

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis, Lokasi, dan Waktu Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif deskriptif. Penelitian telah dilaksanakan pada bulan Desember 2020 sampai bulan April 2021, adapun tempat untuk persemaian padi dan pengambilan sampel tanaman padi di Perumahan Banjarsari Permai Kelurahan Banjarsari Kecamatan Cipocok Jaya dan untuk Uji Isolasi DNA, Uji Kuantitas dan kualitas DNA, Amplifikasi DNA dengan PCR, Elektroforesis gel agarose hasil PCR, dan Visualisasi hasil running menggunakan Chemidoc di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa.

3.2. Alat dan Bahan

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *ice box*, gunting, pena *marker*, lemari pendingin, penggaris, alat tulis, *microtube* 2 ml, *microtube* 1,5 ml, *box styrofoam*, mikropipet, PCR *plate*, *waterbath*, neraca analitik, aluminium foil, autoklaf, sentrifius *Beckman Microfuge*TM 12, pinset, tips pipet, set elektroforesis, spatula, parafilm, erlenmeyer, gelas ukur, *magnetic stirrer*, sarung tangan, lemari asam, *freezer* (-20°C), vortex, mesin PCR, *spektrofotometer*

Nanodrop Thermo Scientific 2000, dan *Chemidoc UV-Transilluminator EZ Biorad*, kamera dan laptop.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daun sehat (tidak terserang hama dan penyakit) sebanyak 0,5 gram dari 3 aksesori padi Introduksi dan 26 Padi lokal Indonesia yang berumur 21 HST, buffer ekstrak CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*), ddH₂O, Na-asetat, Cisam (kloroform, isoamil alkohol), isopropanol dingin, etanol absolute 70%, DNA sample, tips pipet, *loading dye*, gel red, agarose, Primer umur genjah (RM3868, RM5607, dan RM3571) dan Primer tahan wereng batang coklat biotipe 3 (RM17 dan RM125), Komposisi larutan *buffer* isolasi DNA adalah *buffer* CTAB (CTAB (2% M/V), EDTA 0,5 M pH 8 (20 Mm), Tris HCl 1 M pH 8 (100 Mm), NaCl 5 M (1,26 M) dan ddH₂O steril), *buffer* TE (Tris HCl 1 M pH 7,5; EDTA 500 mM pH 8 dan ddH₂O).

3.3. Tahapan Penelitian

3.3.1. Persemaian Padi dan Pengambilan Sampel

Persemaian benih padi dilakukan menggunakan 29 aksesori padi lokal Indonesia dan Introduksi (lampiran 6). Benih tersebut disemai di atas kapas yang lembab disimpan di suhu ruangan yang terkena cahaya matahari. Setelah berumur 14 hari persemaian, tanaman dipindahkan ke media tanam yaitu tanah dan kompos dengan perbandingan (3:1) $\frac{V}{V}$ dan dimasukkan pada ember yang bervolume 39 cm³ (diameter atas 31 cm, diameter bawah 22,5

dan tinggi 23 cm) dengan jumlah 29 ember untuk 29 aksesori padi lokal Indonesia dan introduksi. Setiap ember diisi dengan 3 bibit padi hasil persemaian dengan media tanam tersebut, yang diletakkan di halaman rumah yaitu di perumahan banjarsari permai. Penyiraman dilakukan setiap hari pada pagi dan sore hari.

Pengambilan sampel untuk isolasi DNA dilakukan pada umur 21 HST (hari setelah tanam) dengan kriteria sampel menggunakan daun yang masih muda, sehat, dan tidak terserang hama dan penyakit. Sampel diambil sebanyak ± 7 cm bagian tengah helaian daun diambil untuk digunakan sebagai sampelnya, kemudian setiap sampel dimasukkan ke dalam plastik dan diberi nama dan disimpan ke dalam *ice box* pada suhu -20°C . *Ice box* digunakan agar daun tetap segar dan mencegah terjadi kemerosotan berat kering dan kerusakan jaringan daun.

3.3.2. Isolasi DNA Padi Metode CTAB (Doyle & Doyle, 1987)

DNA padi di isolasi dari sampel daun padi muda dengan menggunakan metode CTAB (*Cetyl trimethyl Ammonium bromide*) (Doyle & Doyle, 1987 dengan modifikasi). Metode CTAB dilakukan melalui tiga tahap yaitu perusakan dinding sel (*preparasi ekstrak DNA*), pemurnian DNA (*purifikasi DNA*), dan pemekatan DNA (*presipitasi DNA*). CTAB berfungsi sebagai buffer pengekstrak yang dapat merusak membran menjadi suatu larutan kompleks yang mengandung DNA.

Isolasi DNA dengan menggunakan metode CTAB dilakukan melalui tiga tahapan, pertama adalah perusakan dinding sel (*preparasi ekstrak DNA*). Proses isolasi DNA yang pertama kali dilakukan adalah mengambil sampel daun padi yang berumur 21 hari. Daun ditimbang sebanyak 0,5 gram tiap sampel, kemudian daun padi dipotong kecil-kecil dan dimasukkan kedalam mortar yang sudah dalam posisi dingin dan dikelilingi es batu. Sampel kemudian digerus sampai halus, daun yang sudah halus dimasukkan kedalam tabung mikro ukuran 1,5 ml kemudian diberi tambahan buffer ekstraksi (CTAB) sebanyak 800 μ l yang terbuat dari Tris HCL 1 M dengan pH 8, EDTA 0,5 M, NaCL 5 M, CTAB serbuk, ddH₂O, dan Na disulfit. Larutan kemudian dikocok perlahan dengan cara membolak balik tabung mikro agar daun dan buffer tercampur. Sample kemudian di inkubasikan selama 15 menit menggunakan *waterbath* pada suhu 65°C untuk melisiskan dinding sel. Setiap lima menit sekali sampel dibolak balik agar buffer dan daun tercampur merata, tujuannya untuk mengoptimalkan kerja buffer ekstraksi.

Tahapan kedua adalah pemurnian DNA (*purifikasi DNA*) yang dilakukan dengan cara menambahkan Chisam 800 μ L suatu campuran cloroform dan isoamil alkohol dengan perbandingan 24:1 ($\frac{v}{v}$). Larutan kemudian di *vortex* agar tercampur merata. Setelah homogen, tabung mikro disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Sentrifugasi ini akan menghasilkan 3 lapisan supernatan yang terbentuk, lapisan paling atas supernatan diambil sebanyak 500 μ L dan dipindahkan kedalam tabung

mikro 1.5 ml, kemudian ditambahkan 450 μ L NaOAc (*Natrium Asetat*), lalu di bolak-balik sebanyak 10 x.

Tahapan ketiga adalah pemekatan DNA (*presipitasi DNA*) dilakukan dengan cara menambahkan etanol absolut dingin sebanyak 900 μ l, ke dalam larutan supernatan tadi, larutan kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm agar terbentuk pellet (DNA yang mengendap). Bagian cair dari larutan supernatan dibuang hingga tersisa pellet. Kemudian tambahkan etanol 70% sebanyak 500 μ L kedalam tabung mikro berisi pellet DNA, kemudian larutan disentrifugasi lagi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Langkah selanjutnya, supernatan (Bagian cair) dari larutan dibuang dan pellet yang di peroleh dikeringkan selama semalam (*overnight*). Pellet yang telah kering, dilarutkan dengan 200 μ l ddH₂O untuk selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37°C selama 30 menit, simpan dalam freezer dan kemudian cek konsentrasi DNA melalui analisis kuantitatif DNA.

3.3.3. Analisis Kuantitatif DNA dengan Spektrofotometer Nanodrop (Thermo Fisher Scientific 2009)

Analisis Kuantitatif DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan *Spectrophotometer Nanodrop*. Analisis ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi dan kemurnian DNA. DNA hasil isolasi disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 15 menit. Pelet hasil sentrifugasi dilarutkan dengan TE 1x sebanyak 200 μ L. Larutan pellet DNA kemudian diteteskan keatas blanko yang berupa lempengan kaca dengan lubang optik. Lubang optik dibersihkan terlebih dahulu

menggunakan larutan TE 1x diteteskan sebanyak 2 μL (satu tetes) ke dalam lubang optik kemudian ditutup. Tahap selanjutnya adalah mengaktifkan menu *measure* pada komputer. Lubang optik dikeringkan menggunakan tissue, kemudian sampel dimasukkan sebanyak 2 μL (satu tetes). Hasil pengukuran akan ditampilkan dalam bentuk **konsentrasi ($\text{ng}/\mu\text{L}$)** dan **kemurnian DNA** berdasarkan rasio absorbansi pada panjang **gelombang 260 nm dan 280 nm**. DNA dengan nilai kemurnian yang baik berada pada rentang 1.8-2.0.

3.3.4. Analisis Kualitatif DNA dengan Elektroforesis Gel Agarosa (Sambrook & Russell 2001)

Setelah didapat konsentrasi dan kemurnian DNA, dilanjutkan untuk Analisis kualitatif DNA tanaman padi yaitu dengan menggunakan alat elektroforesis gel agarose. Untuk Analisis kualitatif DNA, konsentrasi agarose yang digunakan adalah 1%. Pembuatan agar dilakukan dengan cara menghomogenkan gel agarose 0,4 g pada larutan TAE 1x sebanyak 40 ml. Larutan dipanaskan ke dalam *microwave* selama 2-4 menit hingga agar larut. Larutan yang sudah tercampur dimasukkan ke dalam cetakan agar yang sudah diberi cetakan sumur.

Setelah gel agarosa memadat, gel dimasukkan ke dalam bak elektroforesis yang berisi TAE 1x. Sebanyak 2 μL sampel DNA ditambahkan dengan 2 μL *loading dye* dan dicampur, kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel. Proses *running* elektroforesis dilakukan dengan voltase 75 volt selama \pm 30 menit.

3.3.5. Amplifikasi DNA dengan PCR

Analisis selanjutnya yaitu Amplifikasi DNA dengan menggunakan alat PCR adalah salah satu tahap memperbanyak DNA dengan menggunakan suhu tinggi. Pada tahapan ini, amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR membutuhkan temperatur, waktu, dan siklus yang berbeda untuk setiap primernya. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dengan beberapa jam (Handoyo *et al*, 2000). Adapun komponen master mix PCR DNA yang dimasukkan ke dalam *tube* PCR dapat dilihat pada (Tabel 1).

Tabel 1. Komponen master mix PCR

Bahan	Volume (μl)
Buffer	1,5
dNtps	1,5
MgCl ₂	0,6
Primer	F 1.5+R 1. 5
Dream Taq	0,12
Tamplate	1,0
DNA	2,0
ddH ₂ O	7,28

Sumber : Protokol VIVANTIS, 2017

Dalam proses PCR juga membutuhkan fragmen kecil DNA, yang dikenal sebagai primer, serta molekul DNA yang berfungsi sebagai template untuk membangun untai baru. Jika tiga bahan ini disediakan, enzim akan bekerja membuat salinan template dari molekul DNA. Amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR suhu pada tahapan PCR tergantung pada primer yang digunakan.

Campuran larutan PCR dibuat dengan mencampurkan 2 μ L DNA (20 ng/ μ L), dan PCR mix yang mengandung 1,5 μ L 10x bufer PCR, 1,5 μ L

dNTPs, 0.6 μ L MgCl₂, 1,5 μ L primer *reverse* dan *forward* (RM6838, RM5607, RM3571, RM17, dan RM125), 0.12 μ L Dream Taq DNA polimerase dan ditambahkan ddH₂O hingga volume mencapai 7,28 μ L. Campuran DNA dimasukkan ke dalam *plate* dan kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR. Program PCR yang digunakan adalah denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94°C, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas: denaturasi (*denaturation*) selama 60 detik pada suhu 94°C, penempelan primer (*annealing*) selama 60 detik pada suhu 55°C, dan perpanjangan primer (*extension*) selama 2 menit pada suhu 72°C. Perpanjangan primer terakhir dilakukan selama 7 menit pada suhu 72°C.

Dalam Proses PCR juga membutuhkan fragmen kecil DNA, yang dikenal sebagai primer, serta molekul DNA yang berfungsi sebagai template untuk membangun untai baru. Jika tiga bahan disediakan, enzim akan bekerja membuat salinan template dari molekul DNA. Amplifikasi DNA dengan menggunakan PCR suhu pada tahapan PCR tergantung pada primer yang digunakan.

3.3.6. Elektroforesis Gel Agarosa Hasil PCR

Analisis hasil amplifikasi DNA PCR menggunakan elektroforesis gel agaros 1% diawali dengan menyiapkan rangkaian alat elektroforesis terlebih dahulu. Plat kaca dibersihkan dengan alkohol dan dibiarkan hingga kering. Kaca yang telah kering lalu digabungkan yaitu antara kaca A dan kaca B.

Gel agaros dibuat dengan melarutkan 0,4 g bubuk agarose dalam 40 ml TAE 1x untuk kemudian dihomogenkan dan dipanaskan dengan *stirrer and hotplate* hingga mendidih, tunggu hingga tidak terlalu panas. Selanjutnya dituangkan pada cetakan gel yang sebelumnya telah ditempatkan *comb* (sisir) untuk membuat lubang atau sumur dan didiamkan memadat selama 60 menit. Gel agarose yang sudah mengeras direndam dalam TAE 1x.

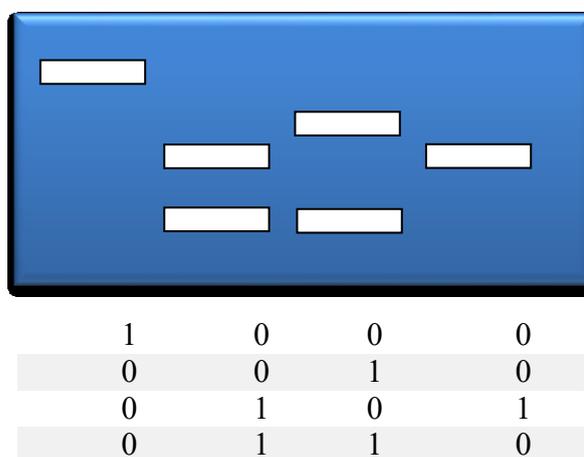
Gel agaros yang telah memadat pada cetakan kaca dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis horizontal dan ditambahkan bufer TAE 1x ke dalamnya. Setelah gel siap, produk PCR yang telah ditambahkan 2 μ L *loading dye* dimasukkan ke dalam sumur gel sebanyak 2 μ L dan disertakan DNA *marker* 100 bp *ladder* sebanyak 2 μ L sebagai pembanding pada sumur pertama untuk melihat ukuran DNA. Selanjutnya sampel DNA dialiri arus listrik dengan daya 100 volt selama 25 menit. Gel agaros yang telah selesai *running* dicuci dengan ddH₂O. Setelah proses *running* selesai, gel divisualisasi dengan *chemidoc* UV-Transilluminator *EZ Biorad*.

3.3.7. Visualisasi Hasil Running Menggunakan Chemidoc

Visualisasi hasil PCR yang telah dirunning dilakukan dengan menggunakan alat *Chemidoc UV-Transilluminator EZ Biorad* untuk melihat fragmen-fragmen DNA yang berbentuk pita-pita DNA. Setiap ukuran pita DNA berhubungan dengan karakter yang akan diamati, dengan bantuan program aplikasi komputer yaitu Image Lab.

3.3.8. Analisis Data

Analisis data molekuler dilakukan dengan skoring pita hasil visualisasi DNA. Setiap pita yang muncul pada gel merupakan alel tertentu. Alel tersebut diterjemahkan menjadi data biner yang diberi nilai berdasarkan ada tidaknya suatu alel (Hairinsyah, 2010). Nilai satu atau (+) akan diberikan apabila terdapat alel, dan nilai 0 atau (-) bila tidak terdapat alel. Untuk lebih jelasnya bisa dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Visualisasi scoreing

Adapun untuk pengolahan data menggunakan statistik deskriptif yaitu menggunakan program software *Gel Analyzer* untuk mengetahui analisis pita DNA dan ukuran bp, ms. *Excel* untuk analisis statistik (*Scoreing*), dari masing-masing primer SSR yang digunakan mengamplifikasi fragmen DNA dari semua aksesori padi tersebut dilakukan dengan matriks *excel*. Selanjutnya yaitu menggunakan program NTSYSpc 2.11a (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems*). Program ini dapat digunakan untuk metode *clustering* untuk membangun pohon

filogeneti dan selanjutnya menganalisis Ada-tidaknya pita, lalu melakukan pengelompokan data untuk membuat dendogram Kekerabatan dan elektroforegram, dilanjutkan dengan menganalisis hasil dendogram dan mengelompokannya berdasarkan kontrol positif dan negatif gen umur genjah dan tahan hama wereng batang coklat.

Adapun aksesori yang dijadikan kontrol positif gen umur genjah yaitu M70D (87 hari), Maninjau (95 hari), Gajah mungkur (95 hari). Sedangkan aksesori yang memiliki umur dalam yaitu Rojolele delangu (155 hari), Kewal bulu putih (165 hari), kewal benur (165 hari) dan Tunggul Hideung (180 hari). Adapun kriteria Padi yang berumur 100 HST tergolong genjah, 116-125 HST tergolong setengah genjah, 126-135 HST tergolong setengah dalam, 135-150 HST tergolong dalam dan lebih dari 150 HST tergolong dalam sekali (Siregar 1981).

Adapun aksesori yang dijadikan sebagai kontrol Positif gen tahan WBC biotipe 3 yaitu Balck madras dan ciherang, sedangkan aksesori yang dijadikan kontrol negative yaitu yang rentan WBC biotipe 3 yaitu Inpari 30 dan IR42.

Setelah dilakukan pengelompokan data hasil dendogram dengan menggunakan primer umur genjah maupun gen tahan WBC biotipe 3 dapat ditarik kesimpulan bahwa kelompok yang memiliki kesamaan genetik dengan aksesori kontrol positif dinyatakan memiliki kemiripan sifat genetik gen umur genjah maupun tahan WBC biotipe 3.