

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif. Menurut Subali (2011) penelitian deskriptif/noneksperimen yaitu penelitian yang tidak disertai manipulasi oleh peneliti secara sengaja terhadap variabel bebas. Penelitian deskriptif juga dapat berupa penelitian yang tidak memiliki variabel bebas. Selain itu, pengendalian terhadap variabel penekan/pengganggu/eksternal (*nuisance/suppressor/external variable*) tidak dikendalikan secara penuh, namun dilakukan dengan memilah kondisi yang berbeda untuk memilih kondisi yang sama/homogen setiap variabel penekan yang bersangkutan.

3.2 Objek Penelitian

Objek yang diidentifikasi pada penelitian ini adalah sampel kulit yang diduga Harimau Jawa yang diperoleh dari PKJ (Peduli Karnivor Jawa) yaitu salah satu NGO (*Non-Government Organization*) lingkungan NGO di Indonesia. Berdasarkan informasi yang didapatkan dari pemilik sampel kulit tersebut, sampel didapatkan pada tahun 1995, 2000, 2008, 2013, dan 2014 dari berbagai sumber, yaitu dari para pemburu yang mengaku membunuh Harimau Jawa, koleksi milik keluarga, dan pelaku ritual di Jawa.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai pada bulan Februari 2018 yang dilaksanakan di Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi Gedung FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No. 299 Bandung.

3.4 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi Gedung FPMIPA B Universitas Pendidikan Indonesia (Lampiran 1 dan Lampiran 2).

Nadia Insani, 2019

IDENTIFIKASI SPECIES DARI KULIT YANG DIDUGA HARIMAU JAWA (Panthera tigris sondaica) BERDASARKAN SIKUEN GEN Cytochrome b

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

3.5 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Tahap persiapan meliputi persiapan alat dan bahan yang akan digunakan dalam proses penelitian. Alat-alat yang sudah dibersihkan serta bahan-bahan yang akan digunakan (kecuali bahan yang mudah meledak jika dipanaskan), dibungkus menggunakan plastik tahan panas dan disterilisasi menggunakan autoclave selama 45 menit pada suhu 121°C. Tujuan sterilisasi adalah untuk menjaga kondisi alat dan bahan dari kontaminasi bakteri, spora, jamur, dan mikroorganisme lainnya.

3.4.2 Optimasi Isolasi DNA

Isolasi DNA yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan dengan beberapa metode, yaitu protokol isolasi DNA berdasarkan Sambrook *et al.* (1989) dan Ojeda *et al.* (2012) dengan beberapa modifikasi, protokol isolasi DNA FavorPrep™ *Tissue Genomic DNA Extraction* Mini Kit dari Favorgen, dan isolasi DNA menggunakan *Cetyltrimethylammonium Bromide* (CTAB) yang dilakukan berdasarkan protokol Saghai-Marooof *et al.* (1984); Rogers and Bendich (1985); Doyle and Doyle (1987); Weising *et al.* (1995) dalam Sandy (2015) dengan beberapa modifikasi. Langkah kerja tiap metode adalah sebagai berikut:

3.4.2.1 Metode isolasi DNA berdasarkan Sambrook *et al.* (1989)

Sampel kulit sebanyak 25 mg dimasukkan kedalam tabung 1,5 ml lalu ditambahkan buffer lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 1% SDS, and 50 mM NaCl) sebanyak 500 µl dan Proteinase K sebanyak 9 µl (11 mg/ml), setelah itu diinkubasi pada suhu 55°C selama 5 jam pada waterbath. Sampel dihancurkan menggunakan mikropestel sampai hancur dan disentrifugasi pada kecepatan 13,000 rpm selama 20 menit. Supernatant dipindahkan kedalam tabung 1,5 ml baru dan ditambahkan NaCl 5 M dengan perbandingan supernatant dan NaCl yaitu 5:3, lalu disentrifugasi pada kecepatan 13,000 rpm selama 15 menit. Isopropanol dingin ditambahkan dengan volume yang sama dengan supernatant yang dipindahkan ke tabung 1,5 ml baru, lalu dihomogenkan. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 13,000 rpm selama 15 menit, dan supernatant dibuang dengan hati-hati agar pelet tidak terbuang. Pelet yang didapatkan dicuci dengan ethanol 70% 750 µL and disentrifugasi pada kecepatan 13,000 rpm selama 5 menit untuk mengendapkan pelet dan membuang alkohol. DNA dilarutkan pada buffer TE 1X dengan volume 25 µL, dan larutan stok DNA kemudian disimpan pada suhu -20°C.

3.4.2.2 Protokol isolasi DNA FavorPrep™ Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit dari Favorgen

Sampel kulit yang sudah dipotong menjadi bagian-bagian kecil sebanyak 25 mg dimasukkan kedalam tabung 1,5 ml lalu ditambahkan 200 µL FATG1 buffer dan dihomogenkan menggunakan *micropestel* atau tip mikropipet. Kemudian ditambahkan proteinase K sebanyak 20 µL (11 mg/ml) di vortex sehingga sampel dan larutan tercampur rata. Selanjutnya tabung isolat diinkubasi pada suhu 60°C selama tiga jam. Setelah inkubasi selesai ditambahkan kembali proteinase K sebanyak 10 µL dan diinkubasi *overnight* pada suhu 60°C sampai sampel lisis sempurna.

Hari berikutnya tabung isolat diangkat dari waterbath untuk ditambahkan 200 µL FATG buffer 2, lalu dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Selanjutnya tabung isolat di sentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama tiga menit. Supernatan dipindahkan ke tabung 1,5 ml baru dan ditambahkan etanol 96% 200 µL, kemudian tabung dibulak-balikan secara perlahan. Tabung isolat disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 detik, lalu dipindahkan ke *FATG Mini Column* pada *Collection Tube* dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 13000 rpm selama tiga menit. *FATG Mini Column* dipindahkan ke *Collection Tube* baru, kemudian W1 buffer ditambahkan ke dalam *FATG Mini Column*. Tabung isolat di sentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama tiga menit, kemudian larutan pada *Collection Tube* dikeluarkan. *Wash buffer* sebanyak 750 µL ditambahkan ke dalam *FATG Mini Column*, kemudian tabung di sentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama tiga menit. Larutan yang tertampung pada *Collection Tube* dikeluarkan.

Tabung disentrifugasi kembali pada kecepatan 13000 rpm selama tiga menit untuk mengeluarkan larutan residu. Selanjutnya 50 µL elution buffer ditambahkan secara perlahan dan hati-hati ke bagian tengah membran *FATG Mini Column* yang ditempatkan di tabung 1,5 ml baru, dan didiamkan selama tiga menit. Tabung disentrifugasi pada kecepatan 13000 rpm selama dua menit, kemudian larutan stok DNA disimpan pada suhu -20°C.

3.4.2.3 Protokol isolasi DNA menggunakan *Cetyltrimethylammonium Bromide* (CTAB) berdasarkan protokol Sanghai-Marooof *et al.* (1984); Rogers and Bendich (1985); Doyle and Doyle (1987); Weising *et al.* (1995) dalam Sandy (2015)

Isolasi DNA diawali dengan menghancurkan sampel kulit menggunakan mortar steril sampai halus, pada tahap ini ditambahkan nitrogen cair. Kemudian sebanyak 30 mg sampel yang sudah halus dimasukan kedalam tabung tabung mikro 1,5 ml, lalu ditambahkan 500 µl buffer lisis *Cetyltrimethylammonium bromide* (CTAB) dan *Sodium Deodecyl Sulfat* (SDS) 20% sebanyak 7 µl. Tabung isolat kemudian dihomogenkan secara perlahan, selanjutnya di inkubasi pada suhu 65°C selama satu jam. Tabung isolat diangkat dari *waterbath* dan ditambahkan proteinase K sebanyak 10 µl lalu dihomogenkan. Tabung diinkubasi kembali pada suhu 65 °C selama dua jam. Setelah inkubasi selesai, proteinase K ditambahkan kembali pada tabung isolat sebanyak 5 µl untuk selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 65 °C selama satu malam (*overnight*).

Di hari berikutnya, tabung isolat diangkat dari *waterbath* dan ditambahkan potasium asetat 5 M sebanyak 1/10 dari volume total, kemudian tabung di inkubasi kembali pada suhu -20 °C selama 20 menit. Setelah 20 menit, tabung dikeluarkan dari freezer untuk ke tahap berikutnya yaitu disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Hasil dari sentrifugasi terbentuk dua fasa, yaitu supernatan (fasa atas) dan pelet (fasa bawah). Supernatan yang terdapat dalam tabung isolat dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml baru, kemudian ditambahkan enzim RNase (*DNase free*) sebanyak 1/100 dari volume total, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam. Setelah inkubasi, tabung ditambahkan *Chloroform Isoamil Alcohol* (CIAA) (24:1) sebanyak ½ dari volume total, lalu dihomogenkan secara perlahan. Tabung isolat disentrifugasi pada kecepatan 15000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml baru yang selanjutnya ditambahkan sodium asetat 3 M sebanyak 1/10 dari volume total, kemudian tabung dibolak-balikan secara perlahan sebanyak 50X sampai homogen. Setelah dihomogenkan, kemudian ditambahkan Etanol Absolut sebanyak 2X volume total, lalu tabung diinkubasi selama 24 jam atau *overnight* pada suhu -20°C.

Setelah inkubasi selama satu malam tabung dikeluarkan dari dalam freezer suhu -20°C, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian di buang secara cepat dan ditambahkan alkohol 70% sebanyak 100 µl, lalu dibuang kembali secara cepat kemudian tabung disimpan terbalik dengan posisi mulut tabung berada dibawah atau berada pada *tissue* steril. Setelah

tabung kering dan tidak berbau alkohol, ditambahkan Tris EDTA (TE) dingin sebanyak 30 µl lalu dihomogenkan dengan cara menjetikan tabung isolat secara perlahan. Tabung kemudian diinkubasi selama 15 menit dalam suhu 37 °C (suhu ruang), kemudian disimpan pada suhu -20 °C.

3.4.3 Uji Kuantitatif dan Kualitatif

Pengukuran kuantitas sampel (kemurnian DNA) dilakukan dengan pengenceran 500X yaitu, mencampurkan sampel sebanyak 5 µl dan ddH₂O sebanyak 495 µl kedalam *cuvette*. Uji kuantitatif dilakukan dengan metode spektrofotometri, dengan tujuan untuk mengetahui konsentrasi DNA. DNA murni dapat menyerap cahaya UV karena adanya basa purin dan pirimidin. Pita ganda DNA dapat menyerap UV pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol akan menyerap cahaya pada 280 nm, sehingga kemurnian dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm.

Uji kualitatif dilakukan dengan elektroforesis gel agarose untuk mengetahui kualitas DNA dengan membaca larik pita DNA yang dihasilkan. 1% agar dibuat dengan cara melarutkan 0,3 gr gel agarose dalam 30 ml TAE 1X dengan bantuan *microwave* sampai gel terlihat bening. Larutan agar kemudian didiamkan hingga suhu larutan hangat, lalu ditambahkan Peggreen sebanyak 1 µl dan dicetak kedalam cetakan agar khusus untuk dibentuk sumur agar. Setelah teksturnya padat, agar direndam dalam dalam larutan TAE 1X pada alat elektroforesis. Sampel sebanyak 5 µl dicampurkan dengan Loading Dye sebanyak 1 µl, lalu dimasukkan kedalam sumur yang tersedia. Kemudian running elektroforesis dimulai dengan menyetel alat pada voltase 50 V selama 60 menit. Setelah running selesai, agar diletakkan pada alat UV-Transiluminator untuk proses pembacaan hasil uji kualitatif DNA.

3.4.4 PCR (Amplifikasi)

Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA dari kulit yang dianalisis adalah penanda universal untuk mamalia dan penanda spesifik untuk Harimau Jawa. Daftar primer *universal* yang digunakan pada penelitian ini adalah COI dan *cytochrome b universal* (Foran *et al.*, 2015), *cytochrome b-a* (Muangkram *et al.*, 2016), dan *cytochrome b-b* (Lopez-Oceja *et al.*, 2016). Penanda spesifik untuk Harimau Jawa yang digunakan adalah ND6 (Luo *et al.*, 2004). Primer yang berhasil

mengamplifikasi sampel DNA adalah *cytochrome b* dengan produk PCR 199 bp, suhu hasil optimasi PCR gen ini terdapat pada Gambar 3.1.

Tabel 3.1 Daftar primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA kulit yang dianalisis

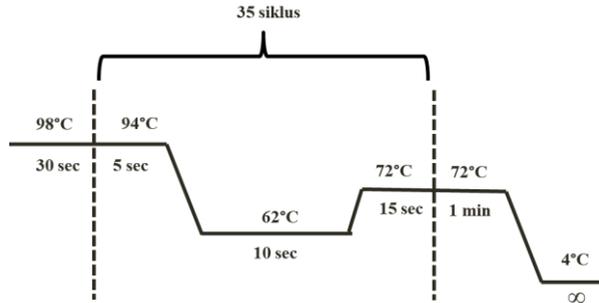
Kode Gen	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Ukuran (bp)
COI	GGTCAACAAATCATAAA GATATTGG	TAAACTTCAGGGTGACC AAAAAATCA	709
CytB-univ	CGAAGCTTGATATGAAA AACCATCGTTG	AACTGCAGTCATCTCCG GTTTACAAGAC	1244
CytB-a	TTYGCATACGCAGCAAT CYTACGATC	GTTGKCCTCCRATTCAT GTRAG	199
CytB-b	TACGCAATCCTACGATC AATTCC	GGTTGCTCCTCCAATTCA TGTTAG	148
ND6	TCTCCTTCATAATCACCC TGA	TGGCTGGTGGTGTGGT TGCCG	421

Tabel 3.2 Protokol PCR gen *cytochrome b-a*

Tahap	Suhu (°C)	Durasi	Keterangan
<i>Pre denaturation</i>	98	30 detik	1 siklus
<i>Denaturation</i>	94	5 detik	35 siklus
<i>Annealing</i>	62	10 detik	
<i>Extension</i>	72	15 detik	
<i>Post extension</i>	72	1 menit	1 siklus
Penyimpanan	4	∞	1 siklus

Total reaksi yang digunakan sebanyak 10 µl dengan komposisi master mix 5 µl Go Taq PCR Master Mix 2X, 1 µl Mix DNA atau DNA Template, 0,5 µl Primer Forward (100 µg/µl), 0,5 µl Primer Reverse (100 µg/µl), dan 3 µl ddH₂O. Lalu dimasukkan kedalam mesin PCR, sesuai dengan yang sudah diprogram sesuai dengan primer yang sudah dirancang. Tahap selanjutnya adalah elektroforesis hasil PCR untuk mengetahui fragmen DNA, hal ini dilakukan menggunakan gel agarose dengan konsentrasi agar 1% dalam total volume 30 ml dan pewarna

Peggreen. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit dan tegangan 100 V. Hasil kemudian dilihat pada UV-Transiluminator dan didokumentasikan.



Gambar 3.1 Protokol PCR *gen cytochrome b* hasil optimasi

3.4.5 Sikuensing dan Analisis Filogenetik

Setelah pita tunggal terbentuk kemudian dilakukan perbanyakan sampel hasil PCR untuk proses sikuensing. Total volume reaksi PCR dibuat sebanyak 4 tabung, setiap tabung berjumlah 20 μ l dengan komposisi mix PCR 10 μ l Go Taq PCR Master Mix 2X, 2 μ l sampel DNA, 1 μ l Primer Forward (10 pmol/ μ l), 1 μ l Primer Reverse (10 pmol/ μ l), dan 6 μ l ddH₂O. Hasil PCR kemudian digabung. Sampel yang dikirim untuk sikuensing adalah hasil PCR sebanyak 50 μ l, primer forward 10 μ l, dan primer reverse 10 μ l. Proses sikuensing berlangsung di Seoul, Korea oleh pihak penyedia layanan jasa sikuensing Macrogen Inc.

Analisis data hasil sikuensing dilakukan dengan melakukan *contig* terlebih dahulu menggunakan Cap3 Contig Assembly pada laman <http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Cap3.html>. Tujuan dilakukannya *contig* adalah untuk mengurangi kemungkinan terjadinya kesalahan pada saat sikuensing yang dapat mempengaruhi proses penjejajaran (*alignment*) (Fortino, 2013). Hasil *contig* dengan data DNA yang terdapat di database GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) menggunakan program BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Tools*) pada laman <http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.gi> untuk memperoleh informasi mengenai sikuen DNA *gen cytochrome b* organisme yang teramplifikasi (Xiong, 2006).

Nadia Insani, 2019

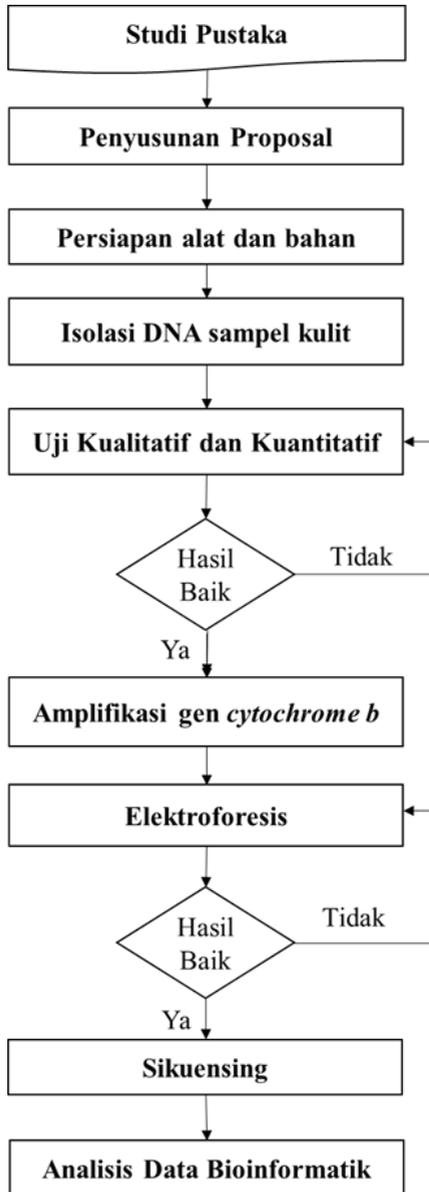
IDENTIFIKASI SPECIES DARI KULIT YANG DIDUGA HARIMAU JAWA (*Panthera tigris sondaica*) BERDASARKAN SIKUEN GEN *Cytochrome b*

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

Sikuen hasil *contig* disejajarkan dan dibandingkan dengan sikuen standar dari hewan mamalia yang terdapat di NCBI. Proses penjejajaran setiap sikuen nukleotida dilakukan menggunakan *software* ClustalX versi 1.83 dengan hasil *output* berupa format *fasta* (.fasta) dan *nexus* (.nxs). Selanjutnya rekonstruksi pohon filogenetik dilakukan pada *software* PAUP versi 4 dengan memilih metode *Maximum Parsimony* (MP), serta dilakukan analisis *bootstrap* untuk mengetahui nilai kekokohan pohon filogenetik yang dihasilkan.

3.5 Bagan Alir Penelitian

Berdasarkan uraian prosedur penelitian yang dijelaskan, alur pada penelitian ini dimulai dengan studi pustaka dan penyusunan proposal. Selanjutnya persiapan alat dan bahan untuk memulai penelitian yang terdiri dari beberapa tahap, yaitu isolasi DNA, uji kualitatif dan kuantitatif, amplifikasi, dan elektroforesis. Hasil amplifikasi dikirim ke Macrogen untuk dilakukan sikuensing, lalu output sikuensing dianalisis menggunakan *software* bioinformatik untuk mendapatkan hasil akhir dari penelitian ini.



Nadia Insani, 2019

IDENTIFIKASI SPECIES DARI KULIT YANG DIDUGA HARIMAU JAWA (*Panthera tigris sondaica*) BERDASARKAN SIKUEN GEN *Cytochrome b*

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

Gambar 3.2 Diagram Alir Penelitian