

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel folikel rambut Lutung Jawa dilakukan di Pusat Rehabilitasi Lutung Jawa *Javan Langur Center* (JLC) Batu, Jawa Timur, selanjutnya penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) dan Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya pada bulan Mei-September 2015.

4.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang diperlukan dalam penelitian antara lain kandang jepit, disposable syringe 1 cc, standar *forceps*, sarung tangan, masker, gunting, *ice box*, kertas label, *autoclave – Bio Clave Gnatus 21L*, *micro tube* 1,5 ml, *micro tube rack*, *microtube* 200 μ L, mikropipet 1 – 10 μ L, 20 – 200 μ L, dan 200 – 1000 μ L, labu Erlenmeyer 100 ml, timbangan analitik digital, *incubator*, mesin penangas, mesin vortex, *white tip*, *yellow tip*, *blue tip*, *pipete tube rack*, sentrifugator, freezer -20 °C, *Thermocycler SensoQuest GmbH*, mesin *sequencing*, computer, *Bio Step UV-Transilluminator DH-40*, Implen *NanoPhotometer[®] Pearl*, Mupid-Exu *Electrophoresis* dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain folikel rambut Lutung Jawa rambut hitam dan Lutung Jawa rambut oranye masing-masing 25 – 30 helai, agen anestesi, Qiagen *DNeasy[®] Blood and Tissue Kit*, ddH₂O, primer *forward* (MC1R_F) 5'-TCTATGCACTGCGCTACCAC-3' dan *Reverse* (MC1R_R) 5'-CG TACAGCACAGCCATGAGT-3', PCR *mix* (Promega *GoTaq[®] Green Master*

Mix), DNA *ladder* 100 bp dan 1 kb, agarosa 1% dan 2%, Promega *blue loading dye* 6x, etanol absolut, etanol 70%, Natrium asetat 3M, kertas parafilm, alumunium foil, dan larutan etidium bromida (EtBr).

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Pemilihan Lutung Jawa di Javan Langur Center Batu, Jawa Timur
2. Pengambilan sampel berupa folikel rambut Lutung Jawa rambut hitam dan oranye
3. Isolasi DNA
4. Uji Kuantitas dan kualitas DNA
5. Desain primer
6. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
7. Uji kuantitas dan kualitas Produk PCR
8. Purifikasi produk PCR
9. Sekuensing DNA produk PCR
10. Analisa data

4.4 Rancangan Penelitian

Data penelitian yang didapat dianalisa secara sistematis untuk menjelaskan suatu gambaran pada tiap tahapan penelitian. Sebanyak enam sampel folikel rambut yang diuji merupakan folikel rambut dari spesies Lutung Jawa (*Trachypithecus auratus*) sebanyak 25-30 helai tiap individu. Folikel rambut kemudian dilakukan pengisolasian DNA dengan menggunakan *DNeasy® Blood and Tissue Kit*. Hasil isolasi DNA akan diukur konsentrasinya dengan nanospektrofotometri dan

ukurannya dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Setelah itu, sampel DNA akan diamplifikasi dengan PCR menggunakan sepasang primer *forward* (MC1R_F) 5'-TCTATGCACTGCGCTACCAC-3' dan *Reverse* (MC1R_R) 5'-CGTACAGCA CAGCCATGAGT-3'. Untuk mengetahui ukuran fragmen produk PCR diukur dengan elektroforesis gel agarosa 2%. Produk PCR kemudian disekuensing dengan metode *Sanger*. Hasil sekuensi fragmen DNA kemudian dibandingkan dengan memanfaatkan *nucleotide* BLAST pada NCBI dan *software* *BioEdit*.

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Pemilihan Lutung Jawa

Lutung Jawa yang digunakan berasal dari *Javan Langur Center* di Batu Jawa Timur. Pemilihan Lutung Jawa dilakukan berdasarkan jumlah populasi Lutung Jawa rambut oranye yang merupakan minoritas dalam populasi Lutung Jawa. Lutung Jawa yang digunakan sebagai sampel penelitian berada dalam penangkaran atau proses persiapan pelepasliaran. Tabel 4.1 menunjukkan informasi individu Lutung Jawa.

Tabel 4.1 Informasi individu Lutung Jawa

No	Nama	Umur (tahun)	Jenis Kelamin	Warna Rambut	Simbol
1	Utung	2	Jantan	Hitam	H1
2	Atun	2	Betina	Hitam	H2
3	Lilin	2	Betina	Hitam	H3
4	Adzuki	15	Jantan	Oranye	O1
5	Merlin	3	Betina	Oranye	O2
6	Kiki	7	Jantan	Oranye	O3

4.5.2 Pengambilan Sampel Folikel Rambut

Lokasi pengambilan folikel rambut dilakukan dibagian *mid dorsum* Lutung Jawa. Menurut Bradley *et al.* (2012) lokasi tersebut merupakan regio yang mewakili pigmentasi secara umum. Folikel yang diambil berjumlah enam sampel yang terdiri tiga individu Lutung Jawa rambut hitam dan tiga individu rambut oranye masing-masing sebanyak 25 helai rambut tiap individu.

Pengambilan sampel dilakukan menggunakan modifikasi dari petunjuk *The Wildlife Forensics Network* (2010) tentang tatacara pengambilan sampel rambut satwa liar untuk keperluan isolasi DNA dan forensik. Tata cara yang dilakukan dengan aseptis, sampel rambut diambil meliputi seluruh bagian rambut beserta folikel (akar rambut) menggunakan pinset (*standard forceps*) selanjutnya dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL dan diberi label. *Microtube* yang telah berisi sampel kemudian disimpan di dalam *ice box*. Seluruh proses pengambilan sampel telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No:418-KEP-UB (**Lampiran 1**).

4.5.3 Isolasi DNA

Isolasi DNA dari folikel rambut Lutung Jawa menggunakan *DNeasy[®] Blood and Tissue Kit* mengikuti protokol isolasi DNA dari jaringan. Terdapat tiga langkah utama dalam isolasi DNA, yaitu perusakan dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA (Surzycki, 2000). Protokol Isolasi DNA dari rambut dan folikel rambut dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

4.5.4 Uji Kuantitas dan Kualitas DNA

4.5.4.1 Uji Kuantitas DNA

Uji kuantitas dilakukan dengan menggunakan mesin Implen *NanoPhotometer*[®] *Pearl*. Pengujian dilakukan dengan *buffer* terakhir saat isolasi DNA (*buffer* AE) sebagai blanko. *Buffer* diteteskan langsung di atas *pedestal submicroliter cell* sebanyak 1 μ L, selanjutnya absorbansi blanko diukur dengan menekan tombol *blank* setelah *lid* (penutup) ditutupkan. Sebanyak 1 μ L sampel diteteskan di atas *pedestal submicroliter cell* yang telah dibersihkan. *Lid* ditutup di atas sampel yang telah diteteskan dan ditekan tombol *sample* kemudian ditunggu hingga hasil keluar di layar monitor.

4.5.4.2 Uji Kualitas DNA

Hasil konfirmasi isolat DNA diukur menggunakan gel elektroforesis agarosa 1% dengan tujuan untuk mengetahui regio DNA target yang menjadi cetakan untuk gen MC1R. Uji kualitas DNA dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1% menggunakan mesin Mupid-Exu *Electrophoresis*. Elektroforesis gel agarosa 1% dilakukan sesuai Sambrook *and* Russel (2001); Fatchiyah dkk., (2011). Dibersihkan cetakan agarosa dan diletakkan secara horizontal, selanjutnya dipanaskan TBE 1x dengan volume 15 ml dan gel agarosa 1% (0,15 g) hingga mendidih atau agarosa larut. Menurut Fatchiyah dkk., 2011 campuran selanjutnya ditambahkan larutan EtBr sebanyak 1 μ L dan didinginkan (tidak sampai memadat), disiapkan sisir untuk pembuatan slot pada gel. Posisi sisir tidak menyentuh permukaan *plate* hingga sumuran terbentuk saat ditambahkan agarosa ke dalam *chamber*. Campuran agarosa dan TBE 1x kemudian dituangkan ke dalam cetakan (*gel plate*) dan dipastikan tidak

terdapat gelembung udara di area sisir yang digunakan. Gel selanjutnya dibiarkan memadat selama 20 – 30 menit pada suhu kamar dan diambil sisir dari gel secara perlahan serta dimasukkan ke dalam *chamber* Mupid-Exu *Electrophoresis*. Kemudian larutan *buffer* elektroforesis (*running* TBE 1x) dituangkan di atas gel hingga menutupi seluruh bagian gel (lebih kurang 1 mm). *Marker* (DNA *ladder*) dan *loading dye* (1:1) selanjutnya dimasukkan ke dalam salah satu sumuran (umumnya sumur pertama). Larutan *loading dye* dan DNA kemudian dimasukkan (1:1) pada sumur selanjutnya. Ukuran cetakan DNA menggunakan DNA *ladder* sebagai penanda (*marker*) ukuran panjang basa DNA. Pada proses elektroforesis, sampel DNA ditambahkan *loading dye* yang terdiri dari *glycerol* dan *bromphenol blue*. *Glycerol* berfungsi sebagai pemberat yang menyebabkan DNA berada di bawah sumur gel, sedangkan *bromphenol blue* berfungsi sebagai visualisasi pada gel (Carson, 2006). *Chamber* dihubungkan dengan *power supply* dan dinyalakan 20 – 30 menit dengan tegangan 100 Volt. Setelah *running* gel elektroforesis selesai arus listrik diputuskan dan diangkat gel dari *chamber*. Gel selanjutnya dipindahkan ke *UV-transilluminator gel doc* dan diamati hasilnya. Hasil didokumentasikan dan diekspos dengan *gel doc imaging* sehingga memudahkan analisis.

4.5.5 Desain Primer

Primer yang digunakan dalam amplifikasi DNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) disesain menggunakan NCBI *GeneBank*: AY205110.1. Primer tersebut didapatkan dari *primer3plus* dengan menggunakan data *locus* AY205110 954 bp DNA *linear*. *Trachypithecus auratus isolate 3 melanocortin-1 receptor* (MC1R) *gene, complete cds* 1-954. Sepasang sekuen primer yang

didapatkan adalah primer *forward* (MC1R_F) 5'-TCTATGCACTGCGC TACCAC-3' dan *Reverse* (MC1R_R) 5'-CGTACAGCACAGCCATGAGT-3' dengan komposisi GC *content* 55% dan Tm 60°C. Tata cara desain primer dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

4.5.6 Proses *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Sampel DNA dari folikel rambut Lutung Jawa diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR. Sepasang primer yang digunakan adalah primer *forward* (MC1R_F) dan *Reverse* (MC1R_R). Amplifikasi dimulai dengan mencampurkan 1 µL DNA, 1 µL primer *forward* 10 pmol, 1 µL primer *reverse* 10 pmol, 5 µL PCR *mix*, dan 2 µL ddH₂O kedalam *microtube* 200 µL. Tahapan amplifikasi dimulai dari pradenaturasi 94°C selama dua menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, kemudian *annealing* pada suhu 52,3°C selama 30 detik dengan gradien +/- 5°C, *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit dan *post extension* pada suhu 72°C selama 7 menit. Proses akan berulang hingga 35 siklus.

4.5.7 Uji Kuantitas dan Kualitas Produk PCR

Pengujian kuantitas produk PCR sama dengan uji kuantitas isolat DNA. Untuk memvisualisasikan produk PCR gen MC1R dari folikel rambut Lutung Jawa, kemudian dilanjutkan dengan *running* elektroforesis gel agarosa menurut Sambrook dan Russel (2001). Pada dasarnya pengujian kualitas produk PCR sama dengan menguji kualitas DNA. Sebanyak 2µL produk PCR ditambahkan 2 µL *Loading dye* dan dicampurkan homogen di dalam PCR *tube*. Produk PCR tersebut dipipet ke dalam sumur gel agarosa 2% dengan TBE 1x pada voltage 100 V, selama

30 menit. Kemudian dokumentasikan hasil elektroforesis dengan kamera digital pada UV-transilluminator (Fatchiyah dkk., 2011).

4.5.8 Purifikasi Produk PCR

Purifikasi produk PCR bertujuan untuk memurnikan DNA dan menghilangkan sisa-sisa PCR mix meliputi dNTPs, Taq Polimerase, dan ion Mg, serta ddH₂O dan primer yang berada di dalam PCR *tube*. Metode yang digunakan dalam purifikasi produk PCR adalah presipitasi etanol dengan modifikasi protokol dari *The National Guard Health Affairs* (2013). Protokol purifikasi produk PCR dapat dilihat pada **Lampiran 6**.

4.5.9 Sekuensing DNA

Sekuensing produk PCR dari gen MC1R dilakukan dua arah yaitu dengan menggunakan primer MC1R_F 10 pmol dan MC1R_R 10 pmol untuk melihat sekuen MC1R sebesar 183 bp yang teramplifikasi dengan menggunakan metode *dye terminator*. Konsentrasi DNA produk PCR minimal 50 ng/μL untuk dapat dilakukan sekuensing. Menurut Abdullah dkk. (2011), hasil sekuensing berupa grafik yang menyatakan kandungan adenin, timin, guanin, dan sitosin yang terdapat pada fragmen DNA yang telah dilabel oleh ddNTPs.

4.5.10 Analisa Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan pembahasan secara kualitatif dengan mendiskripsikan perbedaan DNA gen MC1R antara Lutung Jawa rambut hitam dan rambut oranye menggunakan *software BioEdit* dan BLAST NCBI. Tahap analisis DNA dilakukan dengan penyejajaran sekuen DNA dengan membandingkan antara sampel H, O dan *database NCBI GeneBank: AY205110.1*

(Trachypithecus auratus isolate 3 melanocortin-1 receptor (MC1R) gene, complete cds), penyejajaran menggunakan algoritma *ClustalW multiple alignment* pada software *BioEdit*.