

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

III. MATERI DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN Suska Riau. Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Maret 2017 sampai dengan September 2017.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah mesin thermal cycler PCR CFX9600 (Biorad), freezer, waterbath, mikropipet berbagai ukuran, gel doc (Bio-rad), *sentrifuge*, *mikrotube*, *pestle*, *desikator*, pemanas elektrik, *mortar*, timbangan analitik, gelas ukur, seperangkat alat elektroforesis dan kamera digital. Bahan yang digunakan adalah daun tanaman cabai merah keriting 5 genotipe cabai hasil cekaman suhu tinggi yaitu (1) G016, (2) G011 (3) G006 (4) G059 dan (5) G018. Bahan yang digunakan untuk analisis DNA adalah: CTAB, buffer Tris-HCL, EDTA, NaCl, etanol, isopropanol dingin, kloroform, *agarose*, *isoamylalkohol*, *loading dye*, *etidium bromide*, *Hot Star Taq Plus Master Mix Kit* (Qiagen), dan 14 primer.

3.3. Metode Penelitian

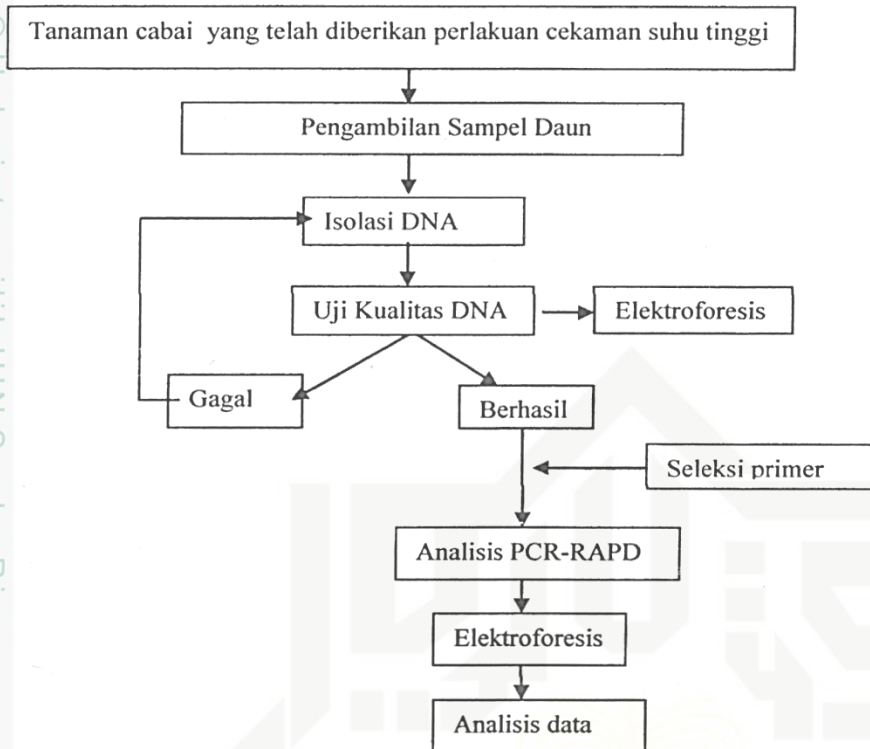
Penelitian dilakukan dengan metode eksperimen. Mengamati keragaman genetik tanaman hasil seleksi dari beberapa genotipe cabai yang toleran terhadap suhu tinggi. Berikut diuraikan tahapan-tahapan dari metode penelitian.

3.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang akan digunakan adalah daun muda/segar dari bibit tanaman cabai yang telah dipelihara, di rumah kaca Fapertapet UIN Suska Riau, yang sebelumnya tanaman cabai tersebut telah dilakukan perlakuan dengan cekaman suhu tinggi sebesar 39°C. Pengambilan sampel dilakukan menurut Cheema dan Pant (2013) dan Saptowo dkk (2015) tanaman tersebut diambil daunnya sebanyak 1 helai daun muda/segar pertanaman pada umur 5 minggu setelah tanam. Bagan alur penelitian ini dapat dilihat pada gambar 3.1.

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.



Gambar 3.1. Bagan alur penelitian

3.3.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA tanaman dilakukan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi. Daun tanaman cabai yang dibutuhkan untuk setiap perlakuan adalah 10 helai daun yang nantinya akan di bulk. Daun tanaman cabai yang masih muda/segar diambil sebanyak 0,50 gram kemudian dimasukkan kedalam mortar, dan ditambahkan 500 μ l buffer ekstraksi, digerus sampai menjadi bubuk (Mullainathan *et al.*,2014). Hasil gerusan kemudian dimasukkan kedalam mikrotube 1.5 ml dan tambahkan 500 μ l buffer yang telah dipanaskan 65°C. Sampel tersebut kemudian di inkubasi dalam waterbath selama 45 menit pada suhu 65°C, yang dimana setiap 15 menit di goyang-goyang secara perlahan. Setelah itu di diinginkan pada suhu ruang, selanjutnya tambahkan 500 μ l larutan IAA (Kloroform: Isoamil Alkohol) dengan perbandingan 24:1 dan tambahkan PVP sebanyak 200 μ l. Kemudian disentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 3 menit, setelah selesai pindahkan supernatan ke dalam mikrotube baru ukuran 1 ml. Ulangi kembali tahapan pencucian dengan Kloroform: isoamil alkohol (24:1) serta kembali menambahkan PVP larutan sebanyak 200 μ l.



Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

Supernatan yang telah didapatkan pada permurnian kedua akan dimasukkan ke dalam mikrotube baru dan ditambahkan 500 μ l isopropanol dingin dan 200 μ l NaCl 5 M, kemudian disimpan di freezer pada suhu -25°C selama 30 menit. Kemudian fase cair dibuang, kemudian pellet DNA dicuci dengan 300 μ l Etanol 100% kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 11.000 rpm selama 3 menit. Ulangi tahapan ini dengan menggunakan etanol 70%. Selanjutnya pellet yang terbentuk dikeringkan dengan alat desikator selama 3 menit. Setelah kering DNA tersebut di larutkan dengan 50 μ l TE dan disimpan dalam freezer sampai DNA digunakan.

3.3.3 Uji Kualitas DNA

Kualitas DNA diujidengan melakukan elektroforesis sampel DNA menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 1% w/v. Gel agarose dibuat menggunakan 0,5 gram agarose ditambah 50 ml TAE 1 x. Campuran tersebut dipanaskan menggunakan hot plate selama 2 menit hingga larutan bening. Saat larutan agarose mulai bening kemudian ditambahkan 2,5 μ l etidium bromide sambil tetap distirer. Larutan agarose lalu dituangkan kedalam cetakan gel, kemudian biarkan sampai gel memadat. Sampel (4 μ l loading dye + 4 μ l DNA hasil isolasi) dimasukkan kedalam sumur yang ada di gel. Setelah itu dielektroforesis dengan tegangan 100 volt selama ± 30 menit.

3.3.4 Jenis Primer

Pada penelitian ini terdapat 14 jenis primer yang digunakan dalam proses PCR tanaman yang diduga toleran terhadap cekaman suhu tinggi seperti terlihat pada tabel 3.1. selanjutnya kegiatan amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR CFX 9600 (Bio-rad). *Pre-denaturation* pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti 39 siklus yang terdiri dari *denaturation* pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 37°C selama 1 menit, *extention* pada suhu 72°C selama 1 menit, dan *final extention* pada suhu 72°C selama 8 menit.

Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose sumur agar konsentrasi 1,2% (w/v), dan setiap contoh sampel (5 μ l) dimasukkan kedalam agarose. Elektroforesis dilakukan dengan voltase 80 V selama ± 50 menit. Letakkan gel agarose pada mesin gel doc (Bio-rad) untuk didokumentasikan.

Tabel 3.1. Jenis dan Sekuen Primer Yang Digunakan Pada Seleksi Primer Menurut Kamel *et al.* (2010) dan Lin *et al.* (2006).

PRIMER	SEQUENCE	PRIMER	SEQUENCE
S-13	5'- GTCGTTCTG- '3	P-06	5'-GTGGGCTGAC- '3
D-08	5'- GTGTGCCCCA- '3	X-01	5'CTCACCGTCC- '3
C-09	5' - CTCACCGTCC- '3	D-11	5'AGCGCCATTG- '3
A16	5'- AGCCAGCGAA- '3	D-06	5'ACCTGAACGG- '3
K-02	5'- GTCTCCGCAA- '3	K-14	5'CCCGCTACAC- '3
K-06	5'- CACCTTTCCC- '3	K-08	5'GAACACTGGG- '3
D-12	5'- CACCGTATCC- '3	P-08	5'ACATCGCCCA- '3

Sumber: Kamel *et al.* (2010) dan Lin *et al.* (2006)

3.4. Pengamatan dan Analisis Data

Berdasarkan hasil elektroforesis, maka akan didapatkan data berupa pita-pita diskrit DNA dengan ukuran tertentu dari masing-masing DNA sampel yang digunakan kemudian dilakukan analisis. Hasil dokumentasi gel pada mesin PCR dilakukan skoring pita. DNA, dimana pita DNA yang terlihat akan diberikan skor 1 dan pita DNA yang tidak terlihat akan diberikan skor 0 seperti terlihat pada tabel 3.2.

Pola pita DNA hasil elektroforesis yang telah mendapatkan skor ini kemudian dihitung menggunakan software POPGEN versi 1.31. Analisis data dilakukan dengan menggunakan metode Unweighted Pair-Grouping Method Arithmetic (UPGMA) dan menggunakan program Numerical Taxonomy and Multivariate System (NTSYS) versi 2.00.

Tabel 3.2. Skoring Pola Pita.

Lokus	Skoring pola pita			
	Sampel			
	1	2	3	4
1	—		—	—
2		—	—	
3	—			—

Tabel 3.3. Pemberian Nilai Pada Hasil Skoring.

Lokus	Pemberian nilai pada hasil skoring			
	Sampel			
	1	2	3	4
1	1	0	1	1
2	0	1	1	0
3	1	0	0	1

Hak Cipta Diindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.