

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.

III. MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada Desember 2016 sampai dengan Januari 2017. Sampel darah, feses dan urin diambil di Balai Inseminasi Buatan Daerah Tenayan Raya Kota Pekanbaru. Proses isolasi dan uji kualitatif dilakukan di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau. Uji kuantitatif dilakukan di Laboratorium FMIPA Institut Pertanian Bogor (IPB) Bogor.

3.2. Materi Penelitian

Materi penelitian ini berupa sampel darah, feses dan urin yang diambil dari 5 ekor sapi bali jantan berumur 4-12 tahun.. Bahan-bahan yang digunakan untuk pengambilan darah yaitu tabung *vacutainer* dengan EDTA 3 mL, spuit 5 cc, kapas alkohol dan *coolbox*. Alat untuk pengambilan sampel feses yaitu spatula, tabung koleksi berukuran 4 mL, alat untuk pengambilan sampel urin yaitu teko ukur dan tabung *vacutainer* 3 mL dengan EDTA.

Bahan-bahan yang digunakan untuk ekstraksi DNA GeneJET genomic DNA purification mini kit #K0781 (Thermo Scientific) terdiri dari *proteinase K*, *lysis solution*, *wash buffer I*, *wash buffer II*, *elution buffer*, aqua DM, 1xPBS, alkohol 70%, *ethanol absolut* 90%. Bahan-bahan yang digunakan untuk elektroforesis yaitu gel agarose, *buffer* 1xTAE, *ethidium bromida* dan *loading dye*. Alat yang digunakan adalah tabung *eppendorf* 1,5 mL, pipet tip, mikropipet, *vortex*, *sentrifuge*, rak tabung *eppendorf* 1,5 mL, *water bath*, *gel doc*, komputer, elektroforesis, *columns collection tube*, *collection tube* dan autoclave.



Hak Cipta Diindungi 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.

3.3. Metodologi Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental, untuk mengetahui hasil isolasi DNA yang dilakukan menggunakan DNA *Kit*.

3.4. Parameter Penelitian

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah uji kualitatif dan uji kuantitatif DNA, uji kuantitatif DNA meliputi konsentrasi DNA, dan tingkat kemurnian (*Purifikasi*) DNA.

3.4.1. Uji Kualitatif DNA

Metode standar yang digunakan untuk identifikasi, pemisahan, dan purifikasi fragmen DNA adalah dengan menggunakan elektroforesis gel agarose. Migrasi elektroforesis DNA melalui gel agarose dipengaruhi oleh faktor ukuran dan konformasi molekul DNA, konsentrasi gel agarose, arus listrik, dan suhu. Pewarna *ethidium bromida* (EtBr) digunakan untuk alat identifikasi dan mengukur semi kualitatif fragmen DNA yang terpisah dalam gel. EtBr ini akan terikat antara dua untai ganda DNA, sehingga pita DNA dalam gel agarose akan berpendar karena pewarna ini mengandung zat *fluoresen*. Ikatan DNA akan terekspos pada sinar UV level medium, sekitar panjang gelombang 300 nm.

Ethidium bromida dapat diberikan pada setiap sampel yang akan dimasukkan ke dalam gel atau dicampurkan ke gel agarose sebelum gel dicetak pada cetakan gel. Intensitas *fluoresen* dapat diukur dengan menggunakan DNA penanda standar, sehingga kuantitas DNA dapat diperkirakan, misalnya antara 0,50 – 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Apabila jumlah DNA yang diperoleh terlalu sedikit sehingga konsentrasinya tidak dapat diukur dengan alat spektrofotometri atau DNA tidak terlalu murni, konsentrasi dapat diestimasi dengan melihat intensitas *fluoresen*



Hak Cipta Diindungi 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.

yang dipancarkan oleh *ethidium bromida*. Foto DNA yang tampak berwarna oranye dan konsentrasi DNA diestimasi dengan membandingkan intensitas *fluorescen ethidium bromida* pada DNA sampel dengan DNA standar (Muladno, 2002).

3.4.2. Uji Kuantitatif DNA

Uji kuantitatif DNA dengan metode spektrofotometer dengan prinsip iradiasi ultra violet yang diserap oleh nukleotida dan protein dalam larutan. DNA murni dapat menyerap cahaya *ultraviolet* karena adanya basa purin dan pirimidin. Penyerapan iradiasi sinar UV secara maksimal oleh DNA dicapai pada panjang gelombang 260 nm, sedangkan penyerapan maksimal oleh protein dicapai pada panjang gelombang 280 nm. Pada panjang gelombang 260 nm, apabila kepadatan optik (*optical density*) atau OD₂₆₀ sama dengan satu, maka konsentrasi setara dengan 50 ng/μL (DNA heliks ganda) 40 ng/μL (RNA atau DNA untai tunggal), 20 ng/μL (oligonukleotida untai tunggal) (Muladno, 2002). Uji kuantitatif DNA terdiri dari konsentrasi DNA dan kemurnian DNA.

3.4.2.1. Konsentrasi DNA

Konsentrasi DNA dapat dihitung menggunakan rumus dengan alat spektrofotometri sebagai berikut :

$$\text{Konsentrasi (ng/}\mu\text{L) DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{Faktor pengenceran}$$

Keterangan:

A₂₆₀ = Nilai absorbansi pada 260 nm

50 = Larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 ng untai ganda DNA per mL (dsDNA)

Hak Cipta Diindungi 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.

3.4.2.2. Kemurnian DNA

DNA murni dapat menyerap cahaya ultraviolet karena adanya basa purin dan pirimidin, nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0 (Fatchiyah dkk., 2011). Kemurnian DNA menggunakan rumus Fatchiyah dkk. (2011) sebagai berikut:

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

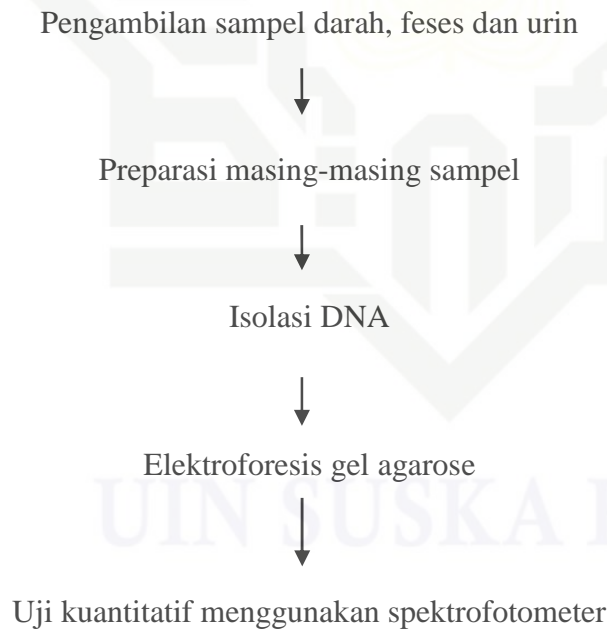
Keterangan:

A_{260} = Pita DNA dapat menyerap cahaya UV pada nilai absorbansi 260 nm

A_{280} = Kontaminan protein atau fenol dapat menyerap cahaya pada nilai absorbansi 280 nm.

3.5. Prosedur Penelitian

Tahapan penelitian dijelaskan pada skema penelitian pada Gambar 3.1.



(Gambar 3.1. Tahapan Penelitian)



Hak Cipta Diindungi 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.

3.5.1. Pengambilan Sampel

Pengambilan darah sebanyak 3 mL melalui *vena jugularis* menggunakan spuit 5 cc. Selanjutnya darah disimpan dalam tabung *vacutainer* dengan EDTA. Pengambilan sampel feses dan urin, sapi bali ditempatkan pada kandang individu. Urin ditampung ± 100 mL menggunakan teko ukur, kemudian dimasukkan ke dalam tabung *vacutainer* dengan EDTA dan koleksi feses dilakukan sesaat setelah feses dikeluarkan sebanyak ± 12 gram, selanjutnya masukkan ke dalam tabung koleksi. Sampel disimpan dalam *coolbox* sebelum dilakukan proses isolasi DNA.

Proses pengambilan sampel dilakukan di Balai Inseminasi Buatan Daerah Tenayan Raya Kota Pekanbaru yang terdiri dari sampel darah, feses dan urin sapi bali. Sampel yang dibutuhkan diperoleh dari 5 ekor ternak sapi bali jantan, dimana setiap individu ternak diambil sampel berupa darah, feses serta urin. Proses pengambilan sampel pada penelitian ini sebagai berikut:

3.5.1.1. Pengambilan Sampel Darah

Proses pengambilan sampel darah dilakukan setelah ternak dimasukkan pada kandang jepit yang selanjutnya pengambilan darah dilakukan oleh dokter hewan beserta paramedis yang bersangkutan (Lampiran 3) dengan dibantu oleh pekerja kandang serta pegawai Balai Inseminasi Buatan Tenayan Raya Kota Pekanbaru.

3.5.1.2. Pengambilan Sampel Feses

Sampel feses dikoleksi dengan cara mengambil feses segar dari 5 ekor ternak sapi bali jantan. Pengambilan sampel feses sebanyak ± 12 gram dilakukan sesaat setelah ternak mengeluarkan feses sampai feses jatuh pada lantai kandang



Hak Cipta Diindungi 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.

(Lampiran 3). Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel pada bagian atas dari tumpukan feses dan dimasukkan dalam tabung koleksi 4 mL.

3.5.1.3. Pengambilan Sampel Urin

Sampel urin diperoleh dengan cara menampung secara langsung urin ternak yang digunakan. Sampel yang ditampung secara langsung menggunakan teko ukur atau gayung yang telah dibersihkan dan disterilkan menggunakan alkohol 70% pada saat ternak menunjukkan tanda-tanda ingin mengeluarkan urin (Lampiran 3). Sampel urin yang diperoleh selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung EDTA dan sisa dari sampel yang tersedia disimpan pada botol koleksi.

3.5.2. Prosedur Preparasi Sampel

Preparasi sampel menggunakan metode Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Mini Kit #K0781 yang telah dimodifikasi. Untuk sampel darah dilakukan dengan cara :

1. Tambahkan 1 mL Aqua DM dalam 500 μ L darah kedalam tabung *eppendorf*, kemudian *vortex*
2. Inkubasi selama 5 menit pada suhu ruang
3. *Sentrifuge* selama 5 menit pada 5000 rpm
4. Supernatan dibuang, *pellet* disuspensi pada 200 μ L 1x PBS
5. Lanjutkan ke proses isolasi DNA

Sampel urin:

1. 4,5 mL urin dimasukkan kedalam tabung *vacutainer* dengan EDTA
2. *Sentrifuge* selama 10 menit pada 5000 rpm
3. Pisahkan supernatan
4. Pindahkan ke tabung 1,5 mL dan disuspensi pada 200 μ L 1xPBS



Hak Cipta Diindungi 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.

5. Lanjutkan ke proses isolasi DNA

Selanjutnya prosedur preparasi sampel feses mengacu kepada penelitian Savira (2012) yang telah dimodifikasi dengan sumber materi berupa feses. Cara yang dilakukan adalah :

1. Sebanyak 0,06 gr feses dimasukkan kedalam tabung *vacutainer* plan (tanpa EDTA)
2. 3 ml aqua DM ditambahkan, kemudian di *vortex*
3. *Sentrifuge* selama 2 x 5 menit pada kecepatan 5000 rpm
4. Supernatan dibuang, *pellet* yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung *eppendorf* menggunakan spatula
5. Langkah 1-4 dilakukan sebanyak 3 kali
6. *Pellet* disuspensi pada 200 μ L 1xPBS
7. Selanjutnya tahap isolasi DNA

3.5.3. Tahapan Proses Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan mengikuti metode yang direkomendasikan oleh Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Mini Kit #K0781, atau menggunakan standar komersil *kit* GeneJET DNA Purification yang telah dimodifikasi. Rangkaian kegiatan ekstraksi DNA disajikan pada Gambar 3.2.

3.5.4. Elektroforesis Gel Agarose

Proses elektroforesis diawali dengan penempatan DNA hasil isolasi ke dalam sumur (*well*) gel yang ditempatkan pada tangki (*chamber*) yang berisi larutan penyangga, kemudian dialirkan listrik bertegangan 100 volt selama 20 menit dengan kutub yang terpisah satu sisi dengan sisi lainnya. Setelah proses elektroforesis selesai, selanjutnya dilakukan proses pewarnaan agar molekul

sampel yang telah terpisah dapat dideteksi. Pada penelitian ini menggunakan *ethidium bromida* (EtBr) sebagai zat pewarnanya.

DNA hasil isolasi diuji kualitasnya dengan cara elektroforesis pada gel agarose 1,5% selama 20 menit dengan tegangan 100 volt dan visualisasi dengan *ethidium bromida* (EtBr) selama 15 menit. Pengamatan dilakukan dibawah sinar UV. Proses pembuatan gel agarose (Muladno, 2002) sebagai berikut:

1. Agarose sebanyak 0,525 gram dilarutkan dalam 35 mL larutan *buffer* 1xTAE dipanaskan pada suhu 250⁰C sampai didapatkan larutan bening
2. 3 μ L *Ethidium bromida* selanjutnya ditambahkan pada larutan bening, diaduk sampai tercampur sempurna
3. Larutan didinginkan sampai 60⁰C, selanjutnya dituang kedalam pencetak gel
4. Sisir ditempatkan pada tepian gel dan gel dibiarkan mengeras
5. Apabila gel telah mengeras, sisir dicabut sehingga akan terbentuk sumur-sumur yang digunakan untuk menempatkan larutan DNA
6. Gel ditempatkan kedalam tangki elektroforesis yang mengandung larutan *buffer* 1xTAE
7. 1 μ L *loading dye* dicampurkan dengan 5 μ L DNA hasil isolasi, selanjutnya diisikan kedalam masing-masing sumur, dimulai dari sumur ke 2, 3, 4, ... dst
8. Pada sumur ke 1 ditempatkan DNA ladder 100 bp
9. Tangki elektroforesis ditutup dan selanjutnya dialiri arus listrik pada tegangan 100 volt selama 20 menit
10. Selanjutnya gel diangkat dan diamati pada *gel doc*
11. Keberhasilan isolasi DNA ditandai dengan terbentuknya pita tunggal dan terletak diatas marker.

Hak Cipta Diindungi 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 mengummumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

Hak Cipta Diindungi 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.

200 μ L sampel (Darah, Feses, Urin) + 20 μ L *proteinase K* + vortex + 400 μ L

Lysis solution, vortex (tabung *eppendorf* 1,5 mL)



Inkubasi dalam *water shaker bath*

selama 10 menit pada suhu 56°C



Tambahkan 200 μ L *ethanol absolut* (96%), vortex



Pindahkan ke spin column, *sentrifuge* selama 2 menit pada 5000 rpm,

pindahkan cairan pada tabung koleksi baru



Tambahkan 500 μ L *wash buffer I*, *sentrifuge* selama 2 menit

pada 5000 rpm, buang larutan dan letakkan kembali pada tabung koleksi



Tambahkan 500 μ L *wash buffer II*, *sentrifuge* selama 5 menit pada 5000 rpm,

buang cairan, letakkan kembali pada tabung



Tabung koleksi kosong dan *column* di *sentrifuge* pada 5000 rpm selama 3 menit,



Tambahkan 200 μ L *elution buffer*, inkubasi selama 2 menit pada suhu ruang,

sentrifuge 2 menit pada 5000 rpm, lakukan sebanyak 2x



Pisahkan DNA murni, simpan pada suhu -20°C

(Gambar 3.2. Isolasi DNA metode Thermo Scientific)

3.6. Analisis Data

Data hasil uji kualitatif DNA dianalisis secara deskriptif dengan melihat keberhasilan melalui pemunculan pita DNA pada gel agarose, dan data hasil uji kuantitatif dianalisis dengan menghitung nilai rata-rata, standar deviasi, dan koefisien keragaman. Perbandingan nilai rata-rata konsentrasi dan nilai rata-rata tingkat kemurnian DNA hasil isolasi dianalisis dengan menggunakan uji t, yaitu:

1. Konsentrasi DNA hasil isolasi darah vs konsentrasi DNA hasil isolasi feses
2. Tingkat kemurnian DNA hasil isolasi darah vs tingkat kemurnian DNA hasil isolasi feses

Rumus-rumus yang digunakan berdasarkan Sudjana (2005) sebagai berikut:

1. Nilai rata-rata : $\bar{X} = \sum X_1 / n$

Keterangan: \bar{X} = Nilai rata-rata

$\sum X_1$ = Jumlah data

n = Banyak data

2. Standar deviasi : $S = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$

Keterangan: S = Standar deviasi

X_1 = Nilai tengah

\bar{X} = Nilai rata-rata

n = Banyak data

3. Koefisien keragaman

$$Kk = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\%$$

Keterangan: Kk = Koefisien keragaman

Hak Cipta Diindungi 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 Diindungi 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.

S = Simpangan baku

\bar{X} = Nilai rata-rata

$$4. \text{ Uji } t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Keterangan: \bar{X}_1 = Nilai rata-rata dari sampel ke-1

\bar{X}_2 = Nilai rata-rata dari sampel ke-2

S^2 = Ragam gabungan

n_1 = Banyak data sampel ke-1

n_2 = Banyak data sampel ke-2