

III. MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret 2016 sampai dengan bulan Mei 2016 di Laboratorium Pemuliaan dan Genetika Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN SUSKA RIAU.

3.2 Bahan dan Alat

Sampel DNA yang digunakan dalam penelitian diekstraksi dari tulang babi dan tulang sapi yang telah diproses menjadi tepung tulang. Jumlah sampel DNA yang digunakan sebanyak 11 sampel yang terdiri dari 2 sampel kontrol yaitu DNA sapi dan DNA babi serta 9 sampel dari campuran tulang sapi dan tulang babi, dengan level campuran yaitu 1%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5% dan 20%.

Bahan-bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA (Kit DNA ekstraksi Genjet Genomic DNA Extraction (*Thermo Scientific*), *lysis solution*, *precipitation solution*, *NaCl solution*, *ethanol 96%*, *chloroform*, *deionized water*. Bahan-bahan yang digunakan dalam PCR adalah sampel DNA, sepasang primer (Tabel 3.1), PCR Master Mix, *nuclease free water*. Bahan yang digunakan dalam elektroforesis adalah air destilasi, *Agarose*, TAE 1x, *Ethidium Bromida* (EtBr), *loading dye*, dan DNA marker (100 pb). Primer yang digunakan mengacu pada Matsunaga *et al.* (1999) dengan susunan basa sebagai berikut :

- Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
 2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

Tabel 3.1. Runutan primer yang digunakan untuk Identifikasi Cemaran Babi

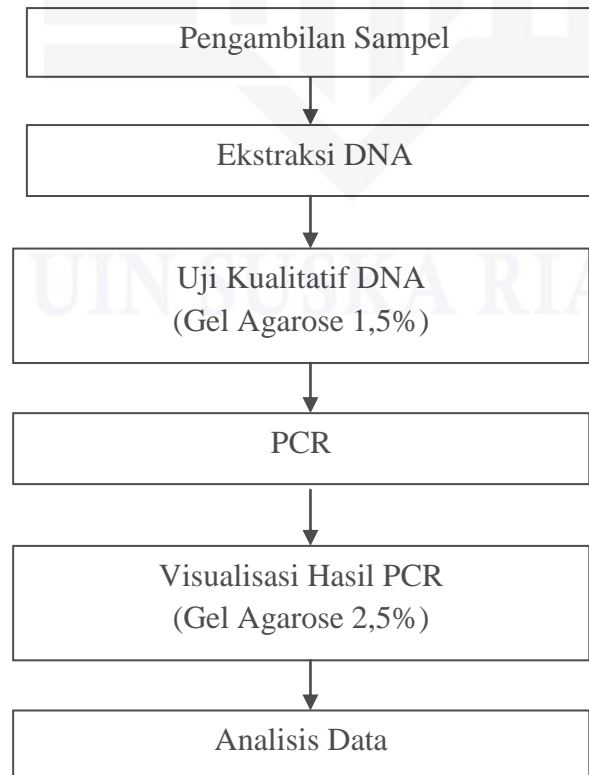
Jenis hewan	Primer	Panjang Amplifikasi
Babi	Forward(5’GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAA-3) reverse (5’-GCT GAT AGT AGA TTT GTG ATG ACC GTA-3)	398 bp
Sapi	Forward(5’GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCATCTTGATGAA-3) reverse (5’CTAGAA AAG TGT AAG ACC CGT AAT ATA AG-3)	274 bp

Sumber :Matsunaga *et al.* (1999)

Alat-alat yang digunakan adalah tabung *ependorf* (1,5 ; 0,5 ; 0,2 ml) tip (100, 200, dan 1000 µl),mikro pipet, sentrifuse, vorteks, water bath, timbangan analitik, *hot plat*, gelas ukur 100 ml, tabung erlenmeyer, dan 1 set alat elektroforesis gel *agarose*. Alat untuk proses PCR adalah mesin *thermal cyclcer*. Alat yang digunakan untuk visualisasi DNA adalah *Gel documentation*.

1.3 Metode Penelitian

Tahap Penelitian Meliputi :



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

1.3.1 Pengambilan Sampel

Tulang sapi dan babi dihaluskan hingga menjadi tepung, dan ditimbang 10 gr dengan level campuran 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5% dan 20% merujuk pada peneliti Primasari, (2011) dengan volume campuran sebagai berikut.

Tabel 3.2. Volume Campuran Tepung Tulang Sapi dan Tepung Tulang Babi

Level campuran	Tepung Tulang Sapi	Tepung Tulang Babi
1%	9,9 g	0,1 g
2,5%	9,75 g	0,25 g
5%	9,5 g	0,5 g
7,5%	9,25 g	0,75 g
10%	9 g	1 g
12,5%	8,75 g	1,25 g
15%	8,5 g	1,5 g
17,5%	8,25 g	1,75 g
20%	8 g	2 g

1.3.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Kit DNA ekstraksi Genjet Genomic DNA Extraction (*Thermo Scientific*) dengan mengikuti protokol ekstraksi yang disediakan produsen. Tahapan ekstraksi adalah sebagai berikut :

1. **Preparasi Sampel.** Tulang dikeringkan dan dihaluskan hingga menjadi tepung. Tepung tulang dimasukkan ke dalam tabung 1,5 mL. sebanyak 0,03 g.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

© Hak cipta milik UIN Suska Riau

State Islamic University of Sultan Syarif Kasim Riau

2. **Degradasi Protein.** Sampel yang telah dimasukkan dilisiskan dengan menambahkan 400 μL larutan *lysis solution*. Masukkan diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 65°C selama 10 menit.
3. **Degradasi Bahan Organik.** Sampel yang telah diinkubasi ditambahkan 600 μL *chloroform* vortek lembut dan disentrifugasi 5.000 rpm selama 4 menit. lalu bagian atas yang bening (DNA) diambil dan dipindahkan ketabung yang baru.
4. **Presipitasi DNA.** Pemurnian DNA kemudian dilakukan dengan penambahan 800 μL *precipitation solution* 1x dan sentrifugasi 5.000 rpm 4 menit. Buang supernatannya dan tinggalkan pellet DNA nya kemudian larutkan pellet DNA dengan tambahkan 100 μL *NaCl solution* vortek lembut, tambahkan 300 μL etanol dingin, biarkan selama 1 malam di suhu -20°C dan disentrifugasi pada 5.000 rpm selama 8 menit. Setelah supernatannya dibuang, DNA kemudian dilarutkan dalam 100 μL *sterile deionized water*. Dan DNA ekstraksi disimpan pada suhu -20°C

1.3.3 Uji Kualitatif DNA

Keberhasilan ekstraksi DNA diuji menggunakan teknik elektroforesis pada gel *agarose* 1.5%. Gel dibuat dari 0,53 gram *agarose* dan 35 mL larutan *buffer* (1x TAE) larutan dipanaskan. Larutan diaduk dengan magnet *stirrer*, kemudian dibiarkan agak dingin dan dituang kedalam cetakan. Hasil isolasi DNA sebanyak 5 μL dicampur dengan *loading dye* sebanyak 1 μL , kemudian sampel yang telah tercampur dimasukkan ke dalam sumur gel *agarose* yang telah disediakan. Sampel kemudian dielektroforesiskan dalam *buffer* TAE 1x selama 20 menit dengan

tegangan 100 Volt sampai sampel berpindah dari kutub negatif ke kutub positif. Selanjutnya hasil elektroforesis gel *agarose* direndam dalam larutan *ethidium bromide* dengan volume 5 μ L *ethidium bromide* dan 500 mL TAE 1x selama 15 menit, kemudian direndam lagi dengan menggunakan aquades selama 5 menit. Gel kemudian diletakkan di atas Gel doc lalu didokumentasikan.

1.3.4 Amplifikasi Ruas Gen Spesifik Penciri DNA Babi

Amplifikasi ruas gen *cyt b* dilakukan dengan metode *Multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Sampel DNA sebanyak 2 μ L dimasukkan kedalam tabung PCR 0.2 mL, ditambahkan komponen-komponen PCR yang terdiri atas primer *forward* 2 μ L primer *reverse* untuk DNA sapi 1 μ L dan untuk DNA babi 1 μ L, Phire green master Mix PCR. Proses amplifikasi dilakukan pada mesin *thermocycler GeneAmp® PCR Sistem (Applied Biosystems TM)* dengan suhu *pradenaturasi* 94°C selama 5 menit, 30 siklus yang terdiri atas *denaturasi* 94°C selama 30 detik, *annealing* 60°C selama 45 detik, *elongasi* 72°C selama 1 menit dan *elongasi* akhir 72°C selama 5 menit. Setelah proses tersebut selesai, tabung diambil dan disimpan dalam referigerator.

1.3.5 Elektroforesis dan Visualisasi Produk PCR

Produk PCR divisualisasikan dengan menggunakan teknik elektroforesis pada gel *agarose* 2.5%. Gel dibuat dari 0,88 gram *agarose* dan 35 mL larutan *buffer* (1 x TAE) larutan dipanaskan. Larutan diaduk dengan magnet *stirrer*, kemudian dibiarkan agak dingin ditambahkan 2.5 μ L pewarna *ethidium bromide*. dan dituang ke dalam cetakan. Masukkan DNA marker 10 μ L dicampur *loading*

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

dye sebanyak 1 μL pada sumur pertama dan pada sumur berikutnya hasil produk PCR sebanyak 2 μL dimasukkan ke dalam sumur gel *agarose* yang telah disediakan. Sampel kemudian dielektroforesiskan dalam buffer TAE 1x selama 40 menit dengan tegangan 80 Volt sampai sampel berpindah dari kutub negatif ke kutub positif. Gel kemudian diletakkan di atas Gel doc lalu didokumentasikan.

1.3.6 Analisa Data

Cemaran babi pada campuran tepung tulang ditentukan dengan membandingkan panjang basa hasil amplifikasi, perbedaan panjang basa pada sapi dan babi dapat digambarkan sebagai berikut.



Sumber : Almira Primasari, (2011)

Gambar 3.1. Visualisasi hasil amplifikasi fragmen spesifik pada DNA campuran dengan enam level perbandingan. M: marker 100 pb, S: kontrol positif sapi, B: kontrol positif babi, T: kontrol positif tikus, 1-5: DNA campuran sapi:babi (1, 5, 10, 15, 20 dan 25%), 6-11: DNA campuran sapi:tikus (1, 5, 10, 15, 20 dan 25%).