

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian jenis ini adalah penelitian deskriptif Siyoto & Sodik (2015) menyatakan bahwa Penelitian deskriptif adalah jenis penelitian yang bertujuan untuk memberikan gambaran atau menjelaskan peristiwa, situasi, atau objek, termasuk orang-orang, atau hal lain yang terkait dengan variabel yang dapat dijabarkan menggunakan angka atau kata-kata.

3.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan merupakan sampel awetan gel silika yang dikoleksi oleh Rani Amarayani (RA) dan Deby Arifiani (DA); masing-masing sampel memiliki spesimen herbarium yang tersimpan di Hebarium Bogoriense BRIN. Adapun nomor koleksi sampel yang digunakan tercantum dalam Tabel 3.1

Tabel 3.1. Sampel dan aksesori nomor *Piper* spp. dari kawasan Malesia

No	Kolektor dan Nomor koleksi	Asal Tumbuhan	Nama jenis
1	RA909	Taman Nasional Bogani Nani Wartabone: Posolo, Desa Ilomata, Kabupaten Bone Bolango, Kecamatan Bulango Ulu, Gorontalo, Indonesia.	<i>Piper celebicum</i> Blume
2	RA914	Taman Nasional Bogani Nani Wartabone: Posolo, Desa Ilomata, Kabupaten Bone Bolango, Kecamatan Bulango Ulu, Gorontalo, Indonesia.	<i>Piper celebicum</i> Blume
3	RA557	Taman Nasional Lore Lindu: Watu Bohe, Desa Torro, Dusun Satu, RT 1, Kabupaten Poso, Kecamatan Kulawi, Sulawesi Tengah, Indonesia	<i>Piper celebicum</i> Blume
4	RA448	Taman Nasional Bogani Nani Wartabone, Desa Matayangan, Tumokang Indonesia, Kabupaten Bolaang Mongondow, Kecamatan Dumoga Barat, Sulawesi Utara, Indonesia	<i>Piper celebicum</i> Blume
5	RA455	Taman Nasional Bogani Nani Wartabone, Desa Matayangan, Tumokang Indonesia, Kabupaten Bolaang Mongondow, Kecamatan Dumoga Barat, Sulawesi Utara, Indonesia.	<i>Piper celebicum</i> Blume

No	Kolektor dan Nomor koleksi	Asal Tumbuhan	Nama jenis
6	RA456	Taman Nasional Bogani Nani Wartabone, Desa Matayangan, Tumokang Indonesia, Kabupaten Bolaang Mongondow, Kecamatan Dumoga Barat, Sulawesi Utara, Indonesia.	<i>Piper celebicum</i> Blume
7	RA900	Taman Nasional Bogani Nani Wartabone: Posolo, Desa Ilomata, Kabupaten Bone Bolango, Kecamatan Bulango Ulu, Gorontalo, Indonesia	<i>Piper decumanum</i> L.
8	RA756	Area P.T. Freeport Indonesia, Kecamatan Kuala Kencana, Mile 34, Kabupaten Mimika, Indonesia	<i>Piper decumanum</i> L.
9	RA346	Dusun Mumes: Pantai Mumes, Kabupaten Raja Ampat, Pulau Waigeo, Kecamatan Teluk Mayalibit, Papua Barat, Indonesia.	<i>Piper decumanum</i> L.
10	RA247	Kampung Warsamdin: Kali & Hutan Waindor, Pulau Waigeo, Kecamatan Teluk Mayalibit, Kabupaten Raja Ampat, Papua Barat, Indonesia.	<i>Piper decumanum</i> L.
11	RA972	Desa Fakal: Kali Kasim, Pulau Misool, Kecamatan Misool Utara, Kabupaten Raja Ampat, Papua Barat, Indonesia.	<i>Piper decumanum</i> L.
12	IPGPD853	Taman Kehati, Dusun Kokolomboy, Desa Lemeleme Darat, Kecamatan Buko, Kepulauan Banggai, Pulau Peleng, Sulawesi Tengah, Indonesia.	<i>Piper decumanum</i> L.
13	RA66	Taman Nasional Bukit Baka-Bukit Raya: Bukit Baka, dekat Sungai Uwah, Kecamatan Tumbang Sinamang, Kabupaten Waringin Timur, Kalimantan Tengah, Indonesia.	<i>Piper porphyrophyllum</i> N. E. Br.
14	RA797	Hutan Lindung Tawai: Jalan Microwave, Telupid, Sabah, Malaysia.	<i>Piper porphyrophyllum</i> N. E. Br.
15	RA576	Tanah Rata, sejalan dari air terjun Robinson menuju Dabu, Dataran Tinggi Cameron, Pahang, Malaysia.	<i>Piper porphyrophyllum</i> N. E. Br.
16	RA613	Hutan Lindung Keledang Saiong, Batu Gajah, Ipoh, Perak, Malaysia.	<i>Piper porphyrophyllum</i> N. E. Br.
17	RA625	Hutan Lindung Ulu Gombak, Gombak, Selangor, Malaysia.	<i>Piper porphyrophyllum</i> N. E. Br.
18	RA658	MacRitchie Reservoir: Jalan Treetop, Cagar Alam Central Catchment, Singapura.	<i>Piper porphyrophyllum</i> N. E. Br.

Vini Ayuni, 2023

KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN KEKERABATAN EMPAT JENIS ENDEMIK PIPERACEAE DI KAWASAN MALESIA BERDASARKAN ANALISIS SEQUENCE-RELATED AMPLIFIED POLYMORPHISM (SRAP)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

No	Kolektor dan Nomor koleksi	Asal Tumbuhan	Nama jenis
19	RA470	Ladang Padi: Kecamatan Lubuk Kilangan, Kota Padang, Sumatra Barat, Indonesia.	<i>Piper porphyrophyllum</i> N. E. Br.
20	RA678	Hutan Pendidikan dan Penelitian Biologi - Universitas Andalas, Sumatra Barat, Indonesia.	<i>Piper porphyrophyllum</i> N. E. Br.
21	RA562	Air terjun Robinson, Tanah Rata, Dataran Tinggi Cameron, Pahang, Malaysia.	<i>Piper cyrtostachys</i> Ridl.
22	RA571	Jalan menuju Gunung Batu Brinchang, Brinchang, Dataran Tinggi Cameron, Pahang, Malaysia.	<i>Piper cyrtostachys</i> Ridl
23	RA574	Tanah Rata, berlawanan arah dengan Bungalow Lutheran Mission, Dataran Tinggi Cameron, Pahang, Malaysia.	<i>Piper cyrtostachys</i> Ridl
24	RA579	Tanah Rata, Jungle Walk No. 5, Dataran Tinggi Cameron, Pahang, Malaysia.	<i>Piper cyrtostachys</i> Ridl
25	RA580	Tanah Rata, Jungle Walk No. 5, Dataran Tinggi Cameron, Pahang, Malaysia.	<i>Piper cyrtostachys</i> Ridl

Pada Tabel 3.1 total sampel *Piper* endemik ini terdiri dari delapan *P. porphyrophyllum*, enam *P. decumanum*, enam *P. celebicum*, dan lima *P. cyrtostachys*.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

a. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari – Mei 2023.

b. Lokasi penelitian

Penelitian bertempat di Laboratorium Sistematika Molekuler Tumbuhan Badan Riset dan Inovasi Nasional yang beralamat di Jl. Raya Jakarta-Bogor KM 46, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat.

3.4 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini terdapat beberapa prosedur penelitian yang dilakukan untuk mendapatkan hasil penelitian yang diharapkan yang terbagi ke dalam dua tahap, yaitu tahap persiapan sebelum dilakukan penelitian, dan tahap penelitian yang merupakan prosedur penelitian saat di laboratorium untuk mendapatkan hasil penelitian.

3.4.1 Tahap Persiapan

Tahap persiapan pelaksanaan penelitian di laboratorium Sistematika Molekuler Tumbuhan, KST Soekarno - BRIN diawali dengan menghidupkan destilator untuk kemudian mengisi *waterbath*, serta dilanjutkan dengan menyiapkan alat dan bahan pada Lampiran 1 Sebelum melaksanakan kegiatan, peneliti menggunakan masker dan sarung tangan lateks sebagai alat perlindungan diri dan melakukan sterilisasi meja kerja menggunakan alkohol.

3.4.2 Tahap Penelitian

Tahap penelitian meliputi tahapan secara sistematis pelaksanaan penelitian saat di laboratorium meliputi preparasi sampel, ekstraksi DNA, uji kuantitatif dan kualitatif, hingga pada proses amplifikasi menggunakan PCR

3.4.2.1 Preparasi Sampel

Sampel disiapkan sesuai pada Tabel 3.1 dengan bagian daun sampel yang akan digunakan. Sampel yang digunakan merupakan sampel yang telah diawetkan menjadi kering menggunakan gel silika.

3.4.2.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan metode protokol *Geneaid Genomik DNA Mini Kit (Plant)* dengan sedikit modifikasi. Sampel awetan daun kering di timbang menggunakan timbangan analitik sebanyak 0,01-0,02 gr (20 mg). Sampel yang telah ditimbang kemudian dibungkus dengan aluminium foil berukuran 5x5 cm dengan label sampel sesuai dengan nomor koleksi. Sampel dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1.5ml untuk dilanjutkan pada proses menumbuk atau menjadikan sampel berbentuk serbuk dengan menggunakan alat *grinder* ataupun menggunakan lumpang dan alu. Proses penumbukan dilakukan menggunakan alat *grinder* yang ditambahkan dengan *beads* sebanyak 2 buah ke dalam tabung selama 3 menit hingga menjadi halus. Adapun jika menggunakan lumpang dan alu, penumbukan dibantu dengan ditambakkannya sedikit pasir halus dan kemudian digerus hingga sampel menjadi serbuk halus. Sampel yang telah menjadi serbuk di masukkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1.5 ml untuk masuk ke tahap lisis.

Tahap lisis dilakukan dengan menambahkan 400 μ L larutan bufer GPX1 dan 5 μ L RNase A ke dalam tabung. Kemudian dilakukan homogenisasi dengan *vortex*

Vini Ayuni, 2023

KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN KEKERABATAN EMPAT JENIS ENDEMIK PIPERACEAE DI KAWASAN MALESIA BERDASARKAN ANALISIS SEQUENCE-RELATED AMPLIFIED POLYMORPHISM (SRAP)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

pada waktu 5 detik. Setelah homogen, sampel diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60°C dalam waktu 10 menit dengan setiap 5 menit sekali sampel dihomogenkan dengan cara tabung dibalikkan sebanyak 2-3 kali. Setelah proses inkubasi selesai, sampel disentrifugasi dalam waktu 5 menit dengan pada kecepatan 13000 rpm. Selama persiapan ekstraksi DNA, 200 µL larutan bufer elusi disiapkan dan diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60°C untuk digunakan pada tahap akhir ekstraksi.

Sample hasil sentrifugasi yang telah melalui proses inkubasi ditambahkan 100 µL larutan bufer GP2. Homogenisasi dilakukan dengan *vortex* kurang lebih 5 detik dan diinkubasikan dalam es selama 3 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 3400 rpm. Hasil dari sentrifugasi ini berupa pelet dan supernatan. Bagian yang diambil adalah supernatan dan dipindahkan ke dalam tabung koleksi 2 ml yang dipasangkan dengan *filter column*. Setelah supernatan dipindahkan, dilakukan sentrifugasi kembali dalam waktu 1 menit pada kecepatan 3500 rpm. Adapun larutan hasil filter yang berada di tabung koleksi 2 ml diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro sentrifugasi 1.5 ml baru dan dihitung volume yang didapatkan.

Tahap *binding* dilakukan dengan ditambahkan larutan bufer GP3 sebanyak 1,5 volume larutan sampel yang kemudian dilakukan homogenisasi menggunakan *vortex* kurang lebih selama 5 detik. Setelah itu, disiapkan tabung koleksi 2 ml yang dipasangi *GD column*. Larutan yang telah dicampur diambil sebanyak 700 µL ke dalam *GD column* dan sentrifugasi dalam waktu 2 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Hasil sentrifugasi berupa larutan *flowthrough* yang perlu dibuang dan DNA yang tersimpan dalam filter *GD column*. Kemudian *GD column* disimpan kembali ke dalam tabung koleksi 2 ml yang sama dan dilakukan sentrifugasi ulang dalam waktu 2 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Hasil sentrifugasi berupa DNA yang tersimpan dalam filter *GD column* dan larutan sampingan *flowthrough* yang perlu dibuang. Larutan bufer W1 sebanyak 400 µL ditambahkan ke dalam *GD column* yang sudah dipasangi tabung koleksi 2 ml dan dilakukan sentrifugasi kembali dalam waktu 30 detik pada kecepatan 13.000 rpm dengan hasil berupa DNA yang tersimpan dalam filter dan larutan *flowthrough*. Larutan *flowthrough* yang tersisa dibuang kembali. Kemudian 600 µL larutan wash

bufer ditambahkan ke dalam tabung yang sama dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm dalam waktu 30 detik dengan hasil yang sama dimana hanya larutan *flowthrough* yang dihasilkan dibuang kembali. Proses terakhir adalah dilakukannya sentrifugasi dalam waktu 3 menit pada kecepatan 13.000 rpm sampai tidak terlihat adanya larutan *flowthrough* yang dihasilkan.

GD column yang telah kering hasil dari sentrifugasi tahap akhir dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1.5 ml yang baru. Bufer elusi yang sebelumnya telah dihangatkan kemudian ditambahkan sebanyak 80 μ L tepat pada bagian tengah *GD column*. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu ruang dalam waktu kurang lebih 3-5 menit. Sentrifugasi dilakukan kembali untuk mendapatkan DNA murni dalam waktu 30 detik pada kecepatan 13.000 rpm. DNA yang telah dihasilkan dalam tabung mikrosentrifugasi 1.5 ml kemudian disimpan dalam mesin pendingin atau *freezer* dengan suhu -20° C.

3.4.2.3 Kuantifikasi DNA

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan menggunakan alat *Nanodrop* Implen p-300. Absorbansi DNA diukur pada panjang 260 nm dan 280 nm (λ 260/280). Sebelum DNA diletakkan, *plate* dibersihkan dengan tisu *Kimwipes* dengan satu arah tarikan. Diisikan 1 μ l larutan blanko, yaitu *Nuclease Free Water*. Selanjutnya, diisikan dengan 2 μ l DNA genom. Diklik tombol “Sampel” untuk mengetahui hasil purifikasi secara otomatis. Kemudian dijalankan dan hasil kuantifikasi akan langsung tercetak pada *thermal printer* yang tersedia.

3.4.2.4 Elektroforesis DNA genom

Agarosa ditimbang menggunakan timbangan analitik sebanyak 0,4 gram dan dilarutkan dalam 40 ml TBE 1x hingga menghasilkan agarosa 1%. Kemudian dilakukan homogenisasi agarosa dan larutan TBE 0,5% dalam tabung erlenmeyer 250 ml. Agarosa yang telah dilarutkan, dipanaskan dalam *microwave* dalam waktu kurang lebih 1 menit dengan kondisi mulut tabung erlenmeyer ditutup menggunakan *plastik wrap* dan diberi lubang sebagai sirkulasi. Pemanasan gel agarosa dilakukan hingga larutan homogen berwarna bening. Hasil gel agarosa bening ditunggu hingga hangat dan setelah hangat ditambahkan 1 μ L *Gel Red Nuclease Acid* dan dihomogenkan secara perlahan. Agarosa cair dituangkan ke dalam cetakan (*tray*) yang telah dipasang sisiran (*comb*). Sisiran diangkat setelah

Vini Ayuni, 2023

KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN KEKERABATAN EMPAT JENIS ENDEMIK PIPERACEAE DI KAWASAN MALESIA BERDASARKAN ANALISIS SEQUENCE-RELATED AMPLIFIED POLYMORPHISM (SRAP)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

agarosa menjadi padat. Sebanyak 2 μL DNA genom diambil dan dihomogenkan dengan 1 μL *loading dye* pada tatakan silikon menggunakan mikro pipet berukuran 10 μL kemudian hasil homogen tersebut dimasukkan ke dalam sumuran agarosa. Kemudian pada ujung sebelah kanan atau kiri sumur agarosa ditambahkan *Ladder* 1 Kb sebanyak 1 μL . Proses elektroforesis ini dilakukan dalam waktu 30 menit pada tegangan 100 volt. Hasil elektroforesis ditampilkan menggunakan alat transiluminasi UV atau sistem *Gel Documentation System*.

3.4.2.5 Amplifikasi DNA menggunakan PCR

Proses amplifikasi menggunakan mesin PCR Wealtec SEDI G yang diawali dengan disiapkannya tabung PCR yang disesuaikan dengan jumlah sampel dan perlakuan. Sampel yang dipilih pada proses seleksi ini adalah sampel RA914 (*P. celebicum*), RA756 (*P. decumanum*), dan RA658 (*P. porphyrophyllum*) sebagai perwakilan pada setiap jenis endemik di wilayah yang berbeda serta dua sampel *P. betle* RA955 dan RA814. Dua sampel *P. betle* L. digunakan sebagai kontrol keberhasilan PCR karena telah teruji pada penelitian sebelumnya (Nabila, 2020) dan menghasilkan pita polimorfik yang baik pada beberapa pasangan primer. Terdapat dua tes pada tahap awal amplifikasi yang dilakukan yaitu seleksi komposisi bahan PCR dan seleksi pasangan *primer* untuk mendapatkan pita polimorfik terbanyak. Adapun komposisi bahan PCR yang diseleksi terdiri dari dua komposisi bahan PCR menggunakan Promega *GoTaq Flexi DNA Polymerase* (M8295) (Tabel 3.2) dan satu komposisi bahan PCR menggunakan Meridian *MyTaqTM HS Mix* (BIO-25045) (Tabel 3.3). Seleksi tiga komposisi bahan PCR dari dua *PCR kit* ini bertujuan untuk mendapatkan komposisi bahan PCR yang menghasilkan pita polimorfik terbanyak.

Total komposisi PCR pada Tabel 3.2 & Tabel 3.3, masing-masing komposisi yang digunakan adalah 12.5 μL dengan primer yang digunakan sebagai bahan uji adalah pasangan primer Me4-Em1 dan Me4-Em3. Pemilihan primer ini mengacu kepada rujukan hasil penelitian sebelumnya yaitu Nabilla (2020) pada *P. betle* yang menghasilkan pita polimorfik yang baik pada primer tersebut. Setelah mendapatkan hasil, dilakukan skoring kasar untuk melihat keberadaan pita yang baik di antara *master mix* yang digunakan. Setelah komposisi bahan PCR telah

selesai ditentukan, maka proses selanjutnya adalah seleksi primer dengan kombinasi pada Tabel 3.4.

Tabel 3.2. Komposisi bahan PCR 1 dan PCR 2 menggunakan *Promega GoTaq Flexi DNA Polymerase* (M8295)

Reagen	Volume	
	PCR 1	PCR 2
Buffer 5x	2.5 µL	2.5 µL
MgCl ₂ 25mM	1 µL	1.25 µL
dNTPs 10mM	0.25 µL	0.25 µL
Taq	0.07 µL	0.07 µL
Primer forward	0.25 µL	0.25 µL
Primer reverse	0.25 µL	0.25 µL
DNA template	1 µL	1 µL
Nuclease free water (ddH ₂ O)	7.18 µL	6.18 µL
Total	12.5 µL	12.5 µL

Tabel 3.3. Komposisi bahan PCR 3 menggunakan Meridian *MyTaqTM HS Mix* (BIO-25045)

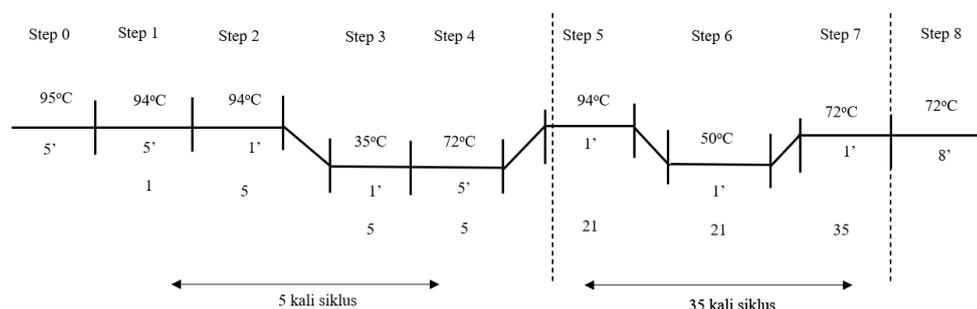
Reagen	Volume
My Taq DNA Polymerase	6.25 µL
Primer forward	0.25 µL
Primer reverse	0.25 µL
Nuclease free water (ddH ₂ O)	4.75 µL
DNA template	1 µL
Total	12.5 µL

Tabel 3.4. Kombinasi seleksi primer yang digunakan pada penelitian ini

	Em1	Em2	Em3	Em4	Em5
Me1	Me1-Em1	Me1-Em2	Me1-Em3	Me1-Em4	Me1-Em5
Me2	Me2-Em1	Me2-Em2	Me2-Em3	Me2-Em4	Me2-Em5
Me3	Me3-Em1	Me3-Em2	Me3-Em3	Me3-Em4	Me3-Em5
Me4	Me4-Em1	Me4-Em2	Me4-Em3	Me4-Em4	Me4-Em5
Me5	Me5-Em1	Me5-Em2	Me5-Em3	Me5-Em4	Me5-Em5

Setelah didapatkan hasil berdasarkan pertimbangan yang telah dilakukan, maka tahap selanjutnya adalah seleksi 25 pasang primer (Tabel 3.4) terhadap sampel. Sampel yang digunakan sebagai uji coba adalah sampel yang mewakili setiap jenisnya yaitu RA914 (*P. celebicum*), RA756 (*P. decumanum*), RA658 (*P. porphyrophyllum*) dan RA797 (*P. porphyrophyllum*) yang diharapkan mampu merepresentasikan hasil sesuai yang diharapkan.

Semua bahan dan komposisi yang telah selesai akan dimasukkan ke dalam mesin PCR *Wealtec* dengan program SRAP dalam waktu 3 jam. Suhu PCR diatur sesuai dengan suhu yang digunakan oleh Li dan Quiros (2001), yaitu diawali dengan fase pre-denaturasi yang dilakukan pada suhu 94°C selama 5 menit. Kemudian dilanjutkan dengan fase denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, fase *annealing* dengan suhu 35°C selama 1 menit dan fase elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit dan tiga fase tersebut dilakukan sebanyak 5 siklus. Proses PCR dilanjutkan dengan fase denaturasi suhu 94°C selama 1 menit, fase *annealing* dengan suhu 50°C selama 1 menit dan fase elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit dan diakhiri dengan fase ekstensi pada suhu 72°C selama 8 menit sebanyak 35 siklus (Gambar 3.1). Hasil PCR kombinasi primer yang tertera pada Tabel 3.4, akan diseleksi berdasarkan pita hasil elektroforesis yang kemudian dilakukan skoring sebagai analisis awal. Hasil skoring pita elektroforesis akan dipilih sebanyak 10 dari 25 pasangan primer yang telah teruji. Sepuluh pasangan primer yang dipilih merupakan pasangan primer yang menghasilkan pita polimorfik terbanyak yang nantinya akan dipakai untuk sampel yang belum ter ujikan.



Gambar 3.1. Program PCR SRAP

3.4.2.6 Elektroforesis Produk PCR

Prosedur elektroforesis produk hasil PCR menggunakan gel agarosa 1%. Sebanyak 0,8 gr agarosa ditimbang menggunakan timbangan analitik dan

Vini Ayuni, 2023

KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN KEKERABATAN EMPAT JENIS ENDEMIK PIPERACEAE DI KAWASAN MALESIA BERDASARKAN ANALISIS SEQUENCE-RELATED AMPLIFIED POLYMORPHISM (SRAP)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

dilartukan dengan 80 ml TBE 0.5% dalam tabung *erlenmeyer* 250 ml. Tabung *erlenmeyer* berisi larutan agarosa dipanaskan dalam *microwave* dengan mulut tabung ditambahkan sirkulasi menggunakan *plastik wrap* yang diberi lubang. Proses pemanasan larutan dilakukan dalam waktu 1 menit hingga larutan menjadi homogen dan bening. Larutan gel agarosa ditunggu hingga cukup hangat. 2 μ L *Gel Red Nucluease Acid* ditambahkan ke dalam tabung, setelah cukup hangat lalu dihomogenkan dengan cara digoyang perlahan. Kemudian larutan gel dituangkan ke dalam cetakan agarosa yang telah dipasang sisir. Setelah agar memadat, agar dipindahkan ke dalam tangki elektroforesis yang telah diberi larutan TBE. Sebanyak 2 uL DNA hasil PCR dituangkan ke dalam sumur gel agarosa menggunakan mikropipet 2.5 uL. Adapun pada bagian ujung kanan atau kiri sumur gel ditambahkan 1 μ L ladder 100 bp. Proses elektroforesis hasil PCR ini dilakukan dalam waktu 90 menit pada tegangan 100 volt. Hasil elektroforesis ditampilkan menggunakan alat transiluminasi UV atau sistem *Gel Documentation System*.

3.4.2.7 Analisis Data

Hasil amplifikasi dari masing-masing sampel dengan primer yang telah dipilih dilakukan skoring secara biner (terdapat fragmen = 1 tidak terdapat fragmen = 0) terhadap masing-masing pita DNA yang ditemukan. Penghitungan indeks similaritas dilakukan menggunakan rumus indeks similaritas Dice. Analisis kluster dan pembangunan dendogram dilaksanakan dengan menggunakan metode *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages* (UPGMA), yang selanjutnya diproses dengan bantuan program komputer *Numerical Taxonomy System* (Ntsys) 2.11a dan *Population Genetic Analysis* (Popgene) 3.2. pada popgene terdapat rumus perhitungan terkait nomor alel efektif (N_e), keragaman genetik (H), dan indeks Shannon (I), dan jarak genetik, yaitu sebagai berikut:

- a) Rumus alel efektif (N_e) (Kimura, 1973)

$$N_e = 1/(\sum(pi^2))$$

Keterangan:

N_e = Nomor alel efektif (*effective number of alleles*)

p_i = Proporsi frekuensi alel ke-i pada lokus genetik tertentu (frekuensi alel di kuadratkan)

- b) Rumus keragaman genetik (Nei, 1972)

$$H = 1 - \sum(p_i)^2$$

Keterangan:

H = Keragaman genetik (Nei's gene diversity)

p_i = Proporsi frekuensi alel ke-i pada lokus genetik tertentu (sumbangan masing-masing alel terhadap total frekuensi alel di lokus tersebut).

- c) Rumus *Indeks Shannon Weinner* (Lewontin, 1973)

$$I = -\sum(p_i)(\ln p_i)$$

Keterangan:

I = Indeks Shannon (Shannon index)

p_i = Proporsi frekuensi alel ke-i pada lokus genetik tertentu (sumbangan masing-masing alel terhadap total frekuensi alel di lokus tersebut)

ln = Logaritma alami

- d) Rumus jarak genetik (*Genetic Distance*) (Nei, 1972)

$$D = -\ln \frac{J_{XY}}{\sqrt{J_X J_Y}}$$

Keterangan:

D = Jarak genetik (*Genetic Distance*)

J_x = frekuensi alel di populasi x

J_y = frekuensi alel di populasi y

J_{xy} = probabilitas frekuensi alel di populasi x dan di populasi y

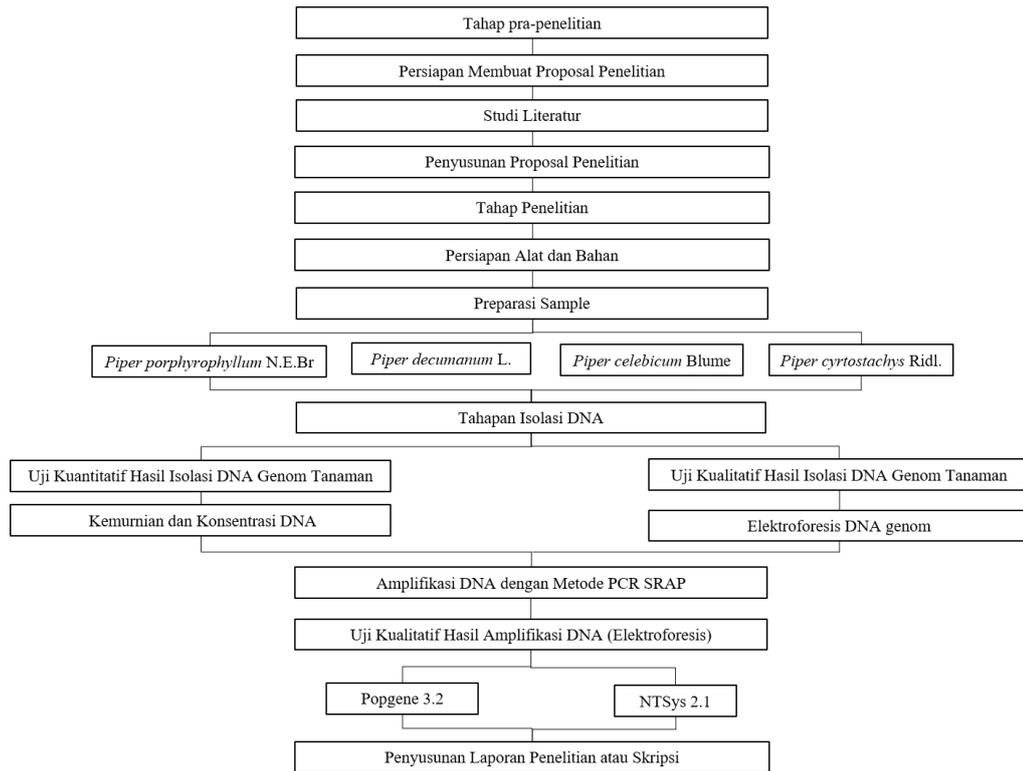
3.5 Alur Penelitian

Diagram alir penelitian tersaji pada Gambar 3.2 berikut. Tahap penelitian yang dilakukan dimulai dengan persiapan sampel hingga dilakukan pengujian dan dilakukannya penulisan skripsi.

Vini Ayuni, 2023

KEANEKARAGAMAN GENETIK DAN KEKERABATAN EMPAT JENIS ENDEMIK PIPERACEAE DI KAWASAN MALESIA BERDASARKAN ANALISIS SEQUENCE-RELATED AMPLIFIED POLYMORPHISM (SRAP)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu



Gambar 3.2. Alur Penelitian