

### **III. TATA CARA PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini 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 hingga Bulan Oktober 2018.

#### **B. Alat dan Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, endosperm tanaman kepel, Isolasi DNA menggunakan *Wizard Genomic DNA Purification Kit A 1120* (Promega *catalogue number*: 12, 2018), alkohol 70%, isopropanol 95%, akuades, kertas parafilm, gel agarose 1%, larutan TAE 1 X, *ethidium bromide* 1 µg/ml, DNA *loading dye* 2 µl.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mortar, pestle, *tube eppendorf* 1,5 ml, mikropipet dan tip, *microcentrifuge*, *freezer*, *sterofoam*, spatula, *waterbath*, pembuangan tip, tempat es, sarung tangan, alat elektroforesis, *UV transilluminator*, timbangan analitik, mangkuk timbang, *microwave*, erlenmeyer, gelas ukur dan spektrofotometer merk Tecan Spark 20M (Tecan *catalogue number*: 06, 2017).

#### **C. Metode Penelitian**

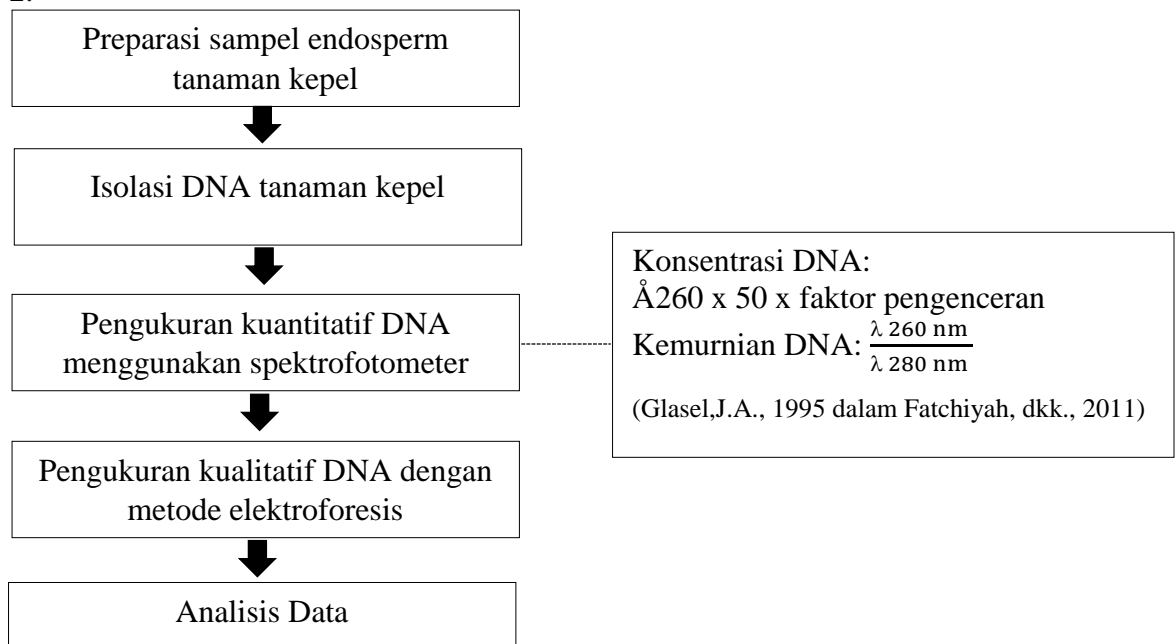
Penelitian dilaksanakan menggunakan metode eksperimen faktor tunggal yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 9 perlakuan. Tiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan, sehingga terdapat 27 unit percobaan Adapun perlakuan dalam penelitian ini, yaitu:

1. Berat sampel 0,1 gram endosperm + lama inkubasi 15 menit
2. Berat sampel 0,1 gram endosperm + lama inkubasi 30 menit
3. Berat sampel 0,1 gram endosperm + lama inkubasi 45 menit
4. Berat sampel 0,2 gram endosperm + lama inkubasi 15 menit
5. Berat sampel 0,2 gram endosperm + lama inkubasi 30 menit
6. Berat sampel 0,2 gram endosperm + lama inkubasi 45 menit
7. Berat sampel 0,3 gram endosperm + lama inkubasi 15 menit
8. Berat sampel 0,3 gram endosperm + lama inkubasi 30 menit
9. Berat sampel 0,3 gram endosperm + lama inkubasi 45 menit

#### D. Tata Laksana Penelitian

Alur kerja yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan yaitu: (1) Preparasi sampel, (2) Isolasi DNA, (3) Analisis kuantitatif DNA, (4) Analisis kualitatif, (5) Analisis data. Tahapan penelitian seperti tersaji pada Gambar

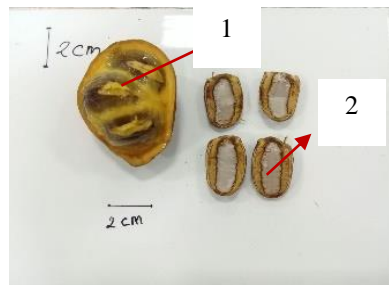
2.



Gambar 2. Tahapan Isolasi dan Analisis DNA pada Tanaman Kepel.

## 1. Preparasi Sampel

Biji kepel diambil dan dibersihkan dari daging buah hingga kesat. Biji kepel kemudian dibelah dan diambil bagian endosperm yang akan dijadikan sampel dalam penelitian. Sampel kemudian disimpan dalam *freezer* pada suhu  $-21^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

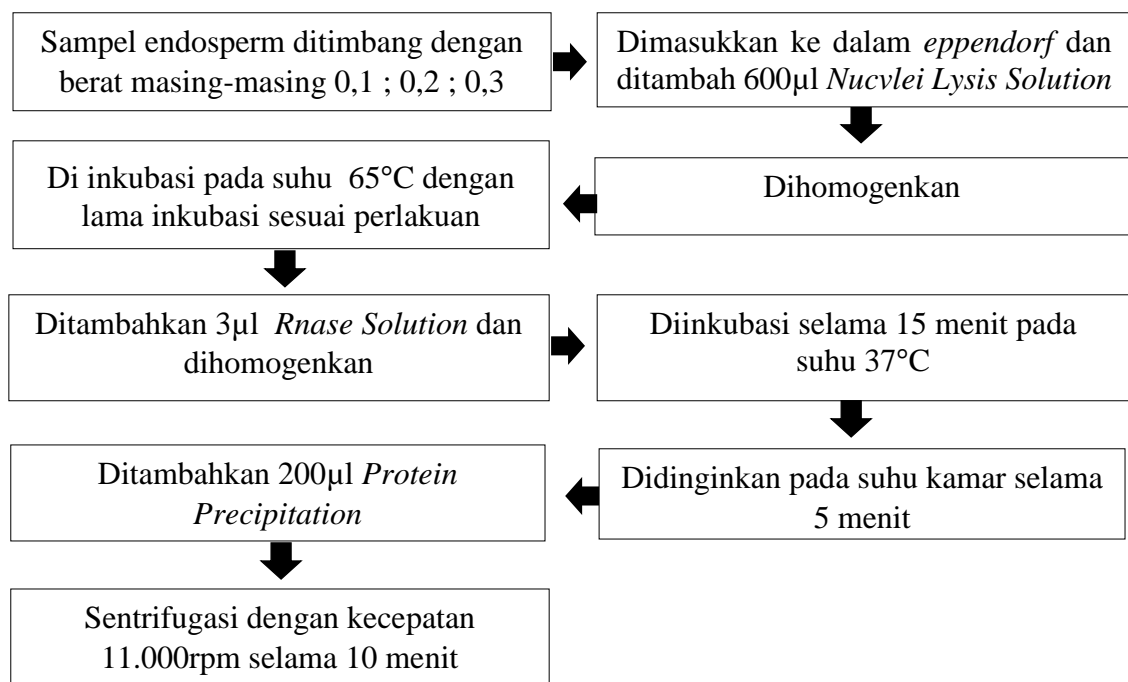


Gambar 3. Bagian dalam Buah Tanaman Kepel 1) biji kepel; 2) endosperm kepel (Dokumentasi Pribadi, 2018).

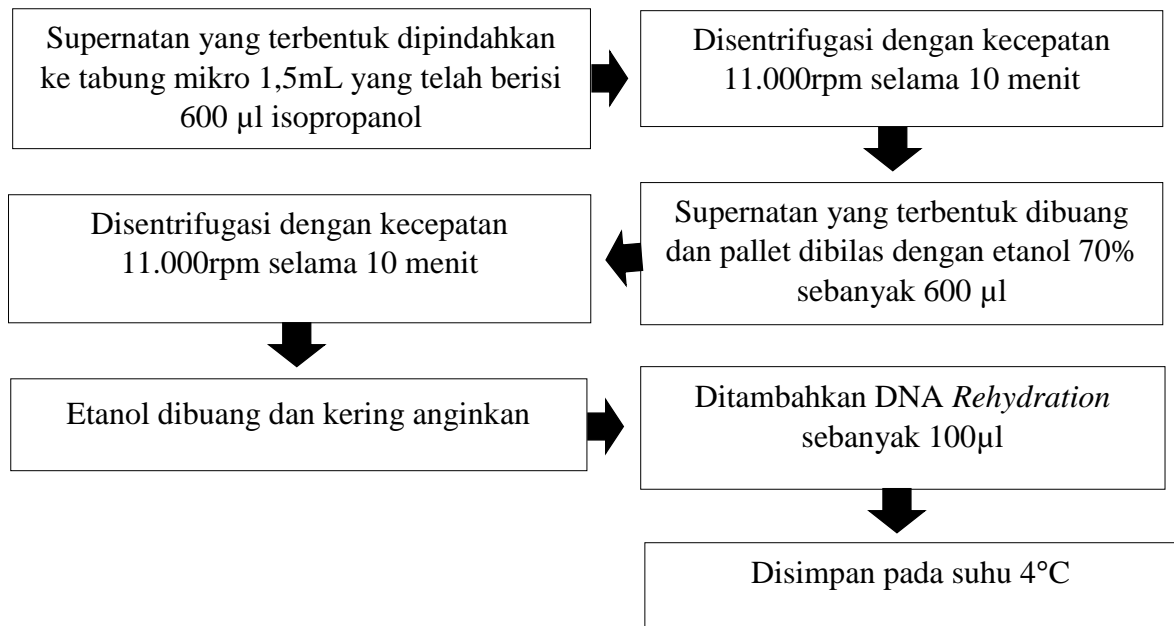
## 2. Isolasi DNA

Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan metode Kit yang memiliki tahapan seperti tersaji pada Gambar 4.

### Tahap 1. Lisis dan Pengendapan Protein



## Tahap 2. Pengendapan DNA



Gambar 4. Tahapan Isolasi DNA Tanaman Kepel (Promega, 2018).

Endosperm dari biji kepel digerus menggunakan *micropestle* yang telah didinginkan dalam freezer dan ditimbang dengan variasi berat yaitu 0,1 g; 0,2 g dan 0,3 g. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 2 ml, dan ditambahkan 600 µl larutan *nuclei lysis Solution* dan di homogenkan selama 3 menit sampai homogen. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65°C di dalam *waterbath* dengan lama inkubasi sesuai dengan perlakuan yaitu 15, 30 dan 45 menit, serta dilakukan pengocokan tabung secara manual setiap 5 menit sekali agar 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 *microcentrifuge*. Hasil dari sentrifugasi yaitu berupa supernatan. Supernatan yang terbentuk lalu dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL sebanyak 600  $\mu$ l diikuti dengan penambahan 600  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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 diisolasi diambil sebanyak 2  $\mu$ l dan diencerkan sebanyak 100 kali dengan akuades steril kemudian dimasukkan dalam kuvet dan dibaca hasil absorbansi optikal densitinya (OD) pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dengan menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dihitung berdasarkan hasil OD tersebut (Tecan *catalogue number*: 06, 2017).

#### 4. Analisis Kualitatif DNA

Agarose sebanyak 0,5 g dilarutkan dalam 50 mL TAE 1X dan dipanaskan dalam microwave selama 5 menit sampai mendidih. Selanjutnya didinginkan  $\pm 1$  menit untuk menghilangkan uap panas dan ditambah 10  $\mu\text{l/ml}$  ethidium bromida dan dituangkan dalam cetakan elektroforesis. Setelah padat gel direndam dalam tabung elektroforesis yang berisi TAE 1X. Sampel DNA sebanyak 5  $\mu\text{l}$  dimasukkan ke dalam masing-masing well (sumuran) dan pada salah satu well dimasukkan marker DNA  $\lambda\text{Styl}$ . 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  $\lambda\text{Styl}$  (Handayani, 2008).

#### E. Variabel yang Diamati

##### 1. Konsentrasi DNA

Konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan spektrofotometer. Konsentrasi DNA dihitung berdasarkan hasil absorbansi optikal densitinya (OD) pada panjang gelombang 260 dan 280 dengan formula:

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

(Glasel, J. A., 1995 dalam Fatchiyah, dkk., 2011)

Keterangan:

$\text{A}_{260}$  = Nilai absorbansi pada  $\lambda$  260 nm

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

## 2. Kemurnian DNA

Kemurnian DNA diukur dengan menghitung nilai absorbansi  $\lambda$  260 nm dibagi dengan nilai absorbansi  $\lambda$  280 ( $\text{\AA}260/\text{\AA}280$ ). Nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2.0 (Glasel, J. A., 1995 dalam Fatchiyah dkk., 2011).

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

(Glasel, J. A., 1995 dalam Fatchiyah dkk., 2011)

## 3. Intensitas dan Berat Molekul DNA pada Gel Elektroforesis

Intensitas dan berat molekul DNA diperoleh 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  $\alpha$  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 dilakukan metode elektroforesis.