

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari hingga Maret 2016. Preparasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Analisis molekuler dilakukan di Worawidh Wajwalku *Wildlife Laboratory*, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Kasetsart Kamphaeng Saen, Thailand.

B. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel DNA yang telah diekstraksi dari sampel darah burung yang didapat di Gunung Merapi, Yogyakarta pada tahun 2009. Sampel yang digunakan di dalam penelitian ini berjumlah 24 sampel koleksi Laboratorium Biologi Molekuler UAJY dari jenis burung yang telah diekstraksi sebelumnya. 24 sampel ini berasal dari 11 spesies burung yang berbeda.

Sampel yang digunakan adalah masing-masing Bentet Kelabu sebanyak 3 sampel, Kacamata Biasa sebanyak 2 sampel, Cekakak Jawa sebanyak 2 sampel, Cikrak Daun sebanyak 4 sampel, Ciung Batu sebanyak 1 sampel, Cucak Gunung sebanyak 4 sampel, Pelanduk Semak sebanyak 1 sampel, Pijantung kecil sebanyak 1 sampel, Srigunting Kelabu sebanyak 3 sampel, Tekukur sebanyak 1 sampel dan Walik Kepala Ungu sebanyak 2 sampel (Tabel 1).

Tabel 1. Jenis Burung Yang Digunakan Dalam Penelitian

No.	Nama Indonesia	Nama Ilmiah
1.	Srigunting Kelabu	<i>Dicrurus leucophaeus</i>
2.	Pelanduk Semak	<i>Malaconcincla sepiarium</i>
3.	Kacamata Biasa	<i>Zosterops palpebrosus</i>
4.	Bentet Kelabu	<i>Lanius scach</i>
5.	Cikrak Daun	<i>Phylloscopus trivirgatus</i>
6.	Walik Kepala Ungu	<i>Ptilinopus porphyreus</i>
7.	Cekakak Jawa	<i>Halcyon cyanoventris</i>
8.	Pijantung Kecil	<i>Arachnotera longirostra</i>
9.	Tekukur	<i>Streptopelia chinensis</i>
10.	Ciung Batu	<i>Myophonus glaucinus</i>
11.	Cucak Gunung	<i>Pycnonotus bimaculatus</i>

C. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminair Flow*, mikropipet, *microtube*, *tip*, *filter tip*, *PCR tube*, *tube rack*, *permanent marker*, sarung tangan, masker, *spindown*, mikrosentrifuse, *microwave*, *thermalcycler*, *gel tray*, *comb*, *erlenmeyer*, *food wrap*, timbangan elektrik, kulkas, *UV illuminator*, *GelDoc*, *parafilm*, elektroforesa, *freezer*, lakban, box.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah burung sebanyak 10 μ l, *Destilated Water* (DW), buffer *KHCl*, *MgCl*, *dNTP*, *Taq Polymerase*, *Hot Start*, *5x HF*, *Haem NF1*, *Haem NR2*, *F2561*, *R3950*, *R2728*, bubuk agarose, alkohol 70%, *1X TA*.

D. Tahap Penelitian dan Cara Kerja

1. Preparasi Sampel

Sampel yang telah diekstraksi diberi kode berdasarkan daftar yang sudah ada di laboratorium biologi molekuler (terlampir) dan dimasukkan ke dalam *tube* dipindahkan kedalam box penyimpanan dan ditutup rapat lalu di segel dengan lakban. Pada saat sebelum digunakan, sampel terlebih dahulu ditambah dengan 10 μ l DW lalu dihomogenkan.

2. Analisis Molekuler

Analisis molekuler dilakukan dalam beberapa tahapan yakni amplifikasi DNA dengan metode *nested* PCR, visualisasi hasil amplifikasi pada kedua tahap PCR, dan perhitungan prevalensi.

2.1. Nested Polymerase Chain Reaction

A. PCR tahap 1

Pada PCR tahapan 1, larutan PCR yang dibuat dalam volume 10 μ l untuk setiap *tube* sampel dengan perbandingan 9 μ l PCR Mix dan 1,5 μ l *template* DNA. Dengan jumlah sampel 24 *tube*, PCR Mix dibuat dengan volume 3X untuk tiap bahannya. Reagen PCR, konsentrasinya, dan volume larutan PCR dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Volume Larutan Untuk PCR Tahap Pertama

No.	Reagen PCR	Konsentrasi Akhir	Volume (μ l) 3x Reaksi
1	DW		195 μ l
2	5X HF	1x	60 μ l
3	dNTP	1,5 mM	6 μ l
4	Primer HaemNF1	0,2 mM	3 μ l
5	Primer HaemNR2	0,6 μ M	3 μ l
6	Taq Hot Start	0.5 u	3 μ l
7	Total Volume		270 μ l

Larutan PCR dibuat di dalam LAF dengan mencampur bahan-bahan larutan di atas. Setelah PCR Mix dibuat, tube kemudian di *vortex* lalu di masukkan ke *microcentrifuge* dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 detik. PCR Mix yang telah dihomogenisasikan kemudian diambil 9 μ l dan dimasukkan kedalam PCR *tube*.

Sampel DNA yang telah diekstraksi kemudian diambil 1 μ l dan dimasukkan kedalam *tube* yang telah berisi PCR Mix. PCR *tube* kemudian di *vortex* dan di *spindown* selama 10 detik. Setelah *spindown*, PCR *tube* dimasukkan kedalam *thermalcycler*. Protokol PCR yang digunakan adalah modifikasi dari Hellgren dkk., (2004), dimana suhu predenaturasi diatur 98°C selama 180 detik, denaturasi 98 °C selama 30 detik, *annealing* 50 °C selama 30 detik, elongasi 72 °C selama 30 detik dan postelongasi 72 °C selama 300 detik untuk 40 kali siklus.

B. PCR Tahap 2

Reagen PCR, konsentrasi, dan volume larutan PCR tahap kedua disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Volume Larutan Untuk PCR Tahap Kedua

No.	Reagen PCR	Konsentrasi Akhir	Volume (μ l) 3x reaksi
1	DW		194 μ l
2	5X HF	1X	60 μ l
3	dNTP	1,5 mM	6 μ l
4	Primer HaemFL	0,2 mM	3 μ l
5	Primer HaemNR2	0,6 μ M	3 μ l
6	Produk PCR Tahap 1		1 μ l
7	Taq Hot Start	0.5 u	3 μ l
8	Total Volume		270 μ l

Larutan PCR dibuat di dalam *cool box* dengan mencampur bahan-bahan larutan di atas. *Microtube* yang telah ditandai di *vortex* lalu di *spindown* kemudian dimasukkan kedalam *thermalcycler*. Suhu predenaturasi diatur 94°C selama 180 detik, denaturasi 94 °C selama 30 detik, *annealing* 50 °C selama 30 detik, elongasi 72 °C selama 45 detik dan postelongasi 72 °C selama 600 detik untuk 30 kali siklus.

2.2. Visualisasi Hasil PCR

Visualisasi hasil PCR dilakukan menggunakan metode elektroforesis. Gel agarosa yang digunakan adalah gel agarosa dengan kepadatan 2 %. DNA *ladder* 100 bp digunakan untuk mengetahui ukuran fragmen DNA. Pita dengan ukuran fragmen DNA 480 bp menunjukkan hasil positif yaitu terdapat DNA parasit malaria burung di dalam darah burung. Sebaliknya hasil negatif, jika pita tidak terbentuk atau pita terbentuk tetapi memiliki ukuran fragmen DNA lebih atau kurang dari 480 bp (Dale dan Schantz, 2003; Hellgren dkk., 2004).

3. Analisis Data

3.1. Identifikasi Molekuler

Identifikasi jenis parasit yang ada pada sampel positif di dalam sampel ini dilakukan melalui sekuensing. Sampel positif dari penelitian ini berupa produk PCR kemudian disiapkan sebanyak 10 µl per reaksi di dalam ddH₂O untuk disekuensing. Sekuensing sampel dilakukan oleh First Base Laboratories Malaysia yakni perusahaan yang bergerak di bidang penelitian molekuler termasuk di dalamnya menyediakan jasa sekuensing. Hasil sekuensing secara lengkap dapat dilihat di lampiran IV. Analisis molekuler selanjutnya dilakukan dengan menggunakan *software* yang ada di NCBI yakni BLAST.

3.2. Perhitungan Prevalensi

Perhitungan prevalensi dilakukan dengan menggunakan rumus dibawah ini

$$\text{Prevalensi} = \frac{\text{Jumlah sampel positif}}{\text{jumlah seluruh sampel}}$$

Hasil analisis molekuler kemudian dijelaskan secara deskriptif. Data kemudian dibandingkan dengan perhitungan prevalensi yang telah dilakukan.

