

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2016 hingga Juli 2017. Bertempat di Kebun Biologi dan Laboratorium Fisiologi, Kultur Jaringan dan Mikroteknik Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

#### **1.2 Persiapan Bahan**

Pengambilan sampel dilakukan di Desa Klutuk, Kecamatan Tambakboyo, Kabupaten Tuban, Jawa Timur. *A. variabilis* yang digunakan dalam penelitian sebanyak delapan varian yang memiliki warna dan corak batang berbeda (Lampiran 1). Umbi delapan varian *A. variabilis* dikoleksi dan ditanam kembali di kebun Biologi. Masing-masing umbi ditanam di dalam pot berukuran diameter  $\pm 50$  cm dan tinggi  $\pm 45$  cm. Media tanam yang digunakan merupakan campuran tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1. Tanaman dipupuk dengan pupuk Phonska sebanyak satu sendok makan untuk setiap pot. Penyiraman tanaman dilakukan ketika media tanam dirasa kering dan membutuhkan air. Pemeliharaan tanaman secara periodik dilakukan dengan membersihkan tanaman dari gulma. Daun muda digunakan sebagai sampel untuk isolasi DNA. Umbi dipanen saat tanaman memasuki masa rebah kemudian diukur berat, diameter, dan tebal umbi. Pengukuran berat umbi dilakukan dengan menimbang umbi menggunakan timbangan. Diameter umbi dan tebal umbi diukur menggunakan penggaris.

#### **3.3 Analisis Glukomanan**

##### **3.3.1 Pengukuran kadar air umbi**

Sampel yang digunakan berupa umbi basah yang masih segar. Kandungan air yang berbeda pada setiap umbi mempengaruhi berat basah umbi, sehingga untuk mendapatkan berat yang konstan, perhitungan berat umbi dikoreksi dengan menggunakan perhitungan kadar air. Sebanyak 10 g umbi basah dikeringkan dalam *oven* pada suhu 105 °C selama dua hari hingga berat konstan. Umbi yang telah dikeringkan disimpan dalam desikator selama satu jam dan ditimbang

hingga mendapatkan berat konstan. Perbedaan berat basah dan berat kering umbi digunakan untuk mengetahui kandungan air umbi dengan persamaan 1 (Chairiyah dkk., 2014).

$$(KA) \% = \frac{BB(g) - BK(g)}{BB(g)} \times 100 \% \quad \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan:

BB : Berat umbi segar (berat sebelum dikeringkan) (g)

BK : Berat umbi yang dikeringkan hingga mencapai berat konstan (g)

KA : Kandungan air yang terkandung dalam umbi segar (%)

Kandungan air yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk penentuan berat kering umbi yang dianalisis glukomanannya.

### 3.3.2 Pengukuran kadar glukomanan

Ekstraksi glukomanan dilakukan menggunakan metode Tartirat & Charoenrein (2011) yang dimodifikasi. Umbi segar ditimbang sebanyak 30 g. Aluminium sulfat ( $Al_2(SO_4)_3$ ) sebanyak 0,6 g dilarutkan dalam 200 ml akuades (0,3 %) dan kemudian digunakan untuk mengekstraksi glukomanan. Irisan umbi dilumat dengan blender dan ditambahkan larutan aluminium sulfat dengan kecepatan sedang selama 3 menit. Bubur encer yang dihasilkan kemudian dipindah ke *beaker glass* dan diinkubasi dalam *water bath* pada suhu 55 °C selama 15 menit, sambil diaduk dengan pengaduk gelas. Bubur encer selanjutnya diencerkan dengan 600 ml akuades. Filtrat yang dihasilkan kemudian dihomogenasi dengan menggunakan *magnetic stirrer* agar homogen. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung *polypropilene* 50 ml dan disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 30 menit pada suhu 25 °C. Supernatan yang dihasilkan ditambahkan dengan IPA (Isopropil alkohol) 95% dengan perbandingan 1:1 untuk menggumpalkan glukomanan. Campuran tersebut diaduk sesekali dengan menggunakan pengaduk gelas. Glukomanan yang tersangkut di pengaduk gelas dikumpulkan di atas kertas saring (*Whatmann*) dan dipadatkan. Setelah itu glukomanan tersebut direndam kembali dalam IPA 95% agar glukomanan tidak menjadi kecoklatan. Sisa glukomanan yang masih terdapat dalam campuran IPA 95 % dan supernatan disaring dengan menggunakan kertas saring. Glukomanan yang diperoleh selanjutnya dikeringkan di atas gelas arloji menggunakan *oven* pada suhu 45 °C, *overnight*.

Glukomanan yang telah kering kemudian disimpan dalam desikator selama satu jam hingga mendapatkan berat konstan untuk menentukan berat kering glukomanan. Sebelum dilakukan penghitungan kadar glukomanan maka harus diketahui terlebih dahulu berat kering umbi yang dianalisis glukomanannya, yang dihitung dengan menggunakan persamaan 2 (Chairiyah dkk., 2014).

$$BK(g) = BB - [(KA/100\%) \times BB] \dots\dots\dots (2)$$

Keterangan:

BB : Berat umbi segar yang digunakan untuk analisis glukomanan (g)

KA : Kandungan air yang terkandung dalam umbi segar (%)

BK : Berat kering umbi yang dianalisis untuk glukomanan (g)

Berat kering umbi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk penentuan kandungan glukomanan yang dihitung dengan menggunakan persamaan 3.

$$\text{Kandungan glukomanan (\%)} = (A/BK) \times 100 \% \dots\dots\dots (3)$$

Keterangan:

A : berat glukomanan hasil ekstraksi (g)

BK : berat kering umbi sampel umbi yang dianalisis glukomanannya (g)

### 3.4 Analisis Molekuler

#### 3.4.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan berdasarkan prosedur dari Dhakshanamoorthy & Selvaraj (2009) yang dimodifikasi. Langkah kerjanya sebagai berikut, masing-masing sampel daun *A. variabilis* seberat 0,5 gram direndam di dalam 5 mL alkohol absolut selama 60 menit. Daun kemudian dikeringkan dan digerus dengan 1 mL buffer ekstraksi CTAB (2 % CTAB, 100 mM Tris-Cl pH 8, 1,4 M NaCl, 2 % PVP, 20 mM EDTA pH 8,0), kemudian ditambahkan 20 µl β-mercaptoethanol sesaat sebelum digunakan dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 60 °C di dalam *waterbath incubator*. Sampel daun kemudian ditambahkan 500 µl CI lalu dilakukan *mix gentle*. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4

°C. Supernatan dipisahkan dari pelet lalu ditambahkan isopropanol absolut dingin 1 x volume supernatan, *mixed well*. Sampel daun diinkubasi selama 60 menit pada suhu -20 °C. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Pelet yang diperoleh dicuci dengan 500 µl etanol 70 % dan dikeringanginkan. Pelet dilarutkan dalam 500 µl ddH<sub>2</sub>O dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Pelet ditambahkan 50 µl 3 M sodium asetat dan 1000 µl alkohol absolut. Larutan diinkubasi pada -20 °C selama 60 menit dan disentrifugasi 5000 rpm selama 10 menit pada 4 °C. Pelet kemudian dicuci dengan 500 µl etanol 70 %. Pelet dikeringanginkan selama 30 menit pada suhu ruang dan kemudian dilarutkan dalam 50 µl buffer TE 7,6 dan disimpan pada suhu 20 °C sampai digunakan.

### 3.4.2 Uji kualitatif dan kuantitatif hasil isolasi DNA

Uji kualitatif DNA total hasil isolasi dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi 0,5 %. Uji kualitatif diawali dengan pembuatan gel agarosa. Bubuk agarosa sebanyak 0,15 g dilarutkan dengan 30 ml TBE 1 x, kemudian dipanaskan dalam *microwave* selama 2 menit. Campuran tersebut didinginkan dengan suhu ±45 °C dan ditambahkan EtBr sebanyak 0,5 µl. Campuran yang telah homogen dituangkan ke dalam cetakan yang telah dipasang dengan sisiran. Campuran tersebut kemudian didiamkan sekitar 30 menit hingga mengeras. Gel agarosa yang telah mengeras kemudian dipindah ke dalam *electrophoresis chamber* dan ditambahkan TBE hingga seluruh permukaan gel tergenangi oleh TBE. Sampel DNA hasil isolasi dicampur dengan *loading dye* (3:1) dan dimasukkan ke dalam sumuran gel yang terbentuk. Proses *running* dilakukan pada tegangan 50 V selama ±45 menit. Hasil *running* kemudian divisualisasi di *gel doc*.

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengencer} \dots\dots\dots (4)$$

Keterangan:

- A<sub>260</sub> : absorbansi pada panjang gelombang 260 nm
- 50 : larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 µg untai ganda DNA

Uji kuantitatif dilakukan dengan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm menggunakan *spectrophotometer*. Konsentrasi DNA ditentukan dengan persamaan 4. Selanjutnya diukur rasio panjang gelombang A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> untuk menunjukkan tingkat kemurnian DNA

hasil isolasi yang diperoleh. DNA hasil isolasi yang baik ditunjukkan oleh nilai yang berkisar antara 1,8-2. Nilai yang menunjukkan angka di bawah 1,8 menunjukkan kontaminan protein dan polisakarida yang tinggi. Sebaliknya nilai lebih dari dua menunjukkan kontaminan RNA yang cukup tinggi pada hasil isolasi tersebut (Fatchiyah dkk., 2016).

### 3.4.3 Amplifikasi DNA dengan RAPD

DNA genom *A. variabilis* diamplifikasi menggunakan 8 primer Kit RAPD (Tabel 1) (Poerba & Martanti, 2008). Campuran reaksi masing-masing tabung PCR sebanyak 10 µl berisi 3 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl primer RAPD 10 pmol, 5 µl 2x PCR *Intron master mix*, 1 µl *DNA template* 50 ng. Reaksi PCR dilakukan selama 45 siklus menggunakan *thermocycler* (Takara). Denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 5 menit, kemudian diikuti oleh 45 siklus yaitu denaturasi 94 °C selama 1 menit, *annealing* 36 °C selama 1 menit, ekstensi 72 °C selama 2 menit. Ekstensi final 72 °C selama 4 menit dan pendinginan pada suhu 4 °C selama 30 menit (Poerba & Yuzammi, 2008).

Tabel 1. Primer RAPD yang digunakan dalam penelitian

No.	Kode Primer	Urutan basa 5'-3'
1	OPA-11	CAATCGCCGT
3	OPC-04	CCGCATCTAC
4	OPU-06	ACCTTTGCGG
5	OPC-07	CACACTCCAG
8	OPN-18E	AAGGTGAGGTCA

### 3.4.4 Elektroforesis hasil amplifikasi RAPD

Hasil amplifikasi RAPD dipisahkan pada gel agarosa 2,0 % (0,6 g bubuk agarosa dan 30 ml buffer TBE) dalam buffer TBE 1 x. Prosedur pembuatan gel agarosa untuk amplifikasi RAPD sama seperti gel agarosa uji kualitatif hasil isolasi DNA. Sampel DNA hasil amplifikasi menggunakan primer RAPD dimasukkan ke dalam sumuran gel. Elektroforesis dilakukan selama 45 menit pada 80 Volt dengan menggunakan 10 kb DNA ladder GeneOn sebagai standar. Hasil pemisahan fragmen DNA divisualisasi di *UV-transiluminator* dan difoto menggunakan *gel documentation system*.

### 3.5 Analisis Data

Data kuantitatif berupa berat, diameter, dan tebal umbi, serta kandungan glukomanan dianalisis varian (ANOVA) menggunakan program SPSS *versi 16 for Windows*, apabila terdapat perbedaan nyata dilanjutkan dengan uji lanjut Tukey dengan signifikansi  $p < 0,05$ . Penggolongan kandungan glukomanan dianalisis menggunakan K-Means Cluster dengan bantuan program SPSS *versi 16 for Windows*.

Profil pita DNA hasil amplifikasi PCR dengan menggunakan primer RAPD diubah ke dalam data biner dengan dua nilai yaitu satu (1) untuk adanya pita DNA dan nol (0) untuk tidak adanya pita DNA. Pita yang dihitung adalah pita yang tampak jelas. Data biner digunakan untuk menghasilkan matrik data biner dengan program *Numerical Taxonomy and Multivariate System (NTSYS-pc) versi 2.1*.

Matrik data biner kemudian diturunkan menjadi matrik kesamaan genetik (*similarity matrix*) antar *A. variabilis* menggunakan koefisien *Jaccard's similarity*. Matrik kesamaan genetik dibuat menggunakan *Similarity for Quantitative Data (SIMQUAL)*. Berdasarkan nilai matrik kesamaan genetik, analisis pengelompokan (*Cluster Analysis*) dilakukan menggunakan metode *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Average (UPGMA)* dengan sub-program *Sequential Agglomerative Hierarchical Nested Cluster Analysis (SAHN)*. Hasil analisis pengelompokan UPGMA dibuat dalam kladogram menggunakan *tree-display* yang merupakan sub-program *Graphics Program NTSYS-pc* (Rohlf, 2000).