

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif kualitatif dengan menggunakan 2 sampel yaitu kultivar pisang Mas Kirana dan pisang Agung Semeru sebagai pisang tahan penyakit, serta pisang Embug sebagai kontrol rentan (Prahardini, 2010), tingkat ketahanan dari ketiga pisang ini akan dibandingkan dengan 9 kultivar lainnya. Kelompok sampel pada penelitian ini terdapat pada tabel 3.1 berikut.

Tabel 3.1 Kelompok sampel beberapa kultivar pisang

No	Nama Kultivar	Nama Latin	Genom	Tingkat Ketahanan
1.	Mas Kirana	<i>M. acuminata</i>	AA	Tahan I
2.	Agung Semeru	<i>M. paradisiaca</i>	ABB	Tahan II
3.	Embug	<i>M. paradisiaca</i>	AAB	Belum diketahui
4.	Barley	<i>M. paradisiaca</i>	AAB	Belum diketahui
5.	Kidang	<i>M. paradisiaca</i>	AAA	Belum diketahui
6.	Agung Jawa	<i>M. paradisiaca</i>	ABB	Belum diketahui
7.	Kepok	<i>M. paradisiaca</i>	ABB	Belum diketahui
8.	Ambon Hijau	<i>M. paradisiaca</i>	AAB	Belum diketahui
9.	Raja Nangka	<i>M. paradisiaca</i>	AAB	Belum diketahui
10.	Susu	<i>M. paradisiaca</i>	ABB	Belum diketahui
11.	Cavendish	<i>M. paradisiaca</i>	AAA	Belum diketahui
12.	Raja Mala	<i>M. paradisiaca</i>	AAB	Belum diketahui

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Agustus 2014. Sampel daun beberapa kultivar pisang diperoleh dari kecamatan Senduro dan Pasrujambe kabupaten Lumajang. Analisis pengelompokan kultivar pisang secara genetik bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler dan Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.



Gambar 3.9 Letak geografis kecamatan Senduro dan Pasrujambe Kabupaten Lumajang (Dinas Pertanian Kab. Lumajang, 2014).

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah penggaris, alat tulis, sarung tangan, kertas label, plastik klip, masker, gunting, mortar, autoklaf, mikropipet (5-10 μ l, 2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l), gelas ukur, tabung vorteks, tabung nitrogen cair, rak tube, vorteks, mesin sentrifugasi, *tube eppendorf* ukuran 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, tabung *tinnual*, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, mesin PCR

(*thermal cycler*) seri BioRAD, *water bath*, inkubator, spektrofotometer seri BioRAD SmartspecTM Plus, kuvet, timbangan analitik, gelas ukur, erlenmeyer, cetakan agar, micropipet, microwave, perangkat elektroforesis merk BioRAD, bak EtBr, mesin *UV transiluminator* (Gel Doc) seri BioRAD molecular Imager Gel DocTMXr imaging system dan software NTSYS-pc (*NumericalTaxonomic System*).

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel daun 12 kultivar pisang seperti pada tabel 3.1, buffer ekstrak yang terdiri dari 3 % CTAB (w/v), NaCl (2 M), Tris HCl pH 8.0 (100 mM) dan EDTA pH 8.0 (20 mM), •-mercaptoethanol 2.5 % (V/v), proteinase K 0,1 mg/ml, kloroform:isoamil alkohol (24:1) (v/v), etanol (70 %,100 %), sodium acetate (3M) solution (pH 8.0), TE buffer (Tris HCl, 10 Mm pH 8.0, 1mM EDTA; pH 8.0), Agarose 0,8%, Tris Borac Acid (TBE): 89 mM Tris-CL,89 mM Borate, dan 2 mM EDTA solution, *loading dye*, Ethidium Bromida (Etbr), Green master mix (Reaction Buffer (pH 8.5), 400 ⁻M dATP, 400 ⁻M dGTP, 400 ⁻M dCTP, 400 ⁻M dTTP and 3 mM MgCl₂), 0,5 μ M *primer forward* dan *primer reverse*, DNA hasil PCR 5 μ l, aquabides dan aquades.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Pengambilan Sampel Daun

Daun yang dijadikan sampel adalah daun muda yang masih menggulung. Daun yang diambil dimasukkan ke dalam plastik klip yang telah diberi label nama

daun kemudian diberi silika gel. Silika gel yang berubah warna diganti dengan silika gel yang baru sampai daun menjadi kering.

3.4.2 Ekstraksi DNA

Metode ekstraksi DNA merupakan modifikasi metode dari Das (2009) dan Fatchiyah (2009), yaitu diambil 0,1 gram sampel daun kemudian dicampurkan dengan nitrogen cair dingin dan ditumbuk dengan alu atau mortar. Bubuk hasil gerusan dipindahkan ke tube sentrifuge sebanyak 1,5 ml steril dengan cepat kemudian ditambahkan ekstrak buffer hangat (60°C) sebanyak 700 μl kemudian dikocok perlahan sampai membentuk bubur. Tabung yang berisi homogenat diinkubasi tube pada suhu 37°C pada inkubator selama 24 jam (overnight), kemudian disentrifugasi 13000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke tabung yang baru. Ditambahkan dengan volume yang sama kloroform:isoamil alkohol (24:1) kemudian divorteks dan disentrifugasi pada 12000 rpm selama 20 menit. Dipindahkan supernatan secara hati-hati ke tabung yang baru dan ditambahkan kloroform:isoamil alkohol (24:1), kemudian disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm selama 20 menit.

Proses selanjutnya yaitu presipitasi DNA dengan cara diambil supernatan dengan hati-hati dan dituangkan ke tabung baru kemudian diendapkan dengan etanol 95% (-20°C) dan natrium asetat (konsentrasi 3 M) kemudian divorteks (volume etanol 95% dan natrium asetat sesuai volume supernatan yang diperoleh, kemudian diinkubasi pada suhu -20°C 1-3 jam. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit dibuang supernatan. Pelet ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 500 μl dihomogenkan secara perlahan. Kemudian

disentrifugasi sampai pelet yang berwarna putih berubah menjadi transparan. Larutan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 15 menit, pelet DNA dikeringkan pada suhu 37°C dan ditambahkan 50 µl aquabides.

3.4.3 Pengukuran Kuantitas dan Kemurnian DNA

Kuantitas dan kemurnian hasil isolasi DNA diukur dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nm. Pita ganda DNA dapat menyerap cahaya UV pada 260 nm, sedangkan kontaminan protein atau fenol akan menyerap cahaya pada 280 nm. Sehingga kemurnian DNA dapat diukur dengan menghitung nilai absorbansi 260 nm dibagi dengan nilai absorbansi 280 nm. Nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8-2,0.

3.4.4 Pengukuran Kualitas DNA (Visualisasi Genom)

Pengukuran kualitas DNA merupakan modifikasi metode dari Das (2009) dan Fatchiyah (2009) yaitu disiapkan gel agarose 1% dengan memanaskan bubuk agarosa dengan TBE hingga mendidih. Setelah mendidih dituangkan kedalam cetakan. Bila telah mengeras gel dan cetakannya dimasukkan kedalam bak elektroforesis dan dituang TBE buffer sampai gel terendam. Dimasukkan DNA 4 µl dan loading dye 1 µl pada masing-masing sumuran. Dihubungkan elektroda dengan *power supply* dan dinyalakan dengan voltase 70 volt dan waktu 60 menit. Setelah selesai dimatikan dan diambil gel, direndam di *Ethidium bromida* selama 15 menit. Hasilnya didokumentasikan dengan UV transiluminator.

3.4.5 Pembuatan Primer (*Primer Design*)

Primer yang digunakan dalam penelitian ini adalah primer yang dibuat berdasarkan urutan nukleotida Musa ABB Group cultivar *Karthombiumtham*

klone SBR2 NBS-LRR mempunyai panjang 1192 bp, kode akses pada NCBI adalah AJ534312.1 dan sekuens basa RGA pada primer daerah *NLRR* (Bustamam, 2004). Hasil urutan basa primer dikonfirmasi dengan menggunakan BLAST di NCBI untuk mengetahui daerah yang daerah konservasi dengan spesies lain pada sekuens RGA.

Tabel 3.2 Hasil urutan sekuens basa primer RGA pisang

Primer	Forward 5'→3'	Reverse 3'→5'
NBS-LRR	ATGTCAGGCGGTGG CAGAAG	AGTGCCGCCATCGACCAT GA
NLRR AS1/AS2 (Bustamam,2004)	TAGGGCCTCTTGCAT CGT	TATAAAAAGTGCCGGACT

3.4.6 Amplifikasi DNA

Penggunaan mesin PCR sesuai dengan protokol dan spesifikasi mesin Bio Rad. Primer yang digunakan sebelumnya diencerkan terlebih dahulu dengan cara mengambil primer stok 100 pmol ditambahkan dengan 90 mikrolit aquabides sehingga konsentrasi primer 10 pmol. Konsentrasi ini yang akan digunakan untuk komposisi reaksi PCR.

Tabel 3.3 Komposisi PCR Mix untuk 12 tabung PCR

No	Bahan	Jumlah (Mikrolit)	Total (Mikrolit)
1.	<i>Green Master Mix</i> (GMM)	12,5x 12	150
2.	Primer <i>Forward</i>	1,5 x 12	18
3.	Primer <i>Reverse</i>	1,5 x 12	18
4.	Aquabides	8,5 x 12	102
	Total		288

Seluruh komposisi tersebut kemudian diambil sebanyak 24 pertabung dan ditambahkan DNA templete sebanyak 1µl pertabung. Dicampur seluruh komposisi larutan dengan cara menjentikan jari ke tabung kemudian di

sentrifugasi. Selanjutnya diatur suhu untuk reaksi PCR sesuai dengan masing-masing primer.

Tabel 3.4 Pengkondisian suhu dan waktu pada PCR untuk primer NBS-LRR

No	Tahap	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
1.	Pre Denaturasi	95	3 menit	1
2.	Denaturasi Annealing Extensi	94 56 72	45 detik 30 detik 1 menit	35
3.	Post Extensi	72	10 menit	1
4.	Penyimpanan	4	Selamanya	

Tabel 3.5 Pengkondisian suhu dan waktu pada PCR untuk primer NLRR

No	Tahap	Suhu (°C)	Waktu	Jumlah Siklus
1.	Pre Denaturasi	94	3 menit	1
2.	Denaturasi Annealing Extensi	94 49 dan 51 72	1 menit 5 menit 2 menit	45
3.	Post Extensi	72	7 menit	1
4.	Penyimpanan	4	Selamanya	

Hasil amplifikasi dianalisis dengan menggunakan gel agarose konsentrasi 1,2 % (Ekasari,2012). Setiap sumuran terdiri dari DNA 4 µl, voltase yang digunakan adalah 60 volt waktu 60 menit. Selanjutnya dilakukan perendaman dengan EtBr selama 15 menit, visualisasi DNA dilakukan dengan UV transiluminator.

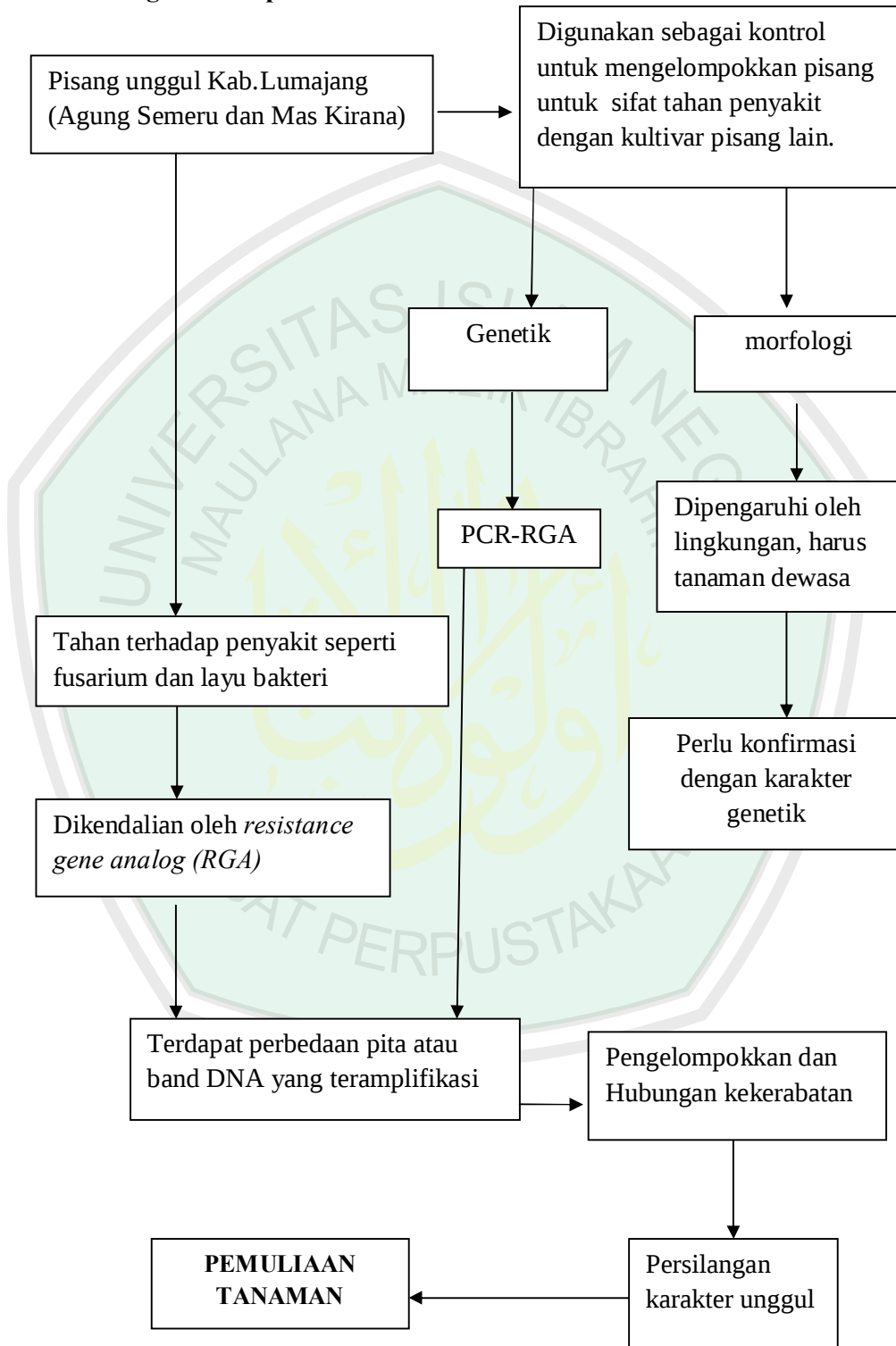
3.4.7 Analisis Data

Analisis dilakukan dengan pemberian skor untuk pita-pita yang muncul. Skor 1 diberi untuk pita yang muncul dan untuk pita yang tidak muncul diberi skor 0 (Suryanto,2003). Selanjutnya dianalisis dengan menggunakan Software NTSYS-pc (*Numerical Taxonomic System*) Versi 2.0.1. Indeks similaritas

dihitung berdasarkan koefisien dalam perhitungan *Similarity of Qualitative Data* (SYMQUAL). Analisis kluster dibuat dengan perhitungan *Sequential Aglomerative Heirarchical and Nested* (SAHN) berdasarkan *un-weighted pair group method with aritmatical averages* (UPGMA) dari indeks similaritas. Hasil dari analisis kluster disajikan dalam bentuk dendrogram.



3.5 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.10 Kerangka konsep penelitian