

## BAB III METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu deskriptif. Menurut Siyoto dan Sodik (2015) penelitian deskriptif adalah penelitian yang bertujuan untuk mendeskripsikan atau menjelaskan suatu peristiwa, keadaan, objek berupa orang, atau segala sesuatu yang terkait dengan variabel-variabel yang bisa dijelaskan baik menggunakan angka-angka maupun kata-kata.

### 3.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan sebagai sumber DNA yaitu daun muda. Tanaman timun apel yang digunakan merupakan timun apel hijau yang berasal dari Karawang, morfologi tanaman timun apel tersaji pada Lampiran 1. Beberapa tanaman Cucurbitaceae yang digunakan pada penelitian ini tersaji pada Tabel 3.1. Dalam analisis filogenetika penggunaan data tunggal seringkali tidak dapat menjelaskan hubungan filogenetika dan informasi taksonomi dari organisme tersebut (Bagheri, dkk. 2016), sehingga diperlukan kombinasi dua penanda molekuler. Dilakukan kombinasi dua penanda molekuler yaitu RAPD dengan sekuen DNA daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS). Sekuen DNA daerah ITS dari sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian ini tersaji pada Tabel 3.2. Dipilih sekuen DNA daerah ITS berdasarkan penelitian Hidayat dkk. (*Accepted manuscript*) yang diperoleh dari *GeneBank The National Center for Biotechnology Information* (NCBI) dan dapat diakses pada halaman website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Fasta format sekuen DNA daerah ITS dan RAPD yang digunakan tertera pada Lampiran 2.

Tabel 3.1  
Sampel Tanaman yang Digunakan Dalam Penelitian

No.	Nama ilmiah	Nama Lokal	Lokasi	Kode
1.	<i>Cucumis sativus</i>	Mentimun	Sumedang	A
2.	<i>Cucumis melo</i>	Melon	Serang	B
3.	<i>Sechium edule</i>	Labu Siam	Bandung	C
4.	<i>Cucurbita pepo</i>	Labu Kuning	Bandung	D
5.	<i>Apple cucumber</i>	Timun Apel	Karawang	E

Tabel 3.2  
Sekuen DNA Daerah ITS yang Digunakan Dalam Penelitian

No.	Nama Ilmiah	Accession	Ukuran (bp)	Kode
1.	<i>Cucumis sativus</i>	AY833602.1	640	A
2.	<i>Cucumis melo</i>	HQ201970.1	626	B
3.	<i>Sechium edule</i>	AM981178.1	619	C
4.	<i>Cucurbita pepo</i>	EF595858.1	603	D
5.	<i>Apple cucumber</i>	LC435064.1	612	E
6.	<i>Begonia</i> sp.	HQ729030.1	654	F

### 3.3. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian merupakan suatu tempat dimana penelitian dilakukan. Adapun penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA) Universitas Pendidikan Indonesia pada tanggal 6 Januari s.d. Februari 2020.

### 3.4. Alat dan Bahan

Daftar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini tertera pada Lampiran 3. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi FPMIPA UPI.

### 3.5. Prosedur Penelitian

#### 3.5.1. Persiapan alat dan bahan

Pada tahap ini, seluruh alat dan bahan dipersiapkan terlebih dahulu. Semua alat tahan panas dicuci dan dikeringkan. Kemudian dibungkus dengan kertas dan plastik tahan panas lalu disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C (250°F) dan tekanan 1,5 atm. Selain itu, bahan yang akan digunakan ditimbang sesuai dengan kebutuhan untuk pembuatan larutan stok. Protokol pembuatan larutan stok tercantum pada Lampiran 4.

#### 3.5.2. Tahapan Penelitian

##### 1. Pengambilan sampel

Bagian tanaman yang digunakan sebagai sumber DNA yaitu daun muda dari tanaman timun apel dan beberapa sampel tanaman Cucurbitaceae (*Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Sechium edule* dan *Cucurbita pepo*). Pencuplikan tanaman dilakukan menggunakan sarung tangan untuk menghindari kontaminasi dan menjaga agar DNA tidak terdegradasi. Daun muda dicuplik kemudian dibilas menggunakan alkohol 70% lalu dimasukkan ke dalam kantung spesimen dan diberi

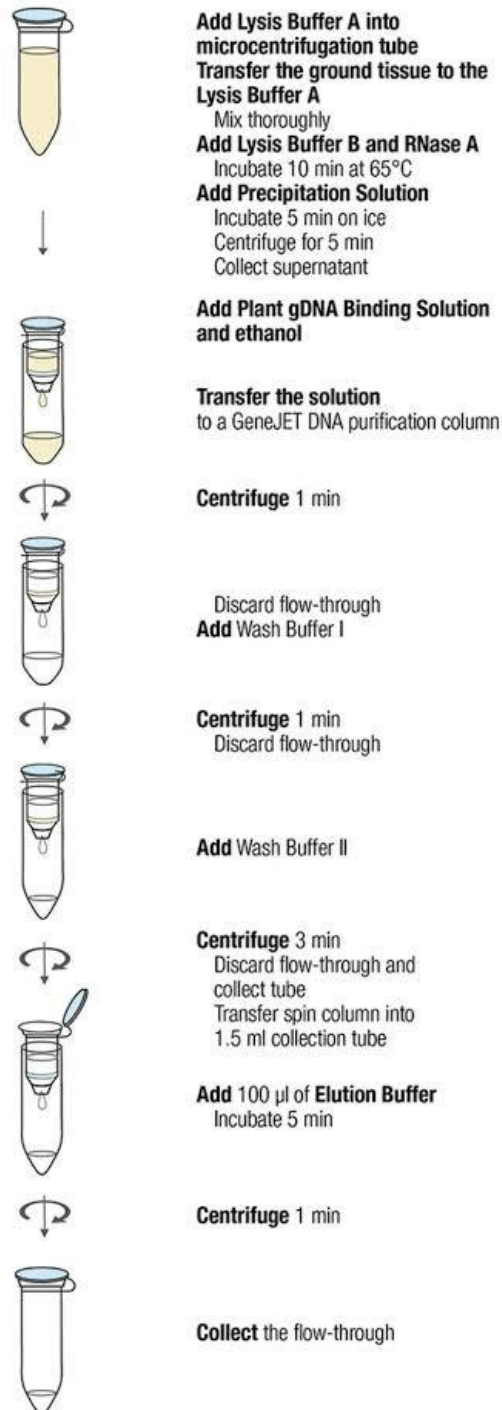
label penamaan (nama species, waktu dan lokasi pencuplikan) selanjutnya disimpan di dalam *cool box* untuk menjaga agar tidak terjadi kerusakan pada DNA sampel selama di lapangan. Sampel tanaman disimpan di *freezer* yang terdapat di Laboratorium pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  bertujuan untuk penyimpanan dalam jangka panjang karena dapat menonaktifkan aktifitas metabolisme.

## 2. Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan bahan dari *GeneJET Plant Genomics DNA Purification Kit*. Prosedur isolasi DNA mengikuti protokol yang tersedia dalam kit (Thermo Scientific, USA) dan mengacu pada penelitian Wulandari (2016). Isolasi DNA tanaman terdiri dari tiga tahapan yaitu penghancuran sel (lisis), pemisahan DNA dari kontaminan lain (purifikasi), pemekatan DNA (presipitasi) (Handayani, dkk. 2016). Tahapan yang pertama yaitu lisis, beberapa helai daun muda (tanpa tulang daun) dihancurkan menggunakan mortar dan alu steril dengan ditambahkan sedikit demi sedikit nitrogen cair untuk menonaktifkan metabolisme, terutama enzim DNase agar DNA tidak terdegradasi selama proses lisis. Daun tersebut dihancurkan sampai semua bagian tercampur rata, dilakukan secara cepat sebelum nitrogen cair menguap. Daun yang sudah berbentuk serbuk dimasukkan ke dalam *microtube* yang telah berisi 350  $\mu\text{l}$  *lysis buffer* 1 menggunakan spatula dengan hati-hati, sekitar tiga atau empat sendok spatula. Sampel yang berada dalam *microtube* dihomogenkan menggunakan vortex selama 10 sampai 20 detik dengan tujuan reagen dan serbuk sampel terlarut bersama. Sampel ditambahkan dengan 50  $\mu\text{l}$  *lysis buffer* 2 kemudian diinkubasi pada suhu  $65^{\circ}\text{C}$  menggunakan *waterbath* selama 10 menit.

Ditambahkan 130  $\mu\text{l}$  *precipitation solution* untuk mengatasi pengendapan debris-debris sel dibagian bawah *microtube*. *Microtube* kemudian dihomogenkan dengan cara dibolak-balik membentuk angka 8 dan diinkubasi pada suhu  $-4^{\circ}\text{C}$  dalam *freezer* selama 5 menit. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Setelah disentrifugasi, suspensi supernatan diambil secara hati-hati dan dipindahkan ke dalam *microtube* baru dengan total volume 400  $\mu\text{l}$ . Ditambahkan *gDNA binding solution* dan etanol dingin 96% masing-masing sebanyak 400  $\mu\text{l}$  ke dalam *microtube* baru yang berisi suspensi supernatan sehingga total volume menjadi 1200  $\mu\text{l}$ , kemudian *microtube* dihomogenkan. Kemudian

sampel diambil sebanyak 400 µl dan dimasukkan kedalam *filter column* yang terpasang pada *collection tube*. *Filter column* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit.



Gambar 3.1 *GeneJET Plant Genomics DNA Purification Kit*

(Thermo Scientific, 2020)

Setelah disentrifugasi, *filtrate* yang terdapat pada *collection tube* dibuang. Sisa sampel yang belum disentrifugasi dimasukkan ke dalam *filter column* yang sama dan disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit, *filtrate* yang tertampung kemudian dibuang. Ditambahkan *Wash buffer 1* sebanyak 500 µl ke dalam *filter column*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit, dan *filtrate* yang tertampung dibuang. *Wash buffer 2* ke dalam *filter column* sebanyak 500 µl, disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit, kemudian *filtrate* yang tertampung dibuang. Dilakukan sentrifugasi ulang dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit untuk memastikan seluruh *wash buffer 2* tidak tersisa pada filter. *Filter column* dipindahkan ke *microtube* baru. Ditambahkan *elution buffer* sebanyak 50 µl tepat dibagian tengah filter untuk melarutkan sampel DNA yang terdapat pada *filter column* kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit. Kemudian sampel disentrifugasi 10.000 rpm selama 1 menit sehingga sampel DNA tertampung pada *microtube*. Ditambahkan untuk kedua kalinya *elution buffer* sebanyak 50 µl dengan tujuan mendapatkan sisa DNA yang masih terdapat pada *filter column*, kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit sama seperti langkah sebelumnya.

### 3. Mengukur kemurnian dan konsentrasi DNA

Pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan menggunakan spektrofotometri. Sampel DNA dari hasil isolasi diencerkan pada tingkat pengenceran 500 kali. Pengenceran dilakukan dengan cara menambahkan 1 µl DNA dan 499 µl ddH<sub>2</sub>O kemudian dihomogekan. Sampel DNA yang telah diencerkan sebanyak 500 µl dimasukan kedalam kuvet mikro dan nilai absorbansi dihitung menggunakan spektrofotometer. Absorbansi diukur dengan panjang gelombang 260 nm serta 280 nm.

### 4. Elektroforesis hasil isolasi DNA

Sampel DNA dari hasil isolasi diuji secara kualitatif menggunakan elektroforesis untuk menentukan keutuhan DNA. Dibuat gel agarose terlebih dahulu dengan konsentrasi 1% yaitu agarose *powder* sebanyak 0,32 gram yang dilarutkan dengan buffer TAE 1x hingga 30 ml dalam tabung Erlenmeyer kemudian mulut tabung ditutup menggunakan *aluminium foil* untuk menghindari kelebihan

tekanan yang bisa menyebabkan terjadinya penguapan (volume berkurang). Agarose dilarutkan dengan cara dipanaskan menggunakan *microwave* selama 15 detik, kemudian dididihkan hingga terlarut sempurna. Setelah larut, agarose didiamkan pada suhu ruangan hingga suhunya turun mencapai 55-65°C lalu ditambahkan 0,8 µl *Peq Green* ke dalam agarose dan dihomogenkan menggunakan batang pengaduk secara perlahan. Penambahan *Peq Green* yang berfungsi mewarnai pita DNA. Agarose kemudian dituangkan ke atas *tray* yang telah dipasang *well forming comb*. Setelah gel agarose mengeras selama 30 menit, *well forming comb* dicabut. *Tray* beserta gel agarose diletakan pada elektroforesis *chamber*, kemudian ditambahkan Buffer TAE 1x hingga gel agarose terendam maksimal 2 mm dari permukaan gel. Sampel DNA sebanyak 2 µl dicampurkan dengan 1 µl *loading dye*, dihomogenkan dengan teknik *pipetting* kemudian dimasukan kedalam sumur pada gel agarose. Proses elektroforesis hasil isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan tegangan 100 volt dan kuat arus 400 ampere selama 45 menit, kemudian fraksinasi hasil elektroforesis diamati pada UV transluminator dan didokumentasikan.

## 5. PCR-RAPD

Sampel DNA dari hasil isolasi diamplifikasi menggunakan metode PCR-RAPD dengan primer acak yang telah diseleksi sebelumnya. Pencampuran komponen reaksi PCR dilakukan secara cepat didalam *coolbox* untuk mencegah agar komponen tidak rusak. Alat yang digunakan untuk proses amplifikasi yaitu mesin *thermocycler* dengan program *Gene Amplified PCR System 9700*. Beberapa komponen yang digunakan untuk PCR adalah *Dream Taq Green*, primer, DNA *template* dan *Nuclease Free Water* dengan volume total 10 µl dalam tabung PCR. Komposisi kebutuhan masing-masing bahan per reaksi PCR dapat dilihat pada Tabel 3.3.

Tabel 3.3 Komposisi Bahan Mix PCR

Komposisi PCR	Volume
Sampel DNA	1 µg/µl
Primer	0,5 µg/µl
<i>Dream Taq Green</i> PCR Master Mix	5 µg/µl
Nuclease free water	3,5 µg/µl
Volume total	10 µg/µl

Diketahui beberapa kandidat primer RAPD yang telah banyak digunakan untuk familia Cucurbitaceae yaitu OPA 06, OPA 07, OPA 12, OPA 12 dan OPA 18, kemudian primer tersebut diseleksi (Sikdar, dkk. 2010). Seleksi primer sangat penting dilakukan karena akan sangat berpengaruh terhadap keberhasilan amplifikasi. Setelah dilakukan tahap seleksi primer, ke lima primer yang digunakan menghasilkan intensitas pita dan jumlah lokus yang diperoleh berbeda-beda. Berdasarkan pertimbangan jumlah dan intensitas pita yang dihasilkan, primer OPA 12 dan OPA 18 dipilih karena mampu mengamplifikasi DNA *template* dengan baik. Kandidat primer acak yang digunakan dalam penelitian ini tertera dalam Tabel 3.4.

Tabel 3.4  
Kandidat Primer Acak yang Digunakan (Sikdar, dkk. 2010)

No.	Primer	Sequence (5' ke 3')
1.	OPA 06	GGTCCCTGAC
2.	OPA 07	GATGACCGCC
3.	OPA 12	TCGGCGATAG
4.	OPA 17	GACCGCTTGT
5.	OPA 18	GAACGGACTC

Setelah bahan komposisi PCR dicampurkan, tabung PCR dihomogenisasi dengan cara di-*impulse* menggunakan *centrifuge* selama 5 detik sampai kecepatan 500 rpm. Selanjutnya mix PCR yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam mesin PCR. Proses amplifikasi menggunakan mesin PCR terdiri dari tiga tahap yaitu, denaturasi (*melting*), penempelan primer (*annealing*), dan perpanjangan (*elongation*). Program PCR yang digunakan mengacu pada penelitian Huda dan Daryono (2013) dengan sedikit modifikasi pada suhu *annealing*. Program PCR tertera pada Tabel 3.5.

Tabel 3.5  
Prosedur Reaksi PCR-RAPD (Huda dan Daryono, 2013)

No.	Reaksi	Suhu (°C)	Waktu (menit)
1.	<i>Pre-denaturation</i>	94	5
2.	<i>Denaturation</i>	94	2
3.	<i>Annealing</i>	32	1
4.	<i>Elongation</i>	72	2
5.	<i>Post elongation</i>	72	10
6.	<i>Endless</i>	4	∞

Pada tahap amplifikasi menggunakan mesin PCR, terlebih dahulu sampel DNA melalui tahap pre-denaturasi selama 5 menit pada suhu 94°C, kemudian memasuki tahap denaturasi yaitu terjadi proses pemisahan kedua untai DNA (*double strand*) menjadi *single strand* pada temperatur tinggi. Memasuki tahap *annealing* pada suhu 32°C selama 1 menit, terjadi proses penempelan primer secara acak pada daerah perlekatan yang sesuai di sepanjang genom. Proses *elongation* oleh enzim Taq DNA polimerase pada suhu 72°C dalam waktu 2 menit. Reaksi amplifikasi pada mesin PCR berlangsung selama 45 siklus. Setelah siklus selesai, sampel produk PCR dikeluarkan dan disimpan di dalam *freezer* (-20°C).

#### 6. Elektroforesis hasil PCR

Amplikon yang telah didapat, diseparasi menggunakan elektroforesis pada *gel agarose* dengan konsentrasi 1,3% yang dilarutkan dengan TAE 1x sebanyak 30 ml dan mengandung 0,8 µl *Peq Green*. Konsentrasi gel agarose ditingkatkan dengan tujuan separasi pita DNA yang terbentuk dari hasil amplifikasi dapat terlihat lebih jelas. Amplikon hasil amplifikasi sebanyak 4 µl dicampurkan dengan 1 µl *loading dye*, dihomogenkan dengan teknik *pipetting* kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarose. Sebagai pembanding ukuran fragmen DNA, digunakan *Thermo Scientific Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* sebanyak 2 µl dicampurkan dengan 1 µl *loading dye*, lalu dihomogenkan dengan teknik *pipetting* kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarose. Proses elektroforesis dilakukan dengan ditambahkan buffer TAE yang berfungsi menjaga kesetimbangan pH saat migrasi fragmen DNA sedang berlangsung dan diberi tegangan 50 volt dan kuat arus 400 ampere selama 50 menit. Hasil elektroforesis diamati pada UV transimulator kemudian didokumentasikan.

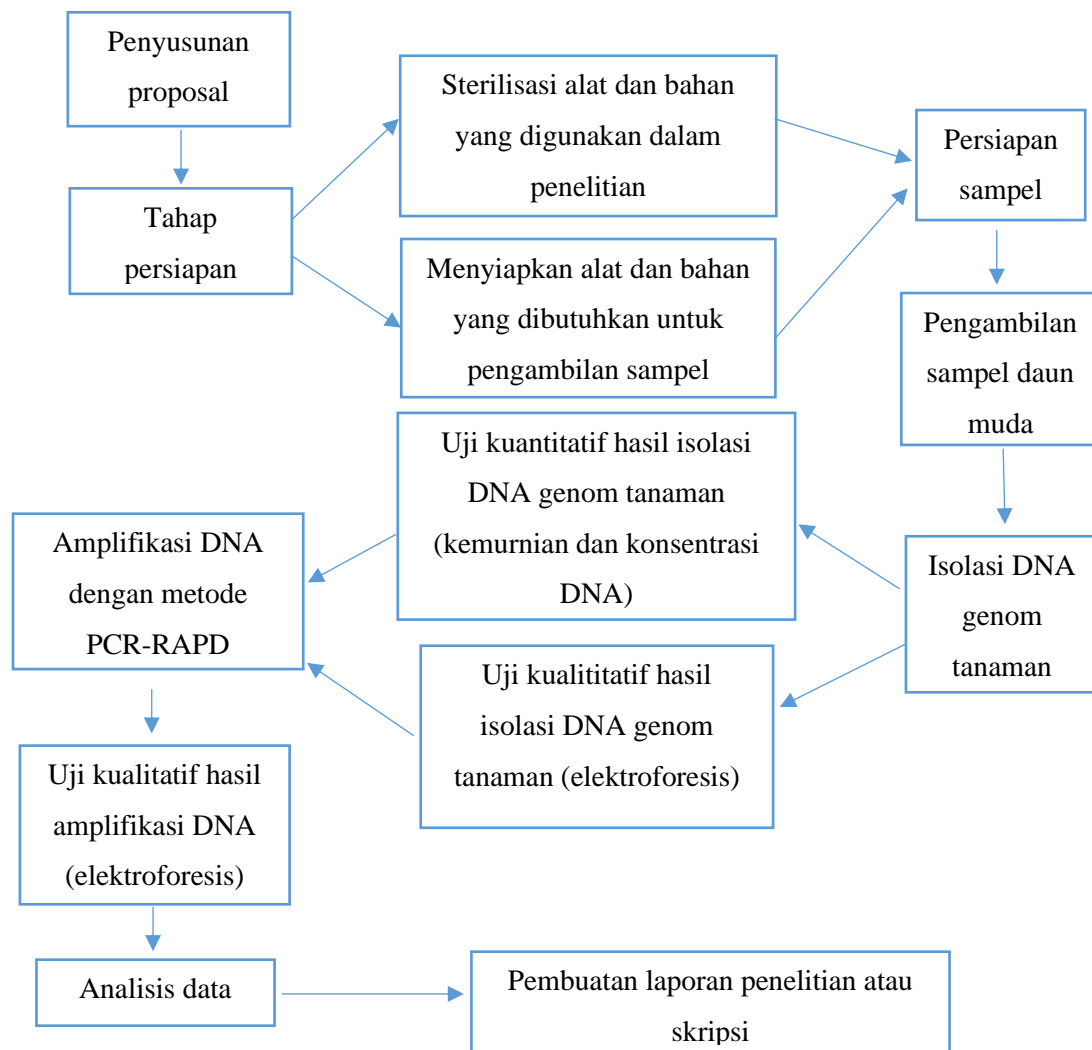
#### 7. Analisis Data

Terlebih dahulu dihitung ukuran dari setiap pita amplikon dengan cara menghitung jarak migrasi fragmen DNA, karena ukuran DNA berbanding lurus dengan nilai log dari jarak migrasi. Penghitungan ukuran fragmen DNA tertera pada Lampiran 5. Ada atau tidak adanya pita-pita dari setiap sampel merupakan data yang kemudian dicatat dalam bentuk matriks. Adanya keberadaan pita diberi nilai 1 sedangkan jika pita DNA tidak muncul diberi nilai 0. Matriks dibuat dengan menggunakan program *Microsoft Excel*. Matriks ini digunakan untuk penambahan



karakter yang akan dianalisis. Setelah didapatkan data RAPD, kemudian dilakukan kombinasi data analisis RAPD dengan sekuen DNA daerah ITS. Sebelumnya telah dilakukan koleksi data sekuen DNA daerah ITS menggunakan program *Notepad* dalam bentuk Fasta format (.text), sekuen DNA diperoleh dari *GeneBank* NCBI. Kemudian tahap sekuen *alignment* menggunakan perangkat lunak Clustal X, yaitu membandingkan sisi homolog dan variabel antar sekuen. Data analisis RAPD dan sekuen DNA kemudian diinput ke perangkat lunak *Phylogeny Aanalysis of Using Parsimony* (PAUP) Versi 4.0. Parameter analisis diinput pada kolom “*command*”, selanjutnya pohon filogenetik direkonstruksi dan dievaluasi. Protokol operasi PAUP Versi 4.0 untuk rekonstruksi pohon filogenetik tersaji pada Lampiran 6.

### 3.8. Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur penelitian