

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Molekuler Kawasan Konservasi Ilmiah Pusat Riset Biosistematika dan Evolusi Kebun Raya Bogor - Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Bogor Jawa Barat. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari – Desember 2024

B. Populasi Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun *M. pedicellata* Vak XXIV.A.156 berasal dari Sulawesi. Lokasi pengambilan sampel penelitian ini diambil dari koleksi Kebun Raya Bogor - Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Jl.Ir. H. Juanda No. 13, Paledang, Kecamatan Bogor Tengah, Kota Bogor, Jawa Barat. Jumlah sampel yang diambil dari penelitian ini adalah satu helai daun *M. pedicellata*. Teknik pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling*. Karena *purposive sampling* adalah teknik pengambilan data dengan pertimbangan tertentu, sehingga dapat memungkinkan peneliti untuk memilih sampel yang relevan dan efisien dalam meningkatkan akurasi hasil penelitian (Sugiyono, 2012).

C. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya sebagai berikut:

1. Alat

Adapun alat yang di gunakan pada penelitian ini diantaranya adalah mortar, pestle, mikropipet (*Eppendorf*), erlenmeyer, inkubator,

timbangan analitik (*Precisa XT220A*), spatula, gelas ukur, centrifuge, (*Spectrofuze 24 D Microcentrifuge*), microcentrifuge (*Bench mark*), spin down (*My Fuge TM Mini Centrifuge*), heat block, microwave, UV sample tray dan GelDoc (*BIO-RAD GelDoc TM EZ imager*), vortex (*Digital Vortex Mixer 230 Volt*), PCR (*TaKaRa PCR Thermal Cyclers*), Elektroforesis (*NYX TECHNIC VoltronyxTM*), Tangki elektroforesis, *gel tray*, *gel comb*.

2. Bahan

Adapun bahan yang di gunakan pada penelitian ini adalah daun *M. pedicellata* koleksi Kebun Raya Bogor, 1% Buffer tris acetate EDTA (TAE), TE, pasir silika, polivinilpirolidon (PVP), Buffer (CTAB), B-mercaptoetanol, PCR mix (*MyTaq polimerase*, ddH₂O, DNA sampel), 1kb DNA ladder, GelRed (pewarna *fluorescent*), *loading dye*, B-mercaptoethanol, Clorform (CI) *Isoamyl-alcohol* (24:1), ice-cold Isopropanol, primer ITS (*Reverse* dan *Forward*), serbuk agarose, mikrotip (2,5 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 1000 µL), tube PCR (2 ml, 1.5 ml, 0.2 ml), Alumunium foil, plastik wrap.

D. Jenis Metode Penelitian

Jenis metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu analisis deskriptif dengan penyajian data secara kualitatif, karena dapat menggambarkan fakta secara akurat dan sistematis mengenai DNA tanaman *M. pedicellata* serta kekerabatannya berdasarkan sekuen ITS.

E. Teknik Pengumpulan Data

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini dengan observasi secara langsung di lapangan. Adapun pengumpulan data pada penelitian ini

meliputi preparasi sampel, ekstraksi DNA, amplifikasi DNA, elektroforesis, dan sekuensing. Berikut adalah langkah-langkah pengumpulan data :

1. Preparasi Sampel

Preparasi sampel diawali dengan melakukan pengambilan sampel daun *M. pedicellata* dari koleksi Kebun Raya Bogor menggunakan gunting tanaman dengan memilih daun muda yang segar dan sehat. Sampel daun pada penelitian ini menggunakan daun muda, karena daun muda mempunyai DNA yang lebih banyak, selain itu daun muda juga mempunyai polifenol dan senyawa metabolit yang lebih sedikit sehingga hasil isolasi DNA dapat lebih murni (Elfianis *et al.*, 2021). Tujuan dari tahapan ini adalah untuk mendapatkan DNA berkualitas baik dalam proses ekstraksi (Sunaryo, 2015). Setelah mendapatkan sampel daun *M. pedicellata*, kemudian bagian daun yang diambil dibersihkan dari kotoran. Selanjutnya sampel dibawa ke Laboratorium untuk tahap ekstraksi. Kemudian setengah bagian daun dipotong menjadi bagian-bagian kecil menggunakan gunting yang steril, selanjutnya sampel dihaluskan menggunakan mortar dan pestle dengan menambahkan pasir silika. Sampel yang sudah dihaluskan kemudian dimasukkan ke dalam tube ukuran 2,0 ml.

2. Ekstraksi DNA sampel

Ekstraksi sampel dilakukan dengan mencampurkan bahan pada sampel yang sudah digerus halus menggunakan mortar dan pestle dengan metode CTAB (Fitmawati *et al.*, 2013). Penggunaan CTAB pada tahap ini sesuai dalam metode Doyle and Doyle. (1987) yang didukung oleh Stewart dan Via. (1993), bahwa CTAB merupakan senyawa yang digunakan untuk mengendapkan protein dan senyawa makromolekul lain, seperti poliasakarida.

Langkah awal untuk memulai ekstraksi yaitu dengan disiapkan 0,5 mL sampel hasil dari preparasi, kemudian dimasukkan PVP seujung sendok, lalu ditambahkan 1 ml buffer (CTAB) dan ditambahkan β -*mercaptoethanol* 50 μ L. Setelah itu vortex agar tidak ada endapan. Lalu diinkubasi dengan suhu 50°C dan waktu 30 menit, setiap 5 menit digoyangkan (*invert*). Setelah diinkubasi buka tutup tube 1-2 menit agar tidak terlalu panas, lalu ditambahkan *chloroform isoamyl* (CI) sebanyak 500 μ L, digoyangkan terlebih dahulu. Kemudian dilakukan *centrifuge* dengan kecepatan 7.200 rpm selama 15 menit. Setelah di *centrifuge* terbentuknya supernatan.

Kemudian supernatan diambil sebanyak 700 μ L dan dipindahkan kedalam *microcentrifuge* yang baru ukuran 1,5 ml. Selanjutnya ditambahkan isopropanol dingin (*ice-cold isopropanol*) sebanyak 500 μ L sehingga terbentuknya supernatan dan pellet (DNA murni). Setelah itu *centrifuge* kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Filtrat hasil dari *centrifuge* tersebut dibuang. Ditambahkan *washing buffer* sebanyak 1 ml, lalu *centrifuge* kembali dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Kemudian diberi larutan TE sebanyak 100 μ L. Lalu diinkubasi terlebih dahulu pada suhu ruang selama 5 menit. Setelah itu 1 μ L DNA dicampurkan dengan PCR mix dengan tube ukuran 0,2 ml yang selanjutnya akan dilakukan proses amplifikasi menggunakan alat PCR.

3. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA menggunakan alat PCR dengan melakukan konfirmasi DNA pada sampel menggunakan primer ITS (Fitmawati *et al.*, 2013). Tahap amplifikasi DNA menggunakan beberapa komponen PCR mix dengan volume total 50 μ L, menggunakan komposisi reagen

PCR di antaranya adalah primer ITS (2 μ L *forward* dan 2 μ L *reverse*), 25 μ L *MyTaqTM Master mix*, 16 μ L ddH₂O, dan 5 μ L DNA tamplat. Kemudian dimasukkan ke dalam alat PCR untuk dilakukan amplifikasi DNA. Proses PCR dijalankan selama kurang lebih 1,5 jam dalam 5 tahap yakni denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, selanjutnya diamplifikasi sebanyak 35 siklus yang terdiri dari denaturasi dengan suhu 95°C selama 20 detik, *annealing* dengan suhu 58°C selama 30 detik, *extention* dengan suhu 72°C selama 30 detik, dan *post extention* dengan suhu 72°C selama 5 menit. Amplifikasi DNA meng-cover daerah ITS1 dan ITS2, menggunakan primer dengan target region 17SE-26SE dengan Urutan nukleotida untuk primer *forward* dan *reverse* dilihat pada tabel 3.1 di bawah

Tabel 3.1 Urutan nukleotid primer untuk amplifikasi DNA

Region	Primer	Sequence (5'-3')	Sumber
ITS	AB101 F	ACGAATTATGGTCCGGTGAA	(Sun <i>et al.</i> , 1994)
	AB102 R	GTGTTCG TGAATTCCCCGGTTCGCTCG CCGTAA	

Kemudian dilakukan elektroforesis untuk memisahkan DNA yang sudah di ekstraksi. Media yang digunakan adalah *gel agarose*. Pemisahan DNA pada elektroforesis berdasarkan muatan listrik dan ukurannya.

4. Pembuatan *Gel Agarose*

Serbuk *agarose* ditimbang sebanyak 0,8 gr. Disiapkan tabung ukur, dan dibuat larutan TAE sebanyak 80 mL kedalam erlenmeyer. Kemudian campuran tersebut dihomogenkan, ditutup dengan plastik *wrap* yang sudah dilubangi kecil-kecil. Larutan dimasukkan ke dalam

oven dan dijalankan selama 2 X 1 menit. setiap 1 menit larutan diangkat dan digoyangkan agar serbuk *agarose* larut. Setelah itu ditambahkan dengan *GelRed* sebagai pewarna *fluorescent* yang dituangkan sebanyak 0,5 μ L. Selanjutnya erlenmeyer digoyangkan perlahan dan diamkan selama 30 detik. Setelah 30 menit, larutan tersebut di tuangkan ke dalam cetakan agar (*gel tray*) lalu di beri sisir (*gel comb*). Larutan dituangkan melalui tepi cetakan secara perlahan. Kemudian diamkan selama 15 menit hingga padat atau berbentuk agar. Setelah berbentuk agar tahap selanjutnya dilakukan proses elektroforesis.

5. Proses Elektroforesis

Proses elektroforesis dilakukan untuk memisahkan molekul berdasarkan ukurannya. Proses elektroforesis diawali dengan *cara gel agarose* dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang sudah diisi dengan 1% TAE. Kemudian disiapkan mikrotube yang sudah berisi PCR mix dan DNA *ladder* 5 μ L. Pada baris pertama dan ujung kiri dituangkan *ladder*. Lalu pada baris ke-dua dituangkan PCR mix (sampel). Kemudian tutup elektroforesis dan *start* elektroforesis pada tegangan 100 V selama 30 - 45 menit.

Setelah itu dilakukan visualisasi hasil elektroforesis menggunakan *GelDoc UV transilluminator* untuk melihat pita DNA. Alat ini berfungsi sebagai pemindah zat pewarna *fluorescent* pada sampel, sehingga sampel dapat terlihat dengan pancaran cahaya. Cara melihat pita DNA menggunakan *GelDoc UV transilluminator* diawali dengan *gel agarose* yang sudah selesai di elektroforesis kemudian dimasukkan kedalam instrumen *GelDoc UV transilluminator* dengan cara meletakkan *gel agarose* pada *UV sample tray*, selanjutnya UV

sample tray tersebut dimasukkan ke dalam *GelDoc transilluminator*. Kemudian tekan tombol on pada bagian belakang *GelDoc transilluminator* untuk melakukan analisis visualisasi hasil *gel agarose* yang berupa pita-pita DNA.

6. Sekuensing

Setelah diketahui hasil dari visualisasi tersebut terdapat amplikon yang baik, kemudian dilakukan sekuensing DNA. Sekuensing DNA adalah proses pengurutan basa nukleotida pada DNA. Proses sekuensing DNA dilakukan di *1st Base Malaysia*, melalui PT. Layanan Genetika *Science Indonesia*.

F. Teknik Analisis Data

Teknik Analisis Teknik analisis data pada penelitian ini menggunakan *software* MEGA 11 dan *website* pada *Center for Biology Information* (NCBI). Hasil sekuensing dari sekuen *forward* dan *reverse* dalam format *AB1 file* berupa kromatogram, di edit menggunakan perangkat lunak MEGA 11 dengan memilih kromatogram DNA yang tidak saling tumpang tindih. Kemudian dilakukan *reverse complement* pada sekuen *reverse* untuk meminimalkan ketidakcocokan antara kedua sekuen. Hasil yang didapat berupa *contig sekuen*.

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) dilakukan pada basis data NCBI dengan memasukkan hasil *contig sekuen* ke *website* BLAST. Kemudian klik BLAST lalu muncul sekuen yang mempunyai kesamaan basa nukleotida dengan sampel yang digunakan dan pilih yang mempunyai *percent identity* tertinggi yakni mendekati 100%, *E. value* mendekati 0.0, dan *query coverage* mendekati 100% pada setiap *database* (Tindi *et al.*, 2017). Kemudian sekuen yang terpilih dari BLAST disimpan dalam format FASTA untuk di analisis filogenetik.

Analisis filogenetik dilakukan untuk mengetahui hubungan kekerabatan antara sampel yang digunakan dengan sekuen dalam *didatabase*. Sampel yang terpilih dari hasil BLAST NCBI dilakukan pensejajaran (*Alignment*) CLUSTAL W menggunakan *software Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA) (Tamura *et al.*, 2021). Kemudian dilakukan analisis pohon filogenetik menggunakan metode *neighbor joining* dan nilai *bootstrap* 1000 ulangan dengan model *kimura 2- paramer*.