

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

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

B. Populasi dan Sampel

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

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Februari sampai dengan bulan September 2014. Lokasi penelitian terbagi menjadi dua, yaitu: pengambilan sampel di Kebun Raya Bogor dan analisis genetik di laboratorium Mikrobiologi FPMIPA UPI.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam Lampiran 1.

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 disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 10-15 menit. Pembuatan larutan yang digunakan tercantum pada Lampiran 2.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun muda dari beberapa tanaman *P. duclitan*, *P. obovata* dan *P. campechiana*. Daun tersebut disimpan pada *plastic bag* dan dimasukkan ke dalam *coolbox* yang sudah diisi dengan es batu sebelumnya agar daun tetap segar. Kemudian di dalam laboratorium, daun tersebut dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan menggunakan tissue. Selanjutnya sampel daun ditimbang seberat 0,1-0,5 gram dari setiap tanaman *P. duclitan*, *P. obovata* dan *P. campechiana* yang tercuplik dan selanjutnya disimpan pada suhu -20°C hingga proses ekstraksi DNA.

b. Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA yang dilakukan berdasarkan metode Clark (1997, dalam Hidayat, 2001) dengan beberapa modifikasi. Mortar dan alu yang digunakan disimpan di dalam *freezer* selama 24 jam untuk memudahkan menggerus daun. CTAB (1 M Tris-HCl pH 8,0; 6 M NaCl; 0,5 M EDTA pH 8,0; 2% CTAB; 2% SDS; ddH₂O steril) yang digunakan terdiri dari CTAB dingin 4°C dan CTAB hangat 65°C. Sebanyak 0,1-0,5 gram daun muda masing-masing sampel direndam dalam alkohol absolut 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 CTAB hangat (sebelumnya dilarutkan dulu menggunakan *magnetic stirrer* dalam suhu 65°C), buffer lisis 1 (20% SDS) 50 µL dan β-mercaptoetanol sebanyak 1% dari CTAB hangat yang digunakan.

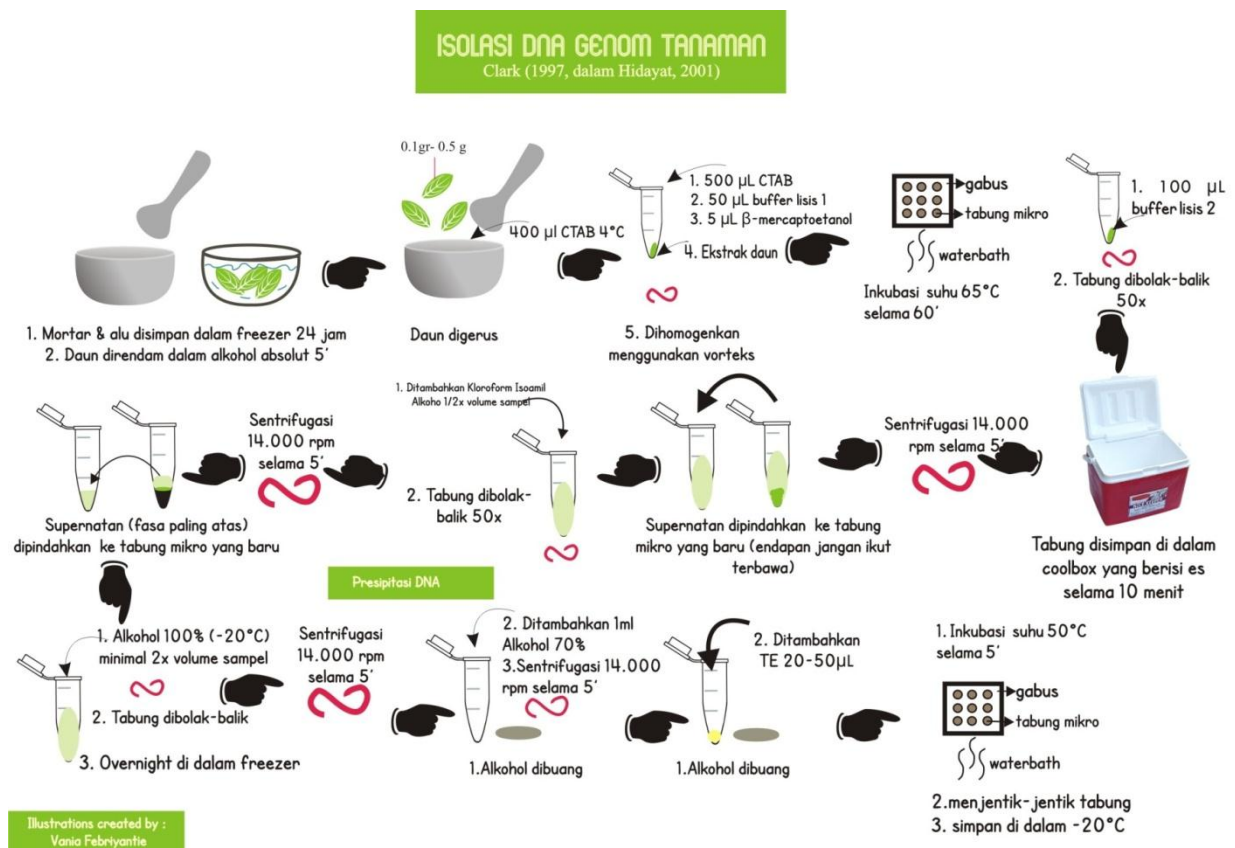
Penggerusan daun dimulai dengan memasukkan daun muda yang telah direndam dalam alkohol ke dalam mortar. Sebelum daun benar-

benar halus, dimasukkan 400 μ L CTAB dingin dan penggerusan dilanjutkan hingga daun benar-benar halus. Setelah halus, daun tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml yang telah diberi label dan diisi dengan larutan CTAB, buffer lisis 1 serta β -mercaptoetanol. Sampel dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Setelah itu sampel diinkubasi dalam penangas air pada suhu 65°C selama 60 menit.

Selanjutnya ditambahkan buffer lisis 2 (5 M Potassium asetat) ke dalam tabung mikro yang berisi sampel sebanyak 100 μ L dan dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50 kali. Simpan tabung mikro tersebut dalam wadah yang berisi es selama 10 menit, lalu disentrifugasi sampel dengan kecepatan 14.000 *rpm* selama 5 menit. Pindahkan fasa atas (supernatan) ke dalam tabung mikro yang baru. Ditambahkan larutan kloroform isoamil alkohol sebanyak 0,5 kali dari volume total sampel dan dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50 kali. Selanjutnya sampel disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14.000 *rpm* selama 5 menit. Fasa paling atas (supernatan) dimasukkan 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 tersebut dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50 kali. Sampel tersebut disimpan dalam *freezer* (-20°C) selama 24 jam.

Setelah 24 jam, dilakukan proses presipitasi DNA. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 *rpm* selama 5 menit dan dibuang alkoholnya. Ditambahkan 1 ml alkohol 70% dan dibolak-balik tabung tersebut. Sampel disentrifugasi lagi selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 *rpm*, alkoholnya dibuang dan tabung dibalikkan di atas tisu hingga tidak ada lagi alkohol di dalam tabung. Selanjutnya sampel ditambahkan pelarut DNA TE sebanyak 30 μ L dan sampel diinkubasi dalam penangas air dengan suhu 50°C selama 5 menit agar DNA dapat larut. Terakhir, sampel siap digunakan untuk masuk ke tahap pengukuran kemurnian DNA dan elektroforesis atau dapat disimpan dalam *freezer* (-

20°C) apabila sampel belum digunakan. Secara singkat langkah kerja isolasi DNA genom dideskripsikan dalam Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema Langkah Kerja Ekstraksi DNA Tanaman

c. Mengukur Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Uji kuantitatif DNA dilakukan menggunakan spektrofotometer. Komposisi larutannya yaitu 5 μL DNA dan 495 μL ddH₂O steril. Larutan tersebut dihomogenkan terlebih dahulu menggunakan alat *vortex* baru kemudian dimasukkan ke dalam kuvet spektrofotometer. Kemurnian DNA diukur dengan menghitung nilai absorbansi 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. Konsentrasi DNA dihitung menggunakan rumus :

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

Keterangan :

A_{260} : Nilai absorbansi pada 260 nm

50 : larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 μg untai ganda DNA per ml

d. Elektroforesis Sampel Hasil Isolasi DNA

Uji kualitatif DNA dilakukan dengan menggunakan elektroforosis. DNA sampel yang akan diamplifikasi terlebih dahulu dielektroforesis agar diketahui ketebalan fragmen DNA tersebut. Proses elektroforesis dilakukan dengan cara membuat gel agarose terlebih dahulu. Gel agarose yang digunakan konsentrasinya 1,4% dalam 25 ml TBE. Sebanyak 2 μL DNA dicampurkan dengan 1 μL *Loading dye* dan kemudian dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel. Proses elektroforesis ini menggunakan larutan TBE dan di-*running* dengan 100 volt selama 30 menit. DNA hasil elektroforesis diamati pada UV transluminator lalu didokumentasikan menggunakan kamera yang ditutupi kertas mika.

e. Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

Amplifikasi ini dilakukan dengan menggunakan mesin *thermocycler* dengan program *Gene Amplified PCR system 9700*. Primer yang digunakan adalah OPB-09 dengan sikuen data 5' TGGGGGACTC

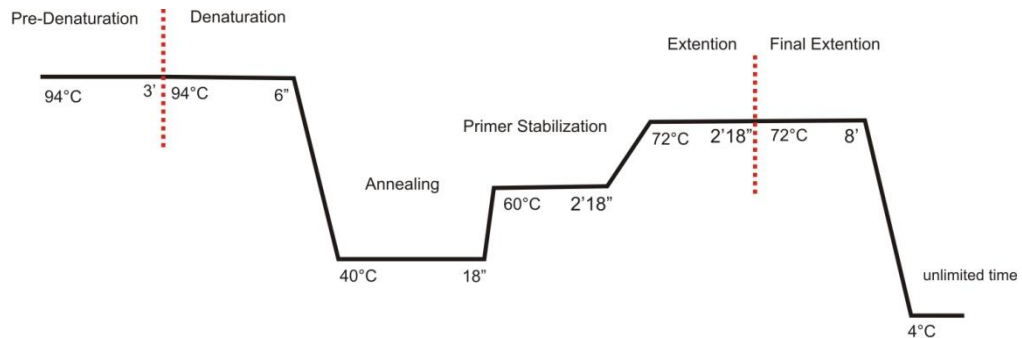
3'dan OPB-10 dengan sikuen data 5' CTGCTGGGAC 3', primer ini diadaptasi dari Rojas *et al.* (2012).

Pencampuran komponen reaksi PCR dilakukan secara cepat dan teliti. Semua proses pencampuran dilakukan di dalam *coolbox* untuk menjaga agar komponen reaksi PCR tidak rusak. Setiap tabung PCR berisi 25 μ L komposisi PCR yang tercantum pada Tabel 3.1.

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.

Tabel 3.1 Komposisi Reaksi PCR berdasarkan Williams, *et al.* (1990) yang mengalami modifikasi

Komposisi PCR	Konsentrasi Awal	Volume (μ L)	Konsentrasi Akhir
Buffer PCR	10x	2,5	1x
MgCl ₂	25 mM	3	3 mM
dNTPs mix	10 mM	0,5	0,2 mM
Primer	200 μ M	1,5	12 μ M
Taq DNA Polimerase	5 U/ μ L	0,25	0,05 U/ μ L
DNA	50ng/ μ L	2	4 ng/ μ L
ddH ₂ O	-	15,25	-
Jumlah	25 μ L		



Gambar 3.2 Program Amplifikasi Fragmen DNA menggunakan *Thermocycler*

f. Elektroforesis Hasil PCR

Amplikon yang didapat, diuji secara kualitatif dengan melakukan elektroforesis pada gel agarose 1,4% dalam 40 ml TBE. Sebanyak 10 μ L amplikon dicampurkan dengan 3 μ 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 gel agarose yang sudah diwarnai dengan EtBr dibilas dengan aquades selama 5 menit. Hasil pewarnaan dilihat dengan sinar ultraviolet dari alat UV transluminator dan didokumentasikan dengan kamera yang lensanya ditutupi kertas mika berwarna merah.

3. 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 dan buat skema interpretasinya, 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 dengan program UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages*).

Pita polimorfik yang dihasilkan dari amplifikasi RAPD-PCR selanjutnya dihitung nilai PIC untuk mengetahui tingkat keinformatifan pada primernya Nilai PIC dapat dihitung dengan rumus:

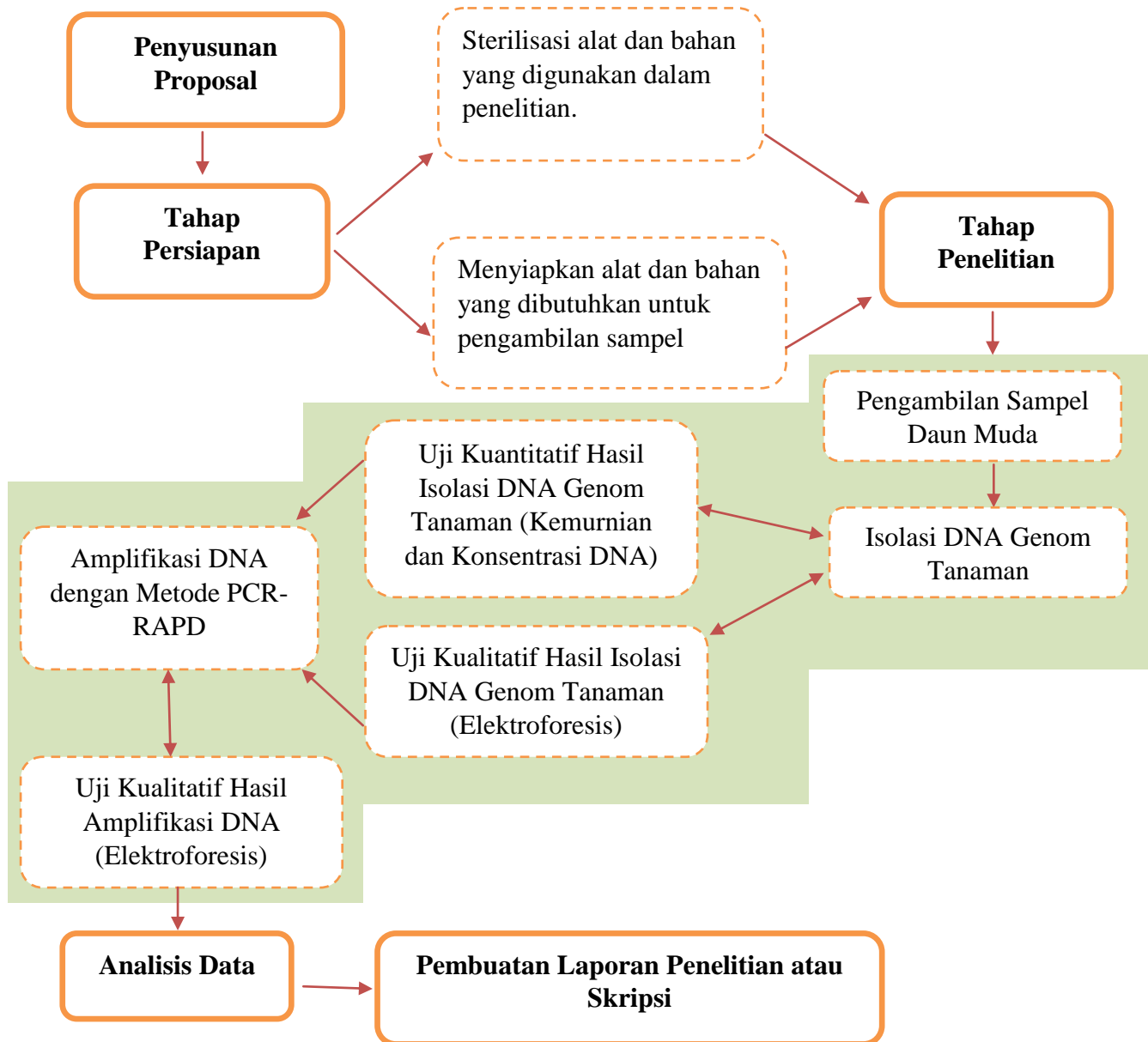
$$\text{PIC} = 1 - \sum p_i^2$$

Keterangan:

P_i = frekuensi alel ke-i

i = 1, 2, 3, n

F. Alur Penelitian



Gambar 3.3 Diagram Alur Penelitian

