

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni hingga selesai. Pengambilan sampel dilakukan di Jalan Bukit Barisan, Kelurahan Glugur Darat I, Kecamatan Medan Timur, Kode Pos : 20238, Medan, Sumatera Utara. Kemudian dilanjutkan dengan analisis molekuler di Laboratorium Genetika Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Sumatera Utara, Medan.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Penelitian ini menggunakan alat yaitu, gunting, kamera digital, *ice box*, freezer, timbangan Analitik, mortal dan alu, spatula, vortex (*Biosan Multi-Vortex V-32*), Mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*) gradient (Eppendorf), digital *water bath* (*18-ONE*), *microcentrifuge tube*, *sentrifuge* (Eppendorf), *spin column* mini horizontal electrophoresis HU10 (*BIO-RAD*), labu erlenmeyer 100 ml, gelas ukur 100 ml, mikro pipet (*Rainin*) dengan volume 10 µl ; 20 µl ; 100 µl ; 1000µl, hotplate (*Benchmark*), gelas kimia 1000 ml, dan alat Gel Documentation (*BIOSTEP*), rak tube, autoclave.

3.2.2. Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan yaitu sampel daun muda yaitu sebanyak 5-6 helai tumbuhan Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), Belimbing Manis (*Averrhoa carambola* L.), Belimbing Sembiring (*Averrhoa carambola*), Belimbing Demak (*Averrhoa carambola* CV Demak) yang diambil dari daerah Bukit Tinggi, Medan Timur, spidol permanen, tip mikro pipet kuning ; biru dan putih, *collection tube*, tube PCR 0,2 ml, tube (Eppendorf) 1,5 ml, alkohol 70%, tisu, *zip-lock* (Plastik klip kedap udara), primer terdiri 6 jenis berbeda yaitu; OPA-2, OPA-3, OPA-5, OPA-7, OPD-11 dan OPD-13, DNA template, aluminium foil, ice gel pack kotak, gloves, DNA Extraction Kit (*Favorgen*), PCR mix, gen *rbcl*, ddH₂O

(*deionized water*) atau akuabides, loading dye (*Thermo- scientific*), akuades steril, TBE (tris HCl, Asam borat, dan EDTA) 10x (1st Base), Serbuk Agarose (*Infitrogen*), DNA loading dye, Kit PCR *with dye* dan DNA gel stain.

Tabel 3.1. Daftar Primer

Identifikasi Primer	Urutan Basa
OPA-2	TGC CGA GCT G
OPA-3	AGT CAG CCA C
OPA-5	AGG GGT CTT G
OPA-7	GAA ACG GGT G
OPD-11	AGC GCC ATT G
OPD-13	GGG GTG ACG A

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian untuk melihat *fingerprint* atau yang disebut dengan sidik jari DNA dan melihat pola pita dari genotipe belimbing dengan genus *Averrhoa* menggunakan beberapa tahapan yaitu: pengoleksian sampel, isolasi atau ekstraksi DNA, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), elektroforesis dan analisis data. Prosedur untuk melihat hasil fingerprint DNA genotipe belimbing dengan genus *Averrhoa* yaitu menggunakan DNA yang berasal dari Jalan bukit barisan, Kecamatan Glugur Darat I, Medan Timur.

3.3.1. Koleksi Sampel

Pengambilan sampel dilaksanakan di Medan Timur. Sampel dipilih sebanyak 4 pohon yang masing – masing tegakan diambil sebanyak 5 – 6 helai daun muda dari pucuk tumbuhan Belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), Belimbing Manis (*Averrhoa carambola* L.), Belimbing Sembiring (*Averrhoa carambola*), Belimbing Demak (*Averrhoa carambola* CV Demak). Sampel daun yang diambil yang masih segar dibersihkan dan disemprot dengan menggunakan alkohol 70%, setelah sampel dikeringkan menggunakan tisu selanjutnya dibungkus menggunakan aluminium foil, kemudian dimasukkan kedalam kantong plastik putih kedap udara

(*zip-lock*) dan selanjutnya semua sampel daun yang didapatkan disimpan kedalam *ice box* yang berisi *ice pack* kotak. Setelah sampai di laboratorium sampel dipindahkan ke dalam *freezer* agar daya penyimpanan sampel bertahan lebih panjang dan *freezer* diatur dengan suhu yang rendah yaitu kurang dari 20°C (Nazly, 2023)

3.3.2. Isolasi DNA Daun Belimbing (*Averrhoa*)

Plant DNA Mini Kit komersial dengan merek *Favorgen* digunakan sebagai panduan dalam tahapan isolasi DNA. Sampel jaringan tumbuhan yang digunakan berasal dari bagian daun yang masih muda yang merupakan daun ketiga dari pucuk daun dan masih dalam keadaan segar. Sebelum sampel dihaluskan panaskan *water bath* terlebih dahulu dengan suhu 65°C. Tahapan selanjutnya yaitu;

- a. Sampel bagian daun tumbuhan dihaluskan menggunakan mortal dan alu, sebelumnya telah ditimbang sebanyak 100 mg dengan menggunakan timbangan digital,
- b. Sampel yang telah lunak selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung *tube* 1,5 ml, kemudian ditambahkan *Rnase* 4 µl dan larutan buffer *FAPGI* sebanyak 400 µl. Campuran sampel ini kemudian dihomogenkan dengan bantuan vortex dengan durasi waktu 10 detik selanjutnya diinkubasi pada suhu 65°C dengan durasi waktu 10 menit. Bolak balik *tube* 2-3 kali selama inkubasi,
- c. Sampel yang telah selesai proses diinkubasi kemudian ditambahkan 130 µl buffer *FAPG2* dan kembali divortex dengan durasi waktu 10 detik. Sampel kemudian diinkubasi kembali kedalam es dengan durasi waktu 5 menit,
- d. Proses inkubasi yang telah selesai menghasilkan sampel berupa larutan dipindahkan kedalam *filter column* yang diletakkan dalam 2 ml *collection tube*, selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 18.000 x g (14.000 rpm) dengan durasi waktu 5 menit,
- e. *Filter column* kemudian dibuang dan cairan yang berada didalam *mikrocentrifuge tube* dipindahkan 300 µl kedalam *collection tube* baru. Kemudian ditambahkan 1,5 volume buffer *FAPG3*. Seluruh sampel campuran divortex kembali dengan durasi 10 detik,

- f. Campuran telah selesai di vortex, kemudian sampel yang berupa larutan dipindahkan sebanyak 650 μ l ke *filter column* diletakkan pada *collection tube* 2 ml. Campurkan selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan 18.000 x g (14.000 rpm) dengan durasi waktu 1 menit,
- g. Setelah membuang larutan dalam tabung pengumpul, kolom penyaring dimasukkan kembali ke dalamnya. Ketika campuran disentrifugasi sekali lagi pada 18.000 x g (14.000 rpm) selama satu menit, kolom penyaring dimasukkan kembali ke dalam tabung pengumpul 2 ml yang baru, dan larutan dalam tabung pengumpul dibuang,
- h. Larutan buffer W I ditambahkan sebanyak 500 μ l kedalam *filter column* lalu disentrifuge dengan kecepatan 18.000 x g (14.000 rpm) dengan durasi waktu 30 detik. Kemudian larutan yang ada pada *filter column* lalu dibuang larutan *wash buffer* sebanyak 600 μ l. Kemudian seluruh campuran disentrifuge lagi dengan kecepatan 18.000 x g (14.000 rpm) dengan durasi waktu 30 detik, lalu larutan yang terdapat dalam *filter column* dibuang kembali kedalam *collection tube*. Kemudian campuran disentrifuge lagi dengan kecepatan 18.000 x g (14.000 rpm) dengan durasi waktu 3 menit,
- i. Tahapan selanjutnya, *filter column* dipindahkan kedalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml yang baru. Kemudian larutan *elution buffer* ditambahkan kembali 100 μ l dan diinkubasi pada suhu ruangan dengan durasi waktu 5 menit. Seluruh campuran bahan disentrifuge dengan kecepatan 18.000 x g (14.000 rpm) dengan durasi waktu 30 detik,
- j. Larutan yang terdapat didalam *microcentrifuge* merupakan DNA murni DNA murni yang telah didapatkan selanjutnya disimpan kedalam *freezer suhu dengsn suhu -20°C* (Nazly, 2023).

3.3.3 Amplifikasi PCR (Polymerase Chain Reaction)

Pada tahapan amplifikasi PCR diperlukan beberapa campuran larutan yaitu; Dimasukkan larutan PCR Mix sebanyak 25 μ l menggunakan mikro pipet kedalam *mini tube*; Larutan DNA template ditambahkan sebanyak 6 μ l kedalam *mini tube*; Lalu larutan primer OPA-2, OPA-3, OPA-5, OPA-7, OPD-11 dan OPD-13

ditambahkan masing-masing sebanyak 5 μ l ke dalam *mini tube*; Larutan terakhir yang ditambahkan ialah ddH₂O sebanyak 9 μ l ke dalam *mini tube*; Sampel yang telah selesai di mix selanjutnya dimasukkan kedalam alat PCR gradient untuk diamplifikasi.

Amplifikasi PCR dilakukan menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) gradient yaitu *Eppendof* dengan aturan sebagai berikut; pada tahap pertama *hot start* dilakukan pada suhu 94°C dengan durasi waktu 5 menit, tahapan selanjutnya dilakukan denaturasi dengan suhu 94°C dengan durasi waktu 45 detik, penempelan primer (*annealing*) dengan suhu 36-37°C dengan durasi waktu 1 menit dan *Extention* dengan suhu 72°C dengan durasi waktu 1,5 menit sebanyak 45 kali siklus. Tahapan terakhir dilakukan final perpanjangan DNA (*Extention*) pada suhu 94°C dengan durasi waktu 8 menit 15 detik (495 detik), setelah semua sudah dilakukan kemudian di holding temperature dengan suhu 4°C untuk menetralkan alat PCR. Sampel DNA murni yang didapatkan dari hasil amplifikasi PCR selanjutnya melalui uji kualitatif DNA menggunakan alat elektroforesis (Nazly, 2023). Tahapan Amplifikasi disajikan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2 Tahapan Amplifikasi

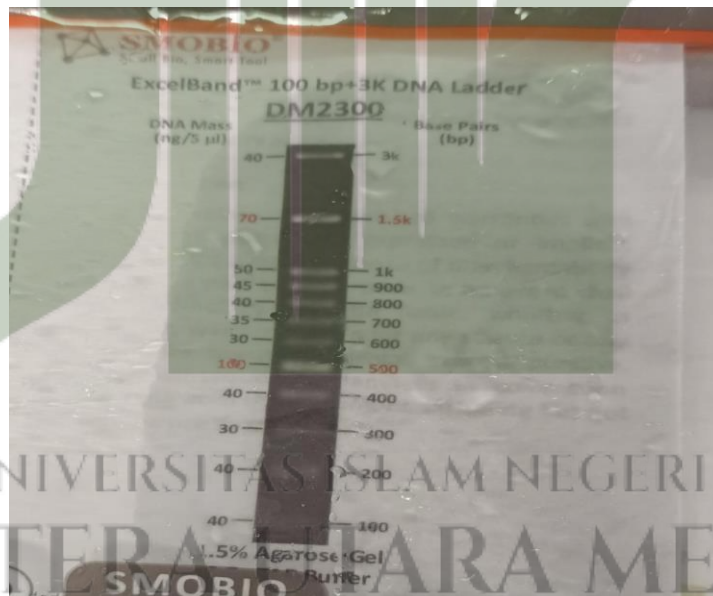
Tahapan		Suhu (°C)	Waktu (detik)	Siklus
Hot Start		94 °C	300 detik	1
Denaturasi		94 °C	45 detik	45
Annealing	OPA 2 OPA 3 OPA 5 OPA 7 OPD 11 OPD 13	36-37 °C	60 detik	
Extension		72 °C	90 detik	
Final Extension		72 °C	495 detik	1
Holding Temperature		2 °C		

3.3.4 Elektroforesis

Uji kualitatif DNA menggunakan alat elektroforesis gel agarosa dengan dilengkapi *Mini Horizontal Electrophoresis* DNA dengan agarose 1% dan divisualisasikan dengan menggunakan UV transluminator. Uji kualitatif DNA dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kualitas hasil isolasi DNA genom total ataupun pengamplifikasian DNA. Proses uji kualitatif DNA diawali dengan tahapan-tahapan yaitu; Pembuatan gel agarosa diawali dengan proses penimbangan bubuk agarose sebanyak 0,4 gr menggunakan timbangan digital. Bubuk agarose kemudian dilarutkan ke dalam larutan TBE buffer 40 ml di dalam tabung erlenmeyer dan ditutup menggunakan aluminium foil. Sebelum campuran larutan dipanaskan di atas *hot plate* larutan tersebut dihomogenkan terlebih dahulu, selanjutnya dipanaskan diatas *hot plate* hingga mendidih. Pada proses pelarutan agarose kedalam larutan TBE buffer dipastikan harus larut sepenuhnya dan warna larutan dalam keadaan tetap bening; Agarosa yang telah larut dengan sempurna dicampurkan dengan larutan *red gel stain* 1 µl lalu dihomogenkan. Larutan gel yang terbentuk dituang ke dalam cetakan yang telah dilengkapi dengan sisir, dan didiamkan hingga mengeras; Sisir yang berada dicetakan dilepas secara perlahan selanjutnya gel yang telah mengeras dimasukkan ke dalam *Mini Horizontal Electrophoresis* dan direndam dengan campuran larutan buffer TBE serta akuades hingga gel terendam; Sampel DNA hasil PCR (*Polymerase Chain Reaction*) 8µl dengan masing-masing kode yang telah ditetapkan dimasukkan ke dalam 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; Terakhir hasil uji kualitatif DNA dilakukan menggunakan *gel documentation* dan divisualisasikan dengan UV transluminator menampilkan urutan pita DNA yang dihasilkan (Nazly, 2023).

3.4 Analisis DNA

Sidik jari DNA yang diamati diatas UV transluminator diterjemahkan dalam data biner dengan ketentuan jika program NTSYS pc-2.02i yang merupakan pengelompokkan dan penyusunan dendogram pita DNA ada maka diberi nilai 1, sedangkan jika pita DNA tidak ada maka diberi nilai 0, serta ukuran pita DNA berdasarkan penanda ukuran DNA 1 kb ladder. Selanjutnya berdasarkan hasil foto pita DNA hasil amplifikasi PCR tiap primer, dianalisis sidik jari DNA diantara varietas belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.), belimbing manis (*Averrhoa carambola* L.), belimbing sembilang (*Averrhoa carambola*), dan belimbing demak (*Averrhoa carambola* Cultivar Demak). Setelah urutan pita DNA dapat dilihat pada masing-masing primer OPA-2, OPA-3, OPA-5, OPA-7, OPD-11 dan OPD-13, pada keanekaragaman pada tanaman Belimbing (*Averrhoa*) (Nazly, 2023). Kekerabatan atau koefisien dendogram berdasarkan karakter genetik dapat diketahui dari pohon kekerabatan pada aplikasi NTSY, semakin terang pola pita yang terlihat pada setiap spesies maka semakin terlihat kekerabatan dari setiap spesies *Averrhoa* yang teruji.



Gambar 3.1 Ukuran fragmen pola pita RAPD