

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Pemuliaan Tanaman Universitas Gajah Mada, dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada pada Bulan Juli sampai dengan Bulan Oktober 2018.

B. Alat dan Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, daun tanaman kepel (daun muda merah, daun muda hijau dan daun dewasa), DNA kit Wizard Genomic DNA Purification Kit A 1120 (Promega *catalogue number*: 12, 2018), alkohol 70%, isopropanol 95%, aquades, kertas parafilm, gel agarose 1%, larutan TAE 1x, ethidium bromida 1 ug/ml, DNA loading dye 2ul, DNA marker.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikropipet + tips, microsentrifuse, mortar, pestle, *tube eppendorf* 1,5 ml, alat tulis, *freezer*, *sterofoam*, spatula/sendok logam, *waterbath*, pembuangan tips, tempat es, sarung tangan, alat elektroforesis, *UV transiluminator*, spektrofotometer merk Tecan Spark 20M (Tecan *catalogue number*: 06, 2017), timbangan analitik, *glassware*, mangkuk timbang, *microwave*, gelas ukur.

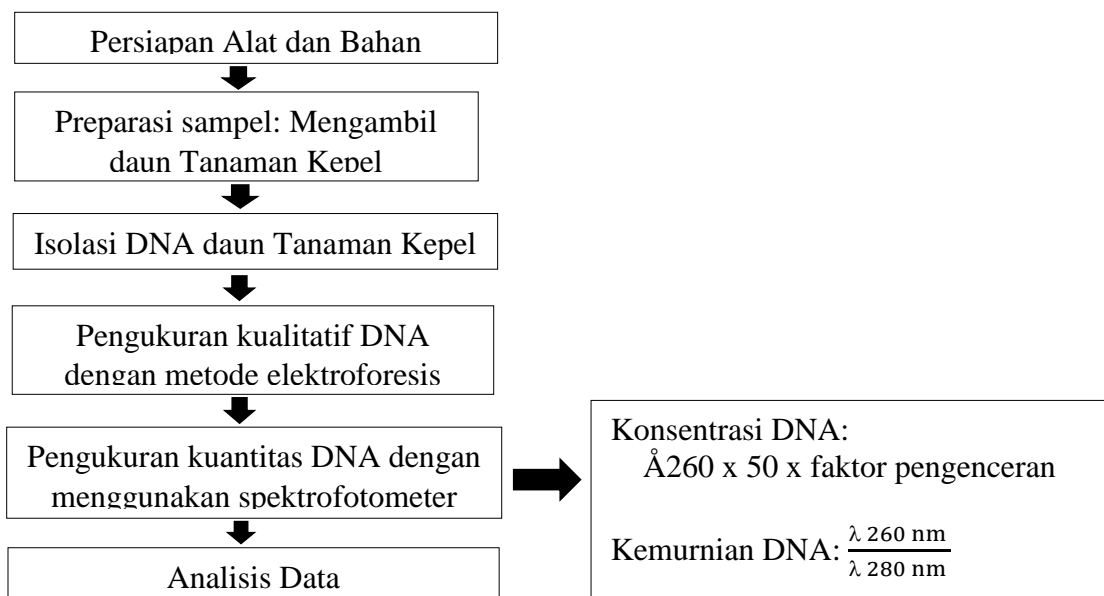
C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental menggunakan faktor tunggal yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri dari 9 perlakuan dengan 3 ulangan, sehingga terdapat 27 unit percobaan Adapun perlakuan dalam penelitian ini, yaitu:

1. 0,1 gram daun muda merah
2. 0,2 gram daun muda merah
3. 0,3 gram duan muda merah
4. 0,1 gram daun muda hijau
5. 0,2 gram daun muda hijau
6. 0,3 gram daun muda hijau
7. 0,1 gram daun dewasa
8. 0,2 gram daun dewasa
9. 0,3 gram daun dewasa

D. Tata Laksana Penelitian

Alur kerja yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan yaitu: (1) Persiapan alat dan bahan, (2) Preparasi sampel, (3) Isolasi DNA daun Tanaman Kepel, (4) Pengukuran kualitatif DNA, (5) Pengukuran kuantitas DNA, (6) Analisis data. Tahapan penelitian seperti tersaji pada Gambar 3.



Gambar 3. Tahapan Penelitian Isolasi DNA pada Daun Tanaman Kepel.

1. Preparasi Sampel



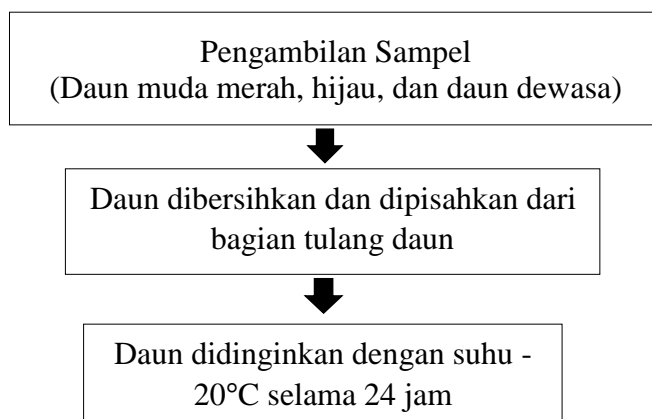
Daun muda merah

Daun muda hijau

Daun dewasa

Gambar 4. Sampel Daun Tanaman Kepel (Dokumentasi Pribadi, 2018)

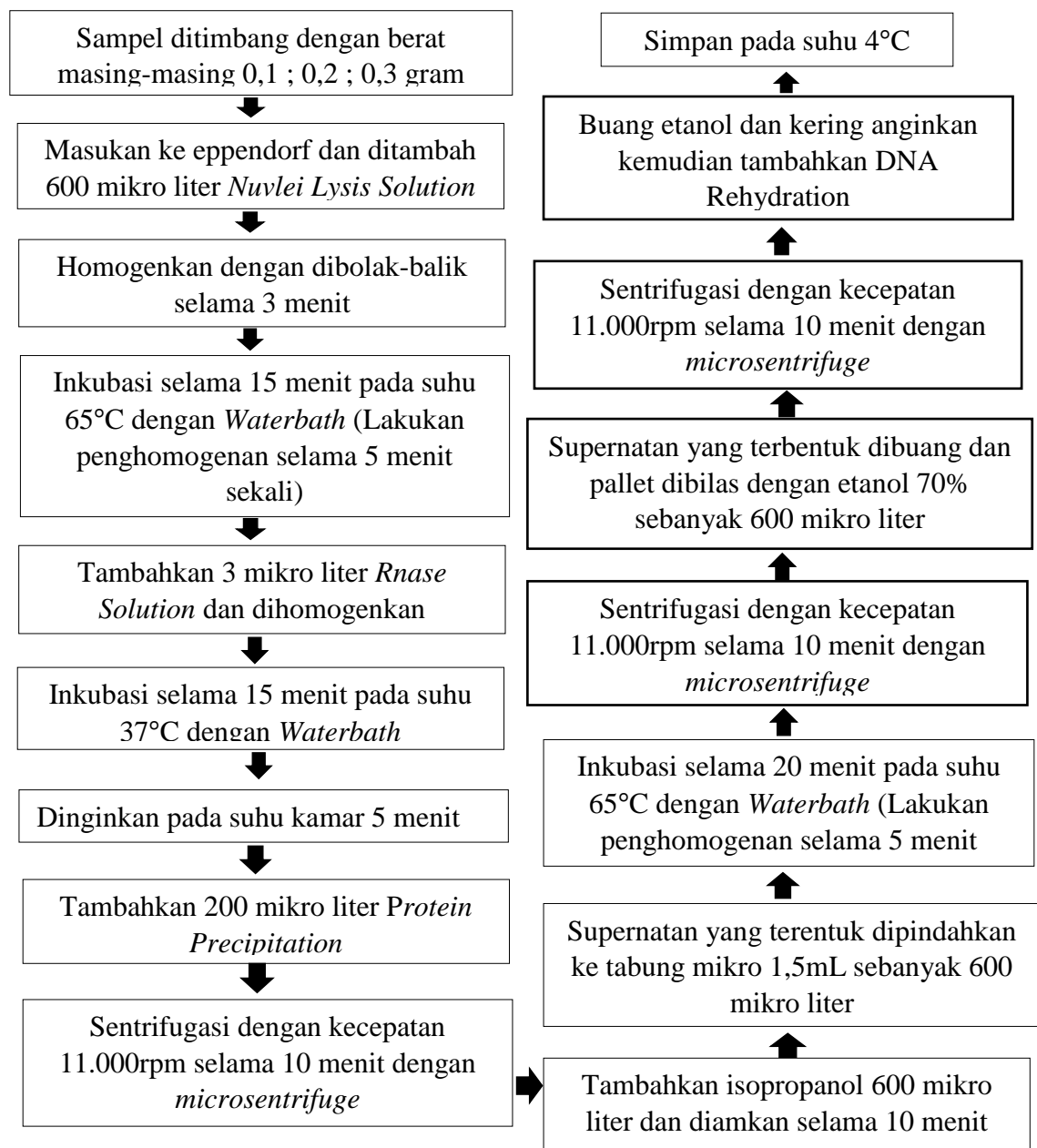
Persiapan sampel dilakukan dengan cara mengambil daun muda merah, daun muda hijau, dan daun dewasa tanaman kepel di wilayah Tamansari Yogyakarta. Sampel dibersihkan dengan cara dicuci dan diusap menggunakan kain bersih, dan dipotong menjadi beberapa bagian serta dipisahkan dengan bagian tulang daun menggunakan pisau, kemudian didinginkan pada suhu -20°C selama 24 jam. Sampel kemudian digerus menggunakan mortar sampai halus. Adapun contoh sampel yang digunakan seperti gambar 5 dan tahapan penelitian seperti pada gambar 5.



Gambar 5. Tahapan Preparasi Sampel dalam Isolasi DNA

2. Isolasi DNA

Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan metode kit yang memiliki tahapan seperti tersaji pada Gambar 6.



Gambar 6. Tahapan Isolasi DNA Daun Tanaman Kepel (Promega 12, 2018)

Daun muda merah, daun muda hijau dan daun dewasa yang sudah halus ditimbang dengan variasi berat yaitu 0,1 gram; 0,2 gram dan 0,3 gram. Sampel daun

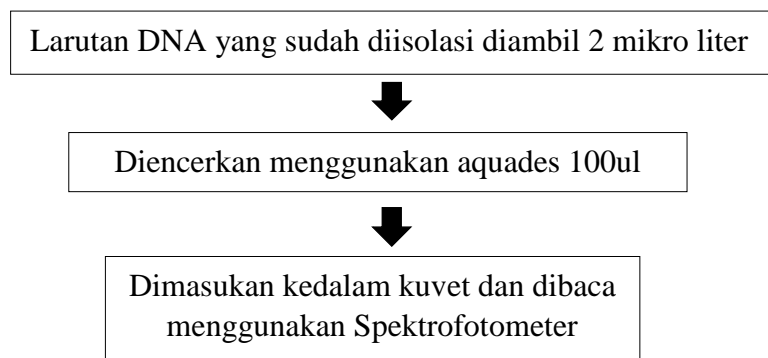
kemudian dimasukkan dalam tabung eppendorf dan ditambah 600 µl larutan *Nuclei Lysis Solution*, dan dihomogenkan selama 3 menit sampai homogen. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65°C di dalam *water bath* dengan lama inkubasi yaitu 15 menit, dan dilakukan pengocokan tabung secara manual setiap 5 menit sekali supaya bahan dalam tabung eppendorf homogen..

Langkah selanjutnya ditambahkan 3 µl larutan *Rnase Solution* dan dihomogenkan kembali dengan cara membolak-balik tabung eppendorf. Campuran yang sudah homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15 menit. Sampel selanjutnya didinginkan pada suhu kamar selama 5 menit., kemudian ditambahkan 200 µl larutan *protein precipitation* dan disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit menggunakan microsentrifuge. Hasil dari sentrifugasi yaitu berupa supernatan, lalu supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL sebanyak 600 µl diikuti dengan penambahan 600 µl isopropanol dan didiamkan dalam suhu kamar selama 10 menit.

Tabung yang berisi larutan DNA dan isopropanol disentrifugasi kembali dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang sedangkan palet yang terbentuk dibilas menggunakan larutan etanol 70% sebanyak 600 µl untuk menghilangkan sisa garam. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit pada suhu kamar. Pelet yang telah bersih dikeringanginkan semalam. Pelet yang telah kering dilarutkan dalam 100 µl larutan DNA Rehydration. Larutan DNA stok tersebut diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. DNA stok yang sudah jadi disimpan pada suhu 4°C hingga siap digunakan.

3. Analisis Kuantitatif DNA

Larutan DNA yang sudah disolasi diambil sebanyak 2 μ l dan diencerkan sebanyak 100 μ l dengan akuades steril kemudian dimasukkan dalam kuvet dan dibaca hasil absorbansi optikal densitinya (OD) menggunakan Tecan Spark 20M pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dihitung berdasarkan hasil OD tersebut (Tecan, 2006). Tahapan analisis kuantitatif DNA tersaji dalam Gambar 7.

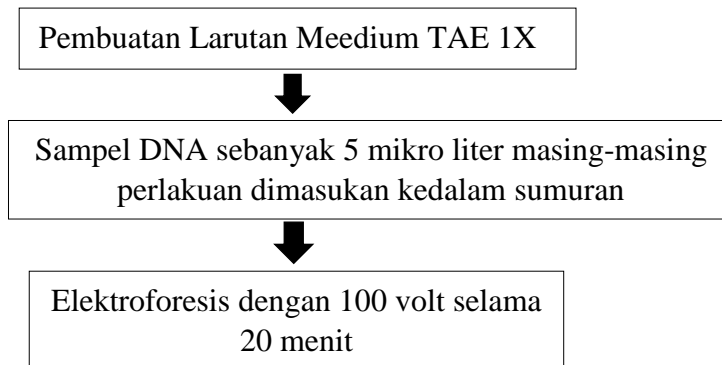


Gambar 7. Tahapan Analisis Kuantitatif DNA.

4. Analisis Kualitatif DNA

Agarose sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam 50 mL TAE 1X dan dipanaskan dalam microwave selama 5 menit sampai terlarut dan larutan terlihat bening. Selanjutnya didinginkan \pm 1 menit untuk menghilangkan uap panas dan ditambah 10 μ l ethidium bromida dan dituangkan dalam cetakan elektroforesis. Setelah padat gel direndam dalam tabung elektroforesis yang berisi TAE 1X. Sampel DNA sebanyak 5 μ l dimasukkan ke dalam masing-masing well (sumuran) dan pada salah satu well dimasukkan marker DNA λ Styl. Elektroforesis dijalankan dengan menggunakan voltase 100 volt selama \pm 20 menit. Arus akan mengalir dari kutub negatif ke kutub positif dan DNA akan bergerak menuju kutub positif dan akan

terpisah sesuai dengan ukuran molekulnya sehingga dengan menggunakan lampu UV dapat dianalisis pita DNA yang tampak dengan cara membandingkan dengan marker DNA λ Styl (Handayani, 2008). Tahapan analisis kualitatif tersaji dalam Gambar 8.



Gambar 8. Tahapan Analisis Kualitatif

E. Variabel yang Diamati

1. Konsentrasi DNA

Konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan Tecan Spark 20M. Konsentrasi DNA dihitung berdasarkan hasil absorbansi optikal densitinya (OD) pada panjang gelombang 260 dengan formula:

$$\text{Konsentrasi DNA} = \mathring{A}_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

(Glasel, 1995 dalam Fatchiyah, dkk., 2012)

Keterangan:

\mathring{A}_{260} = Nilai absorbansi pada λ 260 nm

50 = larutan dengan nilai absorbansi 1.0 sebanding dengan 50 ug untai ganda DNA per ml (dsDNA).

2. Kemurnian DNA

Kemurnian DNA diukur dengan menghitung nilai absorbansi λ 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi λ 280 ($\text{\AA}260/\text{\AA}280$). Nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0.

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{\lambda 260 \text{ nm}}{\lambda 280 \text{ nm}}$$

(Glasel, 1995 dalam Fatchiyah, dkk., 2012)

3. Intensitas dan Berat Molekul DNA pada Gel Elektroforesis

Intensitas dan berat molekul DNA dilakukan dengan menggunakan metode elektroforesis. Pita DNA hasil elektroforesis yang tampak pada UV transiluminator dianalisis dan dibandingkan dengan marker DNA $\lambda Styl$ (Yuwono, 2005).

F. Analisis Data

Data hasil dari variabel pengamatan disajikan dalam bentuk tabel. Hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan sidik ragam atau *analysis of variance* pada taraf α 5%. Apabila ada perbedaan nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT). Hasil pembacaan DNA dianalisis secara kualitatif dengan gel elektroforesis dan kuantitatif dengan Spektrofotometer.