

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk ke dalam penelitian dasar, sedangkan metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif (Nazir, 1988).

B. Objek Penelitian

Objek dalam penelitian ini adalah DNA larva *Hydropsyche sp.* yang diambil dari daerah hulu Sungai Cikapundung yang tidak teraliri limbah (tidak tercemar) yaitu di daerah Bukit Tunggul (lokasi 1) dan di dekat perbatasan antara desa Cipanjalu dan Cilengkrang (lokasi 3). Jumlah individu *Hydropsyche sp.* yang digunakan adalah 18 individu, dimana 8 individu berasal dari lokasi 1 (Bukit Tunggul) dan 10 individu dari lokasi 3 (di dekat perbatasan antara desa Cipanjalu dan Cilengkrang).

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

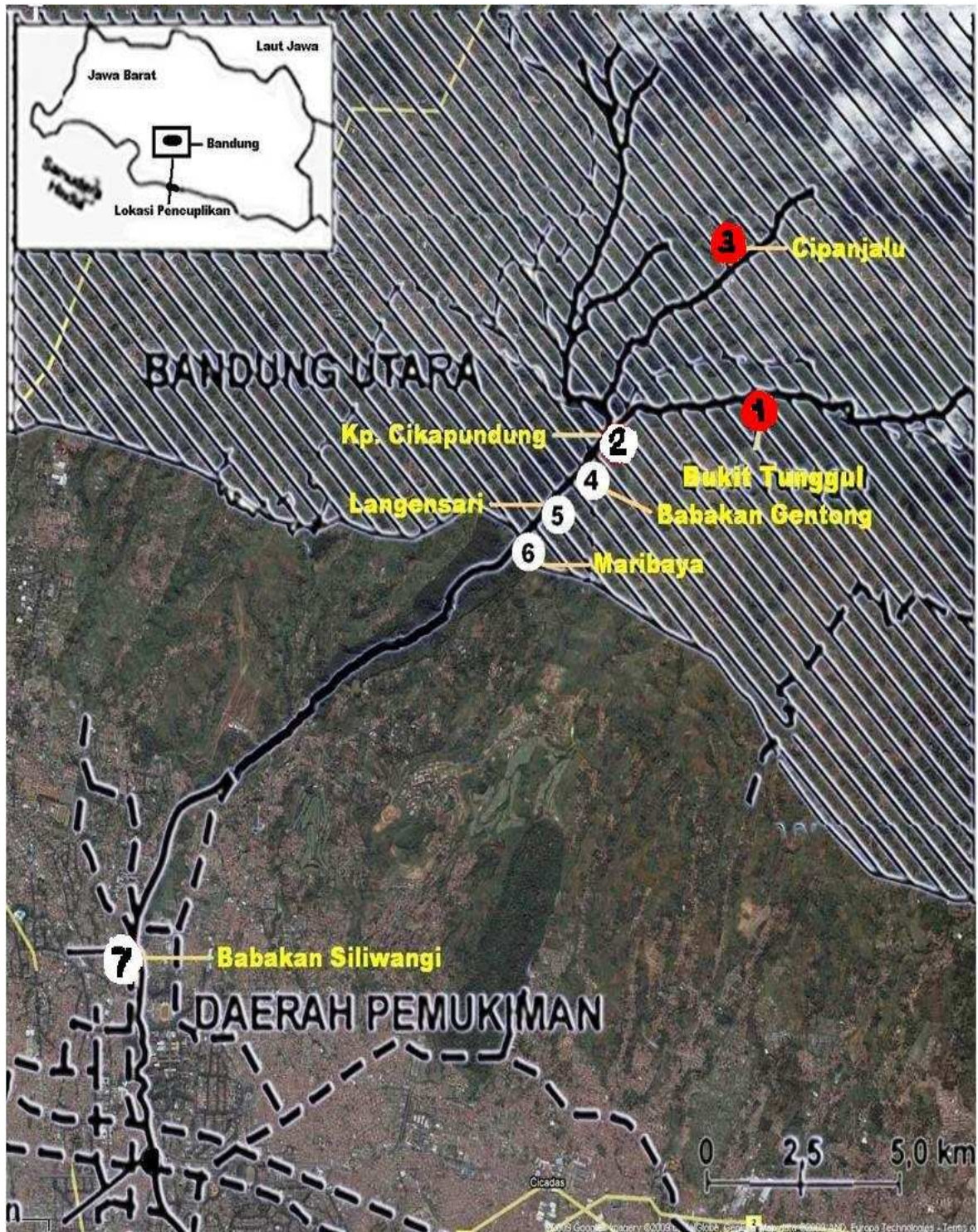
Pengambilan sampel larva *Hydropsyche sp.* dilakukan di tujuh lokasi di sepanjang aliran Sungai Cikapundung. Namun, pada penelitian ini sampel larva

Hydropsyche sp. yang dianalisis lebih lanjut hanya berasal dari 2 lokasi yaitu lokasi 1 (Bukit Tunggul) dan lokasi 3 (dekat perbatasan antara desa Cipanjalu dan Cilengkrang) seperti tertera pada Tabel 3.1. Penentuan kedua lokasi pengambilan sampel tersebut berdasar kepada hasil analisis parameter fisika-kimia air sungai pada saat survey pendahuluan bulan Agustus 2008.

Tabel 3.1. Lokasi pengambilan sampel larva *Hydropsyche sp.* di daerah hulu Sungai Cikapundung.

Lokasi	Daerah	Wilayah Administrasi	Peruntukan lahan	Ketinggian
1	Gunung Bukit Tunggul	Desa Suntenjaya, Kec. Lembang, Kab. Bandung Barat	Kawasan hutan lindung	1439 m dpl
3	Di dekat perbatasan antara Desa Cipanjalu dan Cilengkrang	Desa Cipanjalu, Kec. Cilengkrang, Kab. Bandung	Pemukiman Penduduk, ladang, perkebunan	1338 m dpl

Gambar 3.1. adalah peta lokasi pengambilan sampel larva *Hydropsyche sp.* di daerah hulu Sungai Cikapundung. Jarak antara lokasi 1 (Bukit Tunggul) dan lokasi 3 (dekat perbatasan antara desa Cipanjalu dan Cilengkrang) $\pm 3,33$ km.



Gambar 3.1. Peta lokasi pengambilan sampel larva *Hydropsyche sp.* di daerah hulu Sungai Cikapundung (Sumber: Surtikanti (2008a) yang Dimodifikasi).

2. Waktu penelitian

Penelitian (analisis molekuler) ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan Agustus 2009.

D. Alat dan Bahan

Rincian alat dan bahan terdapat pada lampiran I.

E. Langkah Penelitian dan Alur Penelitian

Langkah penelitian ini terbagi menjadi 2 tahap yaitu (1) pra penelitian dan (2) penelitian. Tahap pra penelitian terdiri dari (a) Persiapan alat dan bahan; (b) Survey lapangan; (c) Penentuan lokasi pengambilan sampel; dan (d) Pengambilan sampel larva *Hydropsyche sp.*, sedangkan tahap penelitian terdiri dari (a) Pengukuran parameter fisika-kimia air; (b) Seleksi metode isolasi DNA; (c) Isolasi DNA larva *Hydropsyche sp.*; (d) Karakterisasi DNA hasil isolasi; (e) Seleksi primer; (f) Amplifikasi DNA; (g) Elektroforesis DNA hasil PCR; dan (h) Analisis data.

1. Tahap Pra Penelitian

a) Persiapan

Sebelum melakukan penelitian, alat dan bahan yang akan dipergunakan perlu dipersiapkan terlebih dahulu. Alat yang akan dipakai seperti: *micropestle*, pinset, tips, tabung mikrosentrifuga 1,5 mL dan tabung PCR harus disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Selain itu, dilakukan pengecekan terhadap semua bahan yang akan dipakai dan dipastikan juga jumlah serta penyimpanannya benar.

b) Survey Lapangan

Survey lapangan dilakukan di sepanjang DAS Cikapundung untuk menentukan lokasi mana yang akan dijadikan tempat pengambilan sampel bentos. Pada masing-masing lokasi yang akan dijadikan lokasi penelitian, dilakukan pengamatan parameter fisika-kimia air sungai secara umum diantaranya warna air sungai, bau dan pH (derajat keasaman). Pengukuran pH air sungai dilakukan menggunakan kertas indikator pH universal. Selain pengamatan parameter fisika-kimia air sungai, dilakukan pencuplikan makrobentos untuk melihat komposisi makrobentos pada tiap lokasi penelitian.

c) Penentuan Lokasi Pengambilan Sampel Bentos

Penentuan lokasi pengambilan sampel bentos dilakukan berdasarkan tata guna lahan dan kemudahan dalam jangkauan transportasi mulai dari daerah Gunung Bukit Tunggul hingga daerah Babakan Siliwangi dan dua anak sungai lainnya, yaitu Sungai Cisarua dan Sungai Cigulung. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa dari tujuh lokasi penelitian, daerah yang tidak tercemar atau tingkat pencemarannya rendah adalah di daerah Bukit Tunggul (lokasi 1) dan di dekat perbatasan antara desa Cipanjalu dan Cilengkrang (lokasi 3) sehingga proses pengambilan sampel larva *Hydropsyche sp.* hanya dilakukan pada dua lokasi tersebut.

d) Pengambilan Sampel Bentos di Lapangan

Berdasarkan hasil studi pendahuluan mengenai analisis makrobentos di Sungai Cikapundung, sampel bentos yang ditemukan di setiap lokasi adalah larva *Hydropsyche sp.* Oleh karena itu, pengambilan sampel bentos hanya dilakukan pada

larva *Hydropsyche sp.* Pengambilan sampel bentos dilakukan dengan cara memilih spesimen yang ada pada tujuh lokasi penelitian pada saat survey pendahuluan. Sampel bentos yang diisolasi DNA adalah sampel yang dikoleksi pada bulan Oktober 2008 (Surtikanti *et al.*, 2008)

Bentos diambil dari sungai dengan jala Surber dengan menggunakan metode *kick sampling* atau zig-zag (Gambar 3.2) dan *hand sampling* atau dengan tangan (Gambar 3.3) . Selanjutnya dengan menggunakan pinset atau sikat gigi, spesimen ditaruh ke dalam cawan Petri. Sampel dibersihkan dengan cara dibilas dengan akuades. Bentos yang telah dibilas (Gambar 3.4. dan Gambar 3.5.), dikeringkan di atas tisu kemudian disimpan ke dalam botol yang berisi alkohol 70%. Botol-botol tersebut kemudian disimpan dalam wadah yang berisi es batu (Gambar 3.6). Setelah tiba di laboratorium botol berisi spesimen tersebut disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C . Sampel bentos yang telah dikoleksi kemudian diamati menggunakan mikroskop binokuler untuk melihat karakteristik morfologi dari larva *Hydropsyche sp.* tersebut.



Gambar 3.2. Kick sampling dalam pengambilan sampel larva *Hydropsyche* sp.



Gambar 3.3. Hand sampling dalam pengambilan sampel larva *Hydropsyche* sp.



Gambar 3.4. Pengeringan sampel larva *Hydropsyche* sp. untuk pengerjaan isolasi DNA.



Gambar 3.5. Larva *Hydropsyche* sp. tanpa mikroskop berukuran 2-14 mm.



Gambar 3.6. Botol berisi sampel larva *Hydropsyche* sp. disimpan ke dalam cool box.

2. Tahap Penelitian

a) Pengukuran parameter fisika-kimia air

Pengukuran parameter fisika-kimia air sungai di lapangan meliputi DO (*Dissolved Oxygen*), konduktivitas/DHL (Daya Hantar Listrik), dan pH (derajat keasamaan). Pengukuran dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1) Oksigen Terlarut/ *Dissolved Oxygen* (DO)

Oksigen terlarut diukur menggunakan metode titrasi *Winkler*.

2) Konduktivitas/ Daya Hantar Listrik (DHL)

Konduktivitas diukur menggunakan alat berupa konduktivimeter.

Pengukurannya dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan.

3) Derajat Keasaman (pH)

Derajat keasaman (pH) diukur menggunakan alat berupa pH meter. *Probe* pada pH meter dicelupkan ke dalam air sampel sampai batas sensor dengan cara digoyangkan. Kemudian amati perubahan skala yang terlihat pada layar atau *monitor* alat.

Pengukuran kimia air berupa BOD dan kandungan logam (Cu, Pb dan Zn) dilakukan di Laboratorium Kimia Lingkungan Keairan Pusat Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Air, Departemen Pekerjaan Umum Bandung.

b) Seleksi Metode Isolasi DNA

Seleksi metode isolasi DNA dilakukan menggunakan metode isolasi menurut Watanabe (2008) dan Yu-Lin (2004) yang telah dimodifikasi. Perbedaan pada kedua

metode isolasi DNA ini terdapat pada jumlah potasium asetat yang ditambahkan. Tujuan dilakukan seleksi metode isolasi DNA yaitu untuk mendapatkan metode isolasi DNA larva *Hydropsyche sp.* yang paling tepat dan memberikan hasil yang memuaskan secara kualitatif.

DNA larva *Hydropsyche sp.* diekstraksi menggunakan metode Watanabe (2008) yang telah dimodifikasi. Tiap individu dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga ukuran 1,5 mL. Setelah itu secara berturut-turut ditambahkan 500 μL *buffer* lisis CTAB 2x, 7 μL SDS 20 %, 2 μL β -Merchптоetanol 1% dan 10 μL proteinase K. Penambahan enzim proteinase K bertujuan agar protein dalam larutan dapat terdegradasi seluruhnya. Campuran tersebut dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 3 jam pada *waterbath*. Selanjutnya setelah 3 jam ditambahkan potasium asetat 5M sebanyak 1/10 volume larutan, kemudian dihomogenkan dan selanjutnya diinkubasi kembali pada *freezer* dengan suhu -20°C selama 20 menit. Setelah 20 menit, sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya, supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi yang baru dan ditambahkan kloroform-isoamilalkohol (CIAA) sebanyak 1/2 volume larutan dan dihomogenkan. Kloroform-isoamilalkohol (24:1 v/v) yang ditambahkan ini bertujuan untuk proses pemurnian DNA.

Sampel kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi yang baru dan ditambahkan 3M sodium asetat sebanyak 1/10 volume larutan. Selanjutnya ditambahkan etanol absolut dingin sebanyak 2x volume total

larutan dan dihomogenkan. Sampel kemudian diinkubasi di dalam *freezer* pada suhu -20°C selama 1 malam.

Setelah satu malam, campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya etanol dibuang secara hati-hati agar DNA tidak ikut terbangun, kemudian ditambahkan alkohol 70% dingin (4°C) sebanyak 1x volume larutan dan langsung dibuang kembali secara hati-hati. Cairan yang masih tersisa didalam tabung dikeringkan, kemudian setelah kering ditambahkan TE sebanyak 30-50 μL dan RNase sebanyak 1/10 volume TE yang ditambahkan. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan disimpan ke dalam *freezer* pada suhu -20°C .

Selanjutnya DNA larva *Hydropsyche sp.* diekstraksi menggunakan metode Yu-Lin (2004) yang telah dimodifikasi. Tiap individu dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga ukuran 1,5 mL. Setelah itu ditambahkan 500 μL *buffer* lisis CTAB 2x dan larva *Hydropsyche sp.* diekstrak sampai halus. Setelah itu berturut-turut dimasukkan 7 μL SDS 20%, 2 μL β -Merchatopetanol 1% dan 10 μL proteinase K. Campuran tersebut dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 3 jam pada *waterbath*. Selanjutnya, larutan disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan dalam tabung baru dan ditambah CIAA (24:1) sebanyak 1/10 volume. Campuran larutan tersebut kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi yang baru dan ditambahkan sodium asetat 1/10 volume dan etanol absolut sebanyak 2 x volume

kemudian diinkubasi semalam pada suhu -20°C . Selanjutnya, tahapan isolasi DNA sama dengan tahapan isolasi DNA menurut Watanabe (2008).

Setelah satu malam, campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya etanol dibuang secara hati-hati agar DNA tidak ikut terbuang, kemudian ditambahkan alkohol 70% dingin (4°C) sebanyak 1x volume larutan dan langsung dibuang kembali secara hati-hati. Cairan yang masih tersisa didalam tabung dikeringkan menggunakan *vacum* kemudian setelah kering ditambahkan TE sebanyak 30-50 μL dan RNAse sebanyak 1/10 volume TE yang ditambahkan. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan disimpan ke dalam *freezer* pada suhu -20°C .

c) Isolasi DNA

Tahap isolasi DNA dilakukan berdasarkan hasil seleksi metode isolasi DNA. Metode isolasi yang digunakan adalah metode yang menghasilkan kualitas DNA dengan hasil paling baik. Stok DNA dibuat 10 replikasi dari dua lokasi pengambilan sampel larva *Hydropsyche sp.*

d) Karakterisasi DNA Hasil Isolasi

Sebelum DNA hasil isolasi dijadikan sebagai DNA templat pada proses PCR, dilakukan karakterisasi secara kualitatif dengan cara elektroforesis. Sampel DNA dielektroforesis pada gel agarosa 1% dalam buffer TAE 0,5x (*Buffer TAE 10x* diencerkan dengan *deion water*) selama 30 menit pada tegangan 100 volt. Sampel DNA dicampurkan dengan *loading dye* dengan perbandingan 5:2 (v/v) kemudian dimasukkan ke dalam tiap sumur di dalam gel, selain itu dimasukkan pula marker DNA Lambda yang dipotong oleh enzim *HindIII* dan *EcoRI* sebanyak 3 μL . Setelah

selesai elektroforesis, pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan ethidium bromida (20 μ L/100 mL *deion water* steril) selama lima menit kemudian dibilas dengan akuades selama tiga menit. Selanjutnya gel diamati pada “UV-Transiluminator” dan didokumentasikan menggunakan kamera digital Nikon Coolpix 2200. Konsentrasi DNA diukur dengan alat UV Spektrofotometer di Laboratorium Genetika Institut Teknologi Bandung.

e) Seleksi Primer

Seleksi primer dilakukan terhadap 20 dekamer primer Operon set-A (Operon Technologies, Inc) seperti pada Tabel 3.2. Seleksi primer ini dilakukan untuk mendapatkan primer acak yang dapat mengamplifikasi semua sampel DNA larva *Hydropsyche sp.* dari lokasi 1 (Bukit Tunggul) dan lokasi 3 (dekat perbatasan antara desa Cipanjalu dan Cilengkrang).

Tabel 3.2. Urutan Primer RAPD OPA1-OPA20.

Kode Primer	Sikuen Primer (5'- 3')	Kode Primer	Sikuen Primer (5'- 3')
OPA1	CAGGCCCTTC	OPA11	CAATCGCCGT
OPA2	TGCCGAGCTG	OPA12	TCGCGATAG
OPA3	AGTCAGCCAC	OPA13	CAGCACCCAC
OPA4	AATCGGGCTG	OPA14	TCTGTGCTGG
OPA5	AGGGGTCTTG	OPA15	TTCCGAACCC
OPA6	GGTCCCTGAC	OPA16	AGCCAGCGAA
OPA7	GAAACGGGTG	OPA17	GACCGCTTGT
OPA8	GTGACGTAGG	OPA18	AGGTGACCGT
OPA9	GGGTAACGCC	OPA19	CAAACGTCGG
OPA10	GTGATCGCAG	OPA20	GTTGCGATCC

f) Amplifikasi DNA

DNA hasil isolasi selanjutnya diamplifikasi melalui proses “Polymerase Chain Reaction” (PCR) dengan komposisi reaksi berdasarkan metode Watanabe (2008) yang telah dimodifikasi. Primer RAPD yang didapatkan dari hasil seleksi digunakan untuk amplifikasi semua sampel DNA larva *Hydropsyche* (18 sampel dari 2 lokasi pengamatan). Pada penelitian ini, komposisi reaksi PCR yang digunakan adalah ½ resep. Hal ini dilakukan untuk menghemat pemakaian bahan- bahan PCR. Komposisi reaksi PCR seperti pada Tabel 3.3. digunakan untuk amplifikasi DNA larva *Hydropsyche* yang terdiri dari: DNA sebanyak 1 µL, 16 ng primer RAPD 1 µL, 1 U/µL *Dream Taq Polymerase* (Fermentas), MgCl₂ (4 mM), 1x *Dream Taq Buffer* (Fermentas), 200 µM dNTPs (0,1 µL untuk masing-masing dATP, dGTP, dCTP dan dTTP) dan *deion water* ditambahkan hingga volume total reaksi 12,5 µL.

Tabel 3.3. Komposisi reaksi PCR.

Larutan Stok	Konsentrasi Stok	Konsentrasi Akhir	Volume ½Reaksi (µL)
MgCl ₂	25 mM	4 mM	1,00
<i>Dream Taq Buffer</i> (Fermentas)	10x	1x	1,25
<i>Dream Taq polymerase</i> (Fermentas)	5 U/µL	1U/µL	0,10
dNTPs	100 mM	200 µM	0,10
DNA	-	-	1,00
Primer RAPD	32 ng/µL	16 ng/µL	1,00
<i>Deion water</i>	-	-	8,05
Total			12,50

Semua bahan tersebut dimasukkan ke dalam tabung PCR secara berurutan, diawali dengan *deion water*, MgCl₂, *Dream Taq Buffer* (Fermentas) kemudian dihomogenkan dengan cara dijentik-jentik. Setelah itu, baru diambil dNTPs dan

Dream Taq Polymerase (Fermentas) dari dalam *freezer* kemudian ditambahkan ke dalam tabung PCR yang telah berisi campuran bahan tadi. Setelah semua bahan dimasukkan ke dalam tabung kemudian dihomogenkan dengan cara dijentik-jentik dan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 detik. Lalu disiapkan tabung-tabung PCR yang telah diberi kode sesuai sampel DNA yang digunakan. Campuran bahan yang telah homogen dimasukkan ke dalam tabung-tabung PCR dengan volume yang sama sebanyak 10,5 μL , kemudian ditambahkan DNA larva *Hydropsyche* dan primer ke dalam masing-masing tabung. Pembuatan komponen reaksi PCR tersebut dilakukan dalam keadaan dingin untuk menjaga kinerja beberapa zat yang mudah rusak yaitu dNTPs dan *Dream Taq Polymerase* (Fermentas).

Alat *Thermocycler* melakukan proses amplifikasi pada suhu 94°C untuk denaturasi awal selama 2 menit, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus yang diawali dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit. Untuk tahap penempelan primer pada DNA cetakan (*annealing*) terjadi pada suhu 35°C selama 1 menit, kemudian tahap polimerasi pada suhu 72°C selama 2 menit. Rangkaian proses dari denaturasi sampai polimerasi disebut dengan satu siklus. Pada siklus yang terakhir dilakukan polimerasi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit. Amplifikasi dilakukan minimal dua kali untuk memastikan pola amplikon sama.

g) Elektroforesis DNA hasil PCR

DNA yang telah diperbanyak melalui proses PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa 2,0% dalam *buffer* TBE 0,5x (20 mM Tris-Borat; 0,5 mM EDTA pH 8). Elektroforesis dilakukan selama 180 menit pada tegangan 50

volt. Sampel DNA dicampurkan dengan *loading dye* dengan perbandingan 5:2 (v/v) kemudian dimasukkan ke dalam tiap sumur di dalam gel, selain itu dimasukkan pula marker *DNA Ladder Mix SM 0331 Fermentas* sebanyak 3 μL . Setelah selesai elektroforesis, pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan *Ethidium Bromide (EtBr)* 20 $\mu\text{L}/100\text{mL}$ *deion water* steril selama lima menit kemudian dibilas dengan akuades selama tiga menit. Selanjutnya gel diamati pada “UV-Transiluminator” dan didokumentasikan menggunakan kamera digital Nikon Coolpix 2200.

h) Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan pola larik DNA pada gel agarosa. Proporsi larik DNA dihitung untuk masing-masing primer. Pada penelitian ini, larik yang dianalisis adalah larik yang hadir dan jelas terlihat oleh mata, tanpa memperhitungkan intensitasnya. Selanjutnya larik DNA hasil elektroforesis diinterpretasikan menjadi angka satu (1) untuk kehadiran larik dan angka nol (0) untuk ketidakhadiran larik. Data matriks tersebut dianalisis untuk mencari nilai heterozigositas dan koefisien kesamaan genetik.

Koefisien kesamaan yang digunakan untuk menguji pasangan objek yang dibandingkan sesuai koefisien Nei dan Li (1979).

Rumus kesamaan Nei dan Li :

$$S_{xy} = 2N_{xy}/N_x + N_y$$

Keterangan :

S_{xy} = Koefisien kesamaan genetik (Nei dan Lie)

n_{xy} = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu x dan y

n_x = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu x

n_y = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu y

Data hasil perhitungan koefisien kesamaan tersebut, dikonstruksi dendogram dengan metode kluster “*unweighted pair group method with arithmetic averages*” (UPGMA) menggunakan software MVSP 3.1 (*Multivariate Statistical Package Ver. 3.1.*). Setelah itu, dilakukan perhitungan nilai heterozigositas menurut Lynch & Milligan (1994). Rumus heterozigositas pada lokus i adalah :

$$H(i) = 2q(i)[1-q(i)] + 2 \text{ var}[q(i)]$$

Keterangan:

$q(i)$ = nilai frekuensi dan heterozigositas dari populasi

$\text{Var}[q(i)] = \frac{1-x(i)}{4N}$, dengan N adalah jumlah sampel

Adapun untuk menghitung nilai $q(i)$ tersebut adalah:

$$q(i) = x(i) \left[\frac{1 - \text{Var}[x(i)]}{8[x(i)]^2} \right]^{-1}$$

Keterangan:

$x(i)$ = frekuensi homozigot resesif ”null” pada lokus i, dan

$\text{Var}[x(i)] = \frac{1-x(i)}{N}$, dengan N adalah jumlah sampel

Setelah itu, dilakukan perhitungan nilai PIC “Polymorphism Information Content” menurut Botsein *et al* (Hou *et al*, 2005) dengan persamaan:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1, 2, 3, \dots, n} p_i^2$$

Keterangan:

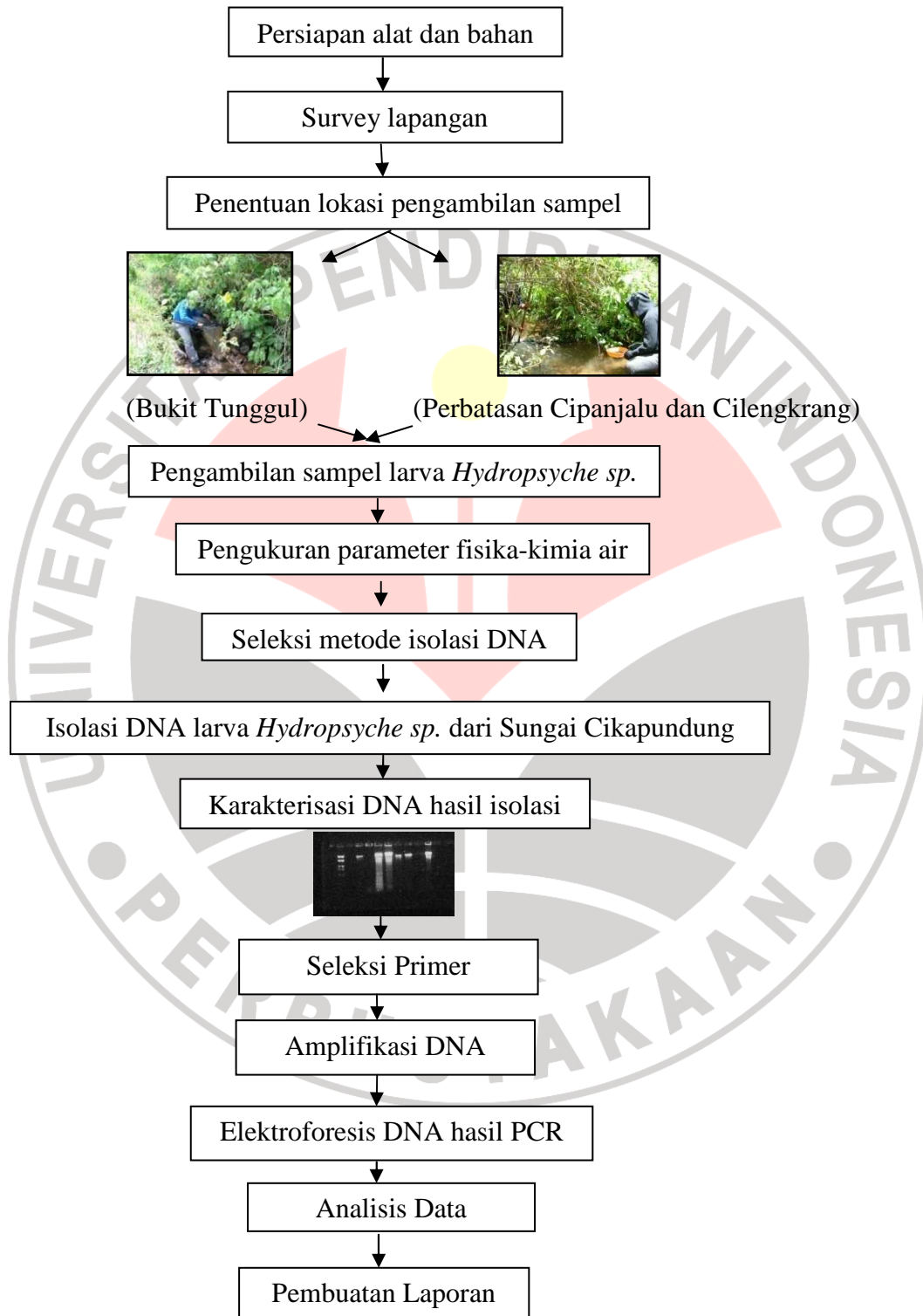
p_i adalah frekuensi alel ke-i.

Perhitungan nilai PIC “Polymorphism Information Content” dilakukan untuk mengetahui tinggi rendahnya tingkat informasi dan memberikan perkiraan kekuatan pembeda dari penanda RAPD yang digunakan.



Alur Penelitian

Alur penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.7.



Gambar 3.7. Skema alur penelitian.