

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan informasi mengenai hubungan filogenetika tanaman timun apel.

3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah DNA dari tanaman timun apel dan beberapa tanaman familia Cucurbitaceae. Sumber DNA berasal dari daun muda. Daftar sampel tanaman tertera pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Sampel Penelitian

No.	Nama Sampel	Kode	Lokasi
1	Timun (<i>Cucumis sativus</i>)	A	Sumedang, Jawa Barat
2	Melon (<i>Cucumis melo</i>)	B	Serang, Banten
3	Labu Siam (<i>Sechium edule</i>)	C	Lembang, Jawa Barat
4	Labu Kuning (<i>Cucurbita pepo</i>)	D	Lembang, Jawa Barat
5	Timun Apel (<i>Cucumis melo</i>)	E	Karawang, Jawa Barat

Sekuens DNA yang digunakan berasal dari *genebank*. Sekuens yang digunakan disesuaikan dengan spesies yang digunakan serta ditambahkan *outgroup*. *Outgroup* yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Begonia* sp. Spesies ini dipilih karena merupakan *sister group* dari famili Cucurbitaceae. Daftar nama sekuens yang digunakan, nomor aksesori, serta ukuran sekuens tertera pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Data Sekuens DNA

No.	Kode Sampel	Nama Umum	Nama Latin	Nomor Aksesori	Ukuran
1	A	Timun	<i>Cucumis sativus</i>	AY833602	640 bp
2	B	Melon	<i>Cucumis melo</i>	HQ201970	626 bp
3	C	Labu Siam	<i>Sechium edule</i>	AM981178	619 bp
4	D	Labu Kuning	<i>Cucurbita pepo</i>	KT347507	618 bp
5	E	Timun Apel	<i>Cucumis melo</i>	LC435068	618 bp
6	<i>Sister group</i>	<i>Begonia</i>	<i>Begonia</i> sp.	HQ729030	654 bp

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Waktu penelitian dimulai pada bulan Januari hingga Februari 2020. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset dan Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI.

3.4 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Riset dan Bioteknologi Departemen Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Daftar alat yang digunakan serta spesifikasinya tertera pada Lampiran 1. Daftar bahan yang digunakan tertera pada Tabel 3.3. Protokol pembuatan bahan dan larutan stok dapat dilihat pada Lampiran 2.

Tabel 3.3 Daftar Bahan yang Digunakan

No.	Nama Bahan	Jumlah
1	Sampel daun timun, melon, labu siam, labu kuning, dan timun apel	@10 g
2	Nitrogen cair	1 L
3	Es batu	1 kg
4	<i>Buffer Lysis A</i>	2 ml
5	<i>Buffer Lysis B</i>	300 μ l
6	<i>Precipitation solution</i>	700 μ l
7	<i>Plant gDNA binding solution</i>	2 ml
8	<i>Wash Buffer I</i>	2,5 ml
9	<i>Wash Buffer II</i>	2,5 ml
10	<i>Elution Buffer</i>	500 μ l
11	5 Primer RAPD	@1 ml
12	Alkohol 96%	5 ml
13	ddH ₂ O	1000 ml
14	Tris HCl	13 g
15	EDTA	20 g
16	Gel agarosa	10 g
17	<i>Peq Green</i>	10 μ l
18	<i>GeneRuller 1 kb DNA Ladder</i>	50 μ l
19	<i>Loading dye</i>	100 μ l
20	<i>DreamTaq Green PCR Master Mix</i>	50 μ l

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Tahap Persiapan

Alat-alat berbahan kaca dan plastik yang akan digunakan dalam penelitian dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat-alat tersebut kemudian dibungkus

Nanda Ayu Novia, 2020

ANALISIS FILOGENETIKA TANAMAN TIMUN APEL BERBASIS METODE RAPD MENGGUNAKAN PRIMER OPA 11 DAN OPA 19

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

dengan plastik tahan panas dan dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

3.5.2 Tahap Penelitian

3.5.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun muda dari tanaman timun apel dan beberapa tanaman famili Cucurbitaceae. Sampel daun kemudian dibersihkan dengan alkohol 70% dan dimasukkan ke dalam plastik yang telah diberi label. Sampel disimpan dalam *coolbox* yang sudah berisi es batu agar daun tetap segar. Di laboratorium sampel daun tersebut disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C hingga proses isolasi DNA dilakukan.

3.5.2.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan bahan dari *Thermo Fisher Scientific GeneJET™ Plant Genomics DNA Purification Kit*. Prosedur isolasi DNA dilakukan mengikuti protokol yang tersedia dalam kit. Komponen-komponen yang digunakan pada kit yaitu *Buffer Lysis A*, *Buffer Lysis B*, *Precipitation Solution*, *Plant gDNA Binding Solution*, *Wash Buffer I*, *Wash Buffer II*, *Elution Buffer*, *GeneJET Genomic DNA Purification Column pre-assembled with Collection Tubes*, dan *Collection Tube* (2 ml).

Mortar, alu, dan spatula yang telah steril disiapkan. Sampel daun dimasukkan ke dalam mortar kemudian ditambahkan nitrogen cair agar daun mudah dihancurkan. Nitrogen cair juga dapat menonaktifkan metabolisme terutama enzim DNase. Daun tersebut dihaluskan secara cepat menggunakan alu sebelum nitrogen cair menguap.

Daun yang telah halus kemudian dimasukkan menggunakan spatula ke dalam *microtube* yang telah berisi 350 µl *buffer lysis A*. Sampel daun yang telah berada di dalam *microtube* kemudian dihomogenkan menggunakan vorteks selama 15 detik. Sampel ditambahkan 50 µl *buffer lysis B* ke dalam *microtube* tersebut, kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama sepuluh menit menggunakan *waterbath*. Sebanyak 130 µl *precipitation solution* ditambahkan ke dalam *microtube*, kemudian dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan *microtube* seperti membentuk angka 8 dan diinkubasi pada suhu -4°C dalam *freezer* selama lima menit. *Precipitation solution* ini berfungsi untuk

Nanda Ayu Novia, 2020

ANALISIS FILOGENETIKA TANAMAN TIMUN APEL BERBASIS METODE RAPD MENGGUNAKAN PRIMER OPA 11 DAN OPA 19

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

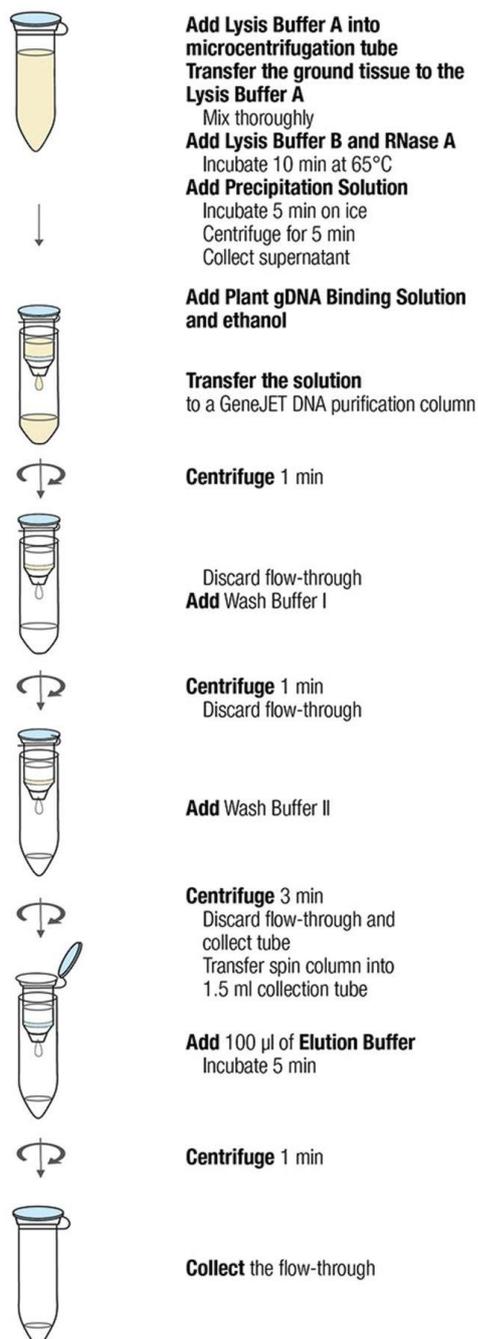
mengendapkan debris-debris sel. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit.

Setelah disentrifugasi, supernatan diambil secara hati-hati dan dipindahkan ke dalam *microtube* baru. Supernatan ditambahkan 400 µl *gDNA binding solution* dan 400 µl etanol dingin 96%, kemudian dihomogenkan. Sampel diambil sebanyak 700 µl dan dimasukkan ke dalam *filter column* yang terpasang pada *collection tube*. *Filter column* kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Setelah disentrifugasi, filtrat yang tertampung 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, filtrat yang tertampung kemudian dibuang kembali. *Wash buffer* 1 dimasukkan ke dalam *filter column* sebanyak 500 µl, disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit dan filtrat yang tertampung kemudian dibuang. *Wash buffer* 2 dimasukkan ke dalam *filter column* sebanyak 500 µL, disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit, filtrat yang tertampung kemudian dibuang.

Untuk memastikan seluruh *wash buffer* 2 tidak tersisa pada *filter column*, dilakukan sentrifugasi ulang dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. *Collection tube* yang terdapat pada *filter column* diganti dengan *microtube* baru. Sampel DNA yang terdapat pada *filter column* dilarutkan dengan menambahkan 50 µl *elution buffer* tepat di bagian tengah filter kemudian diinkubasi pada suhu ruangan selama 5 menit. Selanjutnya, *microtube* dengan *filter column* disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Filtrat pada *microtube* yang merupakan hasil isolasi DNA, disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C .

Untuk mendapatkan DNA yang masih tersisa pada membran, *filter column* yang sama kembali dipindahkan ke dalam *microtube* kosong yang baru, kemudian ditambahkan 50 µl *elution buffer* tepat pada bagian tengah membran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. *Filter column* kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit. Filtrat berisi DNA hasil isolasi pada *microtube* disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C . Skema proses ekstraksi DNA genom tertera pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema Proses Ekstraksi DNA Genom

3.5.2.3 Uji Kuantitatif Hasil Isolasi DNA

Hasil isolasi DNA diuji secara kuantitatif dengan mengukur kemurnian dan konsentrasi DNANYa. Pengukuran kemurnian serta konsentrasi 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 ddH₂O kemudian dihomogenkan. Hasil pengenceran tersebut yaitu sebanyak 500 µl dimasukkan ke dalam kuvet mikro dan absorbansi dihitung menggunakan spektrofotometer. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 260 nm serta 280 nm. Nilai kemurnian DNA umumnya 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 DNA dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

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

Untuk menghitung konsentrasi DNA, digunakan rumus berikut:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

A_{260} : Nilai absorbansi pada 260 nm

A_{280} : Nilai absorbansi pada 280 nm

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

3.5.2.4 Uji Kualitatif Hasil Isolasi DNA

Hasil isolasi DNA diuji secara kualitatif melalui elektroforesis untuk melihat ketebalan DNA. Sebelum tahap elektroforesis, terlebih dahulu dibuat gel agarosa dengan konsentrasi 1% yang dilarutkan dengan menggunakan *buffer* TAE hingga volume 30 ml. Gel agarosa kemudian dilarutkan dengan cara dipanaskan menggunakan *microwave* dengan waktu yang bertahap selama 60 detik. Setelah larut, gel agarosa didiamkan hingga suhunya turun mencapai 55-65°C lalu ditambahkan 0,8 µl *Peq Green* ke dalam gel agarosa dan diaduk perlahan menggunakan batang pengaduk agar homogen. Gel agarosa kemudian dituangkan ke atas *tray* yang telah dipasang *well forming comb*. Setelah gel agarosa mengeras selama 30 menit, *well forming comb* dilepaskan.

Tray beserta gel agarosa diletakkan pada *electroforesis chamber*, kemudian dituangkan TAE 1x hingga gel agarosa terendam. Sampel DNA sebanyak 2 µl ditambahkan dengan 1 µl *loading dye* kemudian dihomogenkan dengan teknik *pipetting* pada parafilm, kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarosa. Proses elektro-foresis dilakukan dengan menggunakan tegangan 100 volt dan kuat

arus 400 ampere selama 25 menit. DNA hasil elektroforesis kemudian diamati pada *UV transiluminator* dan hasilnya didokumentasikan.

3.5.2.5 PCR-RAPD

Proses amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat *Thermocycler* dengan program *Gene Amplified PCR System 9700*. Penanda molekuler yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Amplifikasi pada metode PCR-RAPD dilakukan dengan menggunakan beberapa primer yang telah diseleksi pada penelitian ini. Pencampuran komponen reaksi PCR dilakukan secara cepat dan berhati-hati. Semua proses pencampuran dilakukan di dalam *coolbox* untuk menjaga agar komponen reaksi PCR tidak rusak. Beberapa komponen yang digunakan untuk PCR adalah *DreamTaqGreen*, primer, sampel DNA, dan *Nuclease Free Water* dengan volume total 10 μl dalam tabung PCR. Mix PCR merupakan gabungan komponen yang akan digunakan. Rincian kebutuhan masing-masing bahan per sampel tertera pada Tabel 3.4.

Tabel 3.4 Rincian Bahan Mix PCR

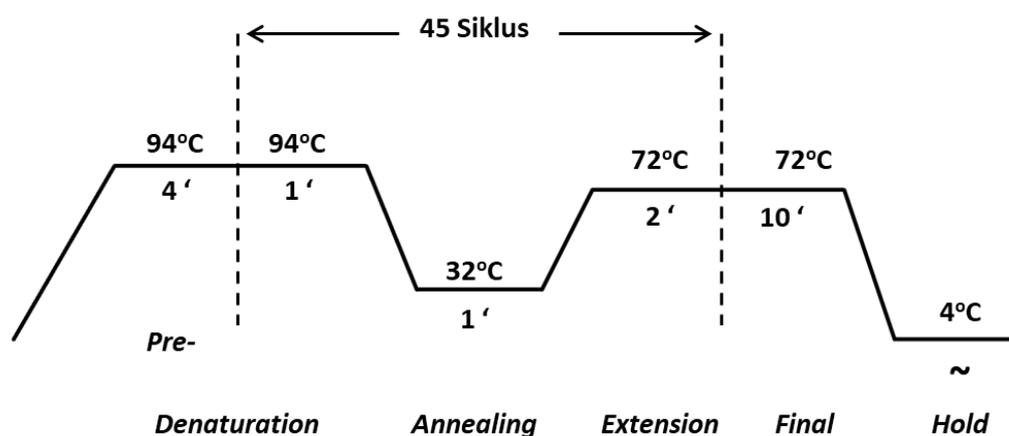
Komposisi PCR	Volume Akhir
Sampel DNA	1 μl
Primer	0,5 μl
Dream Taq Green PCR Master Mix 2x	5 μl
<i>Nuclease-free water</i>	3,5 μl
Jumlah	10 μl

Setelah diketahuinya kebutuhan masing-masing bahan dalam pembuatan mix PCR, bahan-bahan mix selanjutnya dimasukkan terlebih dahulu ke dalam *tube* PCR menggunakan mikropipet kecuali DNA templatnya. Setelah ketiga bahan tersebut dimasukkan, *tube* PCR dihomogenasi dengan cara diimpuls menggunakan *centrifuge* selama 5 detik. Selanjutnya, bahan yang telah diimpuls ditambahkan kembali dengan 1 μL 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 dimasukkan 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 tumbuhan 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*. 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 sekuens 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 45 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 3.2.



Gambar 3.2 Skema Proses PCR RAPD

3.5.2.6 Elektroforesis Hasil PCR-RAPD

Amplikon hasil PCR RAPD yang telah didapat kemudian diuji secara kualitatif dengan melakukan elektroforesis pada gel agarosa dengan konsentrasi 1,4 % yang dilarutkan dengan menggunakan *buffer* TAE hingga volume 30 ml. Gel agarosa kemudian dilarutkan dengan cara dipanaskan menggunakan *microwave* dengan waktu yang bertahap selama 60 detik. Setelah larut, gel agarosa didiamkan hingga suhunya turun mencapai 55-65°C, lalu ditambahkan 0,8 µl *Peq Green* ke dalam gel agarosa dan diaduk perlahan menggunakan batang pengaduk agar homogen. Gel agarosa kemudian dituangkan ke atas *tray* yang telah dipasang *well forming comb*. Setelah gel agarosa mengeras selama 30 menit, *well forming comb* dilepaskan. *Tray* beserta gel agarosa diletakkan pada *electroforesis chamber*, kemudian dituangkan TAE 1x hingga gel agarosa terendam.

Amplikon hasil PCR RAPD sebanyak 4 µl dicampurkan dengan 1 µl *loading dye*, kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarosa. Sebagai pembanding ukuran fragmen DNA, digunakan *Thermo Fisher Scientific Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* dengan volume sebanyak 1 µl dan ditambahkan 1 µl *loading dye* dalam sumur. Proses elektroforesis dilakukan dengan menggunakan *buffer* TAE dan diberi tegangan 50 volt dan kuat arus 400 ampere selama 55 menit. Hasil elektroforesis diamati pada *UV transilluminator* dan hasil didokumentasikan.

3.5.3 Tahap Analisis Data

3.5.3.1 Pembuatan Matriks Hasil PCR RAPD

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

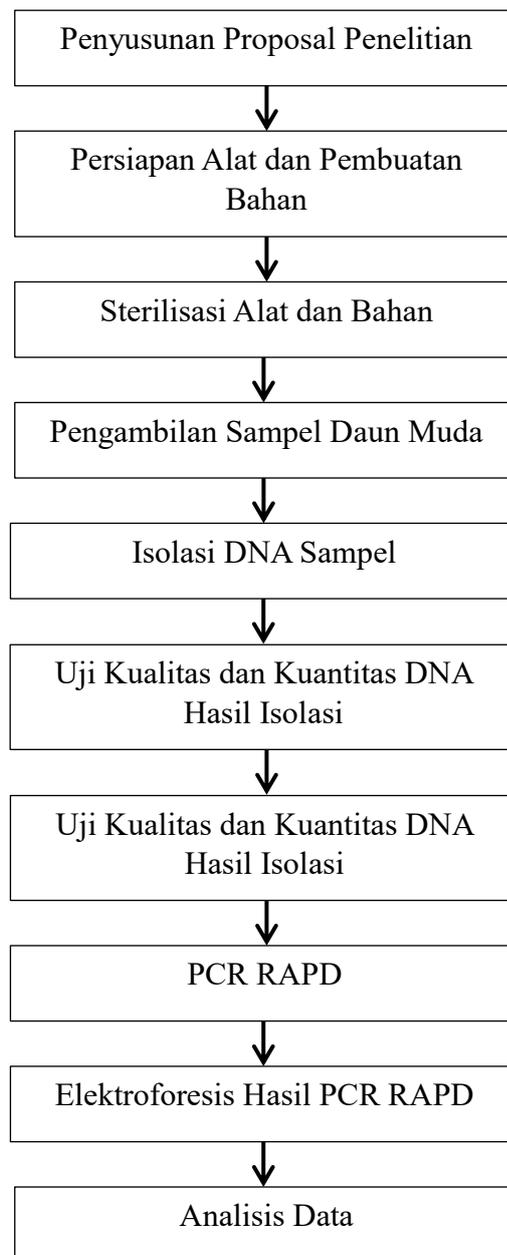
3.5.3.2 Pembentukan Pohon Filogenetik

Pembentukan pohon filogenetik dilakukan terhadap data yang sudah melalui tahap editing data dengan matriks 1 dan 0 dan dilakukan dengan

menggunakan perangkat lunak PAUP*4.0b10, dengan memilih analisis *bootstrap* dan *Maximum Parsimony* (MP) untuk mengetahui nilai *bootstrap* (kekokohan) dari pohon filogenetik yang terbentuk. Langkah-langkah dalam rekonstruksi pohon filogenetik tertera pada Lampiran 4.

Sekuens DNA yang diperoleh dari daerah ITS disejajarkan dengan menggunakan program komputer ClustalX (Thompson et al., 1997). Analisis filogenetik berdasarkan metode parsimoni dilakukan dengan menggunakan program komputer PAUP versi 4.0b10 (Swafford, 1998). Semua karakter pada masing-masing sampel diberi bobot yang sama (Fitch, 1971). Semua pohon filogenetik yang terbentuk disimpan. Evaluasi pohon dilakukan dengan menggunakan analisis *bootstrap* (Felsenstein, 1985) sebanyak 1000 ulangan.

3.5.3.3 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Skema Alur Penelitian