

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis penelitian**

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif yang mengangkat fenomena alam sebagai salah satu masalah dalam penelitian, sehingga dapat menerangkan arti dan kejelasan terhadap fenomena tersebut.

#### **B. Populasi dan sampel**

Populasi dalam penelitian ini adalah beberapa tanaman sawo *P. duclitan*, *P. obovata* dan *P. campechiana* di Kebun Raya Bogor, sedangkan sampelnya adalah DNA beberapa tanaman sawo *P. duclitan*, *P. obovata* dan *P. campechiana* yang telah diisolasi. Sumber DNA berasal dari jaringan daun muda beberapa tanaman sawo *P. duclitan* dan tanaman sawo pembanding yaitu *P. obovata* dan *P. campechiana*.

#### **C. Waktu dan lokasi penelitian**

Penelitian dilaksanakan dari bulan Februari sampai bulan Agustus 2014. Lokasi penelitian terbagi menjadi dua yaitu pengambilan sampel di Kebun Raya Bogor dan analisis genetik di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

#### **D. Alat dan bahan**

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam Lampiran I.

#### **E. Prosedur penelitian**

##### **1. Tahap persiapan**

Alat-alat yang digunakan dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan kemudian dibungkus dengan plastik tahan panas yang selanjutnya disterilisasi panas lembab.

Begitu juga bahan yang digunakan juga disterilisasi panas lembab pada autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 10-15 menit. Pembuatan larutan yang digunakan tercantum pada lampiran III.

## 2. Tahap penelitian

### a. Pengambilan sampel

Sampel yang digunakan adalah daun muda dari beberapa tanaman *P. duclitan*, *P. obovata* dan *P. campechiana*. Pemilihan daun muda sebenarnya untuk memudahkan proses penghancuran daun karena lebih mudah digerus dibandingkan daun yang lebih tua (Prayitno & Nuryandani, 2011). Daun tersebut disimpan pada *plastic bag* yang diberi *silica gel*. Kemudian di dalam Laboratorium, daun tersebut dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya sampel daun disimpan pada suhu -20°C hingga proses ekstraksi DNA.

### b. Isolasi DNA genom

Isolasi DNA genom merupakan tahap awal yang harus dilakukan untuk mendapatkan DNA yang akan dianalisis. Proses pengeluaran DNA dari nukleus, mitokondria dan kloroplas dilakukan dengan menggunakan larutan-larutan dan beberapa teknik tertentu (Fachiya *et al.*, 2011). Isolasi DNA yang dilakukan berdasarkan metode Clark (1997) dalam Hidayat (2001) dengan beberapa modifikasi. Mortar dan alu yang digunakan disimpan di dalam *freezeer* selama 24 jam untuk memudahkan menggerus daun. Buffer ekstraksi (1 M Tris-HCl pH 8,0; 6 M NaCl; 0,5 M EDTA pH 8,0; 2% CTAB; 2% SDS; ddH<sub>2</sub>O steril) yang digunakan terdiri dari buffer ekstraksi dingin 4°C dan buffer ekstraksi panas 65°C. Sebanyak 0,1-0,5 gram daun muda masing-masing sampel direndam dalam alkohol selama 5 menit. Sementara itu, tabung mikro 1,5 mL steril diberi label sesuai dengan kode masing-masing sampel dan dimasukkan ke dalamnya 500 µL buffer ekstraksi panas, buffer lisis 1 (20% SDS) 50 µL dan β-mercaptoetanol sebanyak 1% dari buffer ekstraksi panas yang digunakan.

Penggerusan daun dimulai dengan memasukkan daun muda yang telah direndam dalam alkohol ke dalam mortar. Sebelum daun benar-benar halus, ditambahkan 400 µL buffer ekstraksi dingin dan penggerusan dilanjutkan hingga daun benar-benar halus. Setelah itu, daun yang telah halus, dimasukkan ke dalam

tabung mikro 1,5 ml yang telah diberi label dan diisi dengan larutan buffer ekstraksi panas, buffer lisis 1 serta  $\beta$ -mercaptoetanol. Sampel dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Kemudian sampel diinkubasi dalam penangas air pada suhu 65°C selama 60 menit.

Selanjutnya ditambahkan buffer lisis 2 (5 M Potassium asetat) sebanyak 100  $\mu$ L dan dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50 kali. Simpan tabung mikro tersebut dalam wadah yang berisi es selama 10 menit, lalu sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Fasa atas (supernatan) dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru. Larutan ditambahkan kloroform isoamil alkohol sebanyak 0,5 kali dari volume total sampel dan dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50 kali. Selanjutnya disentrifugasi lagi sampel dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Fasa atas (supernatan) dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru dan ditambahkan alkohol 100% (-20°C) sebanyak minimal 2 kali volume total sampel atau hingga 1,5 ml dan dihomogenkan larutan dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50 kali. Sampel tersebut disimpan dalam *freezer* (-20°C) selama 24 jam.

Setelah 24 jam, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit dan buang alkoholnya. Sebanyak 1 ml alkohol 70% ditambahkan dan bolak-balik tabung tersebut. Sampel disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit, alkoholnya dibuang dan tabung dibalikkan di atas tisu hingga tidak ada lagi alkohol di dalam tabung. Pelarut DNA ditambahkan sebanyak 30  $\mu$ L TE dan inkubasi sampel dalam penangas air dengan suhu 50°C selama 5 menit agar DNA dapat larut. Terakhir, sampel siap digunakan dan disimpan dalam *freezer* (-20°C) untuk masuk ke tahap pengukuran kemurnian DNA dan elektroforesis.

### c. Mengukur kemurnian dan konsentrasi DNA

Uji kuantitatif DNA menggunakan spektrofotometer. Prinsip kerja spektrofotometer adalah interaksi sinar ultraviolet dengan molekul sampel (Sudarman, 2012). Komposisi larutannya yaitu 5  $\mu$ L DNA dan 495  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O steril. Larutan tersebut dihomogenkan menggunakan terlebih dahulu baru kemudian dimasukkan ke dalam kuvet spektrofotometer. Kemurnian DNA diukur

dengan menghitung nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm. Nilai kemurnian DNA biasanya berkisar antara 1,8-2,0. Jika kemurnian DNA kurang dari 1,8 maka indikasi adanya kontaminan dari protein dan UV, sedangkan jika kemurnian DNA lebih dari 2,0 maka indikasi adanya kontaminan kloroform dan fenol, sedangkan konsentrasi DNA dihitung menggunakan rumus :

$$[\text{DNA}] = \text{A}_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan :

$\text{A}_{260}$  : Nilai absorbansi pada 260 nm

50 : larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 $\mu\text{g}$  untai ganda DNA per ml

#### **d. Elektroforesis sampel hasil isolasi DNA**

DNA sampel yang akan diamplifikasi terlebih dahulu dielektroforesis terlebih dahulu agar dapat mengetahui ukuran fragmen DNA tersebut. Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein yang bermuatan di dalam medan listrik (Pratiwi, 2001). Proses elektroforesis dilakukan dengan cara membuat gel agarose terlebih dahulu. Gel agarose yang digunakan konsentrasi 1,4% dalam 25 ml TBE. Sebanyak 2  $\mu\text{L}$  DNA dicampurkan dengan 1  $\mu\text{L}$  *loading dye* dan kemudian dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel. Proses elektroforesis ini menggunakan larutan TBE dan di *running* selama 100 volt selama 30 menit. Selanjutnya gel agarose diwarnai dengan Etidium Bromida (EtBr) selama 10 menit. Kemudian dibilas dengan aquades selama 5 menit. Gel agarose hasil pewarnaan diamati pada UV transluminator lalu didokumentasikan.

#### **e. Amplifikasi DNA dengan metode PCR**

Amplifikasi ini dilakukan dengan menggunakan mesin *thermocycler* dengan program Gene Amplified PCR system 9700. Penanda yang digunakan berjumlah dua penanda yang diadaptasi dari Rojas (2012). Berikut ini merupakan primer yang digunakan :

Tabel 3. Primer RAPD

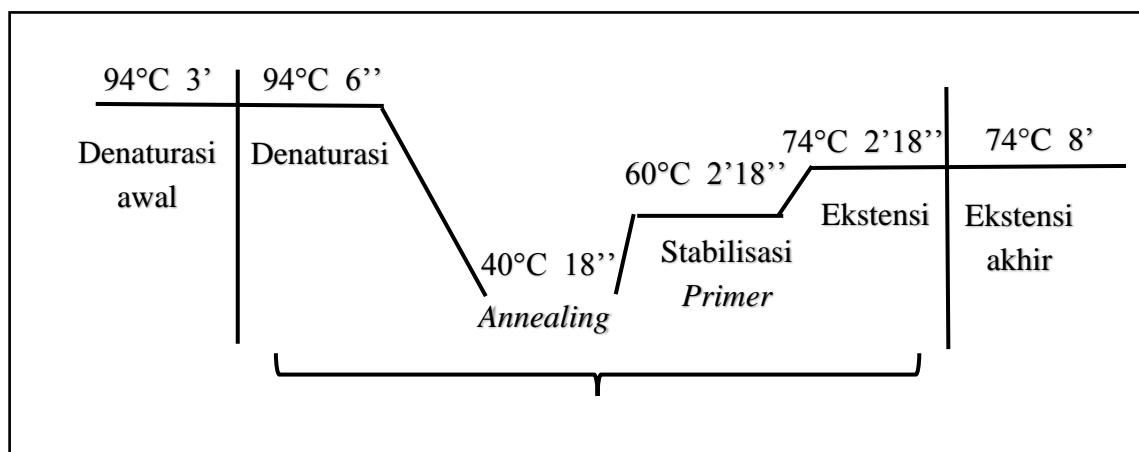
No.	Primer	Sikuen data
1.	SAP-04	5' GGAGCTACCT 3'
2.	OPB-17	5' AGGAAACGAG 3'

Pencampuran komponen reaksi PCR dilakukan secara cepat dan berhati-hati. Semua proses pencampuran dilakukan di dalam *coolbox* untuk menjaga agar komponen reaksi PCR tidak rusak. Setiap tabung PCR berisi 25  $\mu$ L berdasarkan Williams *et al.* (1990) dengan komposisi PCR sebagai berikut :

Tabel 4. Komposisi reaksi PCR berdasarkan Williams *et al.* (1990)  
dengan modifikasi

Komposisi PCR	Konsentrasi awal	Volume ( $\mu$ L)	Konsentrasi akhir
Buffer PCR	10x	2,5	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3	3 mM
dNTPs mix	10 mM	0,5	0,2 mM
Primer	200 $\mu$ M	1,5	12 $\mu$ M
Taq DNA Polimerase	5 U/ $\mu$ L	0,25	0,05 U/ $\mu$ L
DNA	50 ng/ $\mu$ L	2	4 ng/ $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	-	15,25	-
Jumlah	-	25	-

Amplifikasi DNA dilakukan dengan tahap denaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit dan 60 siklus dengan suhu denaturasi 94°C selama 6 detik, *annealing* pada suhu 40°C selama 18 detik, stabilisasi primer pada suhu 60°C selama 2 menit 18 detik dan ekstensi pada suhu 74°C selama 2 menit 18 detik. Ekstensi akhir dilakukan pada suhu 74°C selama 8 menit (Gambar 15).



---

#### **f. Elektroforesis hasil PCR 60 siklus**

Amplikon dilihat dengan melakukan elektroforesis pada gel agarose 1,4% *Gambar 14*. Program amplifikasi DNA *Pbutteria* dalam 40 ml TBE. Sebanyak 10  $\mu$ L amplikon di campurkan dengan 3  $\mu$ L *loading dye* dan dimasukkan ke sumur-sumur gel. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 50 volt selama 2 jam. Marker DNA yang digunakan adalah DNA Lambda yang dipotong oleh enzim restriksi EcoRI dan HindIII. Gel agarose yang telah melalui proses elektroforesis diwarnai dengan Etidium Bromida (EtBr) selama 10 menit. Kemudian dibilas dengan aquades selama 5 menit. Hasil pewarnaan dilihat dengan sinar ultraviolet dari alat UV transluminator dan didokumentasikan dengan kamera.

#### **g. Analisis data**

Analisis data molekuler dilakukan dengan melihat hasil pita-pita DNA yang dihasilkan. Hasil pita-pita DNA menjadi dua kategori yaitu pita dna yang monomorfik dan polimorfik. Kemudian data-data ini dibuat dalam bentuk matriks, dengan melihat kehadiran dan ketidakhadiran pita DNA. Jika pita DNA ada maka diberi nilai 1, sedangkan jika pita DNA tidak ada diberi nilai 0. Selanjutnya data dalam bentuk matriks tersebut diolah dalam software MEGA 4 (*The Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) dengan program UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Aritmatic Averages*).

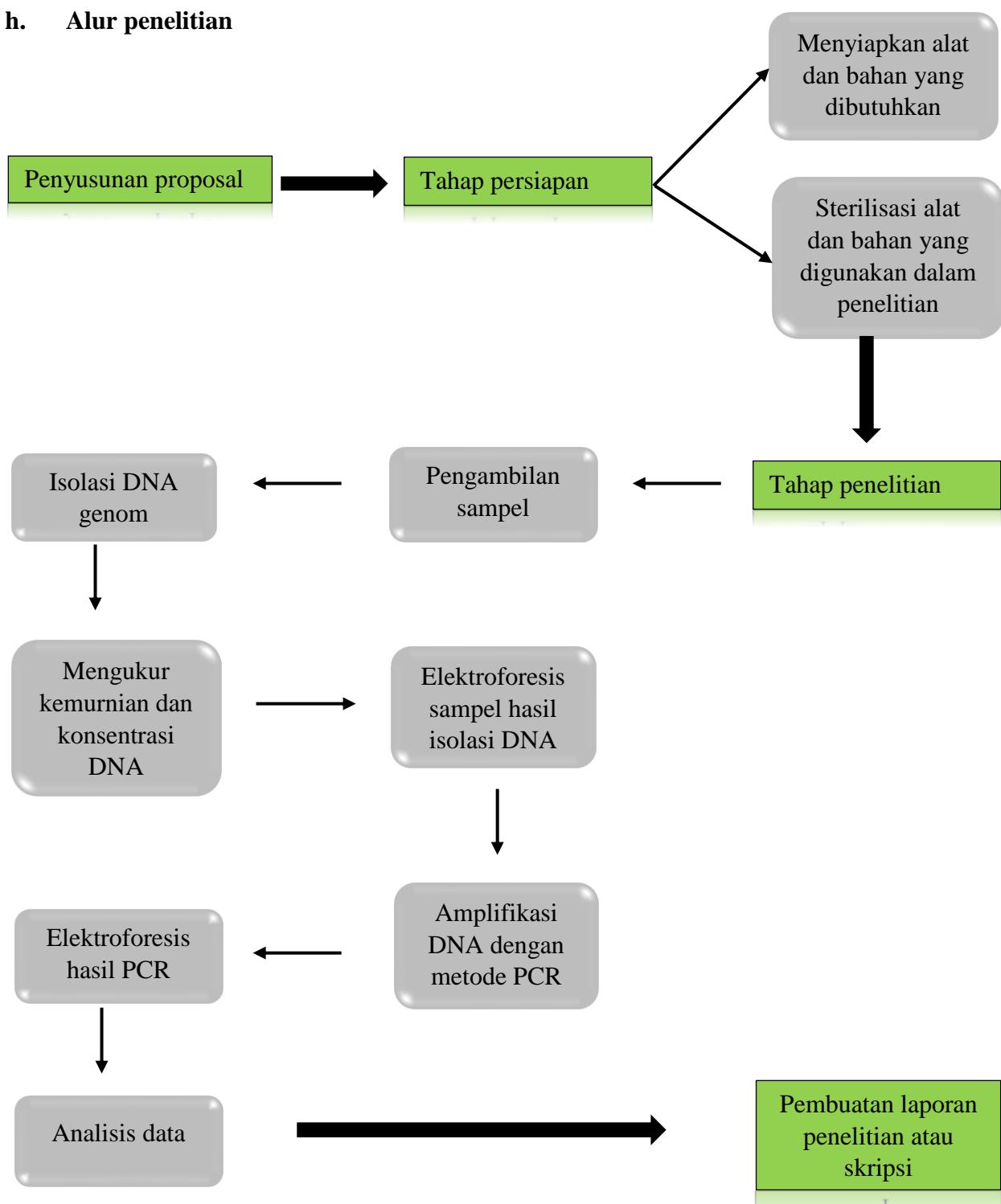
Selain itu, juga dilakukan perhitungan nilai heterozigositas dari primer yang berhasil mengamplifikasi dengan baik. Berikut merupakan rumus dari nilai heterozigositas :

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{pi} p_i^2$$

Keterangan:

$p_i$  = frekuensi alel ke-i  
 i = 1, 2, 3, ..... n

### h. Alur penelitian



Gambar 15. Diagram alur penelitian