

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli hingga Agustus 2017 di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah labu erlenmeyer, gelas ukur, *autoklave*, *ice box*, *hot plate* dan *stirrer*, *blue pastle*, inkubator 65°C, neraca analitik, rak tabung mikro, tabung mikro 2 mL, tabung mikro 1.5 mL, pipet mikro dan tip berbagai ukuran, *microwave*, *NanoDrop Spektrofotometer*, *spindown*, *vorteks*, *UV transilluminator*, *tissue kimwipes*, perangkat elektroforesis gel agarosa VWR, perangkat elektroforesis gel akrilamid C.B.S *Scientific EPS-300x*, plate PCR, penutup plate PCR, mesin pendingin, mesin PCR TI *thermocycler*, sisir sampel, sekat (*spacer*), lempengan kaca (*glass plate*) dan tangki elektroforesis.

Bahan yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini berupa daun tanaman kedelai pertama muncul yang sudah disimpan pada suhu -20 °C berasal dari biji kedelai introduksi USDA dan 15 pasang primer SSR yang didesain berbasis genom kedelai introduksi USDA, yaitu: SATT463, SATT294, SATT191, SATT147, SATT0431, SATT308, SATT197, SATT114, SATT063, SATT045, SATT038, SATT0308, SATT009, SATT002, GMES1604, buffer ekstrasi (2% (w/v) cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 100 mM Tris-HCL pH 8.0,

1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 2% (w/v), *polyvinyl pryrrolidone* (PVP), 0.38% (w/v) natrium disulfit, larutan kloroform-isoamil alkohol (24:1), Na-asetat, isopropanol, etanol 70% larutan mix PCR (Kappa 2G *fast ready mix*, sepasang primer (*Forward* dan *Reverse*), ddH₂O steril), mineral oil, bufer 1x Tris-Asetate EDTA (TAE), 1% gel agarosa, 8% gel poliakrilamid (akrilamid, bis akrilamid, Ammonium Persulfate (APS), TEMED) 1x Tris-Borate EDTA (TBE), 1x Tris EDTA (TE), NaOH, dan DNA *ladder* 100 bp.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan metode deskriptif dengan pendekatan kualitatif dan kuantitatif. Kegiatan yang dilakukan dalam pendekatan kuantitatif meliputi uji kemurnian DNA menggunakan alat Nanodrop Spektrofotometer (Thermo Scientific, USA) sedangkan Uji kualitatif dilakukan dengan teknik elektroforesis untuk melihat adanya DNA.

D. Cara Penelitian

1. Materi Genetik

Bahan tanaman yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini daun tanaman kedelai pertama muncul yang berasal dari biji kedelai introduksi USDA (Tabel 1). Marka SSR yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 15 pasang primer yang didesain berbasis genom kedelai introduksi. Daftar primer yang digunakan dalam penelitian disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Daftar Primer yang Digunakan dalam Penelitian

No	Nama Primer	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	Posisi Kromosom	Motif SSR
1	SATT191	CGCGATCATGTCTCTG	GGGAGTTGGTGTTCCT TGTG	18	(TAT)19
2	SATT009	CCAACTTGAAATTACT AGAGAAA	CTTACTAGCGTATTAAC CCTT	3	(AAAT)3(AAT)13*
3	SATT030	AAAAAGTGAACCAAG CC	TCTTAAATCTTATGTTG ATGC	13	(ATA)21
4	SATT063	AAATGATTAACAATGT TTATGAT	ACTTGCATCAGTTAATA ACAA	14	(TAA)20
5	SATT045	TGGTTTCTACTTTCTA TAATTATTT	ATGCCTCTCCCTCCT	15	(AAT)18
6	SATT197	CACTGCTTTTCCCCT CTCT	AAGATACCCCCAACATT ATTGTAA	11	(ATT)20
7	SATT341	GCGGAGCTTACCAAC ATAAAAAAAACT	GCGGTCCAACATTGAG GCAAGAATAC	8	(AAT)17
8	SATT463	TTGGATCTCATATTCA AACTTTCAAG	CTGCAAATTGATGCAC ATGTGTCTA	7	(AAT)13(G AT)17(AA T)19
9	SATT294	GCGGGTCAAATGCAA ATTATTTT	GCGCTCAGTGTGAAAGT TGTTTCTAT	4	(TAT)23
10	SATT147	CCATCCCTCCTCCAA ATAGAT	CTTCCACACCCTAGTT AGTGACAA	1	(ATA)15
11	SATT114	GGGTTATCCTCCCCAA TA	ATATGGGATGATAAGG TGAAA	13	(AAT)17
12	SATT308	GCGTTAAGGTTGGCA GGGTGGAAGTG	GCGCAGCTTATACAAA AATCAACAA	7	(TTA)22
13	SATT038	GGGAATCTTTTTCT TTCTATTAAGTT	GGGCATTGAAATGGTT TAGTCA	18	(ATA)17
14	SATT002	TGTGGTAAAATAGA TAAAAAT	TCATTTGAATCGTTGA A	17	(TA)5tgtac gatttaaaaata aaata(AT)5
15	GMES1604	GTTGCAGGCACACTG GAGTA	CTCAGCCTCTCCCTGT T		

Referensi : Cregan *et al.* 1999A An integrated genetic linkage map of the soybean

Crop Sci. 39:1464-1490

(Dokumentasi BB-Biogen, 2017)

2. Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) yang dimodifikasi berdasarkan Lestari (2016). Daun tanaman kedelai pertama muncul diambil sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 mL digerus sampai lumat menggunakan *blue pestle* yang telah diautoklaf diikuti dengan tambahan 800 μ l buffer ekstraksi yang mengandung Tris-HCL 100 mM (pH 0,8), NaCl 1,4 M, EDTA 20 Mm (pH 8,0), cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 2% (w/v), *polyvinyl pryrrolidone* (PVP) 2% (w/v) dan natrium disulfit 0,38% (w/v). Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65°C di dalam *water bath* (*Thermo scientific USA*) selama 15 menit dan dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung setiap 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 800 μ l larutan kloroform : isoamil (24:1) ke dalam tabung mikro. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C. Supernatan yang terbentuk lalu dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL sebanyak 600 μ l diikuti dengan penambahan 60 μ l Natrium asetat 3 M (pH 5,2) dan 600 μ l isopropanol. Campuran kemudian diinkubasi di dalam lemari pendingin bersuhu -20°C selama 1 jam. Setelah itu, campuran disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 20°C menggunakan alat eppendorf centrifuge 5810 R. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang sedangkan palet yang terbentuk dibilas menggunakan larutan etanol 70% sebanyak 500 μ l untuk menghilangkan sisa garam. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 20°C. Supernatan kemudian dibuang dan pelet yang telah bersih dikeringanginkan semalam. Pelet yang telah kering dilarutkan dalam

100 μ l larutan TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) dan ditambahkan RNase A (10 mg/ml) sebanyak 2 μ l. Larutan DNA stok tersebut diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. DNA stok yang sudah jadi disimpan pada suhu -20°C hingga siap digunakan.

3. Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA kedelai USDA introduksi

Larutan DNA kedelai yang diperoleh dari hasil isolasi lalu diuji secara kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui tingkat kemurniannya. Uji kuantitatif dilakukan dengan menggunakan alat Nanodrop Spektrofotometer (Thermo Scientific, USA) sedangkan Uji kualitatif dilakukan dengan teknik elektroforesis untuk melihat adanya DNA.

4. Pengenceran stok DNA

Sampel stok DNA yang telah diuji secara kuantitatif dan kualitatif lalu diencerkan sebanyak 100 kali. Pengenceran stok DNA bertujuan untuk meminimalkan adanya kontaminasi seperti protein, fenol maupun sisa bahan pada saat ekstraksi DNA. Konsentrasi DNA yang diperlukan untuk stok amplifikasi DNA menggunakan metode PCR tidak besar sehingga dilakukan pengenceran stok DNA agar dapat digunakan. Pengenceran DNA dilakukan dengan cara melarutkan 10 μ l larutan stok DNA ke dalam tabung mikro berisi 90 μ l ddH₂O steril. Larutan DNA hasil pengenceran ini kemudian digunakan sebagai cetakan DNA pada kegiatan PCR.

5. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan 15 pasang primer SSR. Sampel yang digunakan sebanyak 27 aksesi. Masing-masing sampel diamplifikasi dalam

total reaksi 10 μl yang mengandung Kapa 2G *fast ready mix* sebanyak 5 μl , primer *Forward* dan *Reverse* (konsentrasi 10 μM) masing-masing sebanyak 0,5 μl , ddH₂O steril 3 μl dan cetakan DNA hasil pengenceran 100 kali sebanyak 1 μl , sehingga total reaksi yang diperlukan dalam satu kali kegiatan PCR sebanyak 270 μl . Amplifikasi DNA menggunakan metode PCR.

Reaksi PCR dilakukan dalam mesin PCR *T1 Thermocycler* (Biometra Germany) (Gambar 3) dengan kondisi PCR sebagai berikut: pre denaturasi dilakukan pada suhu 95⁰ C selama 5 menit, denaturasi awal dilakukan pada suhu 94⁰ C, diikuti 34 siklus proses denaturasi selama 30 detik, tahap penempelan primer pada suhu 55⁰ C selama 1 menit, dan tahap perpanjangan basa pada suhu 72°C selama 1 menit. Reaksi PCR diakhiri dengan tahap akhir perpanjangan basa pada suhu 60°C selama 15 menit. Waktu yang diperlukan dalam satu kali kegiatan PCR dilakukan selama 2 jam. Hasil PCR kemudian dielektroforesis menggunakan gel poliakrilamid 8%.



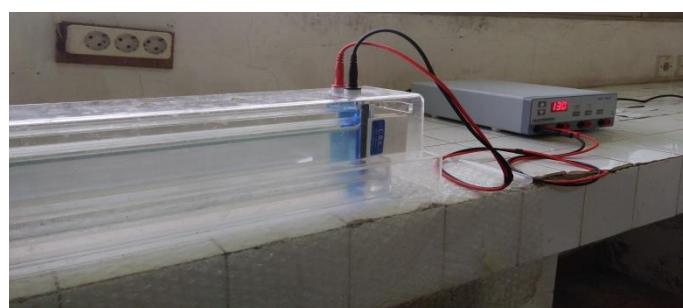
Gambar 1. Amplifikasi DNA menggunakan metode PCR dengan alat *T1 Thermocycler* (Dokumentasi pribadi, 2017)

6. Elektroforesis dan visualisasi DNA

Menurut Westermier (2005) dalam Tamam (2012), elektroforesis adalah suatu proses migrasi molekul bermuatan yang akan bergerak ke arah elektrode

yang memiliki muatan berlawanan di bawah pengaruh medan listrik. Elektroforesis DNA menggunakan metode elektroforesis gel poliakrilamid 8% pada tangki berisi buffer 1x Tris-Borate EDTA (TBE) yang berguna dalam menjaga nilai keseimbangan pH saat migrasi fragmen DNA berlangsung.

Perangkat dalam elektroforesis gel poliakrilamid 8% terdiri dari: sisir sampel, sekat (*spacer*), lempengan kaca (*glass plate*) dan tangki elektroforesis. Dua lempengan kaca (*glass plate*) disusun menggunakan dua buah sekat (*spacer*) diantara keduanya. Sisir sampel diperlukan untuk membuat sumur peletakan DNA yang akan dielektroforesis. Pembuatan sumur ini dilakukan dengan meletakkan sisir sampel sebelum gel memadat. Setelah gel memadat, sumur pertama diisi dengan 1 μ l DNA ladder sebagai marker 100 bp, sedangkan sumur kedua dan seterusnya diisi dengan 1 μ l DNA sampel yang akan diuji. Proses *running* elektroforesis berlangsung selama 110 menit dengan arus listrik 90 Volt. Setelah proses *running* selesai, gel diwarnai dengan Ethidium bromide dan divisualisasi di bawah sinar UV dengan menggunakan alat *UV Transilluminator*. Alat elektroforesis disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Alat elektroforesis (Dokumentasi BB-Biogen, 2017)

E. Analisis Data

Analisis data yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu analisis data polimorfik dan analisis data morfologi. Analisis data yang dilakukan menggunakan perangkat lunak sehingga membantu dalam analisis

1. Analisis Polimorfik

Analisis polimorfik dilakukan dengan menggunakan metode skoring terhadap pita DNA yang muncul pada hasil elektroforesis gel poliakrilamida 8%. Pita-pita yang terlihat pada hasil visualisasi dianggap sebagai satu alel. Pita-pita DNA yang memiliki laju migrasi yang sama dianggap sebagai lokus yang sama. Pada laju migrasi yang sama, setiap pita yang terlihat diberi skor 1, sedangkan pita yang tidak terlihat diberi skor 0, sehingga hasil dari skoring pita berupa data biner. Data hasil skoring dianalisis menggunakan program *sequential agglomerative hierachial and nested* (SAHN)-UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic*) pada perangkat lunak NTSYS versi 2.1 (Rohlf, 2000). Hasil analisis disajikan dalam bentuk dendrogram. Selanjutnya, data hasil skoring juga dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak PowerMarker 3.25 (Liu dan Muse, 2005) untuk mengetahui nilai frekuensi alel utama, diversitas genetika, dan *polymorphic information content* (PIC) yang dihasilkan oleh marka-marka yang digunakan dalam penelitian ini.

2. Analisis Morfologi

Data *Principal Component Analysis* (PCA) diolah menggunakan perangkat lunak XLSTAT. Setiap satu aksesi dianggap sebagai satu unit observasi. Karakter morfologi bersifat data kualitatif dikonversi terlebih dahulu menjadi data kuantitatif, sebagai contoh bunga kedelai berwarna ungu dapat diartikan data kualitatif. Lalu, dikonversi menggunakan angka misalnya 1, yang bersifat kuantitatif. Dengan demikian keseluruhan data akan menjadi data kuantitatif untuk mempermudah analisis. Hasil analisis disajikan dalam bentuk matriks korelasi Pearson dan gambar pengelompokkan aksesi pada empat kuadran.