

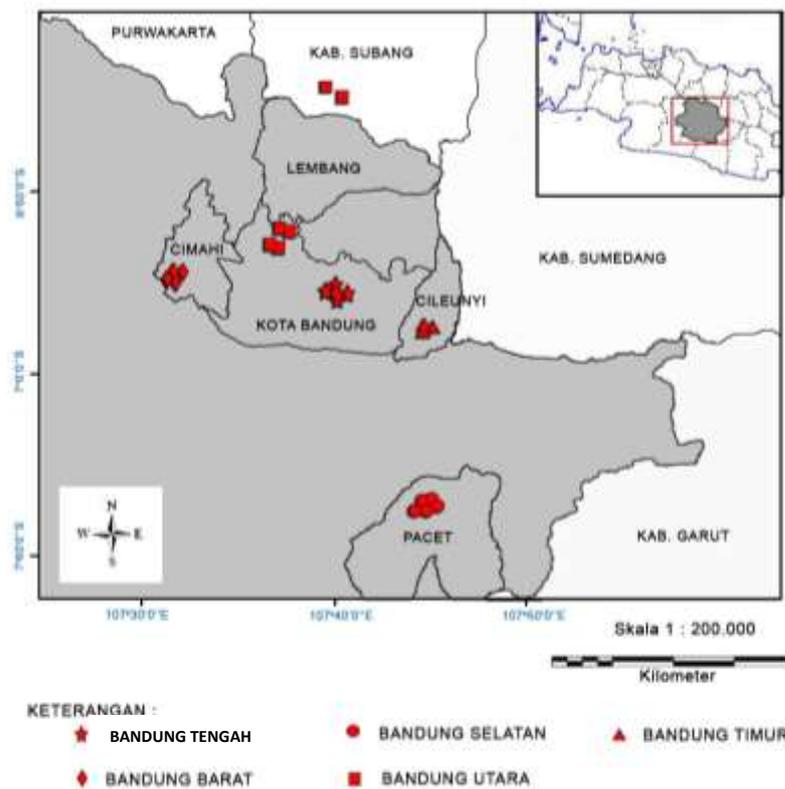
## BAB III METODE PENELITIAN

### A. Jenis Penelitian

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

### B. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah beberapa tumbuhan *P. angulata* yang berada di Kota Bandung dan sekitarnya, sedangkan sampelnya adalah DNA tumbuhan *P. angulata* yang telah diisolasi. Sumber DNA berasal dari jaringan daun muda *P. angulata*. Gambaran peta lokasi pengambilan sampel dapat dilihat pada Gambar 3.1 dan Tabel rincian kode beserta lokasi sampel dapat dilihat pada tabel 3.1.



Gambar 3.1 Peta Lokasi Pengambilan Sampel

Linda Tri Wulandari, 2016  
*ANALISIS RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA (RAPD) CIPLUKAN (*Physalis angulata*; SOLANACEAE) DI BANDUNG DAN SEKITARNYA*

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

Tabel 3.1 Rincian Kode dan Nama Sampel *P. angulata*

Kode Sampel	Nama Sampel	Lokasi Sampel
1	Cibaligo 3	Bandung Barat
2	Cibaligo 4	Bandung Barat
3	Tegalega 1	Bandung Tengah
4	Tegalega 2	Bandung Tengah
5	Tegalega 5	Bandung Tengah
6	Pacet 3	Bandung Selatan
7	Pacet 1	Bandung Selatan
8	Tegalega 4	Bandung Tengah
9	Cibaligo 2	Bandung Barat
10	Cibiru 1	Bandung Timur
11	Cihideung 1	Bandung Utara
12	Cihideung 2	Bandung Utara
13	Cibiru 3	Bandung Timur
14	Pondok Hijau 1	Bandung Utara
15	Pondok Hijau 2	Bandung Utara
16	Tegalega 3	Bandung Tengah
17	Pacet 2	Bandung Selatan
18	Cibaligo 1	Bandung Barat
19	Cibiru 2	Bandung Timur
20	Ciater 1	Bandung Utara
21	Ciater 2	Bandung Utara
22	Pacet 4	Bandung Selatan
23	Pacet 5	Bandung Selatan

### C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari hingga Juni 2016. Lokasi penelitian terbagi menjadi dua, yaitu: pengambilan sampel di Kota Bandung dan sekitarnya, serta analisis variasi genetik di Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

### D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Daftar alat dan bahan yang digunakan tercantum dalam Lampiran 1.

## E. Prosedur Penelitian

### 1. Tahap Persiapan

Alat-alat kaca dan plastik yang akan digunakan dalam penelitian dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Kemudian, alat-alat tersebut dibungkus dengan plastik tahan panas dan disterilisasi panas lembab menggunakan *Autoclave* dengan suhu 121°C, tekanan 1,5 atm selama 10-15 menit.

### 2. Tahap Penelitian

#### a. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah beberapa tumbuhan *P. angulata* yang diperoleh dari Kota dan Kabupaten Bandung, Cimahi, serta Ciater. Adapun kriteria sampel yang digunakan adalah tumbuhan *P. angulata* yang sehat (tidak terserang penyakit, jamur, maupun hama) dan masih memiliki daun muda. Bagian tumbuhan yang digunakan sebagai sampel adalah bagian daun mudanya, karena bagian daun muda tersebut lebih mudah digerus dan lebih sedikit metabolit sekundernya. Beberapa daun tersebut dicuplik dan dibersihkan permukaannya dengan menggunakan alkohol 70%, kemudian sampel dimasukkan ke dalam *plastic bag* yang telah diberi identitas sampel dan disimpan ke dalam *coolbox* berisi es batu agar daun tetap segar. Selanjutnya, di Laboratorium sampel tersebut disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C hingga proses isolasi DNA dilakukan.

#### b. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan *GeneJET™ Plant Genomic Purification Kit* dari Thermo Scientific dengan sedikit modifikasi terhadap protokol penggunaan kit yaitu pada volume penggunaan RNase. Komponen-komponen yang digunakan pada kit yaitu RNase, *Lysis Buffer A*, *Lysis Buffer B*, *Precipitation Solution*, *Plant gDNA Binding Solution*, *Wash Buffer I*, *Wash Buffer II*, *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.

Berikut langkah yang telah dilakukan dalam proses isolasi DNA. Proses isolasi DNA dimulai dengan disiapkannya 350  $\mu\text{L}$  *Lysis Buffer A* ke dalam *microtube*. Kemudian, mortar dan alu yang sudah steril dibilas menggunakan nitrogen cair. Selanjutnya, beberapa lembar sampel daun dimasukkan ke dalam mortar dan ditambahkan kembali dengan nitrogen cair. Daun yang telah diberi nitrogen cair dengan cepat digerus hingga membentuk serbuk-serbuk halus. Serbuk daun yang telah terbentuk kemudian dimasukkan ke dalam *microtube* berisi ml *Lysis Buffer A* dan divorteks selama 10-20 detik. Setelah itu, 50  $\mu\text{L}$  ml *Lysis Buffer B* dan 5  $\mu\text{L}$  RNase ditambahkan ke dalam *microtube*. Sampel yang telah diberi buffer dan RNase kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit dengan menggunakan *Shaking Water Bath* untuk mengoptimalkan proses lisis selnya.

Setelah inkubasi, dilakukan proses presipitasi DNA dengan ditambahkan 130  $\mu\text{L}$  *Precipitation Solution* pada sampel kemudian dihomogenkan dengan membolak-balikkan *microtube* sebanyak tiga kali. Selanjutnya, sampel diinkubasi kembali selama 5 menit pada suhu 4°C dengan menggunakan es batu. Setelah inkubasi selama 5 menit, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam *microtube* baru sebanyak 450-500  $\mu\text{L}$ . Supernatan yang telah dipindahkan ditambahkan dengan 400  $\mu\text{L}$  *Plant gDNA Binding Solution* dan 400  $\mu\text{L}$  etanol 96% kemudian dihomogenkan. Suspensi tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *Collection Tube* yang sudah dipasang *Column Tube* sebanyak 600-700  $\mu\text{L}$ . *Column Tube* yang sudah terisi suspensi disentrifugasi bersama dengan *Collection tube*-nya dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya, filtrat pada *Collection Tube* dibuang dan sisa suspensi supernatan yang belum difiltrasi dimasukan ke dalam *Column Tube* yang sama, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit dan filtratnya dibuang.

Setelah proses filtrasi selesai, sebanyak 500  $\mu\text{L}$  *Wash Buffer I* dimasukkan ke dalam *Column Tube*, dan disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Kemudian, filtrat larutan pada *Collection Tube* dibuang. Selanjutnya, *Wash Buffer II* dimasukkan ke dalam *Column Tube* sebanyak 500  $\mu\text{L}$ . Lalu, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit, dan filtrat pada *Collection Tube* dibuang. Dilakukan proses sentrifugasi ulang 14.000 rpm selama 3 menit untuk mengoptimalkan pemisahan debris dari DNA. Untuk menyimpan DNA pada membran, *Column Tube* dipindahkan ke dalam *microtube* kosong. *Column Tube* tersebut ditambahkan dengan 50  $\mu\text{L}$  *Elution Buffer* tepat pada bagian tengah membran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya, *microtube* dengan *Column Tube* disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Filtrat pada *microtube* yang merupakan hasil isolasi DNA, disimpan dalam freezer pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Untuk mendapatkan DNA yang masih tersisa pada membran, *Column Tube* yang sama kembali dipindahkan ke dalam *microtube* kosong yang baru, kemudian ditambahkan dengan 50  $\mu\text{L}$  *Elution Buffer* tepat pada bagian tengah membran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. *Column Tube* kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Filtrat berisi DNA hasil isolasi pada *microtube* disimpan dalam freezer pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Skema dari proses isolasi DNA tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Skema Proses Isolasi DNA  
(Sumber: Thermo Scientific, tanpa tahun)

### c. Mengukur Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Mengukur kemurnian dan konsentrasi yang merupakan uji kuantitatif DNA dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer. DNA yang digunakan adalah DNA yang telah diencerkan 500x dengan mencampurkan 1  $\mu\text{L}$  DNA dengan 499  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O steril. Campuran tersebut dihomogenkan terlebih dahulu kemudian di-*impulse* dengan menggunakan *centrifuge* selama 5 detik. Selanjutnya, DNA hasil pengenceran tersebut dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak 500  $\mu\text{L}$  dan dihitung absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan penggunaan ddH<sub>2</sub>O sebagai blanko pada spektrofotometer. Kemurnian DNA dapat diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

Keterangan:

$A_{260}$  = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm.

$A_{280}$  = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm.

Nilai kemurnian DNA yang baik mencakup nilai 1,8-2,0. Sedangkan, konsentrasi DNA dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \text{A}_{260} \times 50 \times e$$

Keterangan:

50 = Larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50  $\mu\text{g}$  untai ganda per mL.

e = Faktor pengenceran

#### d. Elektroforesis Hasil Isolasi DNA

Uji kualitatif DNA dilakukan untuk mengetahui kemurnian DNA menggunakan alat elektroforesis. Hasil dari isolasi DNA tersebut akan diketahui letak dan ukuran DNANYA setelah dilakukan proses elektroforesis. Tahapan awal dari elektroforesis adalah dengan disiapkannya *tray* atau cetakan gel agarose. Gel agarose dibuat dengan konsentrasi 1%, yaitu dengan melarutkan 0,3 g agarose ke dalam 30 mL pelarut buffer TAE 1x. Larutan gel agarose dihomogenkan dengan menggunakan *microwave* hingga larutan terlihat bening. Setelah suhu larutan lebih hangat  $\pm 60^\circ \text{C}$ , larutan gel agarose ditambahkan dengan 0,8  $\mu\text{L}$  pewarna *Peq Green* dan diaduk perlahan, kemudian dituangkan ke dalam *tray* yang sudah dipasang sisir yang membentuk 15 sumur. Selanjutnya, gel agarose dibiarkan mengeras pada suhu ruang.

Kemudian, sampel DNA yang akan dielektroforesis disiapkan sebanyak 2  $\mu\text{L}$  dan ditambahkan *loading dye* dengan jumlah yang sama yaitu 2  $\mu\text{L}$ . Gel agarose kemudian dimasukkan ke dalam *Electrophoresis Kit* yang sudah diisi dengan buffer TAE 1x. Selanjutnya, sampel DNA yang telah dicampurkan dengan *loading dye* dimasukkan ke dalam sumur pada gel. Pada elektroforesis sampel hasil isolasi DNA, daya yang digunakan sebesar 100 volt selama 25 menit. Setelah proses elektroforesis selesai, gel agarose kemudian diamati dibawah UV Transluminator dan didokumentasikan dengan kamera digital.

e. Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat *thermocycler* dengan program *Gene Amplified PCR System 9700*. Penanda molekuler yang digunakan adalah *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Primer RAPD bersifat random dengan ukuran panjang biasanya 10 nukleotida. Sebelumnya, telah dilakukan seleksi primer untuk menentukan primer yang dapat digunakan pada analisis RAPD pada *P. angulata*. Ditemukan beberapa kandidat primer yang dapat digunakan yaitu SAP-04, OPB-09, OPB-10, dan OPB-12. Setelah dilakukan tahap pengujian, keempat primer yang digunakan menghasilkan larik DNA dengan ukuran, jumlah dan intensitas yang berbeda-beda. Berdasarkan pertimbangan jumlah dan intensitas larik DNA, maka ditentukan dua primer yang cocok untuk digunakan dalam analisis RAPD pada populasi *P. angulata* yaitu primer OPB-10 dan OPB-12. Primer-primer yang digunakan dalam PCR RAPD dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Primer-Primer yang Digunakan dalam PCR-RAPD

No.	Nama Primer	Sikuen Primer
1.	OPB-10	5' CTGCTGGGAC 3'
2.	OPB-12	5' GTGATCGCAG 3'

Jumlah produk amplifikasi PCR berhubungan langsung dengan jumlah dan orientasi sekuen yang komplementer terhadap primer di dalam genom tumbuhan. Tahapan awal yang harus dilakukan dalam metode PCR adalah dibuatnya mix PCR. DNA yang digunakan adalah DNA dengan pengenceran 10x. Rincian kebutuhan masing-masing bahan per sampel dapat dilihat pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Rincian Bahan Mix PCR

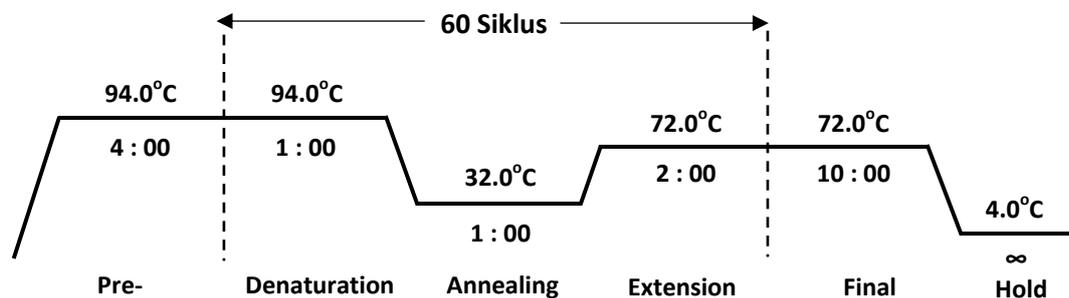
Komposisi PCR	Konsentrasi Stok	Konsentrasi Akhir	Volume Akhir
<b>Dream Taq Green PCR Master Mix 2x</b>	2x	1x	7,5 µL
<b>Primer</b>	100 µM	0,27 µM	0,6 µL
<b>Sampel DNA</b>	100 µg/ µL	0,45 µg/ µL	3 µL
<i>Nuclease-free water</i>	-	-	3,9 µL

Jumlah	15 $\mu$ L
--------	------------

Setelah diketahuinya kebutuhan masing-masing bahan dalam pembuatan mix PCR, bahan-bahan mix selanjutnya dimasukkan terlebih dahulu ke dalam PCR *tube* menggunakan *micropipette* kecuali DNA templatnya. Setelah ketiga bahan tersebut dimasukkan, PCR *tube* dihomogenasi dengan menggunakan di-*impulse* dengan *centrifuge* selama 5 detik. Selanjutnya, bahan yang telah di-*impulse* ditambahkan kembali dengan 4  $\mu$ L DNA templat dari isolat DNA. Ditambahkannya DNA templat paling akhir ini bertujuan untuk meminimalisir resiko kontaminasi. Kemudian, mix PCR yang telah lengkap kembali diberikan impuls dengan menggunakan *centrifuge* selama 5 detik.

Selanjutnya, mix PCR yang telah disiapkan tersebut di masukkan ke dalam mesin PCR. Proses PCR terdiri dari tiga tahap, yaitu denaturasi (*melting*), penempelan (*annealing*), dan Elongasi (*extension*). Pada tahapan PCR, sebelum memasuki tahap denaturasi, fragmen DNA melewati tahap pre-denaturasi terlebih dahulu pada suhu 94°C selama 4 menit. Selanjutnya, DNA akan memasuki tahap denaturasi, yaitu tahapan dimana fragmen DNA tumbuan dipanaskan pada suhu 94°C selama 1 menit sehingga rantai DNA yang masih berbentuk *double strand* dipisahkan ikatan hidrogen pada basa nitrogennya menjadi *single strand*. Kemudian, tahapan PCR dilanjutkan dengan proses penempelan/*annealing* pada suhu 32°C selama 1 menit. Pada tahapan ini primer akan menempel pada DNA templat yang komplementer dengan sekuen dari primer tersebut. Setelah dilakukannya penempelan, suhu akan dinaikkan menjadi 72°C selama 2 menit. Pada suhu tersebut enzim DNA polimerase akan melakukan proses polimerasi yaitu dibentuknya jembatan hidrogen antara rantai DNA yang baru dengan DNA templat. Dibentuknya jembatan baru ini akan dilengkapi oleh basa-basa nitrogen dari dNTPs dan terjadilah pemanjangan yang biasa disebut tahap elongasi. Tahapan-tahapan tersebut akan diulangi sebanyak 60 kali (siklus) sehingga akan didapatkan molekul-molekul DNA *double strand* yang baru. Kemudian, tahapan akan dilanjutkan dengan *final extension* pada suhu 72°C selama 10 menit untuk memastikan proses elongasi berjalan dengan

sempurna. Selanjutnya, tahapan terakhir pada PCR adalah tahap *hold* pada suhu 4°C dimana hasil PCR DNA dapat disimpan hingga jangka waktu tak terhingga. Skema proses PCR RAPD dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3 Skema Proses PCR RAPD

#### f. Elektroforesis Hasil PCR

Tahap elektroforesis hasil PCR tidak jauh berbeda dengan elektroforesis hasil isolasi DNA, yaitu pertama dengan menyiapkan *tray* atau cetakan gel agarose. Perbedaannya terdapat pada gel agarose yang dibuat dengan konsentrasi sebesar 1,4% sebanyak 30 mL dengan pelarut buffer TAE 1x. Tujuan peningkatan konsentrasi ini adalah agar separasi pita-pita DNA yang terbentuk saat proses PCR dapat terlihat lebih jelas. Larutan gel agarose dihomogenkan dengan menggunakan *microwave* hingga larutan terlihat bening. Setelah suhu larutan lebih hangat  $\pm 60^{\circ}\text{C}$ , larutan gel agarose ditambahkan dengan 0,8  $\mu\text{L}$  pewarna *Peq Green* dan diaduk perlahan, kemudian dituangkan ke dalam *tray* yang sudah dipasang sisir yang membentuk 15 sumur. Selanjutnya gel dibiarkan mengeras pada suhu ruang. Hasil PCR yang akan dielektroforesis disiapkan sebanyak 4  $\mu\text{L}$  dan ditambahkan dengan *loading dye* sebanyak 1  $\mu\text{L}$ . Agar kemudian dimasukkan ke dalam *Electrophoresis Kit* yang sudah diisi buffer TAE 1x. Selanjutnya, *DNA Ladder* dan hasil PCR yang telah dicampurkan dengan *loading dye* dimasukkan ke dalam sumur pada gel. *DNA Ladder* yang digunakan adalah *GeneRuler 1 Kb DNA Ladder* dari Thermo Scientific. Berbeda dengan elektroforesis hasil isolasi DNA, pada elektroforesis hasil PCR, daya yang digunakan sebesar 45 volt selama 80 menit. Setelah proses

elektroforesis selesai, gel agarose kemudian diamati dibawah UV Transluminator dan didokumentasikan dengan kamera digital.

g. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan mengamati pita-pita yang dihasilkan dari gel elektroforesis hasil PCR. Ada dan tidak adanya pita-pita dari setiap sampel merupakan data yang kemudian dicatat dalam bentuk matriks. Jika pita DNA ada maka diberi nilai 1 sedangkan jika pita DNA tidak ada, diberi nilai 0. Data dalam bentuk matriks tersebut dikonversi untuk diolah menggunakan perangkat lunak SPSS dengan program PCA (*Principal Component Analysis*).

1) *Polymorphic Information Content* (PIC)

Penghitungan nilai *Polymorphic Information Content* (PIC) dilakukan untuk mengetahui tingkat efektifitas primer yang digunakan. Menurut De Riek *et al.* (2001), pada penanda dominan rentang nilai PIC adalah 0-0,5 dan nilai PIC dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$PIC = 1 - [f^2 + (1 - f)^2]$$

Keterangan:

f = frekuensi alel per data set

2) Klastering

Klastering dilakukan melalui analisis fenetik dan multivariat. Untuk analisis fenetik, matriks dikonversi untuk diolah menggunakan perangkat lunak MEGA 4 dengan program UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Aritmatic Average*). Program UPGMA menghasilkan pohon kekerabatan atau disebut juga dendogram. Dendogram dibangun dari koefisien ketidaksamaan berdasarkan jarak Euclidean (Sokal & Sneath, 1973), dengan rumus berikut:

$$e_{jk} = \left[ \sum_{i=1}^n (X_{ij} - X_{ik})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

Keterangan:  $e_{jk}$  = jarak Euclidean antara sampel j dan k

$n$  = jumlah karakter

$X_{ij}$  = nilai sampel j terhadap karakter ke-i

$X_{ik}$  = nilai sampel k terhadap karakter ke-i

Matriks yang sama juga digunakan untuk dilakukan *principal component analysis* (PCA) dengan menggunakan perangkat lunak SPSS 16.0

### 3) Aliran Gen

Perhitungan aliran gen dapat dilakukan dengan program POPGENE 32. Aliran gen ( $N_m$ ) diestimasi dari nilai  $G_{st}$  dari setiap lokus (Nei, 1973). Perhitungan gen ( $N_m$ ) dengan menggunakan rumus:

$$N_m = 0,5 \times \frac{(1 - G_{st})}{G_{st}}$$

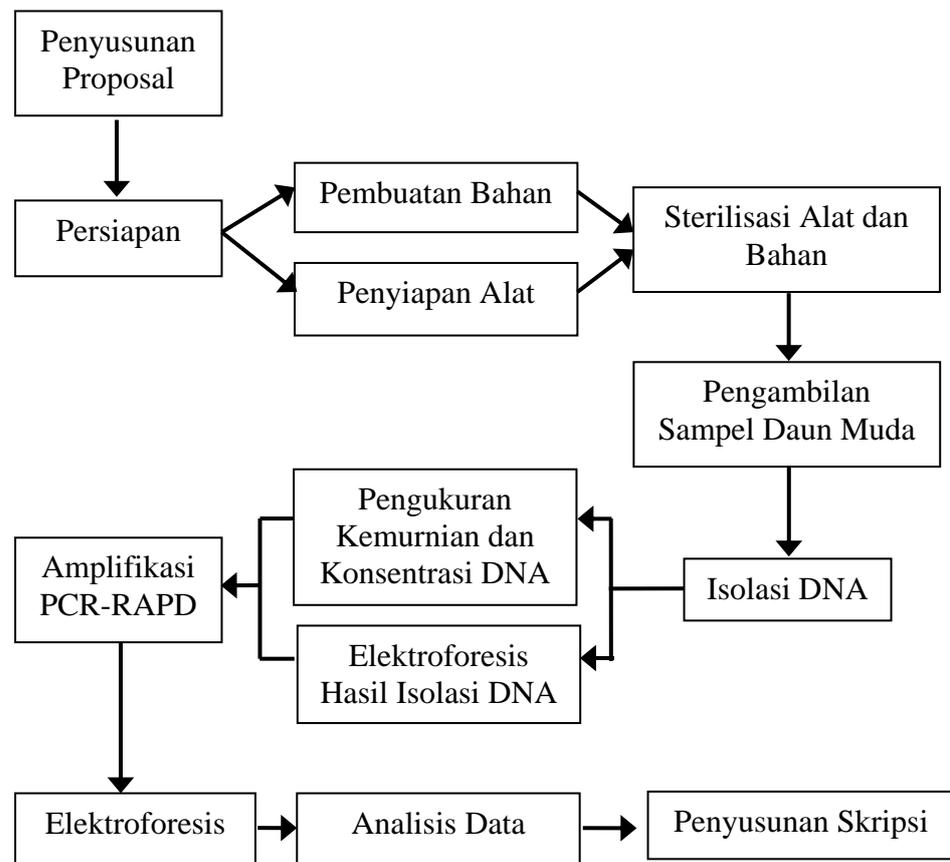
Keterangan:

$N_m$  = aliran gen

$G_{st}$  = koefisien variasi genetik antarpopulasi

### h. Alur Penelitian

Adapun bagan alur penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.4.



Gambar 3.4 Bagan Alur Penelitian