

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian deskriptif. Data diperoleh dari sikuen DNA daerah ITS untuk merekonstruksi pohon filogenetik dalam menentukan kekerabatan antara tumbuhan-tumbuhan Solanaceae.

B. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah beberapa tumbuhan yang termasuk ke dalam suku Solanaceae dan Convolvulaceae yang diperoleh dari beberapa daerah di kota Bandung, sedangkan sampel yang digunakan adalah DNA dari 17 jenis tumbuhan Solanaceae dan 2 jenis tumbuhan Convolvulaceae (sebagai *outgroup*). Khusus untuk sekuen DNA daerah ITS species *Withania somnifera* dan *Capsicum annuum* diperoleh dari GeneBank NCBI yang dapat diakses di www.ncbi.nlm.nih.gov. Daftar tumbuhan yang digunakan sebagai sampel dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Daftar sampel tumbuhan Solanaceae dan Convolvulaceae yang digunakan dalam penelitian

No. Sampel	Nama Tumbuhan	Nama Daerah	Suku
01	<i>Physalis angulata</i>	Ciplukan	Solanaceae
02	<i>Solanum nigrum</i>	Leunca/ Ranti	Solanaceae
03	<i>Solanum wrightii</i>	Karundung	Solanaceae
04	<i>Solanum lycopersicum</i>	Tomat	Solanaceae
05	<i>Solanum torvum</i>	Terung liar	Solanaceae
06	<i>Solanum melongena</i>	Terung ungu	Solanaceae

07	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tembakau	Solanaceae
No. Sampel	Nama Tumbuhan	Nama Daerah	Suku
08	<i>Brugmansia suaveolens</i>	Kecubung orange	Solanaceae
09	<i>Brugmansia candida</i>	Kecubung putih	Solanaceae
10	<i>Brunfelsia uniflora</i>	Melati mentomori	Solanaceae
11	<i>Cestrum nocturnum</i>	Arum dalu	Solanaceae
12	<i>Datura metel</i>	Kecubung ungu	Solanaceae
13	<i>Petunia grandiflora</i>	Petunia	Solanaceae
14	<i>Nicandra physalodes</i>	Nandina	Solanaceae
15	<i>Cestrum cultum</i>	-	Solanaceae
16	<i>Physalis peruviana</i>	Ciplukan	Solanaceae
17	<i>Solanum tuberosum</i>	Kentang	Solanaceae
18	<i>Ipomoea batatas</i>	Ubi jalar	Convolvulaceae
19	<i>Ipomoea cairica</i>	Ubi kates	Convolvulaceae

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret sampai dengan bulan Mei 2015, sedangkan untuk lokasinya dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Sekuensing produk hasil amplifikasi DNA daerah ITS dari seluruh sampel dilakukan di Macrogen, Seoul, Korea Selatan.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Daftar alat dan bahan tersebut tercantum dalam Lampiran 1.

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

Putri Yunitha Wardiny, 2015
ANALISIS FILOGENETIK MOLEKULER BEBERAPA ANGGOTA SUKU SOLANACEAE INDONESIA DAN *Withania somnifera*
 Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Alat-alat yang digunakan dicuci bersih terlebih dahulu dan dikeringkan untuk selanjutnya dibungkus dengan plastik tahan panas dan disterilisasi panas lembab menggunakan *autoclave* dengan suhu 121⁰C selama 15 menit.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun muda dari 17 jenis tumbuhan Solanaceae dan 2 jenis tumbuhan Convolvulaceae. Daun-daun tersebut dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70%, disimpan dalam *plastic bag* yang masing-masing sudah diberi label nama specimen, dan dimasukkan ke dalam *coolbox* berisi es batu untuk menjaga kesegaran sampel. Selanjutnya di dalam laboratorium, sampel disimpan pada suhu -20⁰C hingga proses ekstraksi DNA.

b. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA yang dilakukan menggunakan *GeneJETTM Plant Genomic Purification Mini Kit* dari Thermo Scientific dengan beberapa modifikasi. Komponen-komponen yang digunakan pada kit yaitu 0,7 ml RNase A, 25 ml *Lysis Buffer A*, 3 ml *Lysis Buffer B*, 8 ml *Precipitation Solution*, 24 ml *Plant gDNA Binding Solution*, 10 ml *Wash Buffer I*, 10 ml *Wash Buffer II*, 30 ml *Elution Buffer* (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.5 mM EDTA), *GeneJET Genomic DNA Purification Column pre-assembled with Collection Tubes*, dan *Collection Tube* (2 ml). Sebelum digunakan, *Wash Buffer I* dan *Wash Buffer II* ditambahkan Ethanol 96% hingga volumenya 40 ml.

Daun muda dari setiap specimen ditimbang sebanyak 0,1 g untuk kemudian digerus menggunakan mortar dan alu steril dengan pemberian nitrogen cair secukupnya. Sementara itu, tabung mikro 1,5 ml steril diberi label sesuai kode sampel masing-masing dan diberi 350

μl *Lysis Buffer A*. Bubuk daun yang sudah halus selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung mikro menggunakan spatula steril, lalu dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 10-20 detik. Selanjutnya ke dalam tabung mikro ditambahkan 50 μl *Lysis Buffer B* dan 5 μl RNase A, dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan tabung, lalu tabung-tabung mikro tersebut diinkubasi pada *shaking water bath* dengan suhu 65⁰C selama 10 menit untuk mengoptimalkan proses lisisnya sel.

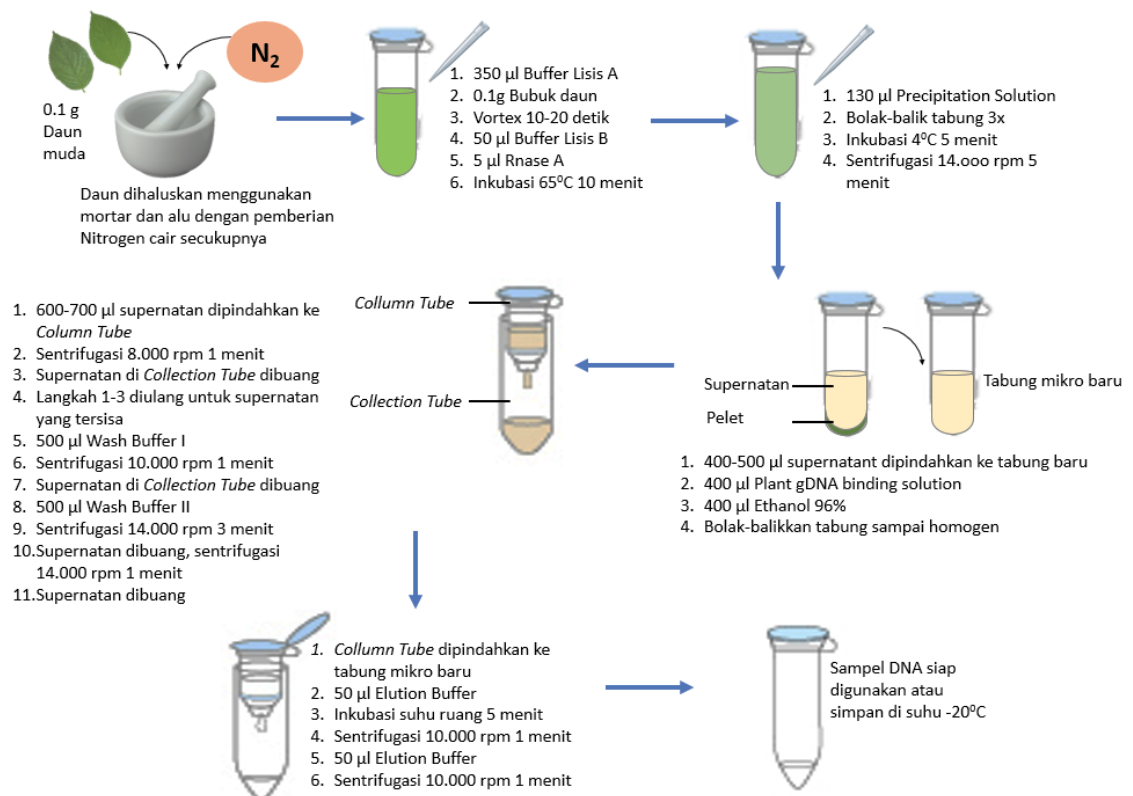
Selanjutnya dilakukan proses presipitasi DNA dengan cara ditambahkan 130 μl *Precipitation Solution* dan dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan tabung sebanyak 3 kali. Selanjutnya tabung diinkubasi pada suhu 4⁰C selama 5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Untuk mengoptimalkan proses presipitasi DNA, supernatan dipindahkan ke tabung mikro baru sebanyak 450-500 μl serta ditambahkan 400 μl *Plant gDNA Binding Solution* dan 400 μl Ethanol 96%, lalu dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan tabung sebanyak 10 kali.

Langkah berikutnya adalah memindahkan 600-700 μl larutan tersebut ke dalam *Collection Tube* yang sudah dipasang *Column Tube*, dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit untuk memerangkap DNA dalam membran silica pada *Column Tube*. Supernatan yang berada pada *Collection Tube* dibuang, dan langkah ini dilakukan kembali untuk 600-700 μl larutan yang tersisa.

Kemudian ditambahkan 500 μl *Wash Buffer I* ke dalam *Column Tube* dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Supernatan yang berada pada *Collection Tube* dibuang. Selanjutnya ditambahkan 500 μl *Wash Buffer II* ke dalam *Column Tube* dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang dan tabung kembali disentrifugasi dengan

kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit untuk mengoptimalkan pemisahan debris dari DNA.

Selanjutnya supernatant dan *Collection Tube* dibuang dan *Column Tube* dipindahkan ke tabung mikro baru. *Elution Buffer* sebanyak 50 µl ditambahkan ke bagian tengah membran *column* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit untuk selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Terakhir, ke dalam tabung kembali ditambahkan 50 µl *Elution Buffer* dan disentrifugasi dengan kecepatan dan waktu yang sama. *Elution Buffer* memiliki kondisi ionik yang rendah sehingga dapat menjaga kualitas DNA genom, namun jika sampel DNA tidak langsung digunakan, dapat disimpan pada suhu -20⁰C untuk menjaga kualitas DNA tetap dalam kondisi baik. Sampel selanjutnya siap digunakan untuk masuk ke tahap uji kuantitatif dan kualitatif DNA. Secara singkat langkah kerja ekstraksi DNA tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema Langkah Kerja Ekstraksi DNA Tumbuhan Menggunakan *GeneJETTM Plant Genomic Purification Mini Kit* Thermo Scientific.

c. Mengukur Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Uji kuantitatif DNA dilakukan dengan cara mengukur kemurnian dan konsentrasi DNA menggunakan spektrofotometer. Komposisi larutan yang digunakan adalah 500 kali pengenceran, yaitu dengan melarutkan 1 μ l sampel dalam 499 μ l ddH₂O steril. Larutan tersebut sebelumnya dihomogenkan terlebih menggunakan vortex baru selanjutnya dimasukkan ke dalam kuvet spektrofotometer.

Nilai kemurnian DNA diperoleh dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm yang dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm. DNA murni umumnya memiliki nilai kemurnian berkisar antara 1.8-2.0. Sedangkan nilai konsentrasi DNA dapat diperoleh dengan menggunakan rumus :

$$[\text{DNA}] = \text{Å}260 \times 50 \times \text{Faktor Pengenceran}$$

Keterangan :

Å260 : Nilai absorbansi pada 260 nm

d. Elektroforesis Sampel Hasil Ekstraksi DNA

Uji kualitatif DNA dilakukan untuk mengetahui kemurnian DNA menggunakan alat elektroforesis. Sampel hasil ekstraksi dielektroforesis untuk diketahui keberadaan DNANYa. Proses elektroforesis dilakukan dengan pembuatan gel agarose terlebih dahulu. Konsentrasi gel agarose yang digunakan adalah 1%, yaitu dengan melarutkan 0,25 g agarose ke dalam 25 ml TAE 1x.

Selanjutnya, sebanyak 5 µl sampel dicampurkan dengan 2 µl *Loading Dye* dan dimasukkan ke dalam sumur-sumur pada gel agarose. Gel agarose yang sudah berisi sampel DNA dielektroforesis menggunakan TAE 1x dengan arus 100 V selama 90 menit. Gel selanjutnya diwarnai menggunakan larutan EtBr dan DNA hasil elektroforesis diamati dibawah UV transluminator serta didokumentasikan menggunakan kamera digital.

e. Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

Amplifikasi DNA daerah ITS dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *Thermal cycler Gene Amplified PCR System 9700*. Proses amplifikasi tersebut mengacu pada Hidayat dan Pancoro (2008, hlm. 17) dengan menggunakan satu pasang primer, yaitu ITS5 (5'-TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAA- 3') sebagai primer *forward* dan ITS4 (5'- CCCGCCTGACCTGGGGTCGC- 3') sebagai primer *reverse*. Dengan menggunakan *DreamTaq Green PCR Master Mix 2x* (Thermoscientific), amplifikasi dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 95⁰C selama 2 menit (1 siklus), dilanjutkan dengan 35 siklus yang

terdiri dari denaturasi pada suhu 95⁰C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 57⁰C selama 2 menit, dan ekstensi pada suhu 72⁰C selama 2 menit. Amplifikasi diakhiri dengan 1 siklus untuk melengkapi proses pemanjangan (*final extension*) pada suhu 72⁰C selama 10 menit (Hidayat *et al.*, 2008, hlm. 17).

Pencampuran komponen reaksi PCR dilakukan secara cepat, steril, teliti, dan dilakukan di dalam *coolbox* untuk menjaga komponen-komponen PCR tidak rusak. Setiap tabung PCR berisi 25 µl komposisi reaksi PCR yang dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Komposisi Reaksi PCR Menggunakan *DreamTaq Green DNA Polymerase* ThermoScientific

Komponen	Volume (50 µl reaksi)	Konsentrasi akhir	Volume akhir (25 µl reaksi)
DreamTaq Green PCR Master Mix 2x	25 µl	1x	12.5 µl
ITS 5	0.1-1.0 µM	0.5 µM	1 µl
ITS 4	0.1-1.0 µM	0.5 µM	1 µl
Sample DNA	10 pg- 1 µg		2 µl
Nuclease-free water	sampai 50 µl		Sampai 25 µl
Jumlah	50 µl		25 µl

f. Elektroforesis Sampel Hasil PCR

Sampel DNA hasil amplifikasi (amplikon) selanjutnya diuji secara kualitatif dengan menggunakan alat elektroforesis untuk diketahui ukuran panjang basanya. Konsentrasi gel agarose yang digunakan yaitu 1%. Sebanyak 2 µl amplikon dicampurkan dengan 2 µl *Loading Dye* dan 1 µl ddH₂O steril lalu dimasukkan ke dalam sumur-sumur gel. Proses elektroforesis dilakukan dengan memberikan arus sebesar 100 V selama 120 menit menggunakan TAE 1x. Marker DNA yang digunakan adalah *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* dari ThermoScientific.

Gel agarose selanjutnya diwarnai dengan larutan EtBr selama 5 menit dan dibilas dengan aquades selama 3 menit. Hasil pewarnaan dilihat di bawah UV transluminator dan didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital.

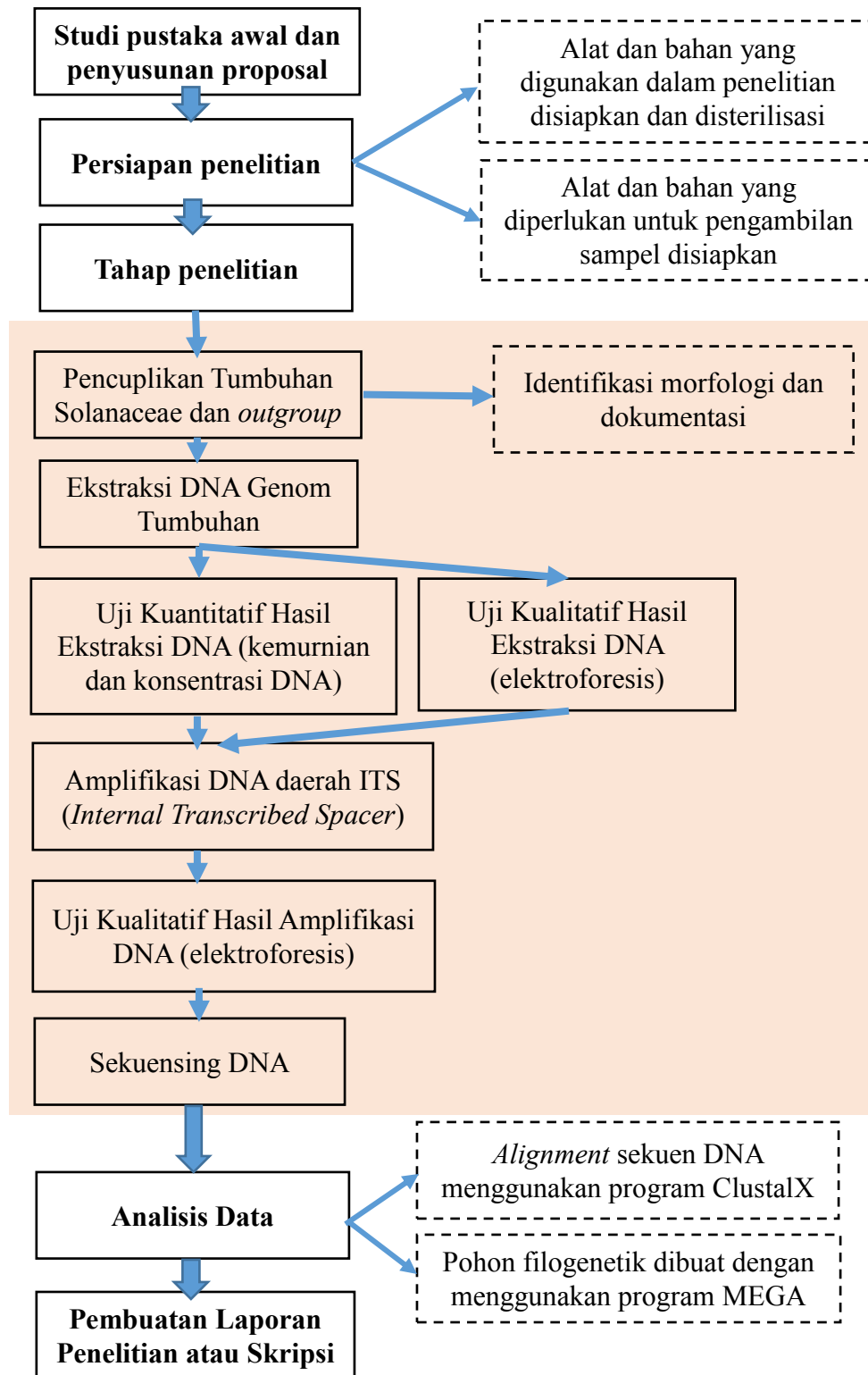
g. Sekuensing DNA

Sekuensing atau penentuan urutan basa DNA dari 19 produk amplifikasi dilakukan di Macrogen, Korea Selatan. Penentuan urutan basa tersebut dilakukan secara dua arah dengan menggunakan pasangan primer ITS5 dan ITS4.

3. Analisis Data

Setelah hasil sekuensing DNA diperoleh, sekuen DNA daerah ITS berdasarkan primer ITS5 dan ITS4 kemudian *dicontig* menggunakan program CodonCode untuk diperoleh sekuen yang utuh. Sekuen DNA tersebut selanjutnya *diblast* dengan data DNA yang ada di GeneBank NCBI untuk memperoleh kepastian jenis spesimen dan untuk mengetahui letak sekuen DNA yang diinginkan, yang dapat diakses di blast.ncbi.nlm.nih.gov. Sekuen-sekuen DNA dari seluruh sampel selanjutnya dibuat fasta format dan *dialignment* dengan menggunakan program komputer ClustalX. Program ClustalX termasuk ke dalam program yang mengikutsertakan *gap* diantara sekuen untuk dianalisis. Selanjutnya analisis filogenetik berdasarkan metode *Maksimum Parsimony* dilakukan dengan menggunakan program MEGA v.4. Pohon filogenetik yang terbentuk disimpan dan evaluasi pohon dilakukan dengan menggunakan program Treeview untuk membentuk pohon filogenetik bersama dengan *outgroup* (Hidayat *et al.*, 2008, hlm. 18).

F. Alur Penelitian



Putri Yunitha Wardiny, 2015. Gambar 3.2 Diagram Alur Penelitian ANALISIS FILOGENETIK MOLEKULER BEBERAPA ANGGOTA SUKU SOLANACEAE INDONESIA DAN *Withania somnifera*. Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu