCR Menggunakan *Sexing Primer* InSex-(F)/InSex-(R) (Dok. Pribadi, 2024)

g. Elektroforesis Sampel DNA Hasil PCR

Sampel-sampel DNA yang telah diamplifikasi menggunakan mesin PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose. Sampel DNA dielektroforesis pada gel agarose 2% yang dilarutkan dalam *buffer* TBE 1X. Bubuk agarose ditimbang menggunakan timbangan analitik sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam botol duran 100 ml, kemudian *buffer* TBE 1X ditambahkan sebanyak 50 ml. Botol duran yang telah berisi bubuk agarose dan *buffer* dipanaskan di atas *hot plate* hingga bubuk agarose larut dan gel terlihat berwarna bening. Setelah itu, ditambahkan pewarna *Gel Red Nucleic Acid* sebanyak 2-3 µL dan dihomogenkan, lalu larutan gel agarose dituangkan ke dalam cetakan (*tray*) dan dipasang sisiran (*comb*). Setelah gel agarose membeku/padat, sisiran (*comb*) dielakkan, dan gel agarose dapat digunakan.

Selanjutnya untuk *running* elektroforesis, langkah pertama yang perlu dilakukan adalah alat elektroforesis disiapkan terlebih dahulu. Kemudian *gel tank* disambungkan dengan *power supply* sesuai dengan kutub positif dan kutub negatifnya. Setelah itu, *buffer* TBE 1X dituangkan pada *gel tank* hingga dapat

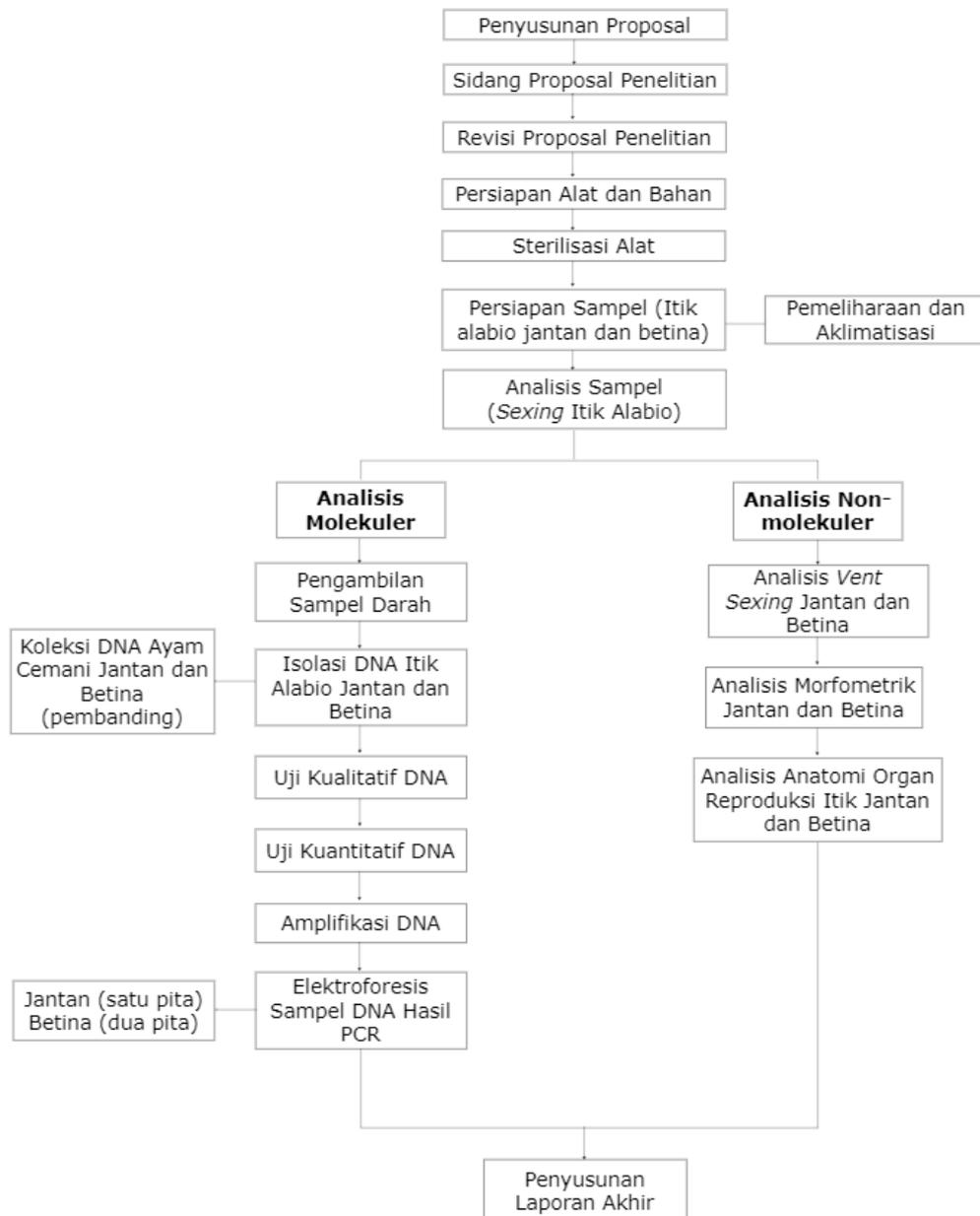
merendam gel agarose yang akan digunakan. Sebelum sampel hasil PCR dimasukkan ke dalam sumur gel agarose, sampel perlu dihomogenkan terlebih dahulu menggunakan *microcentrifuge* selama 15 detik. Setelah itu, sampel hasil PCR dimasukkan ke dalam sumur sebanyak 7-10 μL . Servicebio® GN1000bp DNA Ladder ditambahkan sebanyak 5 μL , dapat dimasukkan ke dalam sumur di sebelah ujung kiri, tengah, atau ujung kanan. Setelah semua sampel dan *DNA ladder* dimasukkan ke dalam sumur, dapat dilakukan *running* elektroforesis pada tegangan 100 volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis dapat divisualisasikan menggunakan alat *LED Transilluminator*.

h. Analisis Data (Analisis Pita/Larik DNA yang Muncul)

Pada penelitian ini, pita DNA yang dianalisis adalah pita yang muncul dengan jelas tanpa mempertimbangkan intensitasnya. Panjang pita DNA hasil amplifikasi menggunakan *sexing primer* dihitung berdasarkan jarak migrasi standar (*DNA ladder/marker*). Pengukuran ukuran pita DNA hasil amplifikasi dilakukan dengan membandingkan antara jarak migrasi standar (*DNA ladder/marker*) dengan pita yang muncul. Pita DNA jantan akan muncul dengan menunjukkan pita tunggal, sedangkan betina akan menunjukkan pita ganda.

3.5 Alur Penelitian

Berikut merupakan alur dari penelitian yang dilakukan. Alur penelitian disajikan dalam bentuk diagram pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4. Alur Penelitian Skripsi