

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kuantitatif untuk mengekstraksi DNA dari beberapa spesimen herbarium *Rafflesia arnoldii* R.Br dan *Rafflesia patma* Blume. Spesimen disajikan pada tabel (3.1). Dalam penelitian ini akan dibandingkan empat protokol yaitu: Kit Promega, Kit Plant DNA Mini, CTAB, Doyle and Doyle, (1990) dan CTAB, Cota Sanchez *et. al.*,(2006).

Tabel 3.1. Keterangan Spesimen Herbarium *Rafflesia*

Kode	Keterangan	Sumber bahan	Lama koleksi	Sifat jaringan
BrRp	Braktea <i>Rafflesia patma</i> Blume.	Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor - LIPI	5 tahun	jaringan tua yang kering
BrRa	Braktea <i>R. arnoldii</i> R.Br.	Koleksi Laboratorium Jurusan Kehutanan - Universitas Bengkulu	10 tahun	jaringan muda
PeRa	Perigon <i>R. arnoldii</i> R.Br.	Koleksi Laboratorium Jurusan Kehutanan - Universitas Bengkulu	10 tahun	jaringan muda
CaRa	Cakram <i>R.arnoldii</i> R.Br.	Koleksi Laboratorium Jurusan Kehutanan - Universitas Bengkulu	10 tahun	jaringan muda

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2012 - Maret 2013 di Laboratorium Riset Genetika dan Biologi Molekular Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat-alat

Alat-alat yang dibutuhkan pada penelitian ini adalah: tabung mikrosentrifuse steril spesifikasi 1,5 ml dan 2 ml; mesin sentrifus; *water bath*; vortex; rak tabung; wadah limbah cair; mikropipet skala 0,5 μL – 1000 μL ; *hand glove* dan alat sterilisasi; mortal dan pistil; *horizontal agarose gel electroforesis apparatus*; *power supply*; cetakan gel dan sisir pembentuk sumur; *hot plate*; *UV transiluminator* beserta kamera Polaroid; nanospetrofotometer 2000; *blue, yellow, white tip*; inkubator; frezer -20°C dan -72°C dan kipas.

3.3.2 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam penelitian adalah Kit Promega (Protokol I); Kit Plant Mini (Protokol II); Protokol III dan protokol IV ini disajikan dalam tabel berikut:

Tabel 3.2 Bahan-bahan Penelitian

Protokol III	Protokol IV
Nitrogen cair	Nitrogen cair
Sampel dari spesimen herbarium	Sampel dari spesimen herbarium
Buffer ekstraksi	Buffer ekstraksi
- 2% CTAB	- 2% CTAB
- 100 mM Tris-HCl pH 7,5	- 100 mM Tris-HCl pH 7,5
- 1,4 M NaCl	- 1,4 M NaCl
- 20mM <i>ethylen diamine tetraacetic acid</i> (EDTA) pH 8,0	- 20mM EDTA pH 8,0
- 2% β -mercaptoetanol	- 2% β -mercaptoetanol
- 2% PVP-40	
Chloroform:isoamyl alcohol (CIA) 24:1	Chloroform:isoamyl alcohol (CIA) 24:1
Isopropanol	Isopropanol dingin
70 % Etanol	70 % Etanol
TE-Rnase solution	TE-Rnase solution
- 1 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, 10mg/mL RNase	1 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0, 10mg/mL RNase

3.4 Langkah Kerja

3.4.1 Protokol I (Kit Promega)

Langkah kerja Isolasi DNA spesimen herbarium *Rafflesia* menggunakan Kit Promega mengikuti pedoman yang tertera pada produk. Langkah kerja Kit Promega adalah sebagai berikut:

- Sampel digerus menggunakan nitrogen cair hingga menjadi serbuk.
- Sebanyak 40 mg serbuk dimasukkan ke dalam 1,5mL tabung.
- 600µL Nuclei Lysis Solution ditambahkan ke dalam tabung.
- Tabung di-vortek selama 3 detik.
- 3µL Rnase solution ditambahkan ke dalam sampel.
- Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.
- Campuran didinginkan hingga menjadi suhu ruangan selama 5 menit.
- 200µL Protein Precipitation Solution ditambahkan ke dalam tabung.
- Tabung di-vortek dengan cepat selama 20 detik.
- Tabung disentrifus selama 3 menit pada 13.000 x g.
- Supernatan dipindahkan secara hati-hati ke dalam 1,5 mL tabung yang berisi 600µL isopropanol bersuhu ruangan.
- Campuran dibolak-balik dengan pelan.
- Tabung disentrifus selama 1 menit pada 13.000 x g.
- Supernatan dibuang.
- 600 µL etanol 70% bersuhu ruangan ditambahkan ke dalam tabung.
- Tabung di-*invert* agar dapat mencuci DNA.
- Tabung disentrifus selama 1 menit pada 13.000 x g suhu ruangan.

- Diuapkan etanol hingga tersisa pelet.
- 100 μ L DNA Rehydration dimasukkan ke dalam tabung.
- Isolat DNA diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65°C.

3.4.2 Protokol II (Kit Plant DNA Mini)

Langkah kerja Isolasi DNA dari spesimen herbarium *Rafflesia* menggunakan Kit Plant DNA Mini mengikuti pedoman yang tertera pada produk. Langkah kerja Kit Promega adalah sebagai berikut:

- Sampel digerus menggunakan nitrogen cair hingga menjadi serbuk.
- 50mg serbuk dimasukkan ke dalam tabung 2mL.
- 800 μ L P1 Buffer ditambahkan ke dalam tabung.
- Campuran divortek.
- Campuran diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit sambil dibolak-balik tabungnya.
- 140 μ L P2 Buffer ditambahkan ke dalam tabung.
- Tabung divortek.
- Tabung disentrifus selama 10 menit pada 10.000 x g.
- Supernatan dipindahkan ke tub baru yang berisi 0,7 volume isopropanol.
- Tabung divortek.
- Tabung disentrifus selama 2 menit pada 14.000 x g.
- Supernatan dibuang dengan hati-hati agar tidak mengenai pelet.
- 300 μ L steril de-ionized water bersuhu 65°C ditambahkan ke dalam tabung.
- 4 μ L Rnase A ditambahkan.

- 150 μ L P3 buffer dan 300 μ L etanol absolut ditambahkan ke dalam tabung.
- Tabung divortek
- Campuran dimasukkan ke dalam tabung 2 mL yang dilengkapi HiBind.
- Tabung disentrifus selama 1 menit pada 10.000 x g.
- HiBind DNA Coloum ditempatkan pada tabung baru.
- 650 μ L DNA Wash Buffer ditambahkan ke dalam tabung.
- Tabung disentrifus selama 1 menit pada 10.000 x g.
- HiBind DNA Coloumn yang kosong disentrifuse selama 2 menit pada 10.000 x g.
- Dipindahkan HiBind DNA Coloumn ke tabung 1,5 mL yan baru.
- Ditambahkan 50 μ L Elution Buffer bersuhu 65°C ke dalam HiBind.

3.4.3 Protokol III (metode Doyle and Doyle, 1990)

Langkah kerja Isolasi DNA dari spesimen herbarium *Rafflesia* menggunakan protokol III adalah sebagai berikut:

- Sampel digerus menggunakan nitrogen cair hingga menjadi serbuk.
- 0,1 g serbuk dimasukkan ke dalam tabung 2mL.
- 1 mL buffer ekstraksi ditambahkan ke dalam tabung.
- Campuran diinkubasi pada suhu 60°C selama 60 menit (sampel di-*invert* setiap 5 menit).
- Campuran didinginkan pada suhu ruang.
- Campuran ditambahkan 600 μ LCIA.
- Campuran dikocok dengan pelan selama 5 menit.
- Tabung disentrifus pada 10,000 rpm selama 15 menit.

- Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru.
- Isopropanol ditambahkan ke dalam supernatan dengan volume yang sama.
- Campuran dikocok dengan pelan.
- Campuran diinkubasi pada -20°C selama 27 jam.
- Campuran disentrifus pada 10,000 rpm selama 15 menit.
- Supernatan dibuang.
- Pelet dicuci dengan etanol 70%.
- Tabung disentrifus pada 13,000 rpm selama 10 menit.
- DNA dikeringkan.
- Pelet dicuci dengan etanol 70%.
- Tabung disentrifus pada 13,000 rpm selama 10 menit.
- DNA dikeringkan.
- Pelet dilarutkan dalam $40\mu\text{L}$ TE-Rnase.
- Tabung diinkubasi selama 1 jam pada 37°C .

3.4.4 Protokol IV (metode Cota-Sanchez *et al.*, 2006)

Langkah kerja Isolasi DNA dari spesimen herbarium *Rafflesia* menggunakan protokol IV adalah sebagai berikut:

- Sampel digerus menggunakan nitrogen cair hingga menjadi serbuk.
- 0,1 g sampeldimasukkan ke dalam tabung 2mL.
- 800 μL buffer ekstraksi suhu 65°C ditambahkan ke dalam tabung.
- Campuran diinkubasi pada suhu 65°C dalam water bath selama 15 menit (di-invertsampel setiap 5 menit).
- Campurandindingkan hingga menjadi suhu ruang.

- 750 μ LCIA ditambahkan ke dalam tabung.
- Tabung di-*invert* dengan pelan sebanyak 50 kali.
- Tabung disentrifus pada 10,000 rpm selama 15 menit.
- Supernatan dipindahkan ke dalam tabung baru.
- Tabung di-*invert* dengan pelan sebanyak 50 kali.
- Tabung disentrifus pada 10,000 rpm selama 15 menit.
- Supernatan dimasukkan dalam tub baru yang berisi 0,7 volume isopropanol dingin.
- Campuran disentrifus pada 10,000 rpm selama 15 menit.
- Supernatan dibuang.
- Pelet dicuci dengan 1 mL etanol 70%.
- Tabung disentrifus pada 10,000 rpm selama 10 menit.
- DNA dikeringkan.
- Pelet dilarutkan dalam 40 μ L TE-Rnase.
- Tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

3.5 Uji Hasil Ekstraksi DNA

Uji hasil isolasi DNA dilakukan secara kuantitatif dan kualitatif. DNA total hasil isolasi kemudian diuji kuantitatif untuk mengetahui konsentrasinya dengan mengukur perbandingan serapan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Konsentrasi DNA yang tinggi digambarkan dengan nilai serapan tinggi pada panjang gelombang 260 nm. kemurnian DNA dibanding dengan makromolekul lain dapat dilihat dari perbandingan serapan antara 260/280 yang berkisar antara 1,8-2,0 (Sambrook *et al.* 1989). Uji kualitas DNA dilakukan

dengan teknik elektroforesis gel agarose 2% pada tegangan 85V, 90 menit menggunakan 1X buffer TBE. Pada masing masing sumur dimasukan 4 μ L DNA masing-masing sampel, 6 μ L aquades dan 2 μ L *loading dye*.

