

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Jenis penelitian pada penelitian ini adalah jenis penelitian deskriptif. Pada penelitian ini dilakukan observasi langsung terhadap peristiwa alam yang terjadi untuk mendapatkan informasi mengenai variasi genetik tanaman Ciplukan (*P. angulata* L.) yang berada di daerah Bandung dan sekitarnya. Informasi variasi genetik tanaman Ciplukan dianalisis dengan menggunakan penanda molekuler *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD). Ciplukan dianalisis dengan menggunakan primer acak OPA 09 dan OPA 10.

#### **B. Populasi dan Sampel**

Populasi yang diambil untuk penelitian ini adalah populasi tanaman Ciplukan (*P. angulata* L.) yang terdapat di wilayah Bandung dan sekitarnya. Sampel yang digunakan untuk analisis variasi genetik berasal dari lima subpopulasi tanaman Ciplukan yang mewakili daerah Bandung dan sekitarnya. Total sampel yang digunakan sebanyak 23 sampel. Setiap subpopulasi terdiri atas tiga sampai enam individu yang tertera pada Tabel 3.1 dan lokasi pengambilan sampel dipetakan pada Gambar 3.1.

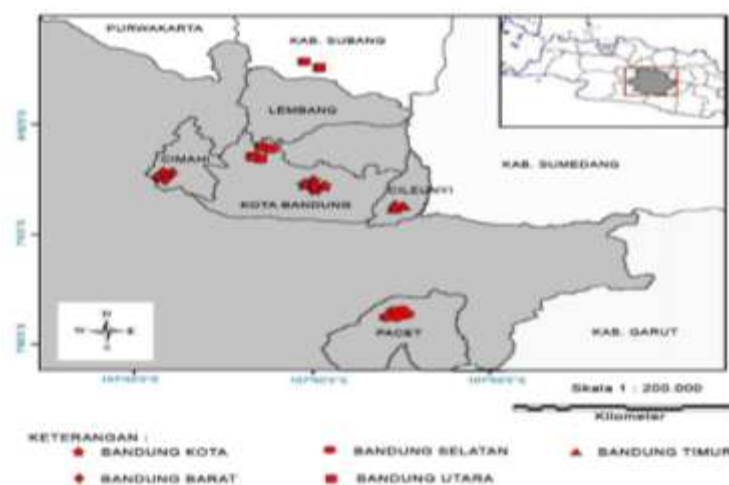
Teknik pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling*. Sampel diambil dari lokasi berbeda, yang dapat merepresentasikan wilayah Bandung dan sekitarnya. Penentuan lokasi pengambilan sampel berdasarkan perbedaan rona lingkungan yang dapat merepresentasikan wilayah Bandung dan sekitarnya. Pengambilan sampel dilakukan pada lokasi Bandung bagian utara, timur, barat, selatan, dan Bandung tengah. Setiap individu diberi kode untuk memudahkan dalam proses penelitian dan analisis data. Kode individu diberi nomor 1 sampai 23 yang berurutan sesuai dengan daerah pengambilan sampel.

Tabel 3.1 Lokasi Pengambilan Sampel

Daerah	Lokasi Individu	Kode Individu
Bandung Bagian Utara	Kompleks Pondok Hijau	1
	Kompleks Pondok Hijau	2
	Cihideung	3
	Cihideung	4
	Ciater	5
	Ciater	6
Bandung Bagian Timur	Kompleks Bumi Harapan Cibiru	7
	Kompleks Bumi Harapan Cibiru	8
	Kompleks Bumi Harapan Cibiru	9
Bandung Kota	Tegalega	10
	Tegalega	11
	Tegalega	12
	Tegalega	13
	Tegalega	14
Bandung Bagian Selatan	Pacet	15
	Pacet	16
	Pacet	17
	Pacet	18
	Pacet	19
Bandung Bagian Barat	Cibaligo	20
	Cibaligo	21
	Cibaligo	22
	Cibaligo	23

### C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian mengenai analisis variasi genetik tanaman Ciplukan diawali dengan tahap pengambilan sampel. Berikut ini lokasi pengambilan sampel dapat digambarkan seperti peta dibawah ini:



Shela Nurul Nadia, 2017

MENGUJI VARIASI GENETIK TANAMAN OBAT CIPLUKAN (*Physalis angulata* L.) DI BANDUNG MENGGUNAKAN RAPD PRIMER OPA 09 DAN OPA 10

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

### Gambar 3.1 Peta Lokasi Pengambilan Sampel

Lokasi pengambilan Kota Bandung sebagai pusat, Kabupaten Subang sebagai wilayah bagian utara dari Kota Bandung, Kota Cimahi sebagai wilayah bagian timur dari Kota Bandung, Cileunyi sebagai bagian barat dari Kota Bandung, dan Pacet sebagai bagian selatan dari Kota Bandung.

Waktu untuk pelaksanaan isolasi DNA, amplifikasi DNA, uji kualitatif dan kuantitatif DNA dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga bulan April 2017.

#### D. Alat dan Bahan

Daftar alat dan bahan yang digunakan untuk penelitian tertera pada lampiran. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini tersedia di Laboratorium Riset Bioteknologi FPMIPA UPI.

#### E. Prosedur Penelitian

##### 1. Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan ini seluruh alat berbahan kaca, mortar dan alu, spatula, serta alat berbahan plastik dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Selanjutnya, alat yang telah di cuci kemudian di bungkus dengan menggunakan plastik tahan panas untuk dilakukan sterilisasi dengan menggunakan *Autoclave*. Proses sterilisasi dengan *Autoclave* dilakukan selama 15 menit pada suhu 121°C.

##### 2. Tahap Penelitian

###### a. Pengambilan Sampel

Sampel berasal dari daerah Bandung dan sekitarnya. Sampel tanaman Ciplukan merupakan tanaman yang telah digunakan pada penelitian Yosnata (2016) dan Wulandari (2016). Pemilihan sampel yang sama dilakukan untuk memverifikasi penelitian sebelumnya dengan perbedaan menggunakan primer acak OPA 09 dan OPA 10.

## b. Isolasi DNA

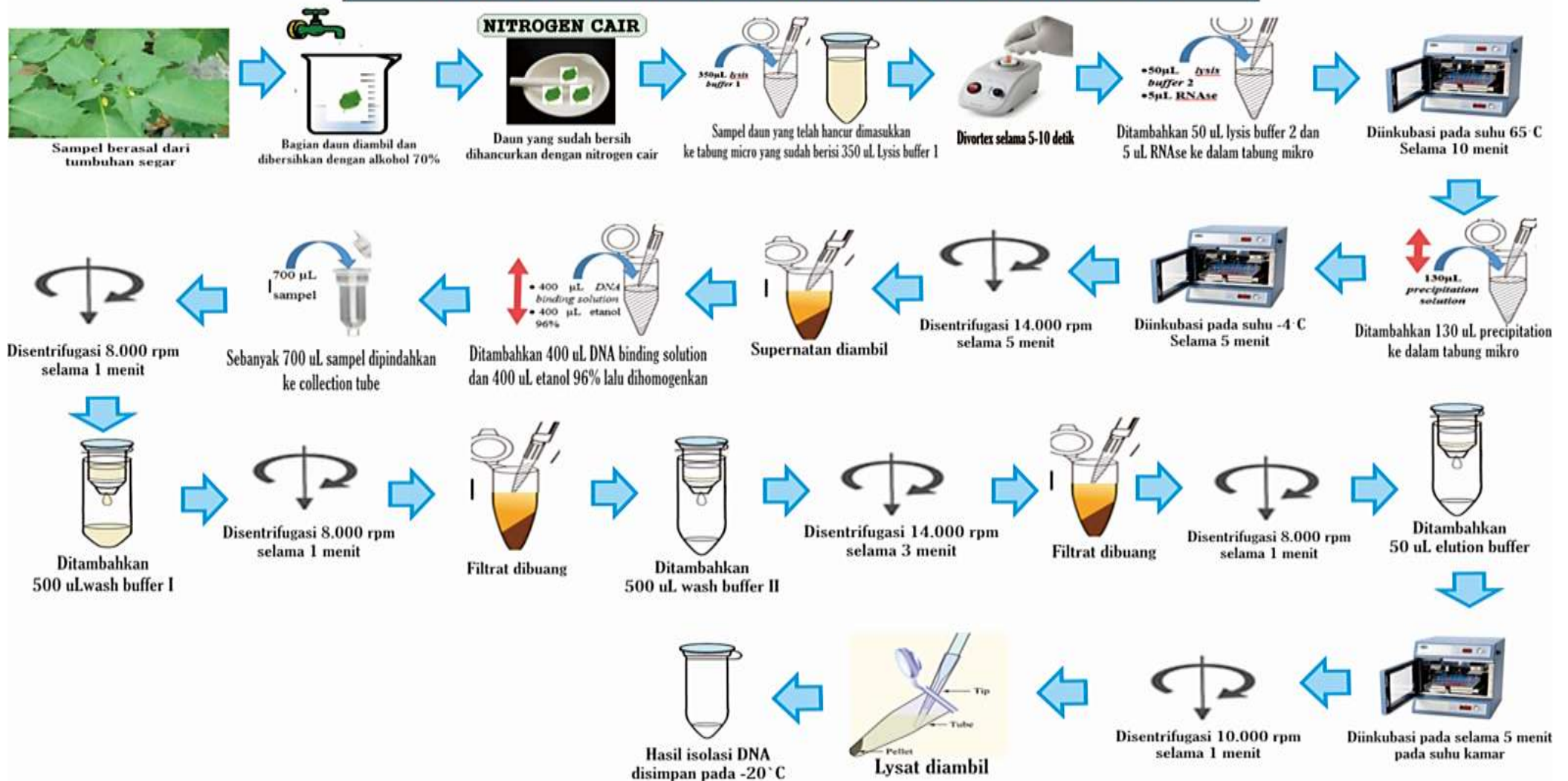
Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan bahan dari *GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit*. Prosedur yang dilakukan sama dengan prosedur yang tersedia di dalam kit. Langkah pertama, daun diletakan di atas mortar kemudian ditambahkan dengan nitrogen cair. Fungsi dari nitrogen cair ini untuk memudahkan dalam menghancurkan daun, nitrogen cair ini memiliki fungsi untuk menjaga DNA pada sampel tanaman tetap utuh. Setelah diberikan nitrogen cair, daun kemudian dihaluskan dengan menggunakan lumpang dan alu. Proses ini dilakukan dengan cepat karena sifat nitrogen cair yang cepat menguap. Daun yang sudah halus kemudian dimasukkan ke dalam mikrotube 1,5 mL yang telah berisi 350 $\mu$ L *lysis buffer* 1. Sampel tersebut kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex selama 10-20 detik. Setelah sampel homogen, sampel ditambahkan dengan 50 $\mu$ L *lysis buffer* 2 dan 5 $\mu$ L RNase. Sampel yang telah ditambahkan *lysis buffer* 2 dan RNase kemudian diinkubasi selama 10 menit pada waterbath suhu 65°C. Selanjutnya, ditambahkan 130  $\mu$ L *precipitation solution* untuk mengendapkan debris-debris sel kemudian sampel yang telah ditambahkan dengan *precipitation solution* dihomogenkan dengan cara dibolak-balik dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu -4°C di dalam freezer. Langkah selanjutnya adalah sampel disentrifugasi dengan kecepatan 14000rpm selama 5 menit. Dari hasil sentrifugasi tersebut, supernatan yang terlihat diambil dengan menggunakan mikropipet lalu dipindahkan mikrotube yang baru. Supernatan kemudian ditambahkan dengan *DNA binding solution* sebanyak 400  $\mu$ L dan etanol dingin 96% sebanyak 400  $\mu$ L, lalu dihomogenkan.

Sampel diambil sebanyak 700  $\mu$ L kemudian dimasukkan ke dalam *filter column* yang terpasang pada *collection tube*. *Filter column* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit.

Filtrat yang tertampung hasil dari sentrifugasi pada *collection tube* kemudian dibuang. Selanjutnya, *wash buffer 1* dimasukkan ke dalam *filter column* sebanyak 500  $\mu\text{L}$  dan disentrifugasi dengan kecemasan 8000 rpm selama 1 menit, filtrat yang tertampung kemudian dibuang. Setelah filtrat dibuang *wash buffer 2* kemudian dimasukkan ke dalam *filter column* sebanyak 500  $\mu\text{L}$ , dan disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14000 rpm, kemudian filtrat yang tertampung dibuang. Kemudian dilakukan sentrifugasi ulang selama 1 menit pada kecepatan 14000 rpm untuk memastikan *wash buffer 2* tidak tersisa.

*Collection tube* yang terdapat pada *filter column* diganti dengan microtube yang baru. Sampel DNA yang terdapat pada *filter column* dilarutkan dengan menambahkan 50  $\mu\text{L}$  *elution buffer* tepat dibagian tengah filter kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit. Kemudian dilakukan sentrifugasi 10000 rpm selama 1 menit, setelah selesai sampel DNA akan tertampung pada microtube.

## ISOLASI DNA CIPLUKAN MENGGUNAKAN KIT GENEJET PLANT GENOMIC DNA PURIFICATION KIT



Gambar 3.2 Alur Isolasi DNA menggunakan *GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit*

(Sumber : Dokumentasi Pribadi, 2017)

Shela Nurul Nadia, 2017

MENGUJI VARIASI GENETIK TANAMAN OBAT CIPLUKAN (*Physalis angulata* L.) DI BANDUNG MENGGUNAKAN RAPD PRIMER OPA 09 DAN OPA 10

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

### c. Uji Kuantitatif Hasil Isolasi DNA

Uji kuantitatif hasil isolasi DNA dihitung dengan menggunakan spektrofotometri. Perhitungan yang dilakukan pada penelitian ini dengan menghitung konsentrasi dan kemurnian hasil isolasi DNA. Adapun langkah kerja yang akan dilakukan dimulai dengan sampel DNA yang diencerkan dengan tingkat pengenceran 500 kali. Pengenceran dilakukan dengan cara menambahkan 1  $\mu\text{L}$  DNA dengan 499  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O yang kemudian dihomogenkan. Hasil pengenceran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kuvet micro khusus untuk DNA. Sebelum dimasukkan ke dalam mesin spektrofotometri, kuvet di bersihkan dengan menggunakan kertas lensa. Perhitungan dengan spektrofotometri menggunakan absorbansi dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNA digunakan rumus sebagai berikut:

Kemurnian DNA	$= \frac{A_{260}}{A_{280}}$
Konsentrasi DNA	$= A_{260} \times 50 \times \text{faktor penenceran}$

Keterangan :

$A_{260}$  : Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

$A_{280}$  : Nilai absorbansi pada panjang gelombang 280 nm

50 : Nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50  $\mu\text{g}$  untai ganda DNA per mL

### d. Uji Kualitatif Hasil Isolasi DNA

Uji kualitatif DNA dilakukan dengan melakukan elektroforesis DNA. Elektroforesis DNA dilakukan untuk mengetahui ketebalan DNA. Langkah pertama yang dilakukan dalam elektroforesis hasil isolasi DNA adalah dengan membuat gel agarosa yang memiliki konsentrasi 1% dalam volume 30 mL. Gel agarose ini dilarutkan

dengan menggunakan buffer TAE 1X. Homogenisasi dilakukan dengan menggunakan microwave. Setelah agarose larut, 0,8  $\mu\text{L}$  *Peq Green* ditambahkan ke dalam agarose ketika suhu agarose mencapai 65-55°C. Setelah ditambahkan *Peq Green* ke dalam agarose yang kemudian diaduk perlahan sampai homogen. Agarose yang sudah homogen dituangkan ke dalam tray yang telah dipasang *well forming comb*. Setelah agarose mengeras selama kurang lebih 15-20 menit, *well forming comb* dicabut secara perlahan-lahan. Tray dan agarose diletakan pada mesin elektroforesis chamber, kemudian dituangkan TAE 1x hingga gel agarose terendam.

Pengujian kualitatif hasil isolasi DNA ini dilakukan dengan mengambil sampel DNA sebanyak 2  $\mu\text{L}$  yang dicampurkan dengan 1  $\mu\text{L}$  *loading dye*. Setelah itu, campuran *loading dye* dan sampel dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarose yang sudah berada di mesin *elektroforesis chamber*. Proses elektroforesis dilakukan selama 25 menit dengan tegangan 100 volt dan kuat arus sebesar 400 mA. Setelah itu, hasil elektroforesis diamati dengan menggunakan Tranluminator UV. Hasil elektroforesis isolasi DNA didokumentasikan dengan menggunakan kamera.

#### e. PCR-RAPD

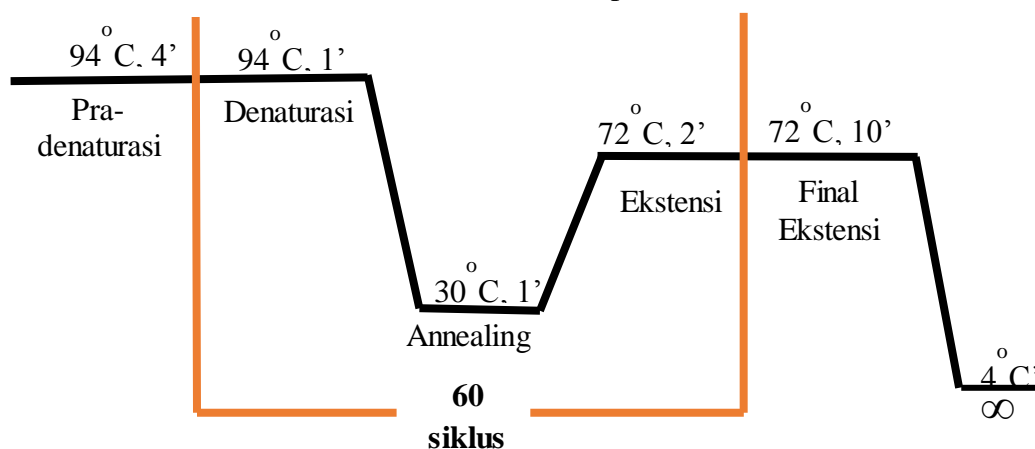
Perbanyakan atau amplifikasi DNA dengan metode PCR-RAPD dilakukan dengan menggunakan primer OPA16 dan OPA10. Alat yang dibutuhkan untuk amplifikasi DNA adalah mesin *thermocycler* dengan program *gene amplified PCR system 9700*. Beberapa komponen yang ditambahkan untuk PCR adalah *Dream Taq Green*, primer, DNA template, dan ddH<sub>2</sub>O dengan volume 10  $\mu\text{L}$  dalam tabung PCR. Berikut ini adalah komposisi dari *Master Mix PCR* yang digunakan:



Tabel 3.2 Komposisi Reaksi PCR

Komposisi PCR	Konsentrasi Awal/Stok	Konsentrasi Akhir	Volume Akhir
<i>Dream Taq Green PCR Master Mix</i>	2x	1x	7,5 $\mu\text{L}$
Primer	200 $\mu\text{M}$	100 $\mu\text{M}$	0,6 $\mu\text{L}$
Sampel DNA	100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,45 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	3 $\mu\text{L}$
<i>Nuclease-free water</i>	-	-	3,9 $\mu\text{L}$
Jumlah			15 $\mu\text{L}$

Proses amplifikasi berlangsung diawali dengan denaturasi dengan suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama 4 menit, dilanjutkan dengan 60 siklus yang terdiri atas tahapan denaturasi  $94^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, annealing  $30^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, dan ekstensi  $72^{\circ}\text{C}$  selama 2 menit. Setelah 60 siklus selesai, dilanjutkan dengan ekstensi akhir pada suhu  $72^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Setelah selesai, suhu diatur untuk bertahan pada  $4^{\circ}\text{C}$ .

Gambar 3.3 Program PCR-RAPD Ciplukan (*P. angulata* L.)

#### f. Elektroforesis Hasil PCR

Hasil amplifikasi kemudian di elektroforesis. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan agarose 2% sebanyak 30 mL yang mengandung 0,8  $\mu\text{L}$  *Peq green*. Amplikon hasil PCR sebanyak 4  $\mu\text{L}$  dicampurkan dengan 1  $\mu\text{L}$  loading dye yang kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarose.

*Thermo Scientific Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* yang telah diencerkan 6 kali dengan volume sebanyak 3  $\mu\text{L}$  digunakan sebagai pembanding fragmen DNA. Pengenceran dilakukan dengan mencampurkan DNA ladder, loading dye, serta ddH<sub>2</sub>O dengan perbandingan 1 : 1 : 4. Proses elektroforesis dilakukan dengan menggunakan buffer TAE. Tegangan yang diberikan 45 volt selama 80 menit. Hasil elektroforesis kemudian diamati dengan menggunakan Transluminator UV.

### 3. Tahap Analisis Data

Data diperoleh dari pita-pita yang dihasilkan dari hasil elektroforesis hasil PCR. Keberadaan pita pada agarose menjadi sumber data utama. Setiap larik pita dalam agarose dikonversikan ke dalam matriks untuk memudahkan dalam intepretasi hasil. Matriks ini yang kemudian dapat dianalisis. Matriks data ini memiliki arti, jika terdapat satu larik pita pada lokus tertentu mendapatkan poin 1, sebaliknya jika tidak terdapat pita maka mendapatkan poin 0 (Kasture *et al.*, 2016).

#### a. *Polymorphic Informatic Content (PIC)*

*Polymorphic Informatic Content (PIC)* merupakan suatu perhitungan untuk mengetahui efektifitas primer yang digunakan. Kisaran nilai PIC 0 – 0,5 dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{PIC} = 1 - [f^2 + (1-f)^2]$$

Keterangan:

f : frekuensi alel pada data set

Nilai PIC dijadikan standar untuk mengevaluasi marka genetik berdasarkan pita DNA hasil PCR. Nilai PIC dibagi menjadi tiga kelas yaitu:

1. Kelas 1, PIC > 0,5 tingkat informatifnya paling tinggi,
2. Kelas 2, 0,25 > PIC > 0,5 tingkat informatifnya sedang,
3. Kelas 3, PIC < 0,25 tingkat informatifnya rendah.

(Carsono *et al.*, 2014)

b. *Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*  
(UPGMA)

Analisis UPGMA dilakukan untuk klastering fenetik. Frekuensi alel dikonversi menjadi urutan basa di dalam file notepad. Jika terdapat pita DNA diberikan simbol A, sedangkan jika tidak terdapat pita DNA diberikan simbol T. File notepad dalam bentuk *.srt* kemudian dilakukan proses *alignment* dengan bantuan perangkat lunak Clustal X2. File notepad dalam bentuk *.srt* kemudian dikonversi menjadi format nexus (*.nxs*).

Analisis UPGMA dilakukan dengan bantuan perangkat lunak MEGA4. Pada MEGA4 dimasukan file berupak format nexus yang sebelumnya telah dikonversikan ke dalam bentuk mega (*.meg*). Pada perangkat MEGA4 terdapat menu *Construct Phylogeny* dan submenu UPGMA yang menghasilkan pohon kekerabatan atau disebut dengan dendogram. Analisis data yang dilakukan masing-masing berasal dari hasil amplifikasi primer acar OPA 09, OPA 10, dan data gabungan yang berasal dari primer acark OPA 09 dan OPA 10.

c. *Principal Component Analysis (PCA)*

*Principal Component Analysis (PCA)* merupakan suatu cara untuk menganalisis data sebaran individu yang mendukung hasil dari analisa UPGMA. Analisis PCA dilakukan dengan menggunakan data dari kedua primer secara terpisah. Hal tersebut dilakukan untuk melihat klastering yang terjadi berdasarkan primer tersebut. Dilakukan pula analisis PCA pada data gabungan untuk melihat hasil secara umum. Analisis PCA dilakukan dengan bantuan perangkat lunak. Perangkat lunak yang digunakan adalah perangkat lunak IBM SPSS 22.

Matriks yang sama digunakan dalam analisis PCA. Data yang dimasukkan untuk analisis PCA adalah data matriks 0 dan 1 yang telah direduksi terlebih dahulu. Pada analisis PCA, alel monomorfik tidak diikutsertakan sebagai variabel dalam input data karena

memiliki nilai koefisien sama dengan 1. Setelah memasukan data, dipilih menu *Analyze* pada *taskbar* dan kemudian pilih sub menu *Factor Reduction*. Jumlah faktor yang akan diekstrak ditentukan dengan kriteria eigenvalue > 0. Konversi data untuk setiap faktor harus disimpan dalam bentuk regresi. Cara penyimpanan dengan membuka pilihan *Score* pada kotak dialog *Factor Reduction* dan dipilih *Save As Regression*.

Hasil PCA yang menghasilkan faktor dengan persentase tertinggi dipilih untuk analisis selanjutnya dengan menggunakan *Principal Coordinate Analysis (PCoA)*. PCoA dilakukan untuk melihat sebaran pengelompokan individu berdasarkan faktor dengan persentase tertinggi yang dipilih sebelumnya. PCoA menyajikan data konversi hasil PCA ke dalam bentuk scatter plot dalam bentuk tiga dimensi.

#### d. Aliran Gen

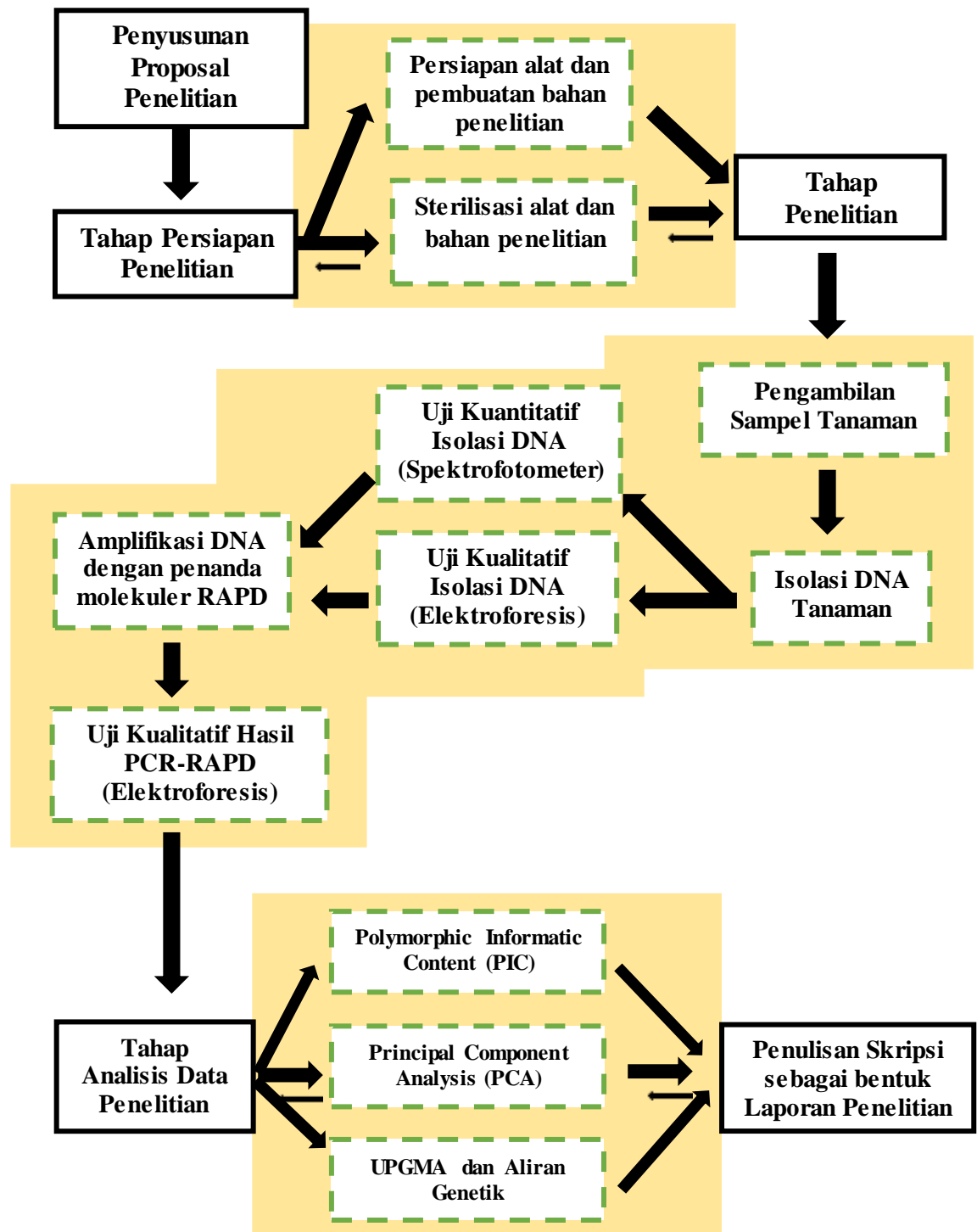
Aliran gen dapat diperkirakan dengan cara menghitung *Number of Migrants per generation (Nm)*. Nilai Nm diperoleh dari perhitungan nilai koefisien diferensiasi ( $G_{st}$ ) berdasarkan frekuensi alel (Nei, 1973). Nilai  $G_{st}$  dan N dihitung dengan menggunakan perangkat lunak POPGEN 32. Nilai Nm > 1 menandakan aliran gen cukup tinggi artinya dapat mencegah terjadinya diferensiasi akibat hanyutan gen. Nilai Nm < 1 menandakan aliran gen dan populasi cenderung berdiferensiasi (Wright, 1931). Rumus manual dalam menghitung aliran genetik adalah sebagai berikut:

$$Nm = \frac{0,5 (1 - G_{st})}{G_{st}} \quad (\text{Nei, 1937})$$

Keterangan : Nm : Estimasi aliran gen

$G_{ST}$  : Koefisien diferensiasi

## F. Alur Penelitian



Gambar 3.4 Alur Penelitian Analisis Variasi Genetik Ciplukan

(Sumber : Dokumentasi pribadi, 2017)