

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian dasar dengan menggunakan metode deskriptif. Data didapatkan dari sikuen DNA daerah ITS untuk merekonstruksi pohon filogenetik dalam menentukan kekerabatan pada suku Euphorbiaceae.

B. Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ni adalah beberapa tumbuhan pada suku Euphorbiaceae sebanyak delapan jenis dari marga-marga terpilih dan satu jenis lainnya berasal dari suku Cucurbitaceae. Suku Cucurbitaceae digunakan sebagai *outgroup* berdasarkan penelitian APG (2003) yang menyatakan bahwa Cucurbitaceae merupakan *sister group* dari suku Euphorbiaceae. Daftar tumbuhan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1 Tumbuhan yang digunakan

| No | Suku | Jenis | Keterangan |
|----|---------------|----------------------------|-----------------|
| 1 | Euphorbiaceae | <i>Phyllanthus niruri</i> | <i>Ingroup</i> |
| 2 | Euphorbiaceae | <i>Sauropus androgynus</i> | <i>Ingroup</i> |
| 3 | Euphorbiaceae | <i>Claoxylon polot</i> | <i>Ingroup</i> |
| 4 | Euphorbiaceae | <i>Antidesma bunius</i> | <i>Ingroup</i> |
| 5 | Euphorbiaceae | <i>Codiaeum variegatum</i> | <i>Ingroup</i> |
| 6 | Euphorbiaceae | <i>Aleurites moluccana</i> | <i>Ingroup</i> |
| 7 | Euphorbiaceae | <i>Manihot esculenta</i> | <i>Ingroup</i> |
| 8 | Euphorbiaceae | <i>Ricinus communis</i> | <i>Ingroup</i> |
| 9 | Cucurbitaceae | <i>Sechium edule</i> | <i>outgroup</i> |

C. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI. Sikuensing produk amplifikasi DNA daerah ITS dari sampel-sampel tumbuhan dilakukan di Macrogen, Seoul-Korea.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Daftar alat yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Spesifikasi alat

| Nama alat | Kegunaan |
|--|--|
| Mesin PCR | Amplifikasi DNA |
| Autoklaf | Sterilisasi |
| Tabung 1,5 ml | Menyimpan larutan |
| Tabung mikrosentrifuga | Mencampur larutan |
| <i>Waterbath</i> | Inkubasi |
| <i>Centrifuge</i> | Pemisahan fasa larutan |
| Mikropipet | Memindahkan larutan |
| Tips mikropipet | Memindahkan larutan |
| Oven | Mengeringkan bahan |
| <i>Vorteks</i> | Homogenisasi larutan |
| <i>Magnetic stirrer dengan hot plate</i> | Memanaskan larutan |
| <i>Freezer</i> | Preservasi DNA |
| <i>Refrigerator</i> | Preservasi reagen |
| Inkubator | Mengatur suhu |
| <i>Electrophoresis apparatus</i> | Memisahkan sampel DNA |
| Gelas ukur | Mengukur volume bahan |
| <i>Beaker glass</i> | Membuat bahan |
| Lampu UV | Melihat DNA |
| Kertas label | Pelabelan sampel |
| Kamera | Dokumentasi |
| Aluminium foil | Membungkus zat, melindungi dari cahaya |
| <i>Cutter</i> | Memotong |
| Sarung tangan | Pelindung |

2. Bahan

Daftar bahan-bahan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.3.

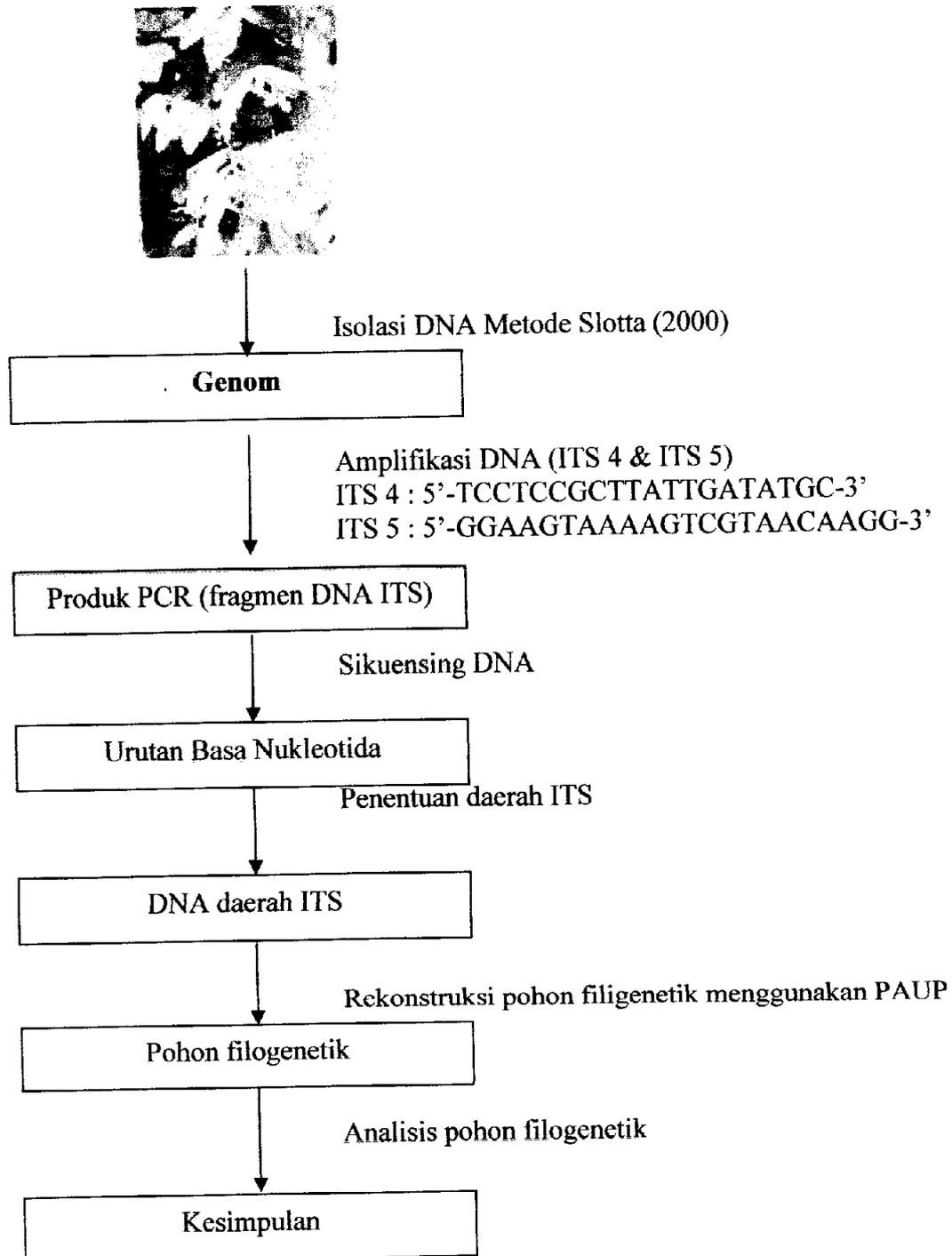
Tabel 3.3. Spesifikasi bahan

| Nama bahan | Kegunaan |
|--|--|
| <i>Taq</i> Polymerase | Mengkatalisis proses polimerasi DNA |
| dNTPs | Nukleotida untuk proses polimerasi DNA |
| Primer ITS 4 dan ITS5 | Faktor inisiasi dalam polimerasi DNA |
| MgCl ₂ | Katalisator polimerasi DNA |
| Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄ | Penyangga dalam polimerasi DNA |
| Air Deion | Pelarut bahan |
| Nitrogen cair | Menggetaskan sampel |
| Buffer lisis 2x CTAB | Menghancurkan membran sel |
| Poly Vinyl Pyrolidone (PVP) | Menarik plastida sel dalam proses isolasi DNA |
| B- Mercaptoethanol | <i>Fresh strillizer</i> dalam proses isolasi DNA |
| Potassium Asetat 5M | Mengendapkan protein yang terdenaturasi dalam proses isolasi DNA |
| SDS 20% | Melarutkan lemak, medenaturasi protein dalam proses isolasi DNA |
| Kloroform & Isoamil alkohol | Memisahkan debris dari asam nukleat dalam proses isolasi DNA |
| Etanol absolut | Mengendapkan asam nukleat dalam proses isolasi DNA |
| Alkohol 70% | Memisahkan garam-garam yang menempel pada DNA |
| Proteinase K | Memutuskan rantai polietida protein |
| RNase | Mendegradasi molekul RNA |
| <i>Buffer</i> Tris-EDTA | Pelarut DNA |
| Asam Asetat Glasial | Bufet untuk elektroforesis DNA |
| Etidium Bromida | Mewarnai DNA pada proses Elektroforesis |
| Agarosa | Media untuk mengelektroforesis DNA |
| Aquades | Pelarut |
| Es Batu | Mempertahankan suhu sampel agar tetap dingin |



E. Alur Penelitian dan Langkah Kerja

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Alur penelitian

Urutan metode penelitian yang dilakukan sesuai dengan alur penelitian adalah sebagai berikut :

1. Sampel Tumbuhan

Pengambilan sampel tumbuhan dilakukan di daerah Cimahi dan Bandung. Bagian tumbuhan yang diambil adalah bagian bunga, buah dan daunnya, kemudian sampel tersebut dimasukkan ke dalam plastik dan diberi label. Sebelumnya sampel tumbuhan difoto untuk kepentingan dokumentasi dan diidentifikasi karakter morfologinya sebagai data sekunder.

2. Isolasi DNA

Isolasi DNA yang dilakukan mengacu pada Slotta (2000) yang mengalami sedikit modifikasi. Genom DNA diekstrak dari daun atau bunga yang masih segar sebanyak 0,1-0,5 gram. Daun dihancurkan menggunakan mortar dan lumpang alu dan diberi nitrogen cair. Serbuk daun dimasukan ke dalam tabung 1,5 ml dan ditambahkan *buffer* ekstraksi sebanyak 350 μ l, 150 μ l CTAB 2%, 2 μ l B-Mercaptoethanol, dan 100 μ l SDS 10%. Larutan dihomogenkan menggunakan alat *vortex* selama 5-10 detik, setelah benar-benar homogen, larutan diinkubasi pada suhu 60° C selama 1 sampai 2 jam.

Enzim proteinase K ditambahkan ke dalam tabung sebanyak 5 μ l, setelah itu diinkubasi selama dua jam pada suhu 65° C. Setelah diinkubasi larutan kembali diberi proteinase K sebanyak 5 μ l, lalu diinkubasi lagi dengan suhu yang sama selama 12-15 jam. 100 μ l potasium asetat ditambahkan dan dicampurkan dengan cara membolak-balik tabung sebanyak kurang lebih

50x. Setelah larutan tercampur, tabung disimpan dalam es selama 20 menit. Tabung diangkat dari dalam es lalu dimasukkan ke dalam alat sentrifuga dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit.

Supernatan dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml baru lalu ditambahkan kloroform dan isoamil alkohol dengan perbandingan 24 : 1 sebanyak setengah volume supernatan. Larutan dicampurkan dengan cara membolak-balik tabung sebanyak 50x, setelah itu tabung dimasukkan ke dalam alat sentrifuga yang kecepatan dan waktunya telah diatur, yaitu 14.000rpm dan 10 menit. Bagian supernatan dipindahkan ke tabung 1,5 ml baru lalu ditambahkan alkohol 100% (v/v) hingga mencapai volume 1,5 ml. Larutan dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan tabung sebanyak 20 kali dan disentrifuga pada 15.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang secara hati-hati agar endapan tidak terbang setelah itu endapan dicuci alkohol 70% (v/v) sebanyak 50 μ l lalu disentrifuga pada kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit.

Alkohol dibuang dengan cara membalikan tabung secara hati-hati agar endapan tidak terbang, setelah itu endapan dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C. Endapan yang telah kering diberi *buffer* TE yang telah dicampur dengan RNase sebanyak 20-50 μ l. Lautan DNA diinkubasikan pada suhu 37°C selama satu jam. Setelah diinkubasi, larutan kembali disentrifuga pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml baru. Hasil isolasi DNA dikarakterisasi

menggunakan alat elektroforesis pada gel agarosa 1% yang dilarutkan dalam *buffer* TAE 1x.

3. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA daerah ITS dilakukan dengan mengacu pada Topik dan Pancoro (2001) dengan beberapa modifikasi. Amplifikasi DNA daerah ITS dilakukan dengan komposisi : 10x *buffer* sebanyak 5 µl hingga konsentrasi akhir adalah sebesar 1x, MgCl₂ sebanyak 4 µl dengan konsentrasi akhir sebesar 1,5mM, primer ITS4 dan ITS5 sebanyak 0,5 µl dengan konsentrasi akhir sebesar 10 pmol/µl, 0,1 µl dNTPs dengan konsentrasi 0.2 mM, 0,25 µl enzim *Taq* polimerase dengan konsentrasi 1 U/µl, 2 µl DNA *template* dan menambahkan air deion hingga volume akhir PCR adalah 50 µl.

Tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR dengan program mengacu pada Topik dan Pancoro (2001), yaitu: *initial pre-melt* pada suhu 95°C dengan waktu 0.5 menit selama satu siklus, *denaturation* pada suhu 95°C selama 0,30 menit, *annealing* pada suhu 40° C selama 1 menit, *extention* pada suhu 71° selama 2 menit. Tahap *denaturation* sampai *extention* dilakukan sebanyak 32 siklus. Tahap *extention* akhir pada suhu 71° C dilakukan selama 10 menit. Hasil amplifikasi dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa dalam *buffer* TAE 1x.

4. Elektroforesis

Tahap awal elektroforesis yaitu dengan menyiapkan *tray*/cetakan gel elektroforesis untuk membuat gel. Sisi-sisi yang terbuka ditutup menggunakan selotip kertas. Gel agarosa dibuat dengan konsentrasi 1% dalam *buffer* TAE 1x. Gel agarosa dididihkan dengan *microwave* sampai campuran terlihat bening. Gel agarose dituangkan ke dalam cetakan gel yang sudah disiapkan lengkap dengan sisir (untuk tempat aplikasi sampel) dipasang dengan posisi tegak dan berjarak 0,5-1 mm dari dasar cetakan. Setelah itu gel dibiarkan mengeras pada suhu ruang.

Sampel DNA yang akan dielektroforesis disiapkan lalu ditambahkan *loading dye* kedalam sampel dengan perbandingan 2:5. Sampel dimasukkan ke dalam sumur yang terdapat dalam gel yang sudah dimasukkan ke dalam alat elektroforesis dan diisi dengan *buffer* TAE 1x. Sampel dielektroforesis pada daya 100 volt selama 40 menit.

5. Sikuensing DNA

Sampel DNA daerah ITS hasil amplifikasi dikirim ke Macrogen Inc Seoul-Korea untuk disikuensing. Produk amplifikasi disikuensing menggunakan primer ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

6. Analisis data

Sikuensing DNA daerah ITS dilakukan di Macrogen Inc. Pencarian daerah ITS pada sikucn DNA dilakukan melalui penyejajaran dengan

menggunakan program komputer CLUSTALX (Thompson dkk., 1997) dan dibantu dengan program Genamics Expression. Analisis filogenetik berdasarkan metode parsimoni dilakukan dengan menggunakan program komputer PAUP versi 4.0b10 (Swofford 1998) untuk empat set data: ITS-1, gen 5.8S, ITS-2 dan gabungan ketiganya. Semua data set dianalisis dengan *heuristic search method* dan *tree bisection-reconnection (TBR) branch swapping*. *Random addition sequence* dengan *stepwise addition option* dilakukan sebanyak 100 ulangan. Semua pohon filogenetik yang terbentuk disimpan. Evaluasi pohon dilakukan dengan menggunakan analisis *bootstrap* (Felsenstein, 1985) sebanyak 1000 ulangan. Indeks konsistensi (CI) dan indeks restensi (RI) dihitung untuk pembuatan pohon konsensus.

