

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Jalan Teratai Dusun III, Kecamatan Sei Rampah, Kabupaten Serdang Bedagai sebagai lokasi pengambilan sampel daun ubi kayu, analisis daun dilakukan di Laboratorium Genetika Lantai 4 Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara Medan pada bulan Juli hingga Selesai 2024.

3.2. Alat Dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu mortal dan alu, spatula, kamera digital, gunting, spidol permanen, *ice box*, *freezer*, vortex (*Biosan Multi-Vortex V-32*), PCR (*Polymerase Chain Reaction*) gradient (*Eppendorf*), tube (*Eppendorf*) 1,5 ml, mini horizontal elektroporesis HU10 (*BIO-RAD*), digital *water bath* (18-ONE), *sentrifuge* (*Eppendorf*), *spin column*, *collection tube*, *microcentrifuge tube*, gelas ukur 100 ml, labu erlenmeyer 100 ml, mikro pipet (Rainin) dengan volume 10 μ l ; 20 μ l ; 100 μ l ; dan 1000 μ l, tube PCR 0,2 ml, gelas kimia 500 ml, tip mikro pipet kuning ; biru dan putih, alat Gel Documentation (BIOSTEP), dan *hot plate*.

3.2.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan adalah empat jenis sampel daun muda ubi kayu yang diambil dari Jalan Teratai Dusun III, Kecamatan Sei Rampah Kabupaten Serdang Bedagai, DNA template, aluminium foil, tissu, alkohol 70%, PCR mix, plastik klip kedap udara (*plastic zip-lock*), gloves, DNA template, DNA Mini Kit Plant (*Favorgen*), ice gel pack kotak, ddH₂O (*deionized water*) atau akuabides, Serbuk Agarose (*Infitrogen*), TBE (tris HCl, asam borat, dan EDTA) 10x (1 st Base), akuades steril, DNA Ladder 100 bp (Geneaid) *Kit PCR with dye, NWF* (*Nuc*

lease water free), *RNase* dan *DNA Gel stain* dan primer DNA yang digunakan OPA 2 (5' TGCCGAGCTG 3'), OPA 3 (5' AGTCAGCCAC 3'), OPA 5 (5'AGGGGTCTTG 3'), OPA 7 (5' GAAACGGGTG 3'), OPD 11 (5' AGCGCCATTG 3') dan OPD 13 (5' GGGGTGACGA 3').

3.3 Prosedur Penelitian

Adapun prosedur penelitian untuk melihat keragaman molekuler (keragaman genetik) pada daun tanaman ubi kayu (*Manihot esculenta* Cantz) menggunakan beberapa tahapan sebagai berikut: pengoleksian sampel, isolasi atau ekstraksi DNA, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), elektroforesis, dan analisis hasil data. Prosedur untuk melihat hubungan filogenetik daun tanaman ubi kayu (*Manihot esculenta* Cantz) yaitu menggunakan RAPD yang berasal dari Desa Sei Rampah Kabupaten Serdang Bedagai.

3.3.1 Koleksi Sampel

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian yaitu daun dari daun tanaman ubi kayu (*Manihot esculenta* Cantz), Sampel diambil dari 1 (satu) lokasi penelitian di Jalan Teratai Dusun III, Kecamatan Sei Rampah, Kabupaten Serdang Bedagai. Sampel dari tanaman daun ubi kayu yang segar dibersihkan dan disemprotkan menggunakan alkohol 70%, lalu sampel dikeringkan menggunakan tissue selanjutnya di bungkus menggunakan aluminium foil, kemudian sampel disimpan kedalam plastik kedap udara (zip-lock) dan selanjutnya sampel yang didapatkan dimasukkan kedalam ice box yang berisi ice pack kotak. Jika sampai di laboratorium sampel dipindahkan ke dalam *freezer* agar masa penyimpanan sampel bertahan lebih panjang, *freezer* diatur dengan suhu rendah (-20°C).

3.3.2 Isolasi DNA

Tahapan isolasi DNA menggunakan *Plant DNA Mini Kit Komersil* dengan merk *Favorgen*. Sampel digunakan berasal dari bagian daun yang masih muda dan masih dalam keadaan segar. Sebelum sampel dihaluskan panaskan *water bath* terlebih dahulu dengan suhu 65°C. Tahap selanjutnya dapat dilakukan sebagai berikut:

- a. Dihaluskan sampel yang sudah ditimbang (100 mg) dengan timbangan digital, lalu dimasukkan kedalam mikrotube.
- b. Ditambahkan RNase 8 μ l dan larutan buffer FAPG 1 sebanyak 400 μ l. Sampel divortex dengan durasi waktu 2 menit selanjutnya diinkubasi pada suhu 65°C dengan durasi waktu 10 menit, bolak-balik tube 2-3 kali selama diinkubasi .
- c. Setelah sampel selesai diinkubasi, 130 μ l buffer FAPG2 ditambahkan, dan diaduk sekali lagi selama sepuluh detik. Setelah itu, sampel diinkubasi sekali lagi selama lima menit di atas es.
- d. Setelah prosedur inkubasi selesai, sampel dalam bentuk larutan dibuat dan dimasukkan ke dalam kolom filter dalam tabung pengumpul 2 ml. Kemudian disentrifugasi selama tiga menit pada 18.000 x g (14.000 rpm).
- e. *Filter column* kemudian dibuang dan cairan yang berada didalam *mikrocentrifuge tube* dipindahkan 300 μ l kedalam *collection tube* baru, kemudian ditambahkan 1,5 volume buffer FAPG3. Seluruh sampel campuran divortex kembali dengan durasi waktu 10 detik.
- f. Setelah selesai campuran divortex, kemudian sampel yang berupa larutan dipindahkan sebanyak 650 μ l ke *filter column* yang diletakkan pada *collection tube* 2 ml. Selanjutnya campuran disentrifuge dengan kecepatan 18.000 x g (14.000 rpm) dengan durasi waktu 1 menit.
- g. Tabung pengumpul limbah dan kolom penyaring diisi ulang dengan larutan. Tabung pengumpul 2 ml baru diisi dengan larutan dari tabung pengumpul limbah dan kolom penyaring setelah sampel campuran disentrifugasi sekali lagi selama satu menit pada kecepatan 18.000 x g (14.000 rpm).
- h. Kolom filter diisi dengan 500 μ l larutan buffer WI, kemudian disentrifugasi selama 30 detik pada 18.000 x g (14.000 rpm). 600 μ l larutan buffer pencuci kemudian ditambahkan setelah larutan dalam kolom filter dibuang dan dimasukkan kembali ke dalam tabung pengumpul. Setelah mensentrifugasi seluruh campuran sekali lagi selama 30 detik pada 18.000 x g (14.000 rpm), larutan dalam kolom filter dibuang kembali ke dalam tabung pengumpul.

Setelah itu, campuran disentrifugasi sekali lagi selama tiga menit pada kecepatan $18.000 \times g$ (14.000 rpm).

- i. I. Selanjutnya, tabung mikrosentrifus 1,5 ml baru diisi dengan kolom filter. Setelah itu, 100 μ l larutan buffer elusi ditambahkan lagi, dan campuran didiamkan pada suhu ruangan selama lima menit. Selama 30 detik, seluruh kombinasi komponen disentrifus pada kecepatan $18.000 \times g$ (14.000 rpm).
- j. DNA murni yang ada di dalam tabung *mikrosentrifus*. Setelah itu, DNA murni yang diekstraksi disimpan pada suhu -20°C di dalam *freezer*.

3.3.3 Amplikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Tahapan amplifikasi PCR yang diperlukan ada beberapa campuran larutan yaitu:

1. Larutan PCR dimasukkan lalu di mix sebanyak 5 μ l menggunakan mikro pipet kedalam *mini tube*.
2. Ditambahkan larutan DNA template sebanyak 2 μ l kedalam *mini tube*.
3. Ditambahkan masing-masing larutan primer OPA 2, OPA 3, OPA 5, OPA 7, OPD 11 dan OPD 13 ke dalam *mini tube* sebanyak 2 μ l.
4. Ditambahkan larutan terakhir yaitu NFW sebanyak 1 μ l kedalam *mini tube*.
5. Setelah pencampuran, bahan ditempatkan dalam instrumen PCR gradien untuk diperkuat.

Langkah-langkah berikut digunakan dalam proses amplifikasi gradien PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Starter panas dilakukan selama lima menit pada suhu 94°C , diikuti denaturasi selama empat puluh lima detik pada suhu yang sama. *Annealing* (penempelan pada primer) berlangsung pada suhu $36-37^{\circ}\text{C}$ selama satu menit, sedangkan ekstensi berlangsung pada suhu 72°C selama 1,5 menit untuk 45 siklus. Tahapan terakhir dilakukan final perpanjangan DNA (Extention) pada suhu 72°C dengan durasi waktu 8 menit 15 detik (495 detik), setelah semuanya sudah dilakukan kemudian diholding temperature dengan suhu 4°C untuk menetralkan alat PCR (Sitepu *et al.*, 2019). Sampel DNA murni yang didapatkan dari hasil amplifikasi PCR selanjutnya melalui uji kualitatif DNA menggunakan alat elektroforesis.

Tabel 3.1. Tahapan Amplifikasi DNA

Tahapan		Suhu (°C)	Waktu (detik)	Siklus
Hot start		98	45	1
Denaturasi		98	10	30
Annealing	OPA2	36	60	
	OPA 3			
	OPA 5			
	OPA 7			
	OPD 11			
	OPD 13			
Extension		72	30	
Final extension		72	145	1
Holding temperature		4 °C		

3.3.4 Elektroforesis

Uji kualitatif DNA menggunakan alat elektroforesis gel agarose dengan dilengkapi *Mini Horizontal Electrophoresis* DNA dengan agarose 1% dan divisualisasikan dengan menggunakan UV transluminator. Tujuan pengujian DNA kualitatif adalah untuk menilai kualitas hasil amplifikasi DNA atau isolasi DNA genom keseluruhan. Proses uji kualitatif DNA diawali dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Diawali dengan proses penimbangan bubuk agarose sebanyak 0,4 gr menggunakan timbangan digital untuk pembuatan gel agarose. Kemudian dilarutkan bubuk agarose ke dalam larutan TBE buffer 40 ml di dalam tabung erlenmeyer dan ditutup menggunakan aluminium foil. Dihomogenkan terlebih dahulu sebelum campuran larutan dipanaskan diatas *hot plate*, dipanaskan larutan diatas *hot plate* hingga mendidih. Penting untuk memastikan agarosa larut secara menyeluruh dan warna larutan tetap bening saat melarutkannya dalam larutan penyangga TBE.

- b. Agarose yang telah larut dengan sempurna dicampurkan dengan larutan *red gel stain* 2 μ l lalu dihomogenkan. Cetakan yang dilengkapi sisir diisi dengan larutan gel yang dihasilkan, lalu dibiarkan memadat.
- c. Dilepas secara perlahan sisir yang berada dicetakan dan selanjutnya gel yang telah mengeras dimasukkan ke dalam *Mini Horizontal Electrophoresis* dan direndam dengan campuran larutan buffer TBE serta akuades hingga gel terendam.
- d. Sampel DNA hasil PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 8 μ l dengan masing-masing kode yang telah ditetapkan dimasukkan kedalam masing-masing sumuran yang telah ditentukan menggunakan *mikro pipet*. Kemudian proses elektroforesis dimulai hingga perpindahan sampel yang di uji terjadi dalam waktu 45 menit dengan tegangan listrik 70 volt.
- e. Terakhir hasil uji kualitatif DNA dilakukan menggunakan *gel documentation* dan divisualisasikan dengan UV transluminator untuk menampilkan urutan pita DNA yang dihasilkan.

3.4 Analisa Data

Setelah urutan pita DNA dapat dilihat masing-masing dari primer OPA 2, OPA 3, OPA 5, OPA 7, OPD 11 dan OPD 13, pada keragaman jenis daun ubi kayu (*Manihot esculenta* Cantz). dilakukan analisis data sebagai berikut:

1. Analisis Keragaman Morfologi Ubi Kayu (*Manihot esculenta* Cantz)

Analisis keragaman morfologi dilihat dari bermacam-macam jenis tanaman ubi kayu (*Manihot esculenta* Cantz) seperti daun ubi kayu yang berbeda, dan batang ubi yang berbeda. Sedangkan pada daun ubi kayu dapat dilihat dari barisan ke 3 daun ada yang menjari 5-9 helai, ada daunnya sempit memanjang dengan tepi rata, dan ada daun yang bergelombang dengan sudut tumpul. Sedangkan pada batang ubi kayu memiliki perbedaan dari warna, ada yang berwarna pink keunguan, hijau tua, dan juga hijau muda.

2. Analisis Hubungan Dendogram *Manihot esculenta* Cantz Dengan Penanda *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD)

Tingkat polimorfisme terbesar ditemukan pada penanda RAPD; polimorfisme adalah gambaran yang diperkuat yang berasal dari variasi fragmen DNA yang terdeteksi. Dengan menggunakan primer seperti OPA 2, OPA 3, OPA 5, OPA 7, OPD 11, dan OPD 13, seseorang dapat melihat variasi fragmen DNA. Pada penandaan RAPD ini menggunakan pengelompokkan dan penyusunan, pada pita DNA terlihat maka diberi nilai 1, begitu pun sebaliknya jika pita DNA tidak terlihat maka diberi nilai 0, berdasarkan penandaan DNA memiliki ukuran pita DNA sekitar 1 kb ladder. Untuk melihat hubungan dendogram dari *Manihot esculenta* Cantz dapat menggunakan aplikasi NTYS pc-2.02i.



UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
SUMATERA UTARA MEDAN