BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif, penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung terhadap peristiwa alam dalam mendapatkan informasi mengenai variasi genetik Ciplukan (*P. angulata*). Data diperoleh dari DNA yang dianalisis variasinya menggunakan metode RAPD dengan primer OPB16 dan primer OPA18.

B. Populasi dan Sampel

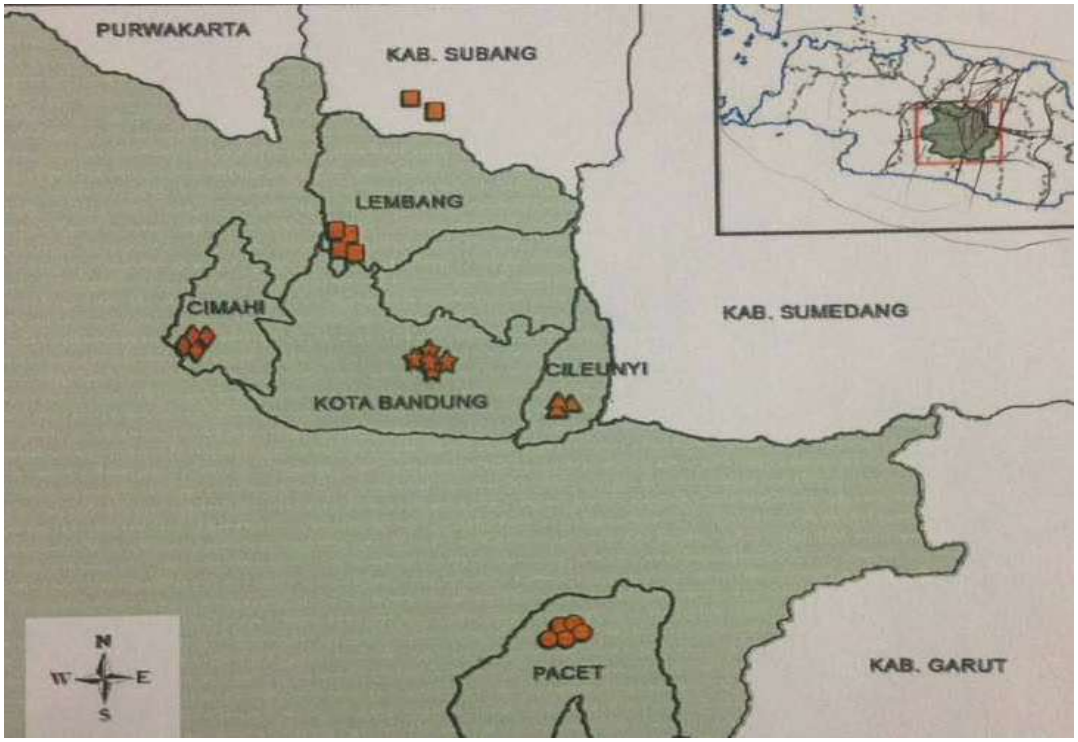
Populasi dalam penelitian ini adalah *Physalis angulata* yang berada di kawasan Bandung. Sedangkan sampel yang digunakan adalah sampel DNA dari lima subpopulasi Ciplukan *(P. angulata)* yang mewakili setiap daerah Bandung. Populasi Ciplukan di kawasan Bandung diwakili oleh lima subpopulasi yang terdiri dari tiga hingga enam individu yang tertera pada Tabel 3.1 dan dipetakan pada Gambar 3.1

Tabel 3.1 Populasi Ciplukan yang Dianalisis

Daerah	Lokasi Individu	Kode Individu
Bandung Utara	Komplek Pondok Hijau	1
	Komplek Pondok Hijau	2
	Cihideung	3
	Cihideung	4
	Ciater	5
	Ciater	6
Bandung Timur	Komplek Bumi Harapan Cibiru	7
	Komplek Bumi Harapan Cibiru	8
	Komplek Bumi Harapan Cibiru	9
Bandung Kota	Tegalega	10
	Tegalega	11
	Tegalega	12
	Tegalega	13
	Tegalega	14

Tabel 3.1 Populasi Ciplukan yang Dianalisis (lanjutan)

Bandung Selatan	Pacet	15
	Pacet	16
	Pacet	17
	Pacet	18
	Pacet	19
Bandung Barat	Cibaligo	20
	Cibaligo	21
	Cibaligo	22
	Cibaligo	23



Gambar 3.1 Peta Lokasi 23 Sampel Ciplukan di Bandung dan Sekitarnya

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian merupakan suatu tempat dimana penelitian dilakukan. Adapun penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian Bioteknologi Fakultas Pendidikan Indonesia dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia. Waktu yang dilakukan dalam penelitian ini selama

bulan Februari 2017 di mulai pada saat persiapan alat dan bahan yang akan digunakan hingga selesai.

D. Alat dan Bahan

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

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

Seluruh alat berbahan kaca, plastik, mortar, alu, dan spatula yang digunakan dalam penelitian dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Kemudian dibungkus dengan platik tahan panas dan dimasukan kedalam autoklaf. Begitu juga bahan yang akan digunakan dimasukan kedalam autoklaf. Alat-alat dan bahan tersebut distreilisasi pada suhu 121^0C tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Pembuatan larutan tercantum pada Lampiran.

2. Tahap Penelitian

a. Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun muda dari tanaman ciplukan. Ciplukan yang ditemukan terlebih dahulu diidentifikasi berdasarkan morfologinya dan didokumentasikan. Kemudian daun-daun muda Ciplukan diambil, kemudian dibersihkan dengan alkohol 70% dandimasukan kedalam plastik yang telah diberi label dan dimasukkan kedalam *coolbox* yang sudah diisi dengan es batu sebelumnya agar daun tetap segar, perlakuan tersebut dalam keadaan tangan memakai sarung tangan karet. Kemudian di dalam laboratorium daun muda tersebut disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20^0C untuk penyimpanan jangka panjang.

b. Isolasi DNA

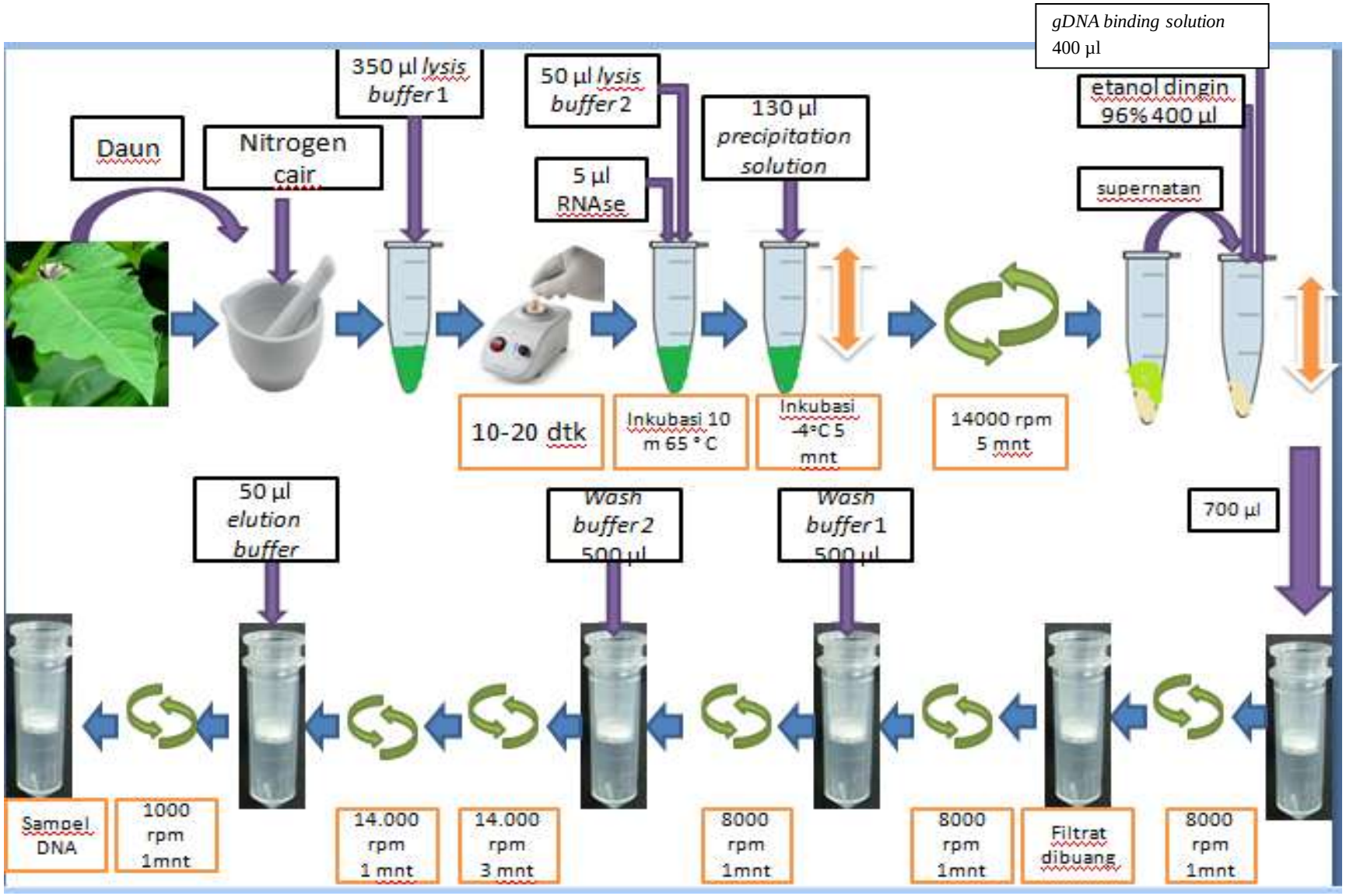
Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan bahan dari *GeneJET Plant Genomics DNA Purification Kit*. Prosedur isolasi DNA mengikuti protocol yang tersedia dalam kit, namun dengan sedikit modifikasi yaitu pada jumlah RNAse dan *elution buffer*.

Daun diletakan di atas mortar kemudian ditambahkan nitrogen cair agar daun mudah dihancurkan karena nitrogen cair dapat menonaktifkan metabolisme, terutama enzim DNAse. Daun tersbut dihaluskan dengan cepat menggunakan alu sebelum nitrogen cair menguap. Daun yang sudah halus dan berbentuk serbuk dimasukan dengan menggunakan spatula ke dalam mikrotube yang telah berisi 350 µl *lysis buffer* 1. Sampel yang berada dalam mikrotube kemudian dihomogenkan menggunakan vortex selama 10 sampai 20 detik. Sampel ditambahkan dengan 50 µl *lysis buffer* 2 dan 5 µl RNAse, kemudian diinkubasi pada suhu 65^{o}C menggunakan waterbath selama 10 menit. Untuk mengendapkan debris-debris sel, ditambahkan 130 µl *precipitation solution* kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak-balik membentuk angka 8 dan kemudian diinkubasi pada suhu -4^{o}C dalam freezer selama 5 menit. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi, supernatan diambil secara hati-hati dan dipisahkan ke dalam mikrotube baru. Supernatan ditambahkan dengan *gDNA binding solution* sebanyak 400 µl dan etanol dingin 96% sebanyak 400 µl, kemudian dihomogenkan.

Kemudian sampel diambil sebannyak 700 µl dan dimasukan kedalam *filter column* yang terpasang pada *collection tube. Filter column* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Setelah disentrifugasi, filtrate yang tertampung pada *collection tube* dibuang. Sisa sampel yang belum disentrifugasi dimasukan ke

dalam *filter column* yang sama dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit, filtrate yang tertampung kemudian dibuang. *Wash buffer* 1 dimasukan ke dalam *filter column* sebanyak 500 µl, disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit, filtrate yang tertampung kemudian dibuang. *Wash buffer* 2 dimasukan ke dalam *filter column* sebanyak 500 µl, disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit, filtrate yang tertampung kemudian dibuang. Untuk memastikan seluruh *wash buffer* 2 tidak tersisa pada filter, dilakukan snetrifugasi ulang dengan kecepatan 14000 rpm selama 1 menit.

Collection tube yang terdapat pada *filter column* diganti dengan mikrotube baru. Sampel DNA yang terdpat pada *filter column* diarutkan dengan menambahkan 50 µl *elution buffer* tepat dibagian tengah filter kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit.Dilakukan sentrifugasi 10000 rpm selama 1 menit, setelah sentrifugasi sampel DNA tertampung pada mikrotube. Untuk mendapatkan sisa DNA yang masih terdapat pada filter, *filter column* dipindahkan ke microtube baru dan dilakukan penambahan *elution buffer*, inkubasi, dan sentrifugasi seperti langkah sebeumnya.



Gambar 3.2 Skema isolasi DNA

c. Mengukur kemurnian dan Konsentrasi DNA

Pengukuran kemurnian serta kensentrasi sampel DNA dilakukan dengan cara spektrofotometri. Sampel DNA diencerkan dengan tingkat pengenceran 500 kali. Pengenceran dilakukan dengan cara menambahkan 1 µl DNA dengan 499 µl ddH_2O kemudian dihomogekan. Hasil pengenceran tersebut sebanyak 500 µl dimasukan kedalam kuvet mikro dan absorbansi dihitung menggunakan spektrofotometer. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 260 nm serta 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. Kemurnian dan konsentrasi DNA dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

Kemurnian DNA = $\frac{Å260}{Å280}$

Kemudian untuk menghitung konsentrasi DNA, digunakan rumus berikut:

Konsentrasi DNA = Å260 x 50 x faktor pengenceran

Keterangan:

Å260 : Nilai absorbansi pada 260 nm

Å280 : Nilai absorbansi pada 280 nm

50 : Nilai absorbansi 1,0 sebangun dengan 50 µg untai ganda DNA per ml

d. Elektroforesis Hasil Isolasi DNA

Hasil isolasi DNA diuji secara kualitatif melalui elektroforesis untuk melihat ketebalan DNA. Sebelum ketahap elektroforesis, terlebih dahulu dibuat gel agarose dengan konsentrasi 1% yang dilarutkan dengan menggunakan buffer TAE hingga 30 ml.

Selanjutnya agarose dilarutkan dengan cara dipanaskan menggunakan *microwave* dengan waktu yang bertahap selama 60 detik. Setelah larut, agarose di diamkan hingga suhunya turun mencapai 55-65 ^{o}C lalu ditambahkan 0,8 µl *Peq Green* ke dalam agarose dan diaduk perlahan menggunakan batang pengaduk agar homogen. Agarose kemudian dituangkan ke atas *tray* dan dipasang *well forming comb*.Setelah gel agarose mengeras selama 30 menit, *well forming comb* dicabut.*Tray* beserta gel agarose diletakan pada elektroforesis *chamber*, kemudian dituangkan TAE 1x hingga gel agarose terendam. Sampel DNA sebanyak 2 µl dicampurkan dengan 1 µl *loading dye* dihomogenkan dengan teknik pipetting kemudian dimasukan kedalam sumur pada gel agarose. Proses elektroforesis dilakukan dengan menggunakan tegangan 100 volt dan kuat arus 400 ampere selama 25 menit. Kemudian DNA hasil elektroforesis diamati pada UV transiluminator dan didokumentasikan.

e. PCR-RAPD

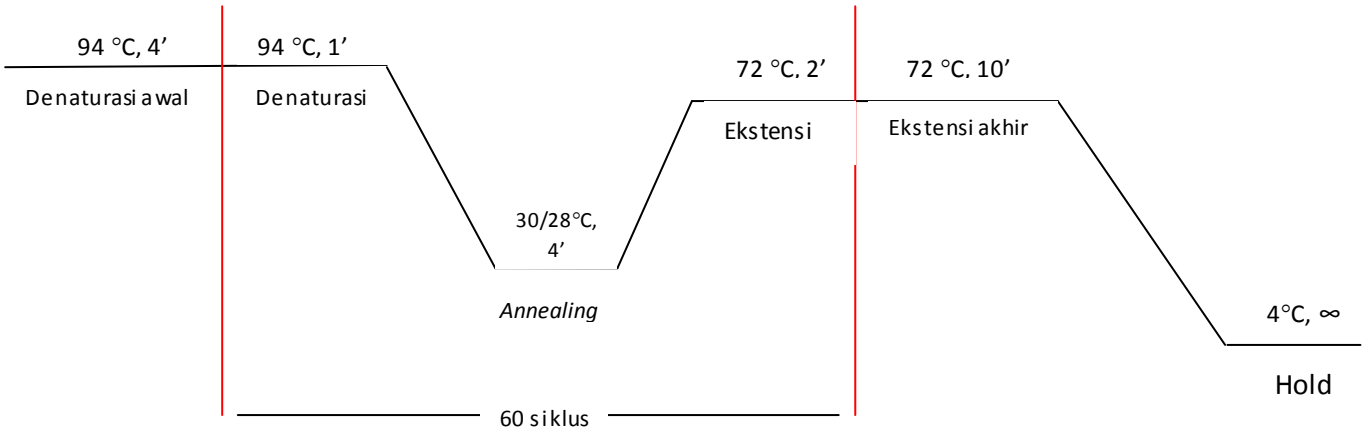
Amplifikasi menggunkaan metode PCR-RAPD dilakukan dengan menggunakan beberapa primer yang telah diseleksi pada penelitian ini yaitu OPB16 dan OPB18. Pencampuran komponen reaksi PCR dilakukan secara cepat dan berhati-hati. Semua proses pencampuran dilakukan didalam *coolbox* untuk menjaga agar komponen reaksi PCR tidak rusak.

Alat yang digunakan untuk proses amplifikasi adalah mesin *thermocycler* dengan program *Gene Amplified PCR System* 9700. Beberapa komponen yang digunakan untuk PCR adalah Dream*Taq*Green, primer, DNA template dan ddH_2O dengan volume total 15 µl dalam tabung PCR. Komposisi reaksi PCR tertera pada Tabel 3.2 berikut.

Tabel 3.2 Komposisi Reaksi PCR

Komposisi PCR	Konsentrasi Awal/Stok	Konsentrasi Akhir	Volume Akhir
Dream*Taq*Green PCR Master Mix	2x	1x	7,5 µL
Primer	100 µM	0,27 µM	0,6 µL
Sample DNA	100 µg/µl	0,45 µg/µl	3 µL
Nuclease-free water	-	-	3,9 µL
Jumlah			15 µL

Proses amplifikasi berlangsung dengan program denaturasi awal dengan suhu 94^{o}C selama 4 menit, dilanjutkan dengan 60 siklus yang terdiri dari tahapan denatuasi 94^{o}C selama 1 menit, *annealing* 30-28^{o}C selama 1 menit, dan ekstensi 72^{o}C selama 2 menit. Setelah 60 siklus tersebut selesai, dilanjutkan dengan ekstensi akhir pada suhu 72^{o}C selama 10 menit dan setelah selesai suhu diatur untuk bertahan pada suhu 4^{o}C. Bagan program suhu pada proses amplifikasi dapat dilihat pada gambar 3.3



Gambar 3.3 Program PCR-RAPD Ciplukan

f. Elektroforesis Hasil PCR

Amplikon yang didapat, diuji secara kualitatif dengan melakukan elektroforesis pada gel agarose dengan konsentrasi 2% yang dilarutkan dengan TAE 1x sebanyak 30 ml dan mengandung 0,8 µl *Peq Green*. Amplikon hasil PCR sebanyak 4 µl dicampurkan dengan 1 µl *loading dye*, kemudian dimasukan ke dalam sumur pada gel agarose. Sebagai pembanding ukuran fragmen DNA, digunakan *Thermo Scientific Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* yang telah diencerkan 6 kali dengan volume sebanyak 2 µl ke dalam sumur. Setelah itu, pengenceran DNA ladder di lakukan dengan mencampurkan DNA ladder, *loading dye*, serta ddH_2O dengan rasio 1 : 1 : 4. Proses elektroforesis dilakukan denggan mengunakan buffer TAE dan diberi tegangan 45 volt dan kuat arus 400 ampere selama 90 menit. Hasil elektroforesis diamati pada UV transimulator dan didokumentasikan.

g. Analisis Data

Analisis data molekuler dilakukan dengan melihat pita-pita DNA yang dihasilkan dari gel elektroforesis hasil PCR. Hasil pita-pita DNA mejadi dua kategori, yaitu pita monomorfik dan polimorfik. Ada atau tidak adanya pita-pita dari setiap sampel merupakan data yang kemudian dicatat dalam bentuk matriks. Matriks ini digunakan untuk beberapa analisis.Jika pita DNA ada maka diberi nilai 1, sedangkan jika pita DNA tidak ada, maka diberi nilai 0.

1) *Polymorphic Information Content*

Dilakukan penghitungan nilai *Polymorphic Information Content* (PIC) untuk mengetahui tingkat efektifitas primer yang digunakan. Primer dengan nilai PIC lebih dari 0,5 menunjukan keinformatifan yang sangat tinggi, sedangkan 0,5 – 0,25 dianggap cukup informatif, dan dibawah 0,25 dianggap kurang informatif

(Bostein *et al.*, 1980). Nilai PIC dihitung secara manual, tanpa menggukan perangkat lunak, dengan menggunakan rumus berikut:

$$PIC = 1 – [f^2 + (1-f)^2]$$

Keterangan:

f = frekuensi alel pada data set

2) *Unweighted Pair-Group Method with Aritmatic Average*

Untuk analisis klastering fenetik dengan metode *Unweighted Pair-group Method with Aritmatic Average* (UPGMA), matriks dikonversi menjadi urutan basa di dalam file notepad. Misalkan jika pita DNA ada ditulis A, sedangkan jika pita DNA tidak ada ditulis T. File notepad tersebut kemudian dikonversi menjadi format nexus (.nxs) dengan mengunakan perangkat lunak ClustalX2 kemudian diinput pada perangkat lunak MEGA 4, lalu data diolah dengan memilih program UPGMA. Progam UPGMA menghasilkan pohon kekerabatan atau yang disebut juga dendogram. Data yang dianalisis adalah data dari masing-masing hasil amplifikasi primer OPB16 dan OPA18 secara terpisah dan data gabungan dari dua primer sehingga diperoleh tiga dendogram.

3) *Principal Component Analysis* (PCA)

Principal Component Analysis (PCA) merupakan suatu cara untuk menganalisis data kekerabatan yang mendukung hasil dari analisa UPGMA. Matriks yang sama digunakan dalam analisis PCA. Apabila nilai Nm > 1 menandakan aliran gen yang cukup tinggi dan dapat mencegah terjadinya diferensisi akibat hanyutan gen. Perangkat lunak yang digunakan untuk analisis PCA adalah perangkat lunak IBM SPSS 20. Data yang dimasukkan untuk PCA menggunakan SPSS diambil dari data matriks 0-1 harus direduksi terlebih dahulu. Alel yang monomorfik tidak diikutsertakan

sebagai variable dalam data input karena memiliki nilai koefisien 1. Setelah memasukan data, kemudian analisis PCA dipilih dari menu *Analyze* dan dipilih sub menu Factor Reduction. Jumlah factor yang akan diekstrak ditentukan dengan kriteria eigenvalue > 0. Selain itu, konversi data untuk setiap faktor disismpan dalambentuk regresi dengan cara membuat opsi Score pada jendela Factor Reduction dan dipilih Save As Regression.

Kemudian dari hasil PCA tersebut maka dipilih tiga faktor yang memiliki persentase variasi tertinggi yang akan digunakan untuk analisis selanjutnya. *Principal Coordinate Analysis* (PcoA) dilakukan untuk melihat sebaran dan pengelompokan individu berdasarkan tiga faktor tersebut. PcoA dilakukan dengan menyajikan data konversi hasil PCA ke dalam bentuk scatter plot bentuk tiga dimensi.

PCA dilakukan dengan menggunakan data dari masing-masing primer secara terpisah untuk melihat klastering berdasarkan masing-masing primer. Meskipun demikian, PCA juga dilakukan terhadap data gabungan dari dua primer untuk melihat hasilnya secara general.

4) Aliran Gen

Aliran genetik diestimasi dengan cara mengestimasi *number of migrants per generation* (Nm). Nilai Nm diperoleh dari penghitungan nilai koefision diferensisasi (G_{ST}) berdasarkan frekuensi alel (Nei, 1973). Nilai G_{ST} dan Nm dihitung menggunakan perangkat lunak POPGEN 32.Nilai Nm > 1 menandakan aliran gen cukup tinggi dan dapat mencegah terjadinya diferensiasi akibat hanyutan gen. Nilai Nm < 1 menandakan rendahnya aliran gen dan populasi cenderung

berdiferensiasi. Adapun rumus penghitungan Nm yaitu sebagai berikut:

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

Keterangan : N_m : Estimasi aliran gen

G_{ST} : Koefisien diferensiasi

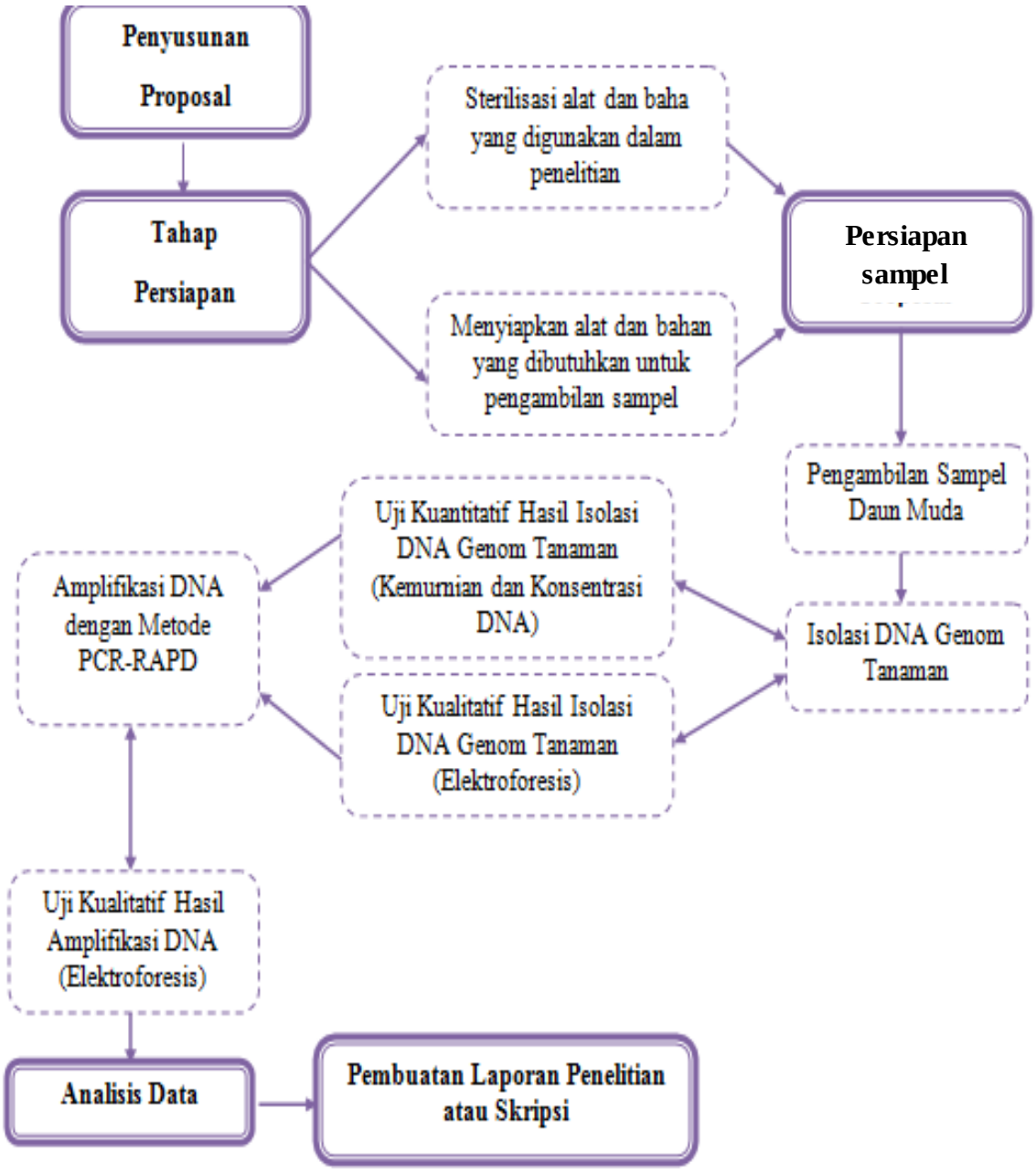
Koefisien diferensiasi (G_{ST}) dihitung dari perbandingan diversitas gen antar populasi dengan diversitas gen total dengan asumsi persamaan equilibrium Hardy-Weinberg (Nei, 1973).

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_t} = \frac{H_t - H_s}{H_t}$$

Keterangan : D_{ST} : Diversitas gen antar populasi H_s : Diversitas gen dalam populasi

H_t : Diversitas gen total

F. Alur Penelitian



Gambar 3.4 Bagan Alur Langkah-langkah Penelitian