

**EVALUASI HASIL ISOLASI DNA DARI JARINGAN
TERFIKSASI FORMALIN DAN JARINGAN
SEGAR HEPAR DARI AYAM
BROILER**

SKRIPSI

Oleh:

ANDI TRI RAKHMAT AKBAR

175130101111048



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**

**EVALUASI HASIL ISOLASI DNA DARI JARINGAN
TERFIKSASI FORMALIN DAN JARINGAN
SEGAR HEPAR DARI AYAM
BROILER**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

ANDI TRI RAKHMAT AKBAR

175130100111048



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

EVALUASI HASIL ISOLASI DNA DARI JARINGAN
TERFIKSASI FORMALIN DAN JARINGAN
SEGAR HEPAR DARI AYAM
BROILER

Oleh :

ANDI TRI RAKHMAT AKBAR

NIM. 175130100111048

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

Pada tanggal 13 Juli 2021

Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing 1

Dra. Anna Roosdiana, M. Apps.Sc

NIP. 19580711 199203 2 002

Pembimbing 2

drh. Fajar Shodiq P., M. Biotech

NIP. 19870501 201504 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Brawijaya

drh. Dyah Ayu Oktavianie A.P., M. Biotech

NIP. 19841024 200812 2 004

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Andi Tri Rakhmat Akbar

NIM : 175130100111048

Program Studi : Kedokteran Hewan

Skripsi berjudul:

Evaluasi Hasil Isolasi DNA dari Jaringan Terfiksasi Formalin dan Jaringan Segar Hepar Dari Ayam Broiler

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaksud di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 3 Maret 2021

Yang menyatakan,



Andi Tri Rakhmat Akbar
NIM. 175130101111048

Evaluasi Hasil Isolasi DNA dari Jaringan Terfiksasi Formalin dan Jaringan Segar Hepar Dari Ayam Broiler

ABSTRAK

Ayam broiler memiliki peran yang penting dalam ketersediaan daging untuk memenuhi kebutuhan nutrisi masyarakat dan kesejahteraan dari para peternak ayam. Ada banyak hal yang perlu diperhatikan dalam manajemen peternakan ayam, terutama pada kesehatan ternak ayam. Ternak ayam yang sakit dan mati akan memberikan kerugian ekonomi. Pendekatan molekuler akan membantu dalam seleksi bibit ayam resisten penyakit dan juga dalam diagnosa penyakit. Tahap paling awal dalam biologi molekuler adalah ekstraksi DNA. Hasil dari ekstraksi DNA tergantung dari kondisi sampel setelah dikoleksi, sehingga bergantung pada metode preservasi jaringan sebelum ekstraksi dimulai. Pada umumnya metode yang digunakan dalam preservasi jaringan sampel ekstraksi adalah dengan menggunakan freezer -20°C . Namun pendinginan dapat menyebabkan kristalisasi air yang berakhir ke pergeseran cairan, tekanan osmosis dan perubahan pH. Tujuan penelitian ini adalah untuk membandingkan hasil konsentrasi, kemurnian DNA serta hasil elektroforesis pita DNA pada dua sampel dengan proses preservasi berbeda. Proses preservasi jaringan sebelum ekstraksi DNA menggunakan sampel terfiksasi *Formalin NS 10%*, dimana formalin adalah larutan fiksatif yang dapat menjaga struktur sel namun dapat mempengaruhi adanya ikatan protein dengan DNA. Pada penelitian ini dibandingkan metode penyimpanan sampel hepar pada suhu -20°C dan *Formalin NS 10%*. Kedua sampel di ekstraksi dengan *ThermoScientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit*. Hasil ekstraksi kemudian di uji secara kuantitatif dengan uji Nanodrop untuk mendapatkan kemurnian dan konsentrasi isolat DNA. Untuk uji kualitatif didapatkan dari visualisasi pita hasil *gel electrophoresis*. Data hasil uji Nanodrop kemudian di analisis menggunakan uji T (*Independent samples T-test*) dan analisis visualisasi pita hasil uji gel elektroforesis pada *UV-transluminator*. Berdasarkan pada uji T (*independent sample T-test*) tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada nilai kemurnian λ 260/280 nm dan Konsentrasi DNA dan terdapat perbedaan yang signifikan pada nilai kemurnian λ 260/230 nm pada kedua metode penyimpanan. Hasil elektroforesis dengan gel agarose 0.8% menunjukkan visualisasi pada kelompok sampel hepar dengan efek *smearing* sedangkan pada kelompok sampel hepar terfiksasi formalin tidak muncul pita DNA. Oleh karena itu formalin dapat digunakan sebagai larutan fiksatif jaringan isolasi DNA dengan kemurnian dan konsentrasi yang cukup baik namun dengan penurunan kualitas DNA.

Kata Kunci : Ekstraksi DNA, Formalin, Gel elektroforesis, Hepar

Evaluation of DNA Isolation result from Formalin-Fixed Tissue and Fresh Liver Tissue of Broiler Chicken

ABSTRACT

Broiler Chicken have a major role in meat availability to fulfill people nutrition needs and the economical welfare of chicken farmers. There are many concerns in chicken farm management especially in health management. Sick and dead chicken will impact the farmer financially. Molecular approach helps in the selection of disease resistant chickens, and also significantly increase the accuracy of disease diagnosis. The very first step in every molecular technique are DNA extractions. The result of DNA extraction depends on the condition of the sample after it is collected, so it depends on the method of preserving the tissue before the extraction begins. In general, the method used in the preservation of the extraction sample tissue is to use a freezer of -20°C . However, cooling can cause water crystallization which results in fluid shifts, osmotic pressure and changes in pH. The purpose of this study was to compare DNA purity and concentration, also DNA band expression after different preservation method. The tissue preservation process before DNA extraction used 10% formalin NS as a fixative maintain cell structure but can affect the presence of protein-to-DNA binding. This research will compare the liver storage method at -20°C and 10% NS Formalin in the DNA extraction process. Both samples were extracted with ThermoScientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit. The extraction results were then tested quantitatively with the Nanodrop test to obtain the purity and concentration of DNA isolates. The qualitative test was obtained from the visualization of the gel electrophoresis result band. The result data from Nanodrop test were analyzed using the T test (Independent samples T-test) and visualization analysis of the band from gel electrophoresis on the UV-transluminator. Based on the independent sample T-Test there are no significant differences between the purity on λ 260/280 nm and DNA concentration but significant difference at λ 260/230 nm purity of both fixative methods. Electrophoresis result with 0.8% agarose gel shows visualization in fresh liver samples with smearing effect but no DNA band in the formalin fixed tissue. The conclusion of the research, formalin is a viable alternative for DNA isolation with relatively good purity and concentration but low DNA quality.

Keywords : DNA extractions, Formalin, Gel Electrophoresis, Liver



DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI.....	ii
LEMBAR PERNYATAAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG.....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Ayam Broiler.....	6
2.1.1 Hepar Ayam.....	7
2.2 DNA (Deoxyribonucleid Acid).....	10
2.3 Isolasi DNA.....	12
2.3.1 Ekstraksi DNA.....	13
2.3.2 Deteksi dan Kuantifikasi Asam Nukleat.....	15
2.3.3 Gel Elektroforesis.....	16
2.4 Fiksasi Jaringan.....	18
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN.....	20
3.1 Kerangka Konsep.....	20
3.2 Hipotesa Penelitian.....	22
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	23

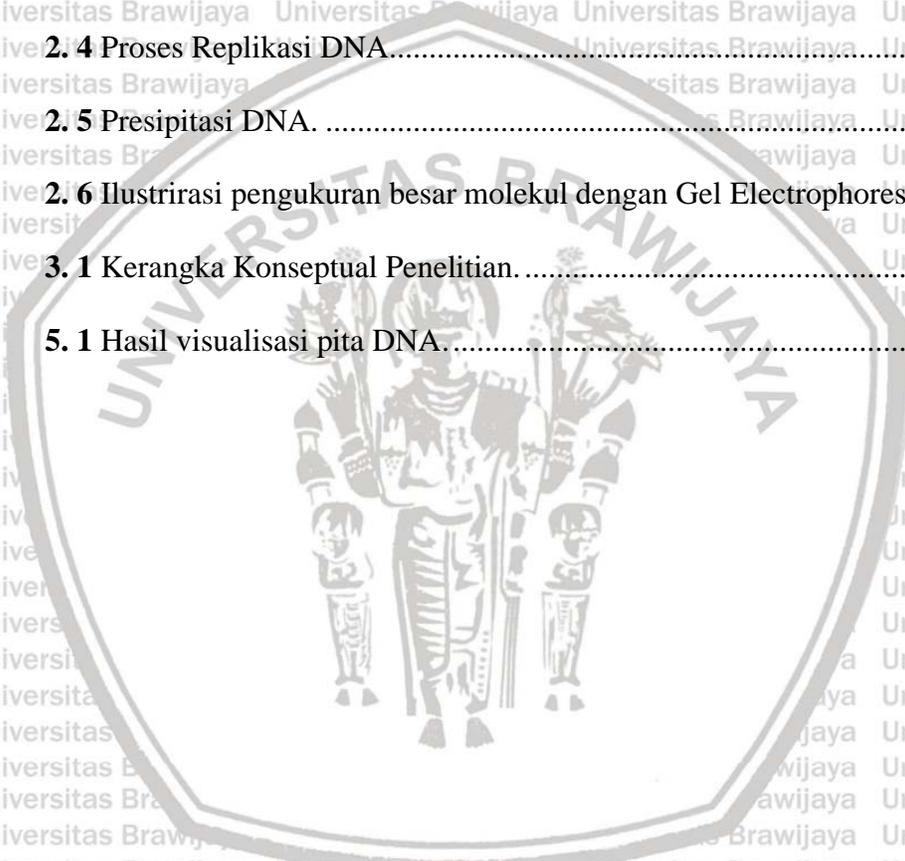


4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	23
4.2 Materi Penelitian	23
4.2.1 Alat	23
4.2.2 Bahan	23
4.3 Tahapan Penelitian	24
4.4 Rancangan Penelitian	24
4.5 Variabel Penelitian	25
4.6 Prosedur Kerja	25
4.6.1 Persiapan Sampel	25
4.6.2 Ekstraksi	25
4.6.3 Uji Nanodrop	27
4.6.4 Uji Elektroforesis	27
4.7 Analisa Data	28
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	29
5.1 Hasil Nilai Kemurnian dan Konsentrasi DNA	29
5.2 Hasil Visualisasi Pita DNA	37
BAB 6 PENUTUP	44
6.1 Kesimpulan	44
6.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2. 1 Ayam Broiler.....	6
2. 2 Strujtur anatomi dan histologi hepar.....	8
2. 3 Rumus kimia pasangan basa nitrogen DNA dan double helix DNA.....	11
2. 4 Proses Replikasi DNA.....	12
2. 5 Presipitasi DNA.....	15
2. 6 Ilustrasi pengukuran besar molekul dengan Gel Electrophoresis.....	18
3. 1 Kerangka Konseptual Penelitian.....	20
5. 1 Hasil visualisasi pita DNA.....	38





DAFTAR LAMPIRAN

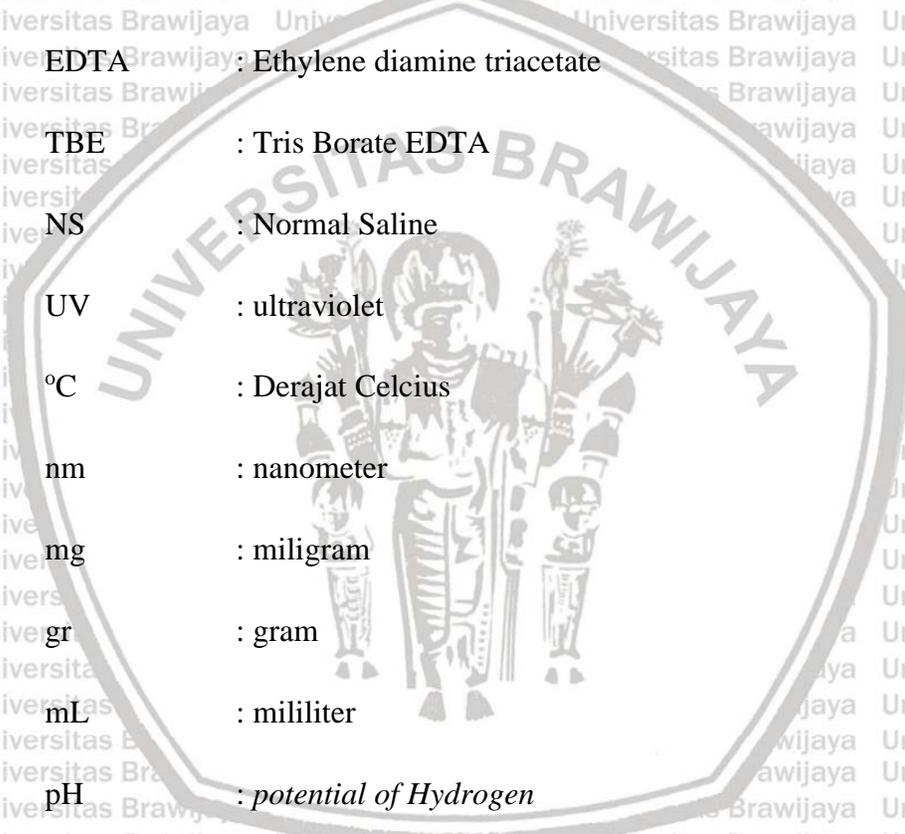
Lampiran

Halaman

1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian.....	47
2. Proses Ekstraksi DNA.....	48
3. Proses Gel Elektroforesis	49
4. Hasil uji Nanodrop Hepar segar dan terfiksasi formalin.....	50
5. Hasil uji independent T Test nilai kemurnian DNA	51
6. Hasil Uji Independent T Test nilai konsentrasi DNA	53
7. Hasil uji nano drop dan elektroforesis otot pectoralis.....	55
6. Hasil Uji nanodrop dan elektroforesis amplifikasi	56

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

- bp : *base pairs*
- DNA : *Deoxyribonucleoid Acid*
- RNA : *Ribonucleid Acid*
- SDS : *sodium dodecyl sulphate*
- EDTA : *Ethylene diamine triacetate*
- TBE : *Tris Borate EDTA*
- NS : *Normal Saline*
- UV : *ultraviolet*
- °C : *Derajat Celcius*
- nm : *nanometer*
- mg : *miligram*
- gr : *gram*
- mL : *mililiter*
- pH : *potential of Hydrogen*
- μL : *mikroliter*
- RE : *Retikulum Endoplasma*



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Ayam broiler adalah unggas yang memiliki kepentingan sangat tinggi dalam konsumsi pangan dunia. Produksi daging ayam terus berkembang karena memiliki keunggulan dari harga yang ekonomis, sumber protein yang dibutuhkan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi masyarakat, produk yang memiliki fleksibilitas tinggi sebagai hasil olahan produk hewani, dan ketersediaannya untuk seluruh kalangan sosial (Scanes and Christensen, 2020). Usaha peternakan ayam broiler dalam bidang peternakan adalah salah satu usaha yang sangat berpengaruh pada aspek kehidupan peternak dan masyarakat, mulai dari meningkatkan pendapatan para peternak dan juga pemenuhan gizi masyarakat (Hendrizal, 2011).

Dalam manajemen peternakan ayam, ada hal yang sangat perlu diperhatikan yaitu manajemen kesehatan ayam. Ternak yang sehat akan memberi keuntungan dan ternak yang sakit akan menyebabkan kerugian finansial. Jika berujung hingga kematian ternak akan menyebabkan kerugian ekonomi yang lebih besar, oleh karena itu program kesehatan hewan untuk mencegah, mendiagnosa dan mengobati penyakit hewan sangat krusial (Scanes and Christensen, 2020).

Teknik analisis biomolekuler sudah digunakan di dunia kedokteran hewan untuk mendukung akurasi diagnosa laboratorik dan pengobatan. Teknik paling dasar dalam biologi molekuler adalah teknik isolasi genom dan ekstraksi DNA. Dikarenakan semua prosedur dalam teknik molekuler dimulai dengan mendapatkan sampel DNA

dari bagian tubuh ataupun jasad dari makhluk hidup tersebut. Sebelum menggunakan sampel DNA dalam teknik analisis kualitas dan kelayakan dari sampel DNA harus dinilai terlebih dahulu. Faktor yang dapat mempengaruhi kualitas dan kuantitas dari DNA yang diekstraksi terdapat dari sumber, asal kondisi dari sampel serta metode ekstraksi yang digunakan (Lucena-Aguilar et al., 2016; Pagala and Ulupi, 2015).

Salah satu usaha dalam menjaga kondisi jaringan agar tetap permanen, tidak berubah seperti kondisi saat organ masih hidup adalah melalui metode fiksasi. Fiksasi adalah proses kimia pengawetan jaringan biologis sehingga mencegah autolisis atau proses pembusukan (Suprianto, 2014). Saat ini terdapat beberapa metode preservasi jaringan yang digunakan dalam analisis biomolekuler yaitu contohnya menggunakan *cryo-fixation*, tetapi kenyataan dalam proses pengambilan sampel sebelum sampai ke laboratorium alat dan bahan untuk *cryo-fixation* tidak selalu tersedia. Dalam pemeriksaan histopatologis sendiri, agen fiksatif yang paling sering digunakan adalah formalin 10% yang dicampurkan dengan air atau larutan *buffer* dengan pH netral. Dalam fiksasi jaringan, formalin memiliki sifat murah, mudah didapat, stabil aman serta dapat melindungi dan mempertahankan jaringan dengan sangat baik. Pada penelitian ini, digunakan normal saline (NS) sebagai pelarut karena sifatnya yang isotonis sehingga dapat menyeimbangkan antara air di dalam jaringan dengan konsentrasi formalin (Musyarifah and Agus, 2018).

Penelitian ini bertujuan untuk mendorong pengembangan metode molekuler dengan menggunakan metode pengawetan sampel yang sama pada sampel tetap dengan formalin 10% NS. Jika harus disimpan dalam waktu lama maka cara penyimpanan sampel dengan formalin NS 10% juga akan sangat membantu dan praktis dalam pengambilan sampel di lapangan dibanding pendingin. Diharapkan

hasil ekstraksi DNA dengan metode penyimpanan sampel formalin NS 10% akan sama atau mirip dengan hasil ekstraksi DNA menggunakan sampel darah atau segar.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Bagaimana pengaruh penyimpanan organ hepar terfiksasi Formalin NS 10% terhadap Absorbansi dan konsentrasi hasil ekstraksi DNA?
2. Bagaimana pengaruh penyimpanan organ hepar terfiksasi Formalin NS 10% terhadap visualisasi pita hasil ekstraksi DNA?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah diuraikan, maka penelitian dibatasi oleh beberapa permasalahan sebagai berikut :

1. Sampel yang digunakan adalah organ hepar dari ayam broiler dari UD Sumber Unggas berumur 21 hari yang dibagi menjadi dua kelompok sampel berdasarkan metode penyimpanan yang berbeda dengan berat sampel yang digunakan 20 mg
2. Sampel organ hepar segar kelompok pertama yang telah dikoleksi dimasukkan ke dalam *freezer* suhu -20°C
3. Sampel organ hepar kelompok lainnya disimpan di dalam Larutan Normal Saline (NS) dengan Formalin-10% pada suhu ruangan

4. Sampel organ hepar kedua kelompok perlakuan diekstraksi menggunakan *Thermo Scientific Gene Jet Genomic DNA Purification*
5. Jumlah *Elution buffer* yang digunakan pada jaringan segar 100 μ l dan 50 μ l pada jaringan yang terfiksasi formalin
6. Pengamatan dilakukan pada hasil Ekstraksi DNA *couloumn purification* sampel hepar segar dan yang telah terfiksasi formalin
7. Parameter kuantitatif yang digunakan adalah kemurnian dan konsentrasi DNA berdasarkan hasil uji nanodrop dengan panjang gelombang λ 260/230 dan λ 260/280 pada sampel jaringan hepar segar dan terfiksasi formalin dan kemudian dianalisis melalui uji *Independent sample T-test* dengan angka kepercayaan 95%
8. Parameter kualitatif yang digunakan adalah Visualisasi Pita DNA hasil ekstraksi yang dibaca pada *minipcr blueGelTM Electrophoresis with built-in transilluminator* dan dianalisa dalam bentuk deskripsi

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang sudah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh penyimpanan organ hepar terfiksasi Formalin NS 10% terhadap nilai kemurnian konsentrasi hasil ekstraksi DNA
2. Mengetahui pengaruh penyimpanan organ hepar terfiksasi Formalin NS 10% terhadap visualisasi pita hasil ekstraksi DNA

1.5 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan oleh penulis dari penelitian ini sebagai berikut:

1. Penelitian ini dapat menambah informasi dan pengetahuan dengan penelitian mengenai hasil ekstraksi pada sampel organ hepar segar dan setelah fiksasi formalin
2. Penelitian ini dapat mengumpulkan data evaluasi tentang Hasil Ekstraksi DNA pada sampel organ hepar segar dan setelah terfiksasi formalin
3. Diharapkan kedepannya dapat menjadi sumber referensi dan pengetahuan untuk penelitian selanjutnya mengenai Ekstraksi DNA menggunakan metode penyimpanan yang berbeda



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ayam Broiler

Ayam Broiler atau sering juga disebut dengan ayam pedaging dan *fryer* adalah ayam muda (jantan ataupun betina) dibawah 10 minggu yang ditenakkan dengan tujuan khusus untuk dikonsumsi dagingnya dengan berat karkas kurang lebih diantara 0,45 kg hingga 2,1 kg. Harga yang ekonomis, fleksibilitas dari penggunaan daging, dan ketersediaan di hampir berbagai tempat membuat produksi ayam broiler menjadi sangat penting dan terus berkembang (Hendrizal, 2011; Scanes and Christensen, 2020). Ciri ciri dari ayam pedaging sendiri adalah memiliki badan yang besar, kuat dan daging yang padat, selain itu daya tumbuh daging cepat dengan waktu yang singkat namun memiliki tingkat produksi telur yang sangat rendah, bersifat tenang, bulunya tidak mengembang dengan warna kulit putih (Hendrizal, 2011).



Gambar 2. 1 Ayam Broiler (Scanes and Christensen, 2020)

Taksonomi dari ayam broiler menurut Hendrizal (2011) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Animalia*

Fillum : *Chordata*

Kelas : *Aves*

Subkelas : *Neonithes*

Genus : *Gallus*

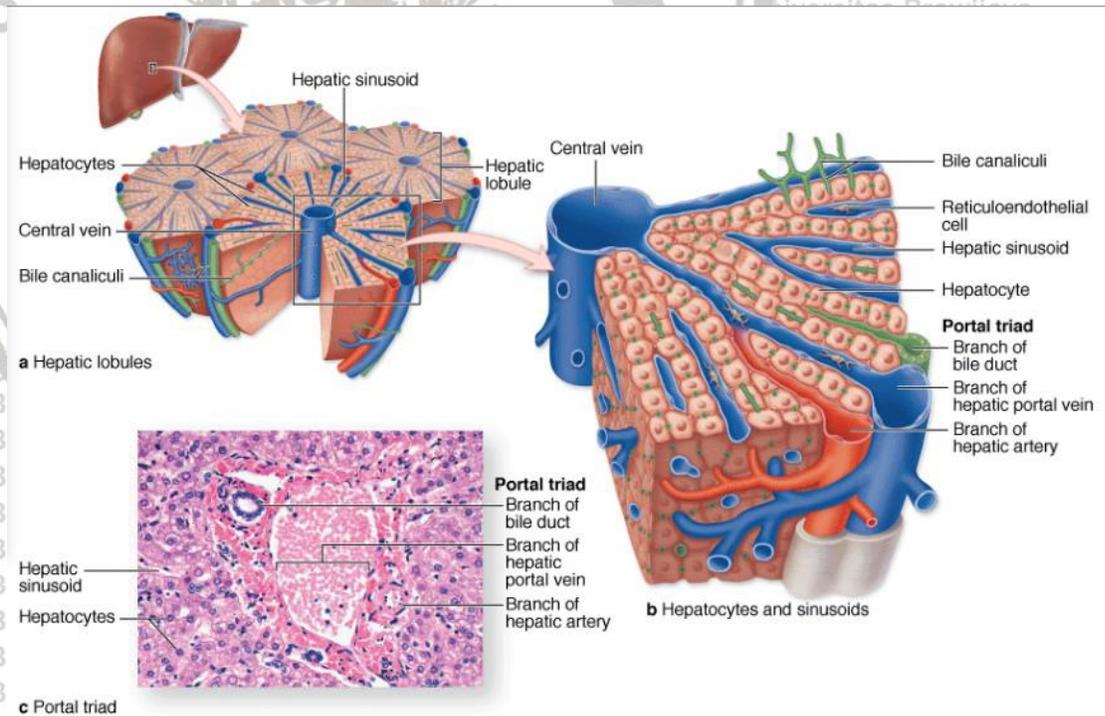
Species : *Gallus-gallus domestika*

2.1.1 Hepar Ayam

Hepar adalah salah satu organ paling penting di tubuh, organ kelenjar terbesar di tubuh dalam mempertahankan fungsi fisiologis normal dan juga menjadi tempat penyakit mudah berkembang. Salah satu fungsi hepar yang paling utama adalah menjaga homeostasis metabolisme, oleh karena itu Hepar menghubungkan saluran pencernaan dengan organ lainnya pada tubuh (Auliyah, 2016). Fungsi lain dari Hepar antara lain produksi asam empedu yang disimpan dalam kantong empedu, cairan ini penting dalam metabolisme lemak. Hepar memiliki peran penting dalam metabolisme karbohidrat dan protein, metabolisme zat beracun dan obat-obatan. Hampir seluruh protein dalam plasma darah dan faktor yang dibutuhkan dalam pembekuan darah disintesis oleh hepar, seperti albumin, fibrinogen dan protein *carrier* lainnya (Mescher, 2010).

Struktur dari hepar sendiri terdiri dari beberapa lobus mulai dari dua lobus utama dexter dan sinister. Lobus dexter terbagi menjadi lobus

anterior dan lobus posterior sedangkan Lobus kiri terdapat Segmen medial dan lateral yang dibagi menjadi dua oleh *ligamentum falsiformes*. Dalam satu lobus hepar terbagi kembali menjadi beberapa lobulus. Lobulus adalah unit fungsional dasar ditengah lobulus terdapat vena sentralis yang dikelilingi dari banyak lempengan sel hepar yang memencar dengan arah sentrifugal seperti roda. Sel satuan terkecil hepar yang berbentuk poligonal disebut dengan hepatosit, diantara sel-sel terdapat kanalikuli biliaris yang merupakan saluran ke duktus biliaris, kemudian ada jalur untuk kapiler darah percabangan dari arteri hepatica dan vena porta hepatica disebut sinusoid hepar (Auliyah, 2016).



Gambar 2. 2 Struktur anatomi dan histologi hepar (Mescher, 2010)

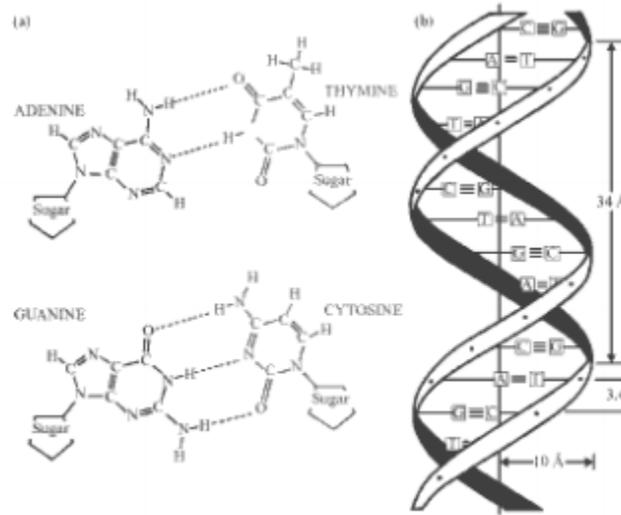
Secara fungsional, bisa disebut sebagai sel yang paling serba guna dalam tubuh. Jika dibandingkan dengan sel lain seperti sel otot yang kaya dengan mitokondria, Hepatosit memiliki organel reticulum endoplasma (RE) yang sangat melimpah, RE halus dan juga RE kasar. RE kasar berfungsi untuk sintesis plasma protein yang sering dilakukan hepatosit daerah periportal. RE Halus memiliki berbagai macam fungsi penting tergantung molekul yang diterima hepatosit, seperti oksidasi, metilasi dan konjugasi dalam proses dektosifikasi dan inaktivasi sebelum suatu senyawa dieksresikan. Pada hepatosit juga terdapat lebih banyak lisosom untuk degradasi organel intraselular, peroksisom untuk oksidasi asam lemak berlebih dan aktivitas katalase serta pembentukan asam urat, kolesterol, asam empedu dan molekul lemak lain yang diperlukan oleh neuron untuk membentuk myelin (Mescher, 2010).

Hampir semua darah yang masuk ke dalam hepar berasal dari organ pencernaan (70-80%) yang dibawah oleh vena porta dan sisanya dari arteri hepatica (20-30%). Posisi dari organ hepar serta vaskularisasinya membuat hepar sebagai organ untuk mengumpulkan, mengubah dan mengakumulasi metabolit yang berasal dari darah, kemudian zat yang bersifat beracun dineutrasisasi dan dieliminasi dalam tubuh (Mescher, 2010), Pada unggas, selain dari usus halus, nutrisi dari *gizzard* atau ventriculus juga akan dibawa ke hepar (Scanes and Christensen, 2020).

2.2 DNA (Deoxyribonucleid Acid)

DNA atau *Deoxyribonucleid Acid* secara kimiawi adalah penyusun dari kromosom, molekul yang memiliki sebagian atau bahkan seluruh material genetic dari suatu organisme yang terdapat dalam inti sel. Seluruh informasi tersebut disampaikan melalui mitosis dan meiosis, dari sel membelah ke sel lainnya saat mitosis dan dari generasi ke generasi selanjutnya melalui meiosis pada sel gamet (Nicholas, 2010).

Secara struktural DNA terdiri dari dua untai, dimana masing masing memiliki pengaturan linear dari nukleotida, molekul gula pentosa yang identik pada DNA (*deoksiribosa*). Selain nukleotida tiap DNA juga memiliki gugus fosfat yang identik dan empat jenis basa nitrogen. Basa nitrogen tersebut terdiri dari dua *pirimidin* yaitu *thymine* (T) dan *cytosine* (C), dan dua *purine* yaitu *guanine* (G) dan *adenine* (A). Struktur dari dua untai DNA memerlukan ikatan hidrogen spesifik antara basa nitrogen tersebut agar dapat mempertahankan struktur yang disebut *double helix*. Dimana A merupakan pasangan dari T dan G adalah pasangan dari C, pasangan basa nitrogen ini yang kemudian disebut dengan *complementary* karena tiap basa yang berkomplemen dengan lainnya (Dale et al., 2012; Nicholas, 2010) seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 2.3**.

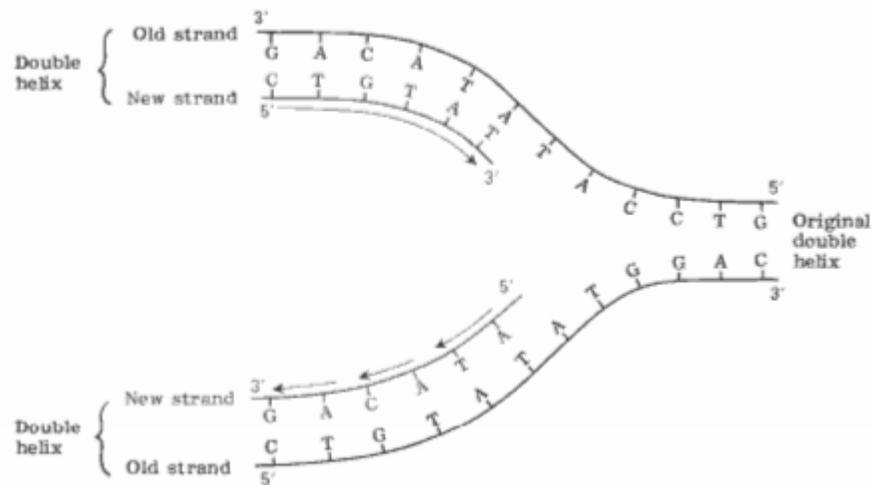


Gambar 2. 3 a. Struktur kimia pasangan basa nitrogen DNA b. *double helix* DNA

Menurut Dale *et al* (2012) dengan struktur pasangan basa DNA membuat dua untai DNA dapat terpisahkan, dalam sel ataupun dalam kondisi *in vitro*, dengan cara melepas ikatan hidrogen yang mengikat basa komplemen. Proses pemisahan ini disebut dengan denaturasi DNA, dan tidak seperti protein proses ini bersifat *reversible*. Dikarenakan sifat dari basa yang komplemen satu sama lain, ikatan hidrogen dapat terbentuk kembali atau *renaturation*. Pemahaman ini sangatlah penting dalam pengolahan DNA *in vitro* dalam berbagai perlakuan contoh seperti hibridisasi dan Teknik rekayasa DNA lainnya. Denaturasi DNA bisa dilakukan di laboratorium dengan pemanasan atau dengan larutan kimia seperti NaOH

Nicholas (2010) Menyebutkan bahwa struktur ini yang menjadi dasar dari mekanisme proses replikasi DNA. Saat untai DNA *double helix* terlepas, nukleotida yang terdapat dalam sel akan berpasangan dengan basa nitrogen dari masing masing untai DNA, membentuk untai komplementer yang baru dari

masing masing untai DNA yang terlepas. Dari proses terlepasnya untai DNA atau *unwinding*, dua untai DNA *double helix* telah terbentuk seperti pada **Gambar 2.4**, dan dengan kata lain kromosom juga telah terduplikasi. Proses replikasi DNA dibantu oleh enzim DNA polimerase untuk pembentukan untai baru dengan menempelkan nukleotida.



Gambar 2. 4. Proses Replikasi DNA (Nicholas, 2010)

Struktur DNA dan proses replikasi DNA menjadi kunci untuk memahami informasi genetik yang tersimpan dalam kromosom dan ditransmisikan antar sel untuk memproduksi berbagai macam efek, Faktanya setiap sekuens basa pada DNA memiliki arti yang sangat spesifik dan tersimpan dalam bentuk kode. (Dale et al., 2012; Nicholas, 2010).

2.3 Isolasi DNA

Menurut Dale et al (2012) langkah pertama dalam hampir semua prosedur teknologi DNA adalah ekstraksi dari DNA dari sel yang kemudian dipurifikasi

dari komponen sel lainnya. Tahap-tahap dan metode dalam ekstraksi DNA adalah tahapan yang bertujuan untuk purifikasi dan fractioning dari asam nukleat.

2.3.1 Ekstraksi DNA

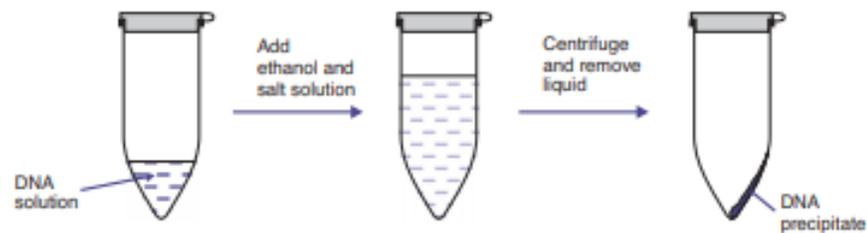
Ekstraksi DNA dimulai dengan mengoleksi sampel segar atau dibekukan hingga siap untuk digunakan untuk menghindari degradasi sel karena enzim seluler yang terdapat dalam sampel. Pada sampel terfiksasi formalin juga dapat digunakan tetapi perlu melewati tahapan khusus dengan pemanasan atau perlakuan alkali agar ikatan DNA-protein *crosslink* terlepas dan menghasilkan hasil ekstraksi yang sesuai dengan diharapkan (Campos and Gilbert, 2012; Dale et al., 2012). Sel yang akan diekstraksi perlu dilisiskan untuk melepaskan komponennya yang dapat dicapai dengan menggunakan EDTA (*ethylene diamine tetra-acetate*), *lysozyme* dan deterjen seperti SDS (*sodium dodecyl sulphate* atau *sodium lauryl sulphate*). *Lisozime* berfungsi untuk merombak polimer yang membentuk dinding sel, EDTA menghilangkan stabilitas dari membrane, sehingga lisozim dapat mencapai struktur sel. EDTA juga memiliki peran menghambat enzim DNase yang dapat membuat DNA terdegradasi dan detergent berfungsi untuk menghilangkan lemak sehingga organel sel dapat dilepaskan. Tetapi untuk sel hewan pada umumnya hanya perlu menggunakan detergent SDS dikarenakan struktur sel yang tidak serumit tanaman, jamur atau bakteri.

Metode lisis yang digunakan dapat disesuaikan berdasarkan kompleksitas dari jaringan yang akan diekstraksi, selain itu jaringan kompleks perlu

dihomogenkan dan didispersikan ke kumpulan sel yang lebih kecil agar tiap individu sel dapat lisis dengan metode yang digunakan (Dale et al., 2012).

Hasil dari ekstraksi sel yang telah lisis mengandung DNA, RNA, protein, lipid dan karbohidrat. Lisis sel secara mendadak kemungkinan besar akan menyebabkan fragmentasi DNA kromosom. Apabila dibutuhkan DNA kromosomal dalam jumlah besar, diperlukan metode lisis yang lebih sederhana agar meminimalisir kerusakan. Tahap selanjutnya adalah pemisahan asam nukleat yang diinginkan dari komponen lainnya: untuk menghilangkan RNA dari komponen DNA diperlukan enzim ribonuklease (RNase) dan juga pastikan enzim DNase telah tidak ada dengan metode pemanasan agar DNA yang diinginkan tidak terdegradasi. Protein perlu dihilangkan karena sel memiliki sejumlah enzim yang dapat mendegradasi asam nukleat dan juga protein yang dapat berikatan dengan DNA sehingga menghambat prosedur ekstraksi. Metode yang digunakan menggunakan larutan fenol dan kloroform untuk denaturasi dan presipitasi protein pada interfase, dan asam nukleat dapat dikoleksi dari lapisan *aqueus* campuran larutan fenol, buffer dan hasil lisis sel. Karena fenol termasuk larutan berbahaya, metode lain yang lebih aman dan praktis digunakan adalah dengan *affinity chromatography* atau menggunakan enzim proteinase K yang merupakan enzim proteolitik dan tersedia secara komersial (Dale et al., 2012).

Setelah langkah tersebut akan didapatkan sampel asam nukleat yang sudah bebas protein, tetapi DNA akan lebih larut dari yang diperlukan untuk ekstraksi. Oleh karena itu dilanjutkan dengan mengkonsentrasikan larutan sampel atau dipurifikasi lebih jauh dengan presipitasi asam nukleat. Cara yang dilakukan bisa dengan menambahkan isopropanol atau ethanol ke sampel, serta kation monovalen (Na^+ , K^+ atau NH_4^+) yang kemudian akan membentuk presipitasi asam nukleat dibawah tabung reaksi setelah disentrifugasi (**Gambar 2.5**). Presipitasi dari garam juga akan terbentuk tetapi dapat dihilangkan dengan pencucian ethanol 70% (Dale et al., 2012).



Gambar 2.5. Presipitasi ethanol, tabung diputar secara landai dan melingkar sehingga presipitasi terbentuk di bawah (Dale et al., 2012)

2.3.2 Deteksi dan Kuantifikasi Asam Nukleat

Setelah didapatkan isolat DNA yang murni, sebelum dilanjutkan ke teknis analisis selanjutnya perlu diketahui kualitas DNA dan apakah DNA dapat digunakan melalui indikator kualitas DNA yaitu kemurnian, integritas dan konsentrasi. Estimasi konsentrasi dapat diukur dengan ultraviolet (UV) spektrofotometer di Panjang gelombang 260 nm. Metode yang juga disebut nanodrop ini sangat efektif namun, kelarutan yang

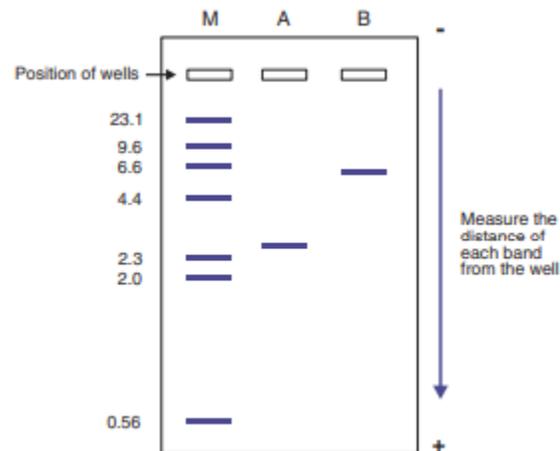
dibutuhkan untuk mengukur sampel pada uji standar nanodrop menurunkan sensitifitas sampel secara drastis. Kekurangan ini ditutupi alat UV spektrofotometer saat ini yang hanya membutuhkan jumlah sampel yang sangat sedikit untuk melihat absorbansi DNA (dalam satuan mikroliter, atau bahkan nanoliter) pada asam nukleat. Keberadaan protein atau fenol akan mempengaruhi angka estimasi hasil nanodrop, absorbansi 280nm sering digunakan untuk melihat kontaminasi, oleh karena itu dengan rasio absorbansi 260:280 diantara 1,75 dan 2 sudah dapat dianggap isolat DNA yang murni (Dale et al., 2012). Nilai kemurnian optimal untuk DNA adalah 1,8, namun sampel dengan rasio diantara 1,6 dan 2 sudah dapat digunakan, perlu diketahui juga bahwa Uji nanodrop tidak dapat mengetahui integritas DNA, kemurnian dan konsentrasi bisa baik tetapi DNA yang diukur dalam larutan telah terdegradasi. Absorpsi DNA dapat dipengaruhi oleh pH dari pelarut yang digunakan. Pelarut asam akan menurunkan hasil 0,2-0,3 dan pelarut basa dapat menaikkan hasil hingga 0,2-0,3 (Dale et al., 2012; Lucena-Aguilar et al., 2016)

2.3.3 Gel Elektroforesis

Gel Elektroforesis adalah Teknik yang krusial dalam analisis dan kemurnian dari asam nukleat, saat molekul dialiri listrik maka molekul tersebut akan bermigrasi ke arah berlawanan dari aliran listrik. DNA dan RNA akan bergerak ke arah anoda (kutub positif) apabila dialiri listrik dari kutub negatif. Pada gel yang mengandung jaringan pori-pori yang kompleks, tingkat kemampuan molekul asam nukleat untuk melewati pori

tersebut akan menentukan seberapa jauh migrasi molekulnya. Untuk DNA untai ganda fragmen linear dengan jarak ukuran yang bervariasi, dapat diketahui besar molekulnya (Panjang DNA) (**Gambar 2.6**). Volume aliran listrik yang dialirkan tidak akan berpengaruh karena semua asam nukleat memiliki muatan yang sama tiap unit satuan. Pewarnaan sering digunakan untuk gel elektroforesis karena berfungsi untuk estimasi jumlah DNA pada tiap pita pada gel, dengan membandingkan intensitas *fluorescence* dari sampel dapat dilihat konsentrasi dari sampel pada gel yang sama. Pewarna seperti *Ethidium bromide* memiliki struktur yang dapat menempel diantara basa nitrogen asam nukleat, pewarnaan dapat dideteksi intensitas *fluorescence* saat terekspos sinar UV. Namun karena *Ethidium bromide* bersifat mutagenik dan dapat membahayakan kesehatan, terdapat banyak alternatif pewarnaan untuk gel elektroforesis (Dale et al., 2012).

Jarak efektif ukuran nukleotida dapat dibedakan dengan gel berdasarkan komposisi dari gel tersebut. Gel agarose dapat digunakan untuk memisahkan molekul asam nukleat yang lebih besar dari beberapa ratus pasangan basa, mengurangi konsentrasi agarose akan mendapatkan separasi yang efektif untuk fragmen yang lebih besar, dan ditingkatkan untuk fragmen yang lebih kecil hingga paling sedikit 10 pasang basa nukleotida. Untuk menganalisis hasil elektroforesis diperlukan kalibrasi dari gel dengan memberi marker standar yang memiliki fragmen dengan ukuran bp yang telah diketahui sebelumnya sebagai kontrol. (Dale et al., 2012)



Gambar 2. 6. Ilustrasi pengukuran besar molekul berdasarkan Gel Elektroforesis

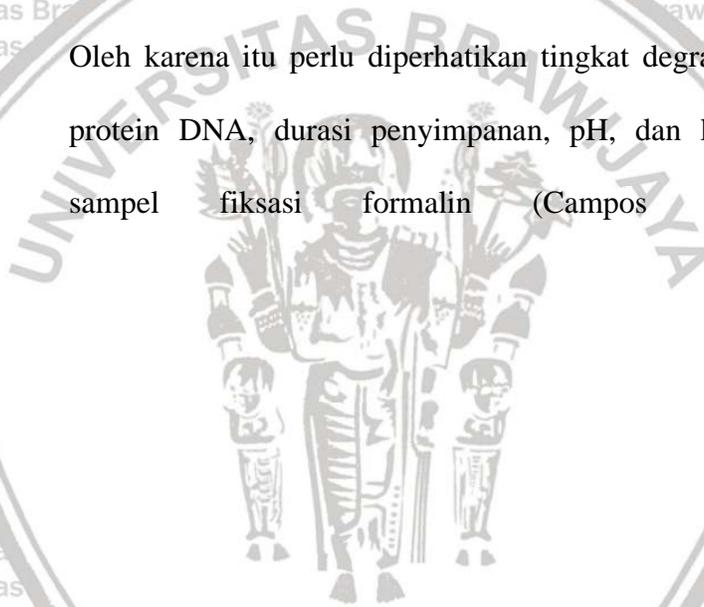
(Dale et al., 2012)

2.4 Fiksasi Jaringan

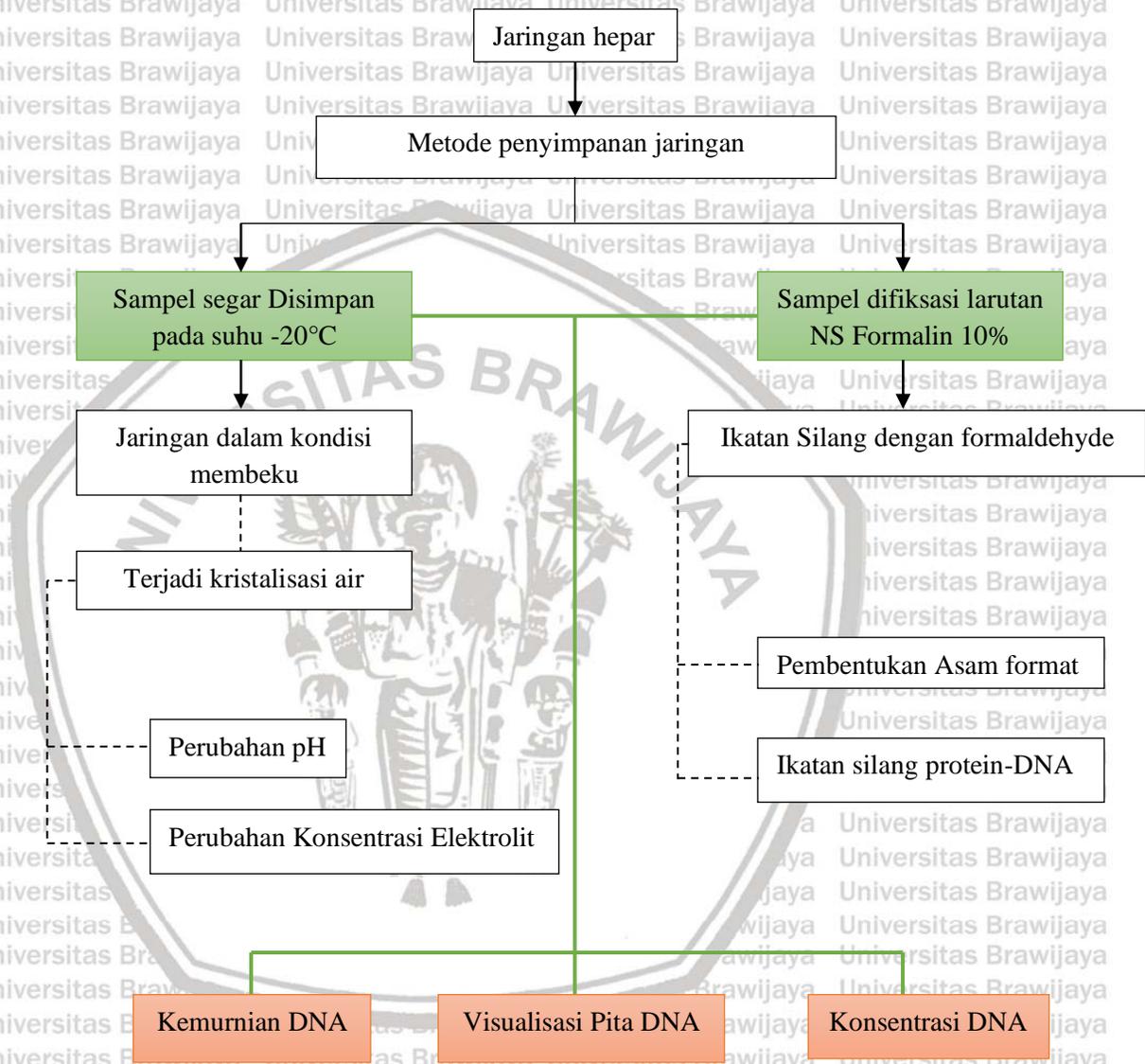
Proses fiksasi jaringan merupakan usaha untuk menghentikan autolisis atau pembusukan dengan proses kimiawi yang mengawetkan jaringan hidup. Tujuannya adalah untuk membuat jaringan yang awet sehingga kondisi jaringan tersimpan secara permanen atau semirip mungkin dengan kondisi saat jaringan masih hidup. Tujuan lainnya adalah untuk mengeraskan jaringan untuk diiris dalam berbagai pemeriksaan seperti contoh pemeriksaan histopatologi (Suprianto, 2014).

Salah satu larutan yang digunakan untuk fiksasi yang paling umum adalah formalin buffer netral 10%, larutan ini bisa disebut sebagai gold standard dalam larutan fiksatif. Formalin memiliki kelebihan yaitu tingkat keasaman yang mendekati normal, dapat menghindari terbentuknya pigmen formalin dan juga masa penyimpanan yang lama. Metode yang umum

digunakan adalah memotong jaringan ke ukuran kecil dan disimpan di dalam larutan fiksatif. Waktu yang dihabiskan jaringan sebelum masuk ke dalam larutan fiksatif dapat berpengaruh karena sel dapat kehilangan banyak organel sel dan terjadi pengerutan nukleus (Suprianto, 2014). Kekurangan dari larutan formalin sendiri adalah terjadinya fragmentasi pada molekul DNA dan keterikatan antara protein dan DNA sehingga mempengaruhi hasil dari ekstraksi DNA, dan DNA yang dapat ditarget menjadi lebih pendek. Oleh karena itu perlu diperhatikan tingkat degradasi dan *cross-link* antara protein DNA, durasi penyimpanan, pH, dan kondisi penyimpanan dari sampel fiksasi formalin (Campos and Gilbert, 2012).

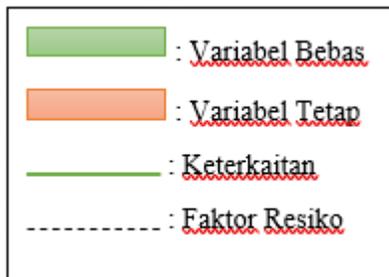


BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN



3.1 Kerangka Konsep

Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian



Kerangka Konsep pada penelitian dimulai dari sampel penelitian yaitu jaringan hepar yang diberikan perbedaan perlakuan dalam metode penyimpanan jaringan. Variabel bebas dalam penelitian kali ini terdiri dari dua perlakuan yang berbeda pada jaringan hepar ayam, sampel segar yang disimpan pada suhu -20°C dan sampel yang difiksasi larutan Normal Saline Formalin 10%. Pada variabel bebas yang pertama dimana sampel segar disimpan pada suhu -20°C , jaringan dalam kondisi beku dan terdapat faktor resiko terjadinya kristalisasi air pada jaringan karena suhu rendah yang akan menyebabkan pergeseran cairan. Pada jaringan beku, cairan ekstraseluler akan membeku dan membuat konsentrasi cairan ekstraseluler yang tidak membeku meningkat sehingga cairan intraseluler bergerak keluar sel melalui osmosis. Kondisi tersebut dapat menyebabkan terjadinya perubahan pH dan konsentrasi elektrolit sel yang dapat mempengaruhi variabel tetap. Sedangkan pada variabel bebas kedua dimana sampel difiksasi formalin, terjadi ikatan formaldehid antara protein dengan DNA untuk preservasi kondisi jaringan yang dapat mempengaruhi hasil ekstraksi DNA, selain itu larutan formalin seiring dengan waktu akan membentuk asam format yang mengakibatkan penurunan pH. Ikatan antar DNA dapat terpengaruh dari perubahan pH yang dapat mempengaruhi hasil ekstraksi. Kedua sampel dengan metode penyimpanan yang berbeda kemudian akan

dibandingkan hasil ekstraksi DNA dalam hal kemurnian dan konsentrasi DNA hasil ekstraksi melalui uji Nano drop, dan visualisasi pita DNA setelah di elektroforesis.

3.2 Hipotesa Penelitian

1. Nilai Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi jaringan hepar terfiksasi formalin dan jaringan segar hepar tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.

2. *Band DNA* hasil isolasi jaringan hepar terfiksasi formalin dan jaringan segar hepar dapat tervisualisasikan dengan baik dan jelas melalui uji elektroforesis



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juni 2020 di Laboratorium Histologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya untuk tahap koleksi sampel. Proses ekstraksi DNA dan elektroforesis dilaksanakan di Laboratorium *Animal Disease Diagnostic* (ADD) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Sementara Uji nano drop dilakukan di Laboratorium Rekayasa Genetika Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

4.2 Materi Penelitian

4.2.1 Alat

Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu masker, glove, aluminium foil, mikropipet, dissecting set, inkubator, timbangan digital, gelas ukur, kapas, blue tip, yellow tip, sentrifugator, papan fiksasi, pot organ, cetakan, Pot Sampel 5 cc, *Freezer, Purification Coulomn, Vortex, Collection tube, Microcentrifuge tube, Thermal cycler, UV Transluminator, Polymerase Chain Reaction tube* (PCR tube).

4.2.2 Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini yaitu Sampel hepar ayam broiler, formalin 10%, Ethanol 50%, *Nuclease free water* (NFW), *Digestion solution, Proteinase K Solution, RNase A Solution,*

*Lysis Solution, Wash buffer I dan II, Elution Buffer, Formalin 10%,
Agar rose.*

4.3 Tahapan Penelitian

1. Rancangan penelitian dan persiapan sampel ayam broiler
2. Koleksi sampel organ hepar ayam broiler
3. Sampel diberi perlakuan disimpan disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C dan dalam pot organ berisi *Formalin NS 10%*
4. Proses Ekstraksi DNA
5. Uji Nanodrop
6. Uji *Electroforesis*
7. Analisa data.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel organ hepar ayam yang dikoleksi dari 5 ekor ayam broiler berumur 21 hari yang kemudian disimpan dalam *Freezer* dengan suhu -20°C dan dalam pot organ berisi *Formalin NS 10%* masing masing 5 potong sampel organ hepar. Langkah selanjutnya ~~dilanjutkan dengan~~ proses ekstraksi DNA dengan menggunakan kit ekstraksi DNA *Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit*. Sampel hasil ekstraksi DNA akan dilanjutkan ke uji Nanodrop untuk melihat konsentrasi dan kemurnian dari DNA. Kemudian dilanjutkan dengan melihat visualisasi pita DNA dengan metode *electrophoresis*. Hasil uji nanodrop dan *electrophoresis* dari isolat DNA sampel yang disimpan dalam *Freezer* dengan suhu -20°C dan dalam pot organ berisi *Formalin NS 10%* kemudian dievaluasi dan dibandingkan.

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu:

1. Variabel bebas : Hepar Ayam Broiler
2. Variabel terikat : Kemurnian DNA, Konsentrasi DNA dan Visualiasi Pita DNA

4.6 Prosedur Kerja

4.6.1 Persiapan Sampel

Sampel merupakan 5 ekor Ayam broiler berusia 21 hari, koleksi organ hepar dilakukan pada hari senin 22 Juni 2020 di rumah potong ayam kota Malang. Sampel organ hepar kemudian disimpan dalam plastic *ziplock* yang diberi label berisikan informasi seperti tanggal pengambilan dan nomor sampel. Sampel kemudian dimasukkan dalam *ice box* untuk dibawa ke Laboratorium Histologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya kemudian disimpan di dalam *Freezer* dengan suhu -20°C dan dalam pot organ berisi *Formalin NS* 10% pada suhu ruang

4.6.2 Ekstraksi

Proses Ekstraksi DNA diawali dengan mempersiapkan sampel, 5 sampel hepar yang disimpan di dalam *freezer* dan 5 sampel yang telah difiksasi formalin. Disiapkan masing-masing sebanyak 20 mg dengan menggunakan pinset dan timbangan digital. Khusus untuk sampel yang difiksasi formalin dicuci dengan NaCl Fisiologis terlebih dahulu sebelum perlakuan. Proses ekstraksi DNA pada penelitian kali ini menggunakan *Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification*

Kit. Pertama sampel dimasukkan kedalam *Polymerase Chain Reaction tube* (PCR *tube*). Selanjutnya sampel digerus dengan pinset hingga halus, ditambahkan *digestion solution* 180 μ L dan Proteinase K 20 μ L menggunakan mikro pipet. Sampel selanjutnya dihomogenkan dengan vortex selama 10-15 detik lalu diinkubasi dalam suhu 56°C selama 2 jam hingga jaringan lisis secara sempurna. Kemudian sampel ditambahkan RNase sebanyak 20 μ L lalu dihomogenkan dengan vortex selama 10-15 detik hingga homogen dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan *lysis solution* 200 μ L dan dihomogenkan dengan vortex kembali selama 10-15 detik hingga homogen. Dimasukkan 500 μ L ethanol 50% ke dalam sampel dan dihomogenkan dengan vortex selama 10-15 detik. Larutan sampel kemudian dipindahkan ke DNA *Purification coulumn* dan dimasukkan kolom berisi larutan tersebut kedalam *collection tube*. Sampel kemudian di masukkan ke dalam *Microcentrifuge* dengan kecepatan 6000 g selama 60 detik. Setelah disentrifugasi *collection tube* berisi larutan yang telah tersaring di buang dan diganti dengan *collection tube* yang baru. Selanjutnya ditambahkan *wash buffer I* 1500 μ L dan disentrifugasi 8000 g selama 60 detik. Diulangi langkah membuang *collection tube* berisi larutan yang telah tersaring dan diganti dengan *collection tube* yang baru Ditambahkan *wash buffer II* sebanyak 500 μ L dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan maksimal selama 3 menit. Dibuang kembali *collection tube* dan dipindahkan ke PCR tube

1,5 ml yang baru, kemudian ditambahkan *elution buffer* sebanyak 50 μ L ke dalam sampel larutan hepar fiksasi formalin dan 100 μ L ke dalam sampel hepar yang disimpan di dalam *freezer*. Kedua jenis sampel diinkubasi suhu ruang selama 2 menit dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 8000 g selama 1 menit. Terakhir disimpan sampel hasil ekstraksi DNA dalam PCR *tube* 1,5 ml pada suhu -20°C.

4.6.3 Uji Nanodrop

Pada penelitian kali ini dilakukan uji Nanodrop untuk melihat kemurnian dan konsentrasi DNA sebagai pemeriksaan kuantitatif hasil yang telah ekstraksi. Uji Nanodrop atau spektrofotometri akan memancarkan cahaya ultraviolet yang diserap oleh basa purin dan pirimidin pada DNA. Nilai absorbansi isolat DNA diperiksa pada panjang gelombang 260/230 nm untuk konsentrasi DNA dan 260/280 nm kemurnian DNA. Isolat hasil ekstraksi DNA yang baik akan memiliki kemurnian 1,8-2,0 dengan konsentrasi minimal 100 ng/ μ L (Hikmatyar et al., 2015). Uji Nanodrop dilakukan di

Laboratorium Rekayasa Genetika Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

4.6.4 Uji Elektroforesis

Proses Elektroforesis dimulai dengan membuat gel agarose dengan persentase 0,8%. Pembuatan gel agarose dimulai dengan mencampurkan agarose 0,16 g dan ditambahkan Tris/Borate/EDTA

buffer (TBE *buffer*) sebanyak 20 ml. Larutan tersebut kemudian dipanaskan dengan microwave selama 30 detik. Setelah itu larutan ditambahkan 2 μ L *peggreen*, di homogenkan dan dituang kedalam cetakan *tray*. Diamkan pada suhu ruangan dan larutan akan mengeras dengan sendirinya. Kemudian diletakkan gel pada alat elektroforesis yang telah dituang TBE *buffer*. Pada sumuran gel cetakan *tray* dimasukkan sampel 10 μ L dan loading dye 2 μ L pada tiap sumuran sejumlah sampel yang diuji, diletakkan juga marker DNA 100bp sebanyak 5 μ L di sumuran paling ujung sebagai pembanding. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 100 volt, 400 miliampere selama 25 menit. Kemudian diamati visualisasi pita DNA hasil elektroforesis pada gel dengan *UV-transluminator*.

4.7 Analisa Data

Data hasil uji nanodrop yaitu konsentrasi dan absorbansi isolat DNA dianalisa menggunakan uji *independent sample T-test* dengan angka kepercayaan 95% dan menggunakan software SPSS. Hasil pita DNA yang telah melalui elektroforesis dianalisa secara deskriptif. Kedua hasil digunakan untuk mengevaluasi hasil ekstraksi DNA dari sampel jaringan hepar yang disimpan dengan *freezer* dengan jaringan hepar yang difiksasi formalin.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Nilai Kemurnian dan Konsentrasi DNA

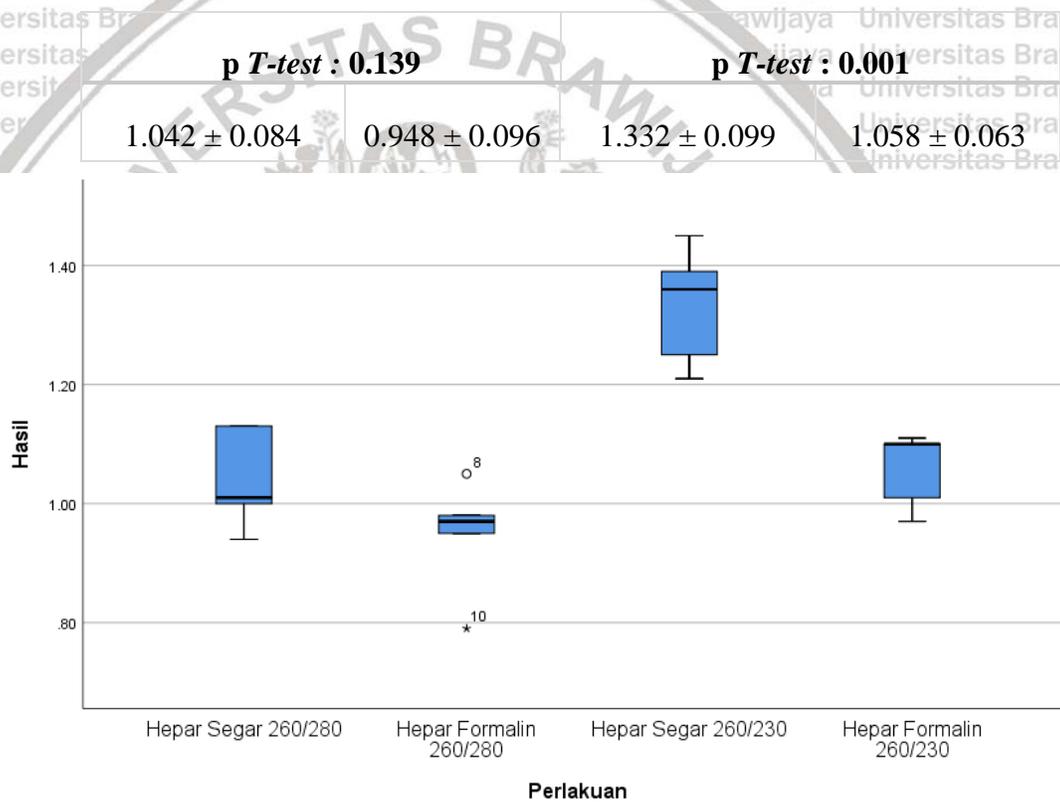
Isolat DNA yang telah diekstraksi kemudian diukur kemurnian dan konsentrasinya melalui uji nanodrop. Hasil dari uji nanodrop pada kedua kelompok sampel, yaitu jaringan hepar segar yang disimpan di dalam freezer (-20°C) dan jaringan hepar terfiksasi NS Formalin 10% dapat diamati pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5. 1 Hasil Nilai Kemurnian dan Konsentrasi Amplifikasi DNA Sampel Uji

No.	Keterangan	λ 260/230 nm	λ 260/280 nm	Con (ng/ μ l)
1	Hepar Segar 1	1,39	1,13	94,14
2	Hepar Segar 2	1,21	0,94	101,41
3	Hepar Segar 3	1,45	1,13	104,95
4	Hepar Segar 4	1,25	1	204,05
5	Hepar Segar 5	1,36	1,01	69,94
6	Hepar Formalin 1	0,97	0,95	109,5
7	Hepar Formalin 2	1,11	0,98	118,51
8	Hepar Formalin 3	1,01	1,05	78,07
9	Hepar Formalin 4	1,1	0,97	214,2
10	Hepar Formalin 5	1,1	0,79	234,61

Berdasarkan uji *independent T-test* pada hasil uji nanodrop, didapatkan hasil bahwa ada perbedaan yang signifikan pada nilai kemurnian pada kedua kelompok sampel panjang gelombang λ 260/230 nm namun tidak ada perbedaan yang signifikan pada kedua kelompok sampel pada panjang gelombang λ 260/280 nm dan juga pada

konsentrasi isolat DNA. Uji statistika yang dilakukan pada kedua metode penyimpanan dapat dilihat pada (**Lampiran 5**), berdasarkan uji tersebut diketahui penyimpanan jaringan hepar segar yang telah dibekukan dan terfiksasi formalin tidak memberikan pengaruh yang berbeda signifikan ($p > 0.05$) dan memberikan pengaruh signifikan ($p < 0.05$) pada kemurnian isolat DNA. Perbandingan rata-rata nilai kemurnian DNA terhadap sebaran data yang diuji dapat diamati pada **Grafik 5.1**.



Grafik 5. 1 rata-rata nilai kemurnian DNA kedua metode penyimpanan.

Keterangan: nilai ($p > 0.05$) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada kemurnian λ 260/280 nm dan nilai ($p < 0.05$) menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada hasil isolasi DNA antara penyimpanan jaringan hepar segar dan terfiksasi NS formalin 10%.

Semua hasil pada uji nanodrop pada panjang gelombang λ 260/280 nm menunjukkan angka dibawah angka ideal (1.75-2.0) (Dale et al., 2012) dengan nilai paling tinggi 1,13 pada sampel hepar segar 1 dan 3 dan untuk sampel terfiksasi formalin bernilai 1,05 pada sampel hepar formalin 3. Untuk nilai terendah pada sampel hepar segar 2 senilai 0,94 dan pada hepar formalin 5 dengan nilai 0,79. Menurut literatur, apabila nilai kemurnian pada panjang gelombang λ 260/280 nm dibawah angka ideal menunjukkan adanya kontaminasi protein pada isolat DNA sampel, hal ini dapat terjadi karena proses presipitasi DNA yang kurang sempurna dan sisa protein dari lisis sel karena kurangnya waktu inkubasi menggunakan *buffer lysis* dan proteinase-K dan jika berada di atas angka kemurnian 2.0 menunjukkan kemungkinan adanya kontaminan RNA pada isolat DNA (Wardani et al., 2018). Jika ditinjau ke tahapan prosedur setiap sampel pada kedua kelompok dan pada interpretasi semua hasil pada panjang gelombang λ 260/280 nm yang seragam di bawah angka ideal dapat dikatakan bahwa jenis kontaminan yang mempengaruhi kemurnian pada isolat sama pada setiap sampel.

Pada hasil uji nanodrop absorbansi λ 260/230 nm dapat diamati bahwa semua hasil berada dibawah nilai ideal DNA murni, Menurut Ningsih (2018) nilai kemurnian DNA yang baik pada panjang gelombang λ 260/230 nm adalah 2-2.2. Jika diamati data hasil uji nanodrop didapatkan data tertinggi sebesar 1,45 pada sampel hepar segar ketiga dan 1,11 pada sampel hepar formalin kedua, dengan rentang data paling rendah pada 1,21 pada sampel hepar segar kedua dan hepar formalin pertama sebesar 0,97. Berdasarkan dengan literatur, untuk hasil yang berada di bawah nilai ideal 2 mengindikasikan adanya kontaminasi karbohidrat, material organik, dan

kemikal lain seperti lipid, garam dan fenol yang memiliki absorbansi pada gelombang 230 nm. (Ningsih et al., 2018; O'Neill et al., 2011).

Apabila dibandingkan kembali nilai kemurnian DNA diantara kedua kelompok sampel, dapat diamati bahwa pada panjang gelombang λ 260/230 nm rata-rata nilai kemurnian DNA hepar terfiksasi formalin lebih rendah dibandingkan dengan hepar segar. Hal ini dapat disebabkan oleh kemurnian pada sampel hepar terfiksasi formalin yang menurun sehingga membuat perbedaan kemurnian yang signifikan. Kemurnian pada isolat DNA dapat menurun dikarenakan waktu fiksasi sampel yang berlebih sehingga terjadi *crosslink* antara asam nukleat dan formaldehid yang lebih kuat dan proses ekstraksi yang belum sempurna (Hafy et al., 2018). Hal tersebut menjadi faktor yang membuat perbedaan yang signifikan diantara kemurnian λ 260/230 nm sampel hepar terfiksasi formalin dan hepar segar.

Diamati pada hasil kemurnian λ 260/280 nm, rata rata hasil uji nanodrop pada kelompok sampel hepar terfiksasi formalin lebih rendah dibandingkan dengan hasil hepar segar. Hasil ini memberitahukan bahwa kontaminasi protein pada hepar terfiksasi formalin lebih tinggi dibandingkan dengan hepar segar yang dibekukan. Hal ini dapat disebabkan dengan terjadinya *crosslink* antara DNA dan Formaldehid karena faktor enzimatis dari reagen isolasi atau faktor mekanis dari suhu yang digunakan atau pada saat proses *pipetting*. Hal ini sesuai dengan literatur dimana menurut Hafy et al (2018) kemurnian pada isolat DNA dapat terpengaruh dari dua faktor yaitu faktor teknis seperti teknik isolasi atau purifikasi DNA yang dilakukan belum sempurna dan waktu fiksasi sampel dengan formalin. Teknik isolasi dan purifikasi DNA yang sempurna akan melepaskan *crosslinking* secara sempurna.

Selain itu, proses fiksasi sampel dengan formalin yang menyebabkan ikatan antara asam nukleat dengan protein yang berkaitan dengan semakin lama sampel disimpan dalam formalin maka semakin kuat ikatan *crosslink* yang terbentuk antara DNA dan protein.

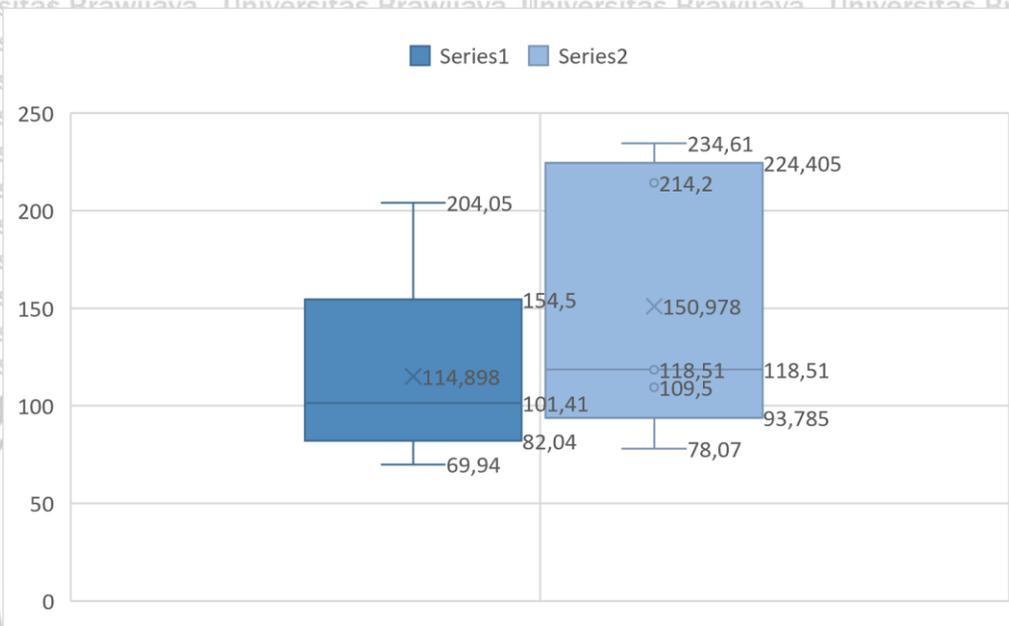
Jika ditarik kesimpulan dari seluruh hasil kemurnian, dapat diamati bahwa kedua Panjang gelombang pada kedua kelompok sampel berada dibawah nilai ideal kemurnian yang dikarenakan adanya kontaminasi protein, kemikalia lain seperti fenol dan garam pada isolat DNA (Ningsih et al., 2018; O'Neill et al., 2011; Wardani et al., 2018). Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan bahwa formalin bukan menjadi sebab dari penurunan angka kemurnian dikarenakan kedua kelompok sampel yaitu hepar terfiksasi formalin dan hepar segar. Pendapat ini didukung dengan literatur dimana formaldehid yang terkandung dalam formalin NS tidak masuk dalam jangkauan panjang gelombang yang digunakan untuk mengukur DNA (230, 260 dan 280 nm) karena daya serap optimum formaldehid pada uji spektrofotometri terdapat pada angka paling rendah pada 375 nm dan paling tinggi pada angka 560 nm tergantung dengan pelarut yang digunakan (Hladová et al., 2019).

Berdasarkan Uji *independent sample T-test* diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan diantara data konsentrasi hasil uji nanodrop isolat DNA kedua kelompok sampel, sesuai dengan yang terlampir pada **Lampiran 6**. Dari hasil uji statistika didapatkan bahwa ($p > 0.05$) yang berarti nilai rata-rata penyimpanan jaringan terfiksasi formalin dan jaringan segar tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi hasil isolate DNA. Berikut sebaran data statistika konsentrasi isolat DNA hasil uji nanodrop pada **Grafik 5.2**

p T-test : 0.377

114.9 ± 51.67

150.98 ± 69.07



Grafik 5. 2 rata-rata nilai konsentrasi DNA kedua metode penyimpanan.

Keterangan: nilai ($p > 0.05$) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada konsentrasi hasil isolasi DNA antara penyimpanan jaringan hepar segar dan terfiksasi NS formalin 10%.

Dapat-diamati Hasil konsentrasi **memiki** rentang nilai yang relatif beragam dan besar. Untuk hasil konsentrasi paling tinggi dimiliki sampel hepar formalin 5 dengan nilai 234,61 ng/μl dan untuk sampel hepar segar memiliki nilai paling tinggi 204,05 ng/μl. Untuk nilai terendah ditemukan pada sampel hepar segar 5 dengan nilai 69,94 ng/μl dan untuk kelompok sampel hepar formalin dengan nilai 78,07. Untuk hasil konsentrasi memiliki hasil yang cukup besar pada sampel hepar segar 4 (204,05 ng/μl), hepar formalin 4 (214,2 ng/μl) dan hepar formalin ke 5 (234,61 ng/μl) (**Tabel 5.1**). Angka konsentrasi yang tinggi tidak menjamin DNA dengan integritas dan

kualitas yang baik, diperlukan pengujian dengan ~~diuji kembali pada uji~~ elektroforesis, DNA dengan integritas yang kurang baik yang telah terdegradasi akan terpecah menjadi molekul yang lebih kecil. Molekul kecil yang terdegradasi dalam larutan DNA saat di uji spektrofotometri akan tampak terakumulasi dan memiliki konsentrasi tinggi, kemurnian dibawah angka ideal dan pita DNA pada gel elektroforesis tidak terbentuk (Nzilibili et al., 2018).

~~Jika dibandingkan rata-rata~~ hasil konsentrasi rata-rata pada kelompok sampel hepar segar yang dibekukan dengan freezer dibandingkan dengan hepar terfiksasi formalin, dapat diamati bahwa rata-rata konsentrasi hepar formalin lebih tinggi. Selain itu ~~Dapat diamati juga~~ standar deviasi dari data isolat DNA hepar terfiksasi formalin juga lebih besar dibanding hepar segar, yang berarti sebaran data isolate DNA terfiksasi formalin jauh lebih besar dibanding sebaran data hasil isolate DNA hepar segar. Uji *independent T-test* menunjukkan nilai signifikansi ($p > 0.05$) yang berarti tidak ada perbedaan signifikan diantara hasil konsentrasi kedua metode penyimpanan. Perbedaan pada jumlah elution buffer yang digunakan yaitu 50 μ l pada sampel hepar terfiksasi formalin dan 100 μ l pada sampel hepar segar juga tidak berpengaruh seperti pada penelitian yang menggunakan dua metode untuk ekstraksi DNA dari sampel formalin dengan dua jumlah *elution buffer* (50 μ l dan 100 μ l) tetap memberikan hasil konsentrasi dan kemurnian yang dapat diterima pada uji spektrofotometri (Gouveia et al., 2016).

Apabila dibandingkan dengan hasil ekstraksi otot pectoralis, pada ekstraksi otot pectoralis juga disimpulkan bahwa metode preservasi tidak memberikan perbedaan signifikan pada konsentrasi dan kemurnian isolat DNA otot pectoralis. Pada Panjang

gelombang λ 260/230 nm didapatkan hanya ada satu sampel otot segar dengan nilai 2.13 dan satu sampel otot formalin dengan angka 2.02 yang masuk angka ideal (2.0 – 2.2). Sedangkan untuk hasil λ absorbansi 260/280 nm dan konsentrasi relatif sama dengan percobaan pada organ hepar dimana nilai kemurnian tidak melewati angka ideal (1.8 – 2.0) dan nilai konsentrasi juga dengan persebaran data yang luas antara nilai tertinggi dan terendah (**Lampiran 7**). Perbedaan jaringan dimana hepar memiliki nukleus yang lebih besar dan sel yang mengandung banyak mitokondria, protein dan metabolit zat-zat lain dibandingkan otot. Otot pectoralis secara struktur mengandung lebih banyak sitoplasma dan inti yang dipinggir nukleusnya (Mescher, 2010). Jaringan hepar secara struktur dan karakteristik jaringan lebih tinggi kemungkinan terjadi kontaminan yang menurunkan angka kemurnian sedangkan otot pectoralis memiliki kemungkinan ekstraksi DNA yang jauh lebih mudah karena struktur yang lebih **sederhana** dibanding hepar yang kompleks.

Seluruh hasil ekstraksi DNA hepar kelompok sampel *freezer* dan fiksasi formalin NS 10% diamplifikasi dengan uji PCR dan kedua kelompok sampel kembali di uji kemurnian dan konsentrasi melalui uji nanodrop. Kedua hasil dari kelompok sampel amplikasi DNA organ hepar segar dan terfiksasi formalin tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Kemurnian DNA pada kedua panjang gelombang memiliki angka kemurnian yang hampir mendekati angka ideal DNA, yang berarti masih mengandung kontaminan yang sama dengan hasil isolasi DNA. Untuk nilai konsentrasi memberikan nilai yang sangat besar pada kedua kelompok sampel hepar terfiksasi formalin dan hepar segar. Hasil dari pengamatan menunjukkan dengan perbedaan nilai kemurnian dan konsentrasi tidak disebabkan dari perbedaan larutan

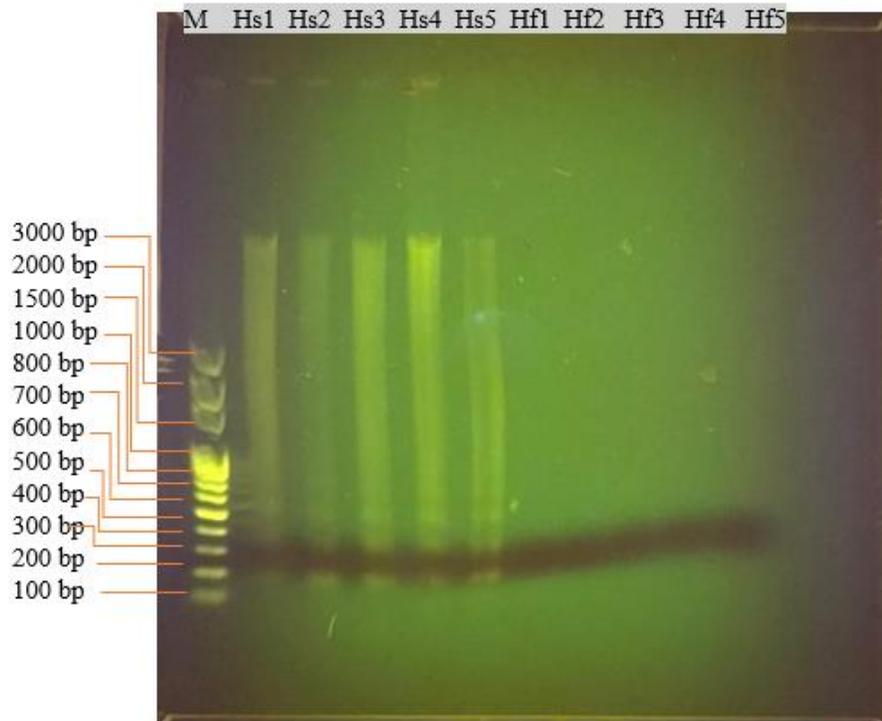
fiksatif yang digunakan (**Lampiran 8.**). Menurut Gouveia *et al* (2016) faktor yang mempengaruhi hasil kemurnian dan konsentrasi DNA pada organ terfiksasi formalin antara lain pada saat tahap pra-fiksasi dan pasca-fiksasi. Pre-fiksasi adalah waktu pada antara koleksi jaringan dan waktu prosedur dimulai, dimana jaringan dapat mulai terdegradasi karena hipoksia atau karena enzim-enzim DNase dan RNase. Pasca-fiksasi adalah saat preparasi pemotongan jaringan dan proses ekstraksi DNA yang tidak sempurna seperti pada tahap *digestion* dan purifikasi.

5.2 Hasil Visualisasi Pita DNA

Seluruh sampel isolat DNA yang telah di uji kuantitatif untuk melihat nilai kemurnian dan konsentrasi DNA dilanjutkan ke uji kualitatif yaitu gel elektroforesis untuk melihat integritas dari DNA yang telah disolasi. Pada pengamatan digunakan *DNA Ladder* 100 bp sebagai marker sumuran 1 dengan gel agarose 0.8% yang kemudian akan menunjukkan hasil seperti yang ditampilkan pada **Gambar 5.1.**

Seluruh sampel hepar segar menunjukkan pita DNA yang terlihat jelas, sedangkan seluruh sampel hepar terfiksasi formalin tidak terlihat membentuk pita DNA. Hal ini selaras dengan faktor yang mempengaruhi hasil angka kemurnian DNA seperti kontaminasi protein, garam fenol dan kemikalia lainnya (O'Neill *et al.*, 2011) terutama pada kelompok hepar terfiksasi formalin yang nilai kemurnian berada dibawah nilai kemurnian kelompok hepar segar. Tetapi jika dibandingkan dengan nilai ideal kemurnian DNA pada panjang gelombang λ 260/230 nm dan λ 260/280 nm, kedua kelompok sampel berada di bawah nilai kemurnian yang baik dan telah diuji tidak menunjukkan signifikasi yang berbeda. Jika dibandingkan ke nilai

konsentrasi hasil uji nanodrop kedua kelompok juga tidak terdapat perbedaan signifikan dari kedua kelompok sampel dan juga pada nilai konsentrasi cukup baik,



Gambar 5.1 Hasil uji elektroforesis pita DNA pada gel agarose 0.8% menunjukkan tidak ada pita DNA yang muncul pada sampel Hepar terfiksasi Formalin, tampak Panjang DNA hepar segar lebih dari 3000 bp dan terjadi *smearing*. M: Marker DNA ladder 100 bp, Hs: Hepar Segar, dan Hf: Hepar Formalin

Tetapi berdasarkan penelitian Nzilibili (2018) DNA dengan konsentrasi tinggi dan kemurnian rendah menunjukkan ciri-ciri dari DNA yang telah terdegradasi dan terdistrupsi sehingga sudah tidak utuh lagi, sehingga DNA terpecah menjadi molekul yang lebih kecil yang tampak tinggi pada konsentrasi isolat yang diuji spektrofotometri, tetapi pada saat uji gel elektroforesis tidak menunjukkan *band* DNA yang tervisualisasi dengan baik dan jelas.

Pada gambar hasil elektroforesis DNA dapat diamati terdapat efek *smearing* atau *smear* pada kelompok sampel hepar segar. *Smearing* menjadi tanda bahwa sampel isolate DNA yang digunakan tidak utuh atau memiliki integritas yang kurang baik (Ningsih et al., 2018) dikarenakan DNA pada gel agarose tidak membentuk pita yang jelas dengan warna yang jelas dan terang. Selain dari DNA yang tidak utuh efek *smearing* juga dapat disebabkan faktor lain, menurut Magdeldin (2012) *Smearing* dapat disebabkan kuantitas DNA yang ada di dalam sumuran agar elektroforesis terlalu banyak atau *overload* sehingga membuat corak panjang seperti luntur yang disebut dengan *smearing*. Masalah ini semakin sering terjadi seiring dengan semakin besar ukuran DNA yang ada pada sampel (>10kb). Selain dari *overload* DNA, apabila DNA yang berada di dalam sumur terlalu sedikit juga dapat menyebabkan pita DNA yang terdistorsi dan juga tampak tipis dan tidak jelas (Kurien and Scofield, 2012; Magdeldin, 2012). Presipitasi protein dari kontaminasi pada sampel elektroforesis dari luar atau dari sampel juga dapat menyebabkan terjadinya *smearing* dengan ukuran yang jauh lebih besar dari DNA dan tertahan pada pori pori gel agarose selama proses elektroforesis sehingga membuat gambaran *smearing* (Skutkova et al., 2013).

Pita DNA pada sampel hepar segar tidak tervisualisasikan dengan jelas dan terang jika dibandingkan dengan marker DNA yang digunakan, pita DNA yang tipis mengindikasikan konsentrasi isolate DNA yang rendah dengan kemurnian rendah. Menurut Magdeldin (2012) konsentrasi minimal dari DNA *double stranded* yang dapat dideteksi ethium bromide pada gel agarose adalah 10ng, jika dibandingkan dengan konsentrasi sampel tidak ada yang dibawah konsentrasi minimal. Pita DNA

yang tipis juga dapat disebabkan oleh dua faktor yaitu denaturasi dan degradasi DNA.

Degradasi DNA adalah terlepasnya ikatan DNA pada ikatan fosfodiester DNA sehingga DNA menjadi untai pendek sedangkan denaturasi adalah terlepasnya ikatan antar *double-stranded* DNA menjadi *single-stranded* DNA. DNA dengan struktur yang rusak akan menjadi tidak sensitive terhadap ionisasi listrik proses elektroforesis, sehingga DNA tidak bermigrasi dengan sempurna dan pita DNA tidak tervisualisasikan (Nzilibili et al., 2018). Alasan lain Degradasi DNA dapat menyebabkan penurunan intensitas pita DNA yang dihasilkan karena fragmen DNA yang lebih pendek juga dapat menyebabkan DNA yang migrasi tidak utuh sehingga fragmen bermigrasi dengan cepat sehingga membuat pita DNA menjadi lebih tipis dan tidak terpusat pada satu titik (Han et al., 2018; Nzilibili et al., 2018).

Sampel DNA pada hasil uji elektroforesis mengindikasikan terjadinya fragmentasi DNA dimana fragmentasi pada sampel isolat DNA terfiksasi formalin sangat rentan terjadi dan dapat menjadi penyebab tidak munculnya pita DNA pada gel elektroforesis hepar terfiksasi formalin. Sampel organ yang telah difiksasi dalam larutan formalin lebih dari satu minggu akan menghancurkan asam nukleat yang akan mengakibatkan *cross-linking* pada semua komponen jaringan, yang menghasilkan asam nukleat yang sangat terfragmentasi dan lebih sulit untuk di ekstraksi (Gouveia et al., 2016). Hafy *et al* (2018) juga menyatakan pendapat yang sama mengenai waktu penyimpanan sampel dalam formalin yang akan mempengaruhi integritas DNA dengan menginduksi terjadinya degradasi DNA. Salah satu hal yang dapat dilakukan adalah dengan penambahan alkali dan *heating* sebelum proses isolasi DNA sampel organ terfiksasi formalin. Menurut Campos *and* Gilbert (2012) menambahkan alkali

0.1 M NaOH dan 1% larutan SDS dengan pH 12 dan dilanjutkan proses *heating* dengan suhu 120°C selama 25 menit atau 100°C selama 40 menit sebelum prosedur isolasi DNA akan menghasilkan fragmen DNA yang lebih Panjang. Gugus OH pada NaOH akan berikatan dengan gugus karbon pada formaldehyde dan menyebabkan ikatan formalin dengan DNA terlepas dan pemanasan akan membantu terlepasnya ikatan antar molekul.

Asam nukleat yang berikatan dengan formalin juga merupakan salah satu alasan *ethium bromide* (EtBr) tidak dapat mewarnai pita DNA. EtBr adalah pewarna DNA yang digunakan dalam uji elektroforesis yang dapat menyerap sinar UV sehingga dapat tervisualisasi apabila berikatan dengan basa asam nukleat yang bersifat *hydrophobic*. Sifat hidrofobik dari basa nitrogen yang berikatan dengan EtBr akan menyebabkan munculnya fluoresens apabila terpapar sinar UV. Dengan adanya *cross-link* antara formalin dan asam nukleat maka EtBr tidak akan bisa berikatan dan menghasilkan fluoresens (Magdeldin, 2012).

Jika dibandingkan dengan hasil ekstraksi pada otot pectoralis, hasil elektroforesis juga memiliki hasil yang sama dimana pada kelompok sampel terfiksasi formalin tidak tervisualisasikan dan hanya terlihat visualisasi pita DNA tipis pada sampel otot pectoralis segar, tetapi pada sampel hepar segar tampak efek *smearing* (Lampiran 7). Pada organ hepar terdapat lebih banyak mitokondria (Mescher, 2010) yang di dalam matriks mitokondria hewan eukariotik terdapat mtDNA dengan ukuran yang relatif kecil jika dibandingkan dengan DNA nukleus.

Pada ayam memiliki $1,2 \times 10^9$ (1,2 milyar) pasang basa per genom haploid dengan mtDNA pada umumnya berukuran sekitar $1,6 \times 10^5$ (≥ 16.000) (Hafy et al., 2018;

Scanes and Christensen, 2020). Ukuran mtDNA yang lebih kecil dan sirkuler membuat lebih mudah untuk terpengaruh dengan *crosslinking* dengan formalin, ukuran mtDNA yang lebih kecil memungkinkan untuk menghasilkan efek *smearing* pada hasil gel elektroforesis karena ukuran pasang basa yang lebih kecil. (Hafy et al., 2018). Hal tersebut mendukung hasil dimana elektroforesis sampel hepar yang menimbulkan efek *smearing* dikarenakan organel mitokondria yang lebih banyak dibanding otot skelet pectoralis dengan hasil elektroforesis yang tidak terdapat *smearing* dan tervisualisasi dengan jelas. Kandungan karbohidrat yang lebih tinggi pada hepar dikarenakan ada banyak proses metabolisme dibandingkan pada otot seperti gluconeogenesis menjadi faktor pertimbangan kontaminasi yang lebih banyak pada hepar (Mescher, 2010).

Pada proses PCR sampel hepar segar dan terfiksasi formalin, semua sampel hasil amplifikasi kecuali pada sampel hepar formalin 4 menunjukkan visualisasi pita DNA yang cukup baik dan dapat diukur, terdapat efek *smear* yang menandakan terdapat kontaminasi protein yang sama dengan hasil pada isolat ekstraksi DNA.

(Lampiran 8.) Berdasarkan hasil yang telah dibahas dapat diambil kesimpulan bahwa sampel hepar terfiksasi formalin tetap mengandung DNA walau tidak tervisualisasikan. Proses ekstraksi DNA jaringan terfiksasi formalin yang dikembangkan belum bisa mendapatkan kualitas DNA yang tetapi sudah dapat digunakan untuk amplifikasi PCR (Hafy et al., 2018).

Hasil penelitian didukung dengan hasil penelitian oleh Bodewes et al (2015) dimana dilakukan evaluasi penggunaan amplifikasi dan sekuensing untuk mendeteksi virus yang diketahui ataupun tidak diketahui pada DNA yang di ekstraksi jaringan

terfiksasi formalin dan parafin atau *formalin fixed paraffin embedded tissue* (FFPE tissues). Sekuens DNA atau RNA dari virus yang menginfeksi jaringan hewan dapat dideteksi pada jaringan bursa burung camar terinfeksi adenovirus dan jaringan paru paru musang yang terinfeksi influenza A. Pada literatur yang sama juga disebutkan fragemntasi DNA pada jaringan terfiksasi formalin yang mempengaruhi hasil sekuensing DNA. Namun perbedaan tidak signifikan diamati pada panjang sekuens yang diobservasi pada jaringan FFPE dengan kelompok yang tidak terfiksasi formalin. Keuntungan lain dari metode ekstraksi dan sekuensing dari jaringan FFPE dalam diagnosa virus DNA atau RNA adalah dapat dilakukan korelasi langsung dengan hasil pengamatan histopatologis dengan membandingkan perubahan yang terjadi pada jaringan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa metode ekstraksi DNA pada jaringan yang terfiksasi formalin dapat menjadi pendekatan yang cukup baik untuk mendeteksi DNA dan dapat diaplikasikan ke metode diagnosa virus sebagai alternatif saat sampel yang tersedia adalah sampel terfiksasi formalin.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Hasil isolasi DNA antara penyimpanan jaringan hepar segar dan terfiksasi NS formalin 10% menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada nilai kemurnian λ 260/280 nm dan Konsentrasi DNA dan terdapat perbedaan yang signifikan pada nilai kemurnian λ 260/230 nm.
2. Jaringan hepar segar menunjukkan adanya visualisasi pita DNA dengan efek *smearing* dan jaringan hepar terfiksasi formalin tidak menunjukkan visualisasi pita DNA pada uji elektroforesis.

6.2 Saran

Dilakukan penyesuaian Prosedur yaitu penambahan tahap **heating pemanasan** dan larutan alkali sebelum prosedur ekstraksi dimulai untuk melepas ikatan *crosslink* antara asam nukleat dan formalin agar dapat meningkatkan kualitas hasil uji elektroforesis dan nanodrop. Saran lain adalah menggunakan DNA Ladder 1kb yang sesuai dengan ukuran DNA yang diekstraksi. Selain itu, diperlukan penelitian lanjutan untuk mengetahui pengaruh dan prosedur optimal untuk ekstraksi DNA sampel terfiksasi formalin untuk meningkatkan kajian informasi dan mempermudah penyimpanan sampel proses isolasi DNA.

DAFTAR PUSTAKA

- Auliyah, R., 2016. Gambaran Histopatologi Hepar Ayam Pedaging yang Diinfeksi L2 *Toxocara vitulorum*. Surabaya: UNAIR
- Bodewes, R., van Run, P. R., Schürch, A. C., Koopmans, M. P., Osterhaus, A. D., Baumgärtner, W., Kuiken, T., & Smits, S. L. (2015). Virus characterization and discovery in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Journal of virological methods*, 214, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.02.002>
- Campos, P.F., Gilbert, T.M.P., 2012. DNA Extraction from Formalin-Fixed Material, in: *Ancient DNA Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer Protocols.
- Dale, J.W., Schantz, M.V., Plant, N., 2012. *From Genes to Genomes. Concepts and Applications of DNA Technology*, 3rd ed. Wiley Blackwell.
- Gouveia, G.R., Ferreira, S.C., Siqueira, S.A.C., Pereira, J., 2016. Nucleic Acids Extraction from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues, in: Larramendy, M.L., Soloneski, S. (Eds.), *Nucleic Acids - From Basic Aspects to Laboratory Tools*. InTech. <https://doi.org/10.5772/61581>
- Hafy, Z., Larasati, V., Puspita, R.S., S, N., M, H., A, R., R, S., 2018. Hubungan Lama Penyimpanan Sampel Arsip Jaringan Dalam Blok Parafin Terfiksasi Formalindengan Kualitas Hasil Ekstraksidna Mitokondria Jaringan. *Sriwij. J. Med.* 1, 157–162. <https://doi.org/10.32539/SJM.v1i3.31>
- Han, Z., Sun, J., Lv, A., Sung, Y., Sun, X., Shi, H., Hu, X., Wang, A., Xing, K., 2018. A modified method for genomic DNA extraction from the fish intestinal microflora. *AMB Express* 8, 52. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0578-3>
- Hendrizar, M., 2011. Performans Produksi Ayam Broiler yang Dipelihara Dengan Kepadatan Kandang Yang Berbeda. Pekanbaru : UIN Sultan Syarif Kasim Riau
- Hikmatyar, M.F., Royani, J.I., D., 2015. Isolasi Dan Amplifikasi DNA Keladi Tikus (*Thyponium flagelliform*) Untuk Identifikasi Keragaman Genetik. *J. Bioteknol. Biosains Indones.* JBBI 2, 42. <https://doi.org/10.29122/jbbi.v2i2.507>

Hladová, M., Martinka, J., Rantuch, P., Nečas, A., 2019. Review of Spectrophotometric Methods for Determination of Formaldehyde. Res. Pap. Fac. Mater. Sci. Technol. Slovak Univ. Technol. 27, 105–120. <https://doi.org/10.2478/rput-2019-0012>

Kurien, B.T., Scofield, R.H., 2012. Common Artifacts and Mistakes Made in Electrophoresis, in: Kurien, B.T., Scofield, R.H. (Eds.), Protein Electrophoresis, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 633–640. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_58

Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A.M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J.A., López-Guerrero, J.A., Aguilar-Quesada, R., 2016. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. Biopreservation Biobanking 14, 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>

Magdeldin, S., 2012. Gel-Electrophoresis and Its Applications. INTECH Open Access Publisher.

Mescher, A.L., 2010. Junquiera's Basic Histology, 12th ed. McGraw-Hill, USA.

Musyarifah, Z., Agus, S., 2018. Proses Fiksasi pada Pemeriksaan Histopatologik. J. Kesehat. Andalas 7, 11.

Nicholas, F.W., 2010. Introduction to Veterinary Genetics, 3rd ed. Wiley Blackwell.

Ningsih, T.Y., Wahyono, D.J., Gumilas, N.S.A., 2018. Deteksi Gen Litik BRLF1 Epstein-Barr Virus pada Penderita Karsinoma Nasofaring. Biosfera 35, 29. <https://doi.org/10.20884/1.mib.2018.35.1.517>

Nzilibili, S.M.M., Ekodiyanto, Moh.K.H., Hardjanto, P., Yudianto, A., 2018. Concentration and Purity DNA Spectrophotometer: Sodium Monofluorophosphate forensic impended effect. Egypt. J. Forensic Sci. 8, 34. <https://doi.org/10.1186/s41935-018-0065-7>

O'Neill, M., McPartlin, J., Arthure, K., Riedel, S., McMillan, N., 2011. Comparison of the TLDA with the Nanodrop and the reference Qubit system. J. Phys. Conf. Ser. 307, 012047. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/307/1/012047>

Pagala, M.A., Ulupi, N., 2015. Deteksi Gen Mx Ayam Tolaki Menggunakan Teknik Ekstraksi DNA Yang Berbeda. J. Ilmu Dan Teknol. Peternak. Trop. 1, 1. <https://doi.org/10.33772/jitro.v1i1.355>

Scanes, C.G., Christensen, K.D., 2020. Poultry science, 5th ed. Waveland Press.

Skutkova, H., Vitek, M., Krizkova, S., Kizek, R., Provaznik, I., 2013. Preprocessing and Classification of Electrophoresis Gel Images Using Dynamic Time Warping. *Int J Electrochem Sci* 8, 14.

Suprianto, A., 2014. Perbandingan Efek Fiksasi Formalin Metode Intravital Dengan Metode Konvensional Pada Kualitas Gambaran Histologis Hepar Tikus. Pontianak: Universitas Tanjung Pura.

Wardani, A.K., Alirsyah, A., Fauziah, A., 2018. Identifikasi Gen Transgenik pada Produk Susu Bubuk Kedelai dan Susu Formula Soya dengan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction). *Agritech* 37, 237. <https://doi.org/10.22146/agritech.16656>

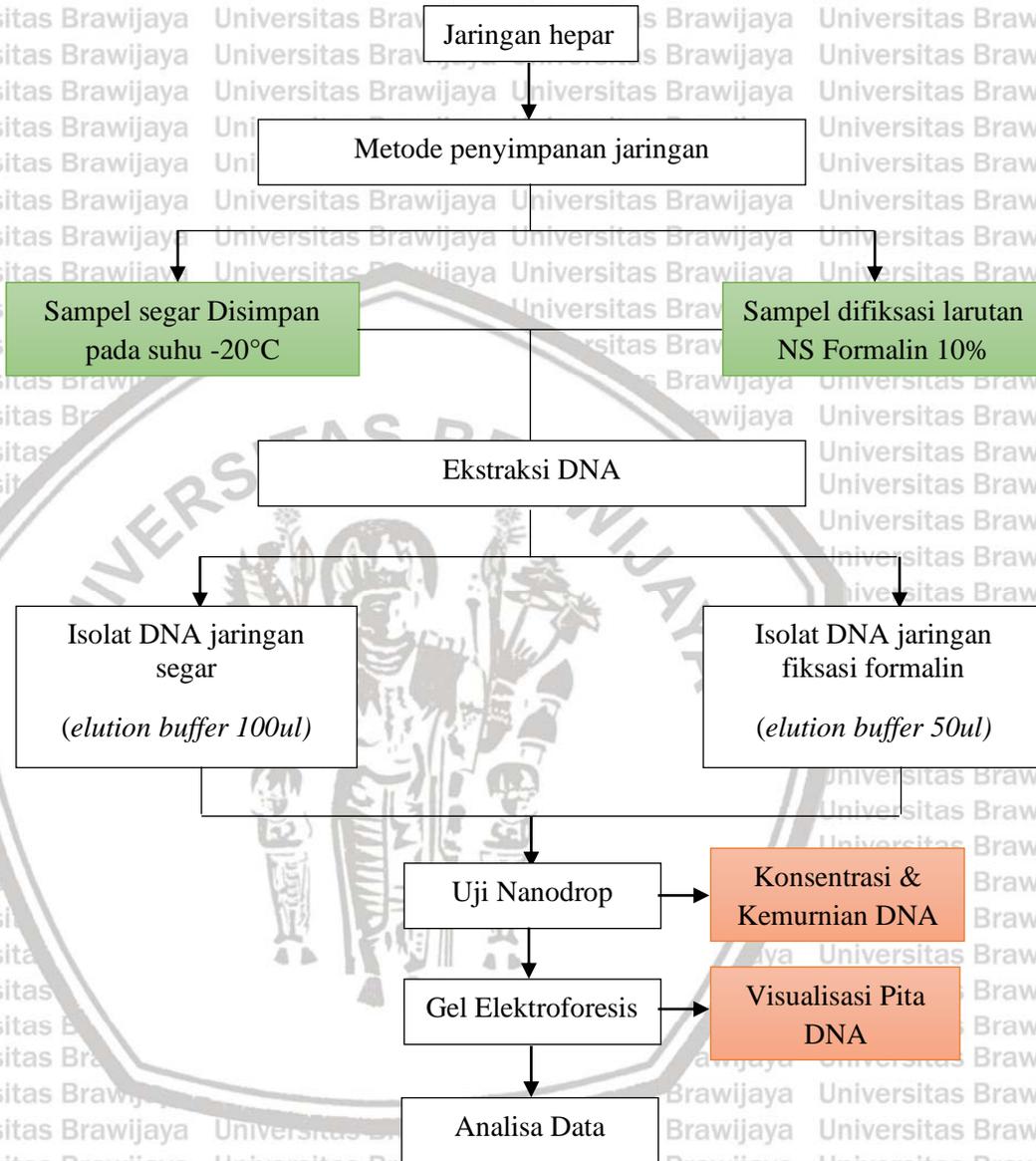




LAMPIRAN



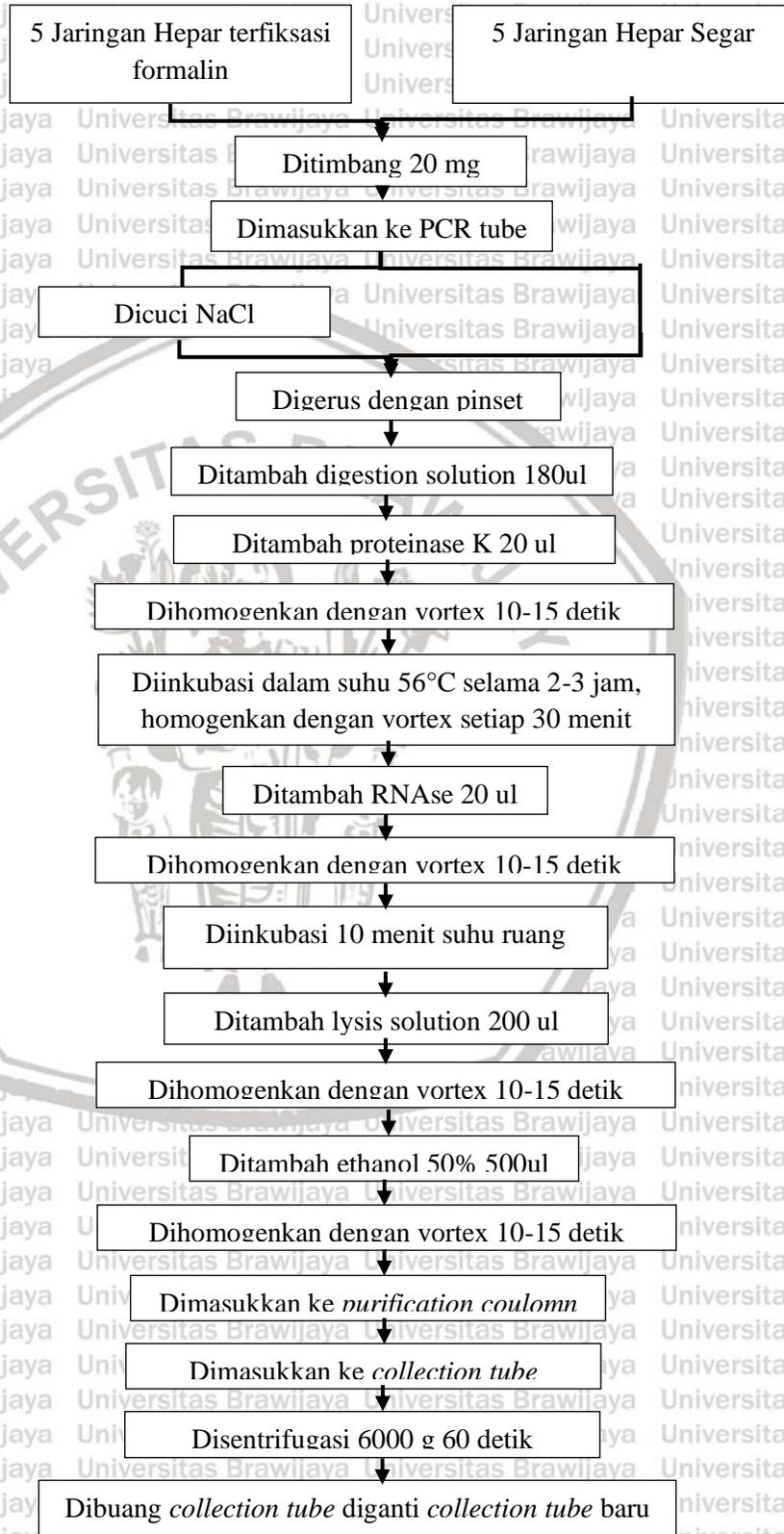
Lampiran 1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

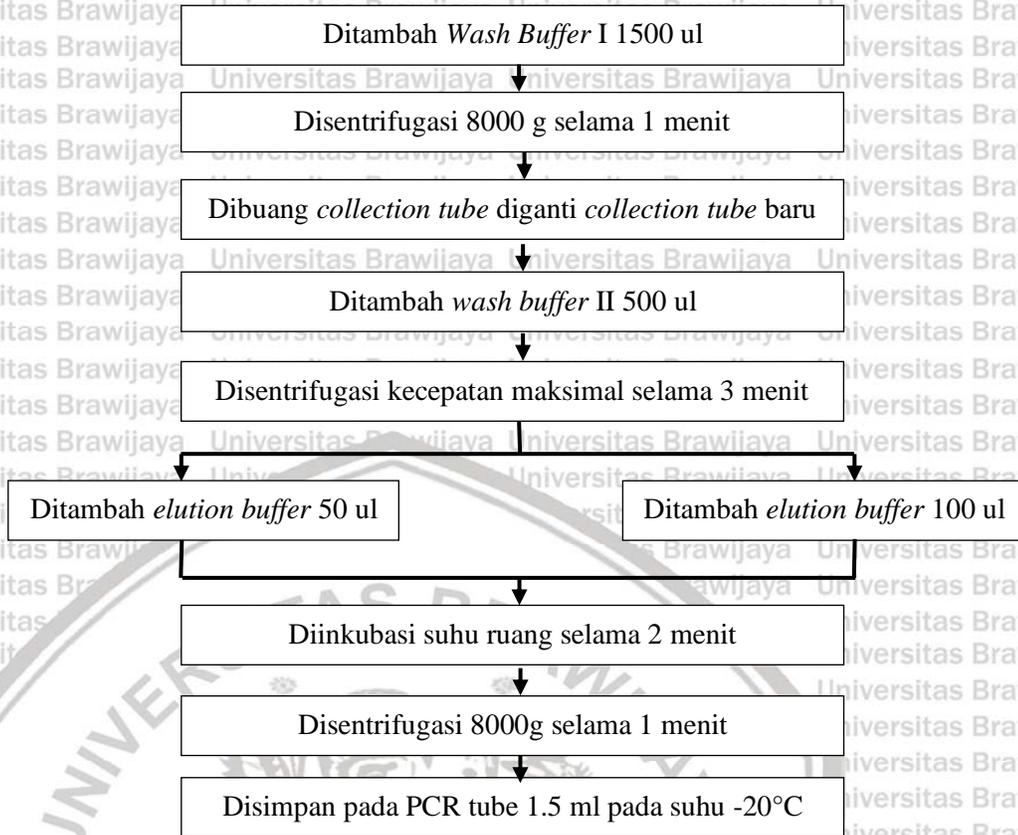


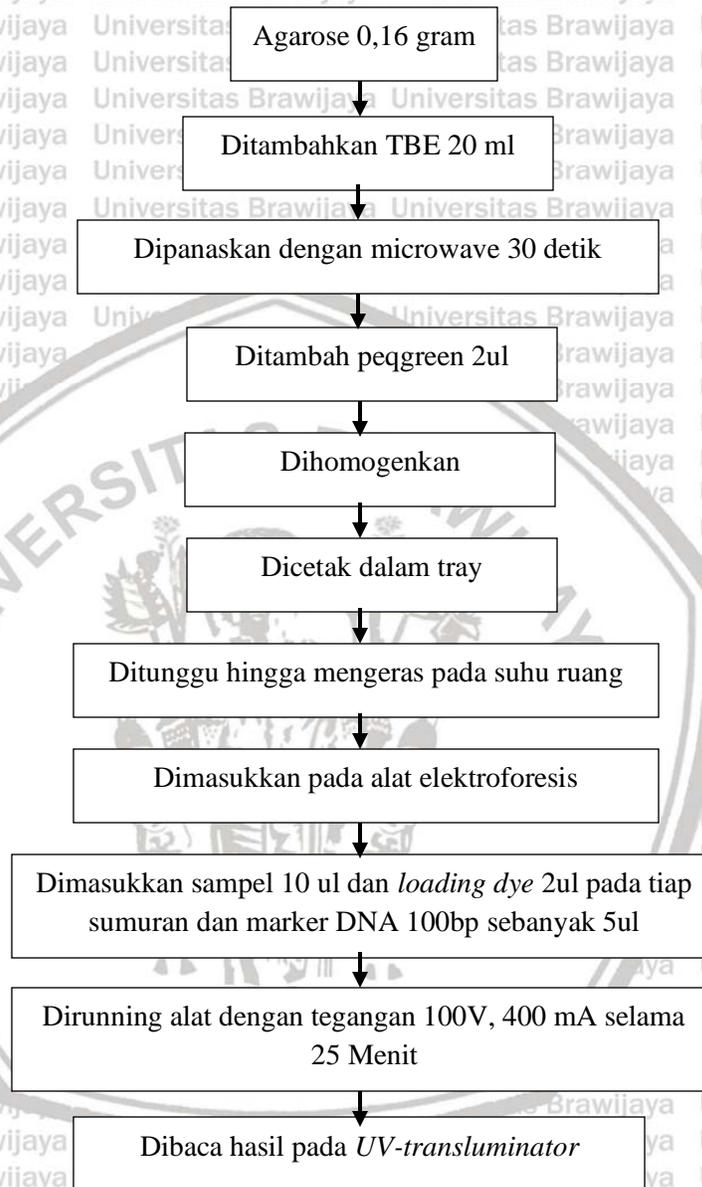
■ : Variabel Bebas

■ : Variabel Tetap

Lampiran 2. Proses Ekstraksi DNA





Lampiran 3. Prosedur Gel Elektroforesis

Lampiran 4. Nilai serapan panjang gelombang 230 nm, 260 nm, dan 280 nm

Hasil uji nanodrop sampel hasil Ekstraksi DNA jaringan terfiksasi formalin dan jaringan segar hepar ayam broiler di Laboratorium Genetika dan Molekuler Jurusan Biologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Sampel	Keterangan	λ 260/230	Abs 230	Abs 260	Abs 280	λ 260/280	Con (ng/ul)
A6	Hepar Segar 5	1,39	1,35	1,88	1,67	1,13	94,14
A7	Hepar Segar 7	1,21	1,68	2,03	2,16	0,94	101,41
A8	Hepar Segar 9	1,45	1,45	2,1	1,86	1,13	104,95
A9	Hepar Segar 14	1,25	3,27	4,08	4,09	1	204,05
A10	Hepar Segar 15	1,36	1,03	1,4	1,39	1,01	69,94
B6	Hepar Formalin 5	0,97	2,25	2,19	2,31	0,95	109,5
B7	Hepar Formalin 7	1,11	2,14	2,37	2,42	0,98	118,51
B8	Hepar Formalin 9	1,01	1,54	1,56	1,49	1,05	78,07
B9	Hepar Formalin 14	1,1	3,91	4,28	4,43	0,97	214,2
B10	Hepar Formalin 15	1,1	4,27	4,69	5,95	0,79	234,61

Lampiran 5. Hasil uji *independent t-test* kemurnian isolat DNA

Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Hasil Hepar Segar 260/280	.251	5	.200*	.867	5	.253
Hepar Formalin 260/280	.308	5	.136	.879	5	.305
Hepar Segar 260/230	.211	5	.200*	.942	5	.678
Hepar Formalin 260/230	.345	5	.052	.809	5	.096

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Hasil pengujian uji normalitas Saphiro-Wilk menunjukkan nilai (p) masing-masing variabel. Oleh karena nilai $p > 0.05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data masing-masing variabel yang digunakan terdistribusi normal.

Group Statistics

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
				Mean
Hasil Hepar Segar 260/230	5	1.3320	.09960	.04454
Hepar Formalin 260/230	5	1.0580	.06380	.02853

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Hasil	Equal variances assumed	1.880	.208	5.180	8	.001	.27400	.05290	.15202	.39598
	Equal variances not assumed			5.180	6.809	.001	.27400	.05290	.14821	.39979

Hasil pengujian *independent t-test* menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0.001.

Oleh karena nilai $p < 0.05$, maka H_0 tidak diterima dan dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan signifikan rata-rata hasil kemurnian DNA λ 260/230 nm penyimpanan dengan fiksasi NS formalin 10% dan sampel segar hepar ayam broiler.

Group Statistics

Univers	Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Hasil	Hepar Segar 260/280	5	1.0420	.08468	.03787
	Hepar Formalin 260/280	5	.9480	.09602	.04294

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Hasil	Equal variances assumed	.050	.829	1.642	8	.139	.09400	.05725	-.03803	.22603
	Equal variances not assumed			1.642	7.877	.140	.09400	.05725	-.03839	.22639

Hasil pengujian *independent t-test* menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0.139.

Oleh karena nilai $p > 0.05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan rata-rata hasil kemurnian amplicon DNA λ 260/280 nm penyimpanan dengan fiksasi NS formalin 10% dan sampel segar hepar ayam broiler.

Lampiran 6. Hasil uji *independent t-test* konsentrasi isolat DNA

Tests of Normality

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
hasil Konsentrasi Hepar Segar	.376	5	.020	.788	5	.064
Konsentrasi Hepar Formalin	.281	5	.200*	.876	5	.293

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Group Statistics

Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
hasil Konsentrasi Hepar Segar	5	114.8980	51.67467	23.10961
Konsentrasi Hepar Formalin	5	150.9780	69.06791	30.88811

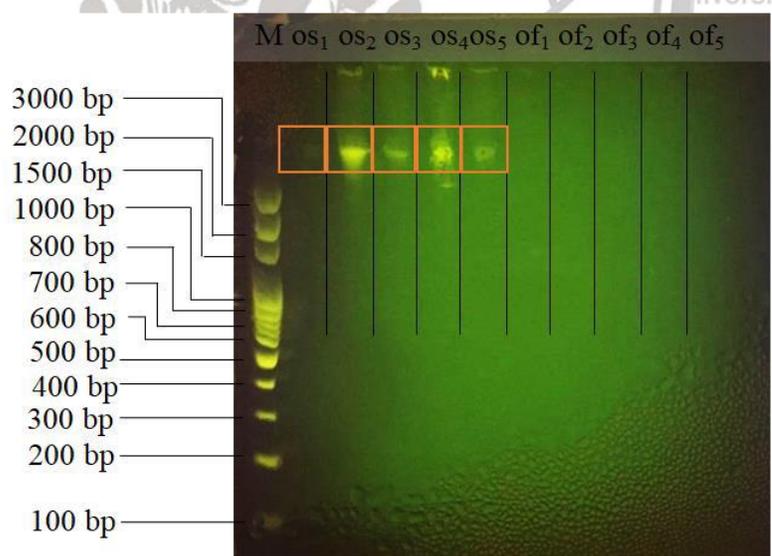
Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
hasil	Equal variances assumed	1.732	.225	-.935	8	.377	-36.08000	38.57628	-125.03706	52.87706
	Equal variances not assumed			-.935	7.410	.379	-36.08000	38.57628	-126.28582	54.12582

Hasil pengujian *independent t-test* menunjukkan nilai signifikansi (p) sebesar 0.377. Oleh karena nilai $p > 0.05$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan rata-rata hasil konsentrasi amplicon DNA penyimpanan dengan fiksasi NS formalin 10% dan sampel segar hepar ayam broiler.

Lampiran 7. Hasil uji nanodrop dan elektroforesis isolat DNA otot pectoralis segar dan terfiksasi formalin

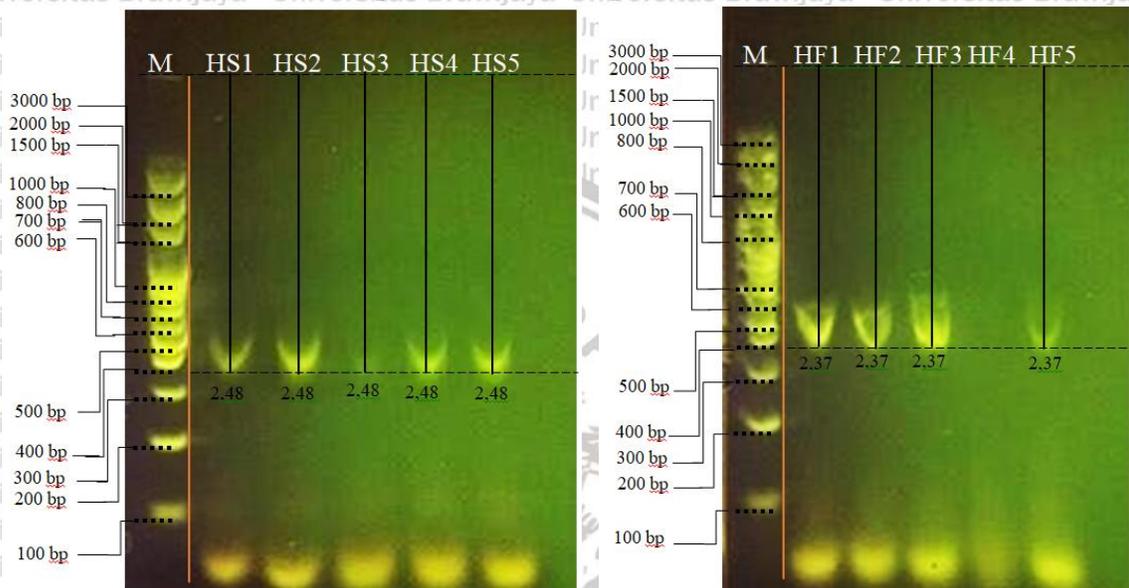
No.	Keterangan	λ 260/230 nm	λ 260/280 nm	Con(ng/ μ l)
1.	Otot Segar 1	2.13	1.27	598.2
2.	Otot Segar 2	0.79	0.91	57.17
3.	Otot Segar 3	1.22	1.2	23.92
4.	Otot Segar 4	0.68	0.83	63.22
5.	Otot Segar 5	1.69	1.13	471.66
6.	Otot Formalin 1	1.03	0.7	213.46
7.	Otot Formalin 2	0.61	1.04	34.2
8.	Otot Formalin 3	2.02	1.12	551.19
9.	Otot Formalin 4	0.64	0.87	51.37
10.	Otot Formalin 5	1.1	0.75	265.28



Hasil uji elektroforesis pita DNA menunjukkan tidak ada pita DNA pada sampel Otot Formalin dan panjang lebih dari 3000 bp pada sampel Otot Segar pada gel agarose 0.8%. M: Marker DNA ladder 100bp, OS: Otot Segar, dan OF: Otot Formalin.

Lampiran 8. Hasil uji nanodrop dan elektroforesis amplifikasi DNA Hepar segar dan terfiksasi formalin

Elektroforegram sampel (a) Amplifikasi Hepar Segar menunjukkan adanya pita DNA pada gel agrose 2% (b) Amplifikasi Hepar Formalin menunjukkan adanya pita DNA pada HF1, HF2, HF3 dan HF5. Namun pada HF4 tidak ada pita DNA



No	Keterangan	λ 260/230 nm	λ 260/280 nm	Con(ng/ μ l)
1.	Amplifikasi Hepar segar 1	1.84	1.54	880.37
2.	Amplifikasi Hepar Segar 2	1.84	1.5	885.16
3.	Amplifikasi Hepar Segar 3	1.81	1.38	826.76
4.	Amplifikasi Hepar Segar 4	1.82	1.49	973.79
5.	Amplifikasi Hepar Segar 5	1.85	1.52	892.57
6.	Amplifikasi Hepar Formalin 1	1.8	1.5	923.32
7.	Amplifikasi Hepar Formalin 2	1.83	1.49	967.47
8.	Amplifikasi Hepar Formalin 3	1.84	1.51	889.2
9.	Amplifikasi Hepar Formalin 4	1.79	1.52	1031.1
10.	Amplifikasi Hepar Formalin 5	1.75	1.41	1037.4