

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pemuliaan Tanaman Universitas Gadjah Mada dan Laboratorium Kultur In Vitro Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan mulai September 2018 – April 2019.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 10 sampel, meliputi 6 sampel kedelai impor dan 4 sampel kedelai lokal. Primer yang digunakan yaitu primer target sekuen EPSPS-CP4. Bahan reagen ekstraksi menggunakan *genomic* DNA mini kit plant (*Catalogue number*: GP100, 2019), etanol absolut, etanol 70%. Elektroforesis menggunakan agarosa, EtBr (*Ethidium Bromide*), *loading dye*, marker 50 bp, TAE buffer dan ddH₂O. Bahan PCR menggunakan master mix gotag green, nuclease-free water dan DNA *template*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*) BIO RAD, seperangkat alat DNA elektroforesis BIO RAD dan *GeneQuant* Spektrofotometer, *waterbath*, autoklaf, *microwave*, timbangan analitik, *glassware*, *microcentrifugase*, kulkas, mortal dan alu, mikropipet, mikro tip dan UV *transiluminator*.

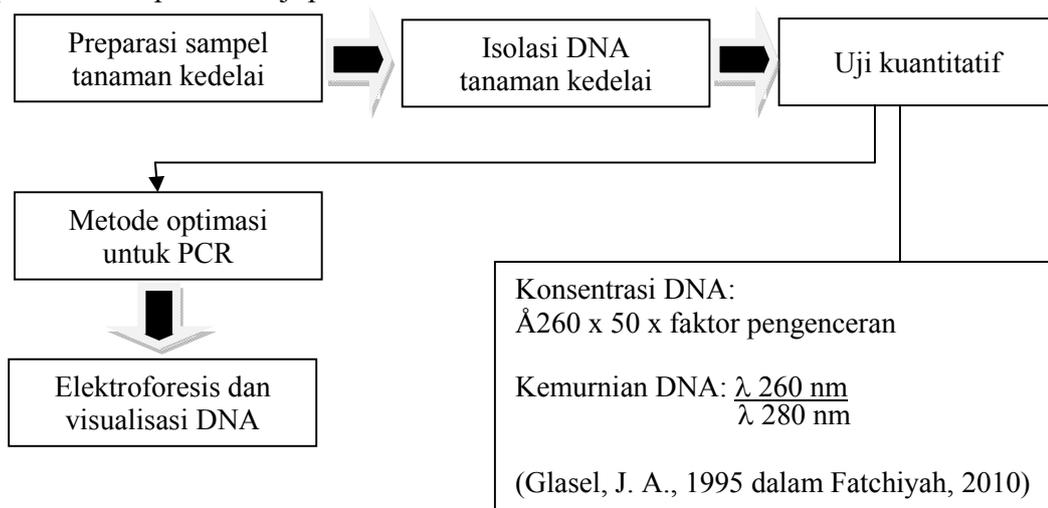
C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan merupakan metode observasi yang dilakukan di laboratorium tentang isolasi DNA dan deteksi gen EPSPS-CP4 dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada tanaman kedelai (*Glycine*

max) dengan pengambilan sampel menggunakan purposive sampling. Hidayat (2017) menjelaskan purposive sampling merupakan salah satu teknik sampling non random sampling dimana peneliti menentukan pengambilan sampel dengan cara menetapkan cirri-ciri khusus yang sesuai dengan tujuan penelitian sehingga diharapkan dapat menjawab permasalahan penelitian. Kedelai diperoleh dari pasar induk Daerah Istimewa Yogyakarta, meliputi pasar Sentral; Beringharjo; Prawirotaman dan Gamping serta kedelai dari Unit Pelaksana Teknis (UPT) Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Jawa Timur yaitu kedelai Anjasmoro.

D. Tata Laksana Penelitian

Alur kerja yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas beberapa tahapan yaitu: (1) Preparasi sampel, (2) Isolasi DNA, (3) Uji kuantitatif DNA, (4) Metode optimasi untuk PCR, (5) Elektroforesis dan visualisasi DNA. Tahapan penelitian seperti tersaji pada Gambar 3.



Gambar 1. Skema Tahapan Penelitian Deteksi Gen EPSPS-CP4 dengan Metode PCR pada Tanaman Kedelai dari Pasar Induk di Daerah Istimewa Yogyakarta

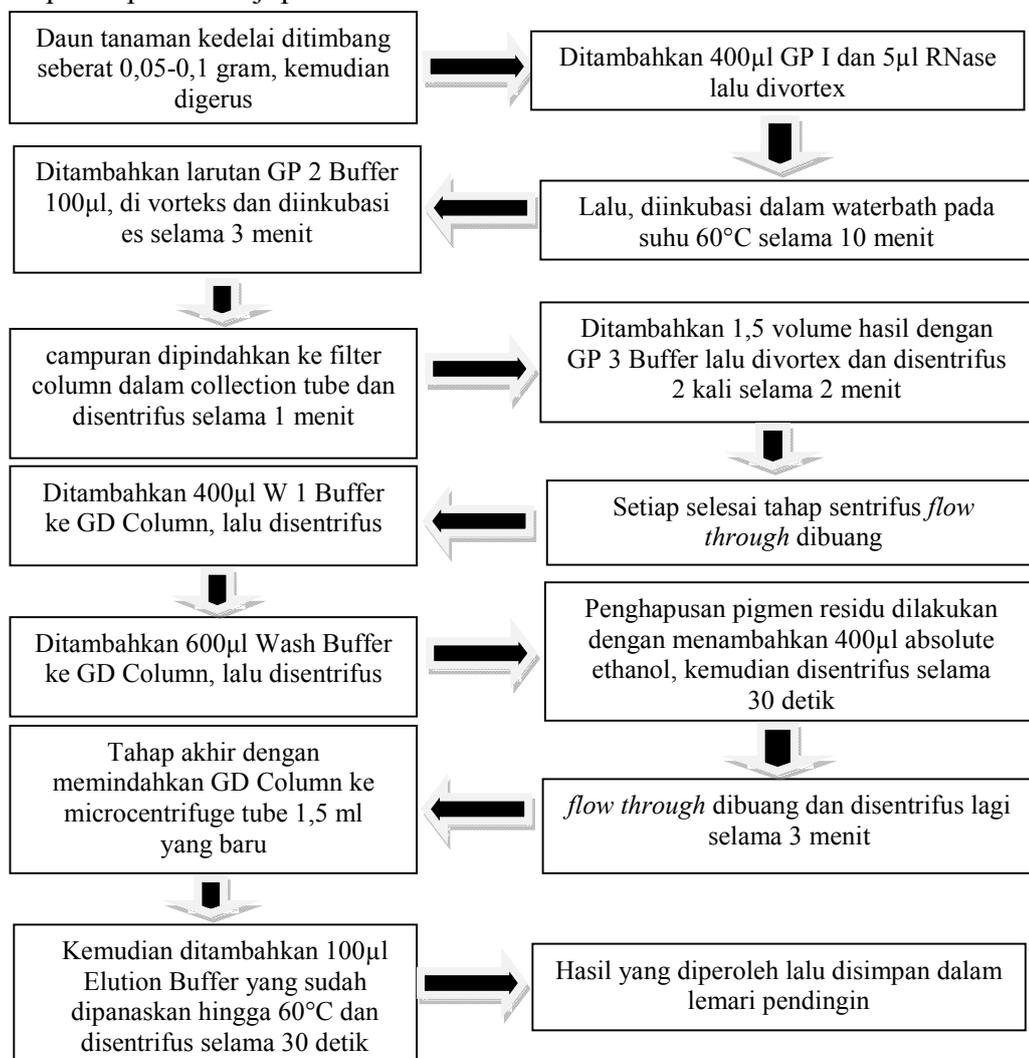
1. Preparasi Sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan menanam biji kedelai dalam polibag berukuran 40x40 cm hingga 2 minggu. Masing-masing polibag berisi 2 biji. Setelah berumur 2 minggu, tanaman kedelai diambil daunnya untuk dilakukan isolasi DNA (Lampiran 1).

2. Isolasi DNA

Isolasi DNA pada penelitian ini menggunakan metode kit yang memiliki

tahapan seperti tersaji pada Gambar 4:



Gambar 2. Tahapan Isolasi DNA Tanaman Kedelai Menggunakan Metode Kit (Catalogue number: GP100, 2019)

3. Uji Kuantitatif DNA

DNA dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh. Referensi diatur dengan menggunakan ddH₂O. Faktor pengencer (ddH₂O) sebanyak 1998 µl dan DNA 2 µl dimasukkan dalam kurvet. Kurvet yang berisi cairan kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer untuk diukur penyerapan cahaya pada panjang gelombang 260 nm sehingga diketahui DNA dan rasio DNA-RNA (GeneQuant™ 1300 catalogue number: 28-9182-13, 2019).

4. Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Kegiatan awal yang dilakukan untuk PCR adalah optimasi suhu yang efektif agar menghasilkan pita polimorfik. Optimasi dilakukan dengan menggunakan primer RRS0t. Daftar nama dan susunan primer untuk deteksi sekuen EPSPS-CP4 seperti yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Daftar nama dan susunan primer untuk deteksi sekuen EPSPS-CP4

| No | Nama Primer | Susunan primer | Jumlah basa | Panjang DNA yang terdeteksi |
|----|-------------|--|-------------|-----------------------------|
| 1 | RRS0t-5 (f) | 5'CCT TTA GGA TTT CAG CAT CAG TG-3' | 23 basa | 121 bp |
| 2 | RRS01-3 (r) | 5'GAC TTG TCG CCG GGA ATG-3' | 18 basa | |

(Tung, dkk., 2008).

Amplifikasi DNA dilakukan dengan reaksi berantai polymerase (PCR) untuk menggandakan sekuens DNA berdasarkan primer yang digunakan. Amplifikasi DNA dilakukan dengan *thermal clycer*. Tabel 3 menyajikan tahapan reaksi amplifikasi DNA.

Tabel 2. Tahapan Reaksi Amplifikasi DNA Optimasi Suhu *Annealing* Menggunakan PCR

| No | Tahapan Reaksi | Suhu Reaksi (°C) | Lama Reaksi (menit) |
|----|--------------------|------------------|---------------------|
| 1 | <i>Pre-heating</i> | 95 | 4:00 |
| 2 | Denaturasi | 95 | 1:00 |
| 3 | <i>Annealing</i> | Suhu terpilih | 1:00 |
| 4 | Elongasi | 72 | 1:30 |
| 5 | Elongasi akhir | 72 | 7:00 |

(Yusuf, 2010).

Optimasi suhu penempelan primer dilakukan pada suhu 55°C, 56°C, 58°C, 59°C dan 60°C. Selanjutnya dipilih satu suhu sebagai suhu penempelan primer (*annealing*) yang menghasilkan pita paling terang.

5. Elektroforesis dan Visualisasi DNA

Hasil amplifikasi kemudian dielektroforesis gel dalam tegangan 100 volt selama 55 menit menggunakan 1,5% (0,45 gram/30 ml) gel agarosa di dalam tangki elektroforesis gel yang berisi penyangga TBE 1x pH 8 yang dipanaskan dalam *microwave* sampai terlarut sempurna kemudian ditambahkan dengan pewarna DNA (*Fluoresafe DNA Staining*) sebanyak 5 µl, ladder 50 bp dan DNA *template* 10 µl. Selanjutnya gel agarosa diangkat dari tangki elektroforesis dan divisualisasi menggunakan sinar UV dan difoto dengan kamera digital (Yuwono, 2005).

E. Variabel yang Diamati

1. Konsentrasi dan Kemurnian Hasil Isolasi DNA

Produk hasil isolasi DNA dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer (GeneQuant™ 1300 *catalogue number*: 28-9182-13, 2019) untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA yang diperoleh. Konsentrasi DNA dihitung

berdasarkan hasil absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 dengan formula $A_{260} \times 50 \times$ faktor pengenceran. Nilai kemurnian DNA dilihat pada serapan cahaya UV pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol dapat menyerap cahaya pada 280 nm. Adanya perbedaan penyerapan cahaya UV ini maka kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan absorbansi 280 nm, dan nilai kemurnian DNA berkisar 1,8-2,0 (Fatchiyah, 2010).

2. Deteksi Gen EPSPS-CP4

Deteksi gen EPSPS-CP4 dilakukan dengan visualisasi hasil amplifikasi DNA dengan metode elektroforesis. Pita DNA hasil elektroforesis yang tampak pada UV transiluminator dibandingkan dengan marker DNA dan selanjutnya di skoring, jika muncul pita nilai 1 dan jika tidak muncul pita nilai 0 (Yuwono, 2005).

F. Analisis Data

Data hasil isolasi DNA dan deteksi gen EPSPS-CP4 dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada tanaman kedelai (*Glycine max*) dari pasar induk Daerah Istimewa Yogyakarta dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel hasil kuantifikasi DNA dan visualisasi gambar pita DNA dengan skoring jika muncul pita nilai 1 dan tidak muncul pita nilai 0.