Hak Cipta Dilindungi 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.

© Hak cipta milik UIN Suska Riau
State Islamic University of Sultan Syarif Kasim Riau
UIN SUSKA RIAU

III. MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai Februari 2017 di Laboratorium Genetik dan Pemuliaan Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau. Jalan H. R Soebrantas No.155 Km.15 Kelurahan Simpang Baru-Panam. Kecamatan Tampan, Kota Pekanbaru.

3.2 Alat dan Bahan

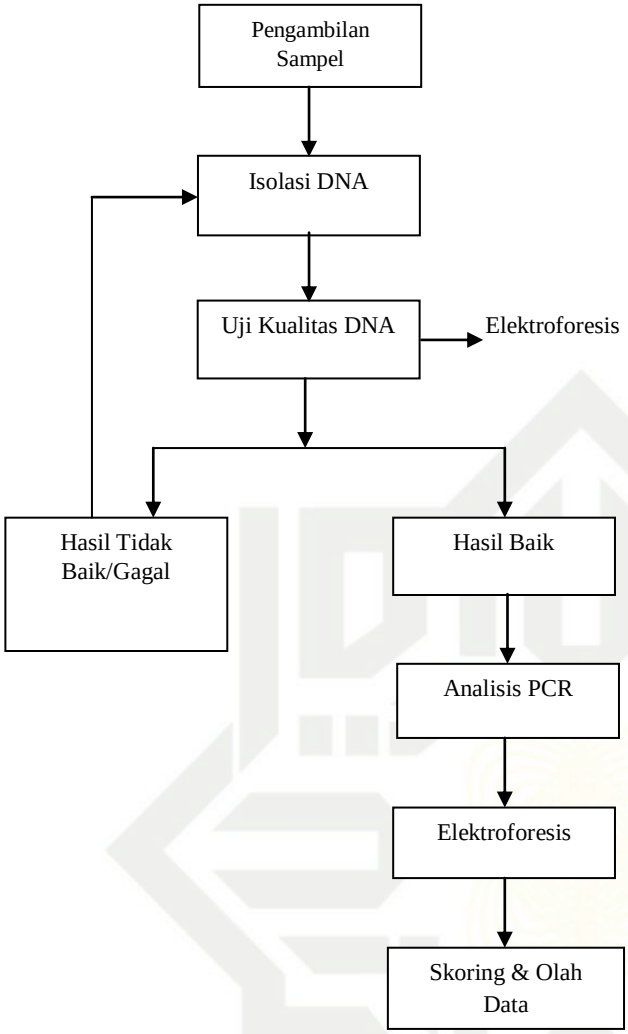
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesin *thermal cycler PCR CFX9600 (*Bio-rad). Gel doc (Bio-rad), *freezer*, *waterbath*, *sentrifuge*, mikropipet berbagai ukuran, pemanas elektrik, *mortal*, *pastle*, *mikrotube*, dan *camera digital*. Bahan yang digunakan yaitu daun pasak bumi muda/segar yang diambil dari beberapa zona di Taman Nasional Kerinci Seblat, Kabupaten Kerinci, Propinsi Jambi. Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi DNA adalah daun pasak bumi, CTAB, Buffer Tris-HCI, EDTA, NaCl, Markocapto Etanol, PVP, Etanol, Isopropanol dingin, Klorofom, dan Isoamylalkohol. Bahan untuk PCR adalah *Hot Star Taq Plus Master Kit Mix* (Qiagen), *Primer*, *Coral load*, air steril bebas *nucleas*. Bahan untuk elektroforesis adalah *agarose*, *Buffer TAE 1×*, *loading Dye*, dan DNA marker 100 bp.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Survei dan Pengambilan Sampel

Survei lapangan bertujuan untuk mengumpulkan dan memaparkan data informasi dari objek penelitian, dan menginterpretasikan dan menganalisisnya secara sistematis. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun muda pasak bumi yang segar diambil dari beberapa zona yaitu zona inti, zona rimba, zona rehabilitasi dan zona pemanfaatan di Taman Nasional Kerinci Seblat, Kabupaten Kerinci, Propinsi Jambi. Masing-masing zona diambil minimal 10 tanaman pasak bumi dengan jarak antara tanaman 50 m. Sampel kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik yang berisi sillica gel dan kemudian disimpan di *refrigerator* dengan suhu -20ºC sampai isolasi DNA dilakukan. Bagan penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1.

Hak Cipta Dilindungi 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.
© Hak cipta milik UIN Suska Riau
State Islamic University of Sultan Syarif Kasim Riau
UIN SUSKA RIAU



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian

3.3.2 Isolasi DNA Tanaman

Isolasi DNA tanaman dilakukan dengan menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) dengan modifikasi. Daun tanaman pasak bumi yang muda dan segar, potong kecil-kecil dan letakkan dalam mortal, tambahkan 500 µl *buffer* ekstraksi, kemudian digerus dalam mortal hingga menjadi bubur. Selanjutnya, hasil gerusan tersebut dipindahkan ke dalam tabung (*microtube)* baru dan ditambah 500 µl *buffer* yang telah dipanaskan pada suhu 65ºC, kemudian di inkubasi pada suhu 65ºC selama 45 menit dalam *waterbath* dan setiap 15 menit dikocok perlahan-lahan. Angkat dan dinginkan sesuai suhu ruangan. Tambahkan Kloroform : Isoamil alkohol (24:1) sebanyak 500 µl kedalam tabung. Sentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama sepuluh menit, pindahkan fase atas

Hak Cipta Dilindungi 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)* ke dalam *microtube*baru dan steril. Ulangi kembali tahapan pencucian dengan Kloroform : isoamil alkohol (24:1)

Supernatan yang telah didapatkan pada pemurnian kedua akan dimasukkan ke dalam mikrotube baru dan ditambahkan 500 µl isopropanol dingin dan 200 µl NaCl 5 M, kemudian disimpan di freezer pada suhu -25^{0}C selama 30 menit.Kemudian disentrifuse dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit dan setelah itu fase cair dibuang, kemudian pellet DNA dicuci dengan 300µl Etanol 100% kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit. Ulangi tahapan ini dengan menggunakan etanol 70%. Selanjutnya pellet yang terbentuk dikeringkan selama 60 menit. Setelah kering DNA tersebut di larutkan dengan 50µl TE dan disimpan dalam freezer sampai DNA digunakan.

3.3.3 Uji Kualitas DNA

Kualitas DNA perlu diuji yaitu dengan mengelektroforesis sampel DNA menggunakan gel agarose dengan konsentrasi 0,8% w/v. Gel agarose dibuat menggunakan 0,4 g agarose ditambah 50 ml TAE 1x. Campuran tersebut dipanaskan menggunakan *hot plate* selama 2 menit hingga larutan bening. Setelah larutan berwarna bening ditambahkan dengan larutan *Etidium brimide* 2,5 µl. Lalu dituangkan kedalam cetakan gel, kemudian biarkan sampai gel memadat. Sampel (6 µl DNA hasil isolasi) dimasukkan kedalam sumur yang ada di gel. Setelah itu dielektroforesis dengan tegangan 80 volt selama ± 30 menit. DNA kemudian diamati dengan UV transilluminator.

3.3.4 Seleksi PrimerdanAmplifikasi DNA Menggunakan PCR

Seleksi primer bertujuan untuk mendapatkan primer yang cocok untuk penelitian ini.DNA sampel dicampur (bulk), kemudian diamplifikasi dengan 20 jenis primer secara acak yaitu OPT-07, OPO-06, OPO 11, OPD -03, OPY-20, OPY-12, OPY-07, OPY-16, OPT-09, OPD-08, OPY-15, OPY-19, OPY-17, OPD-13, OPY-08, OPO-05, OPO-16, OPT-09, dan OPY-14.Dari 20 primer yang dipilih 5 primer yang menghasilkan pola pita polimorfik dan jelas untuk digunakan lebih lanjut dalam analisis RAPD. Seleksi primer dilakukan untuk mencari primer yang dapat mengamflipikasikan pita DNA yang jelas dan dalam jumlah yang banyak. Amplifikasi dilakukan pada kondisi: denaturasi awal pada suhu 95ºC selama 5

Hak Cipta Dilindungi 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.
© Hak cipta milik UIN Suska Riau
State Islamic University of Sultan Syarif Kasim Riau

menit diikuti 39 siklus yaitu, denaturasi pada suhu 94ºC selama 1 menit, annealing pada suhu 37ºC selama 1 menit, dan elongasi pada suhu 72ºC selama 1 menit, dilanjutkan dengan tahap elongsi akhir pada suhu 72ºC selama 8 menit dan pendingin pada suhu 8ºC selama 1 menit. Hasil amplifikasi divisualisasi menggunakan elektroforesis horizontal dengan agarose 1.2% w/v.

Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose konsentrasi 1% (w/v), dan setiap contoh sampel (6 µl) dimasukkan ke dalam sumur agarose dan salah satu lubang sumur dimasukkan DNA ladder yang berfungsi sebagai penanda (marker). Elektroforesis kembali menggunakan *buffer* TAE 1× dengan voltase 100 V selama 30 menit atau sampai *loading dye* berada sekitar 1 cm diatas bagian bawah gel. Kemudian setelah elektroporesis selesai dilakukan, gel agarose direndam kembali dalam larutan *ethidium bromide* sebanyak 5 µl/500 ml air selama 15 menit dan cuci dengan air bersih selama 20 menit. Letakkan gel agarose pada mesin gel doc (bio-rad) untuk didokumentasikan.

3.4 Analisis Data

Analisis data genetik dilakukan dengan scoring pola pita dengan ukuran yang dihasilkan. Profil DNA diterjemahkan ke dalam data biner untuk analisis statistik selanjutnya dengan ketentuan nilai 1 untuk adanya pita DNA dan 0 untuk tidak adanya pita DNA.Parameter yang akan dihitung meliputi tingkat jumlah alel yang diamati (Na), persentase lokus polimorfik (PPL), nilai Heterozigot Total (Ht), Jumlah alel yang efektif (Ne) dan jarak genetik (Ds).

a. Persen lokus polymorphic $PPL = \frac{\sum(PL)}{\sum(PL)+\sum(ML)} x100\%$

b. Jarak genetik berdasarkan Nei (1972) yaitu: $D_s = -\log_e [J_{xy}/(J_x J_y)^{0.5}]$, dimana, $J_{xy} = \sum X_i Y_i$, $J_x = \sum X_i^2$, $J_y = \sum y_i^2$ adalah jumlah frekuensi dari individu X dan Y.

c. Heterozigot pengamatan H' = $-\sum$pi log2 pi, $H_e = 1 - \sum pi^2$

d. Shannon diversitas index H' = $-\sum pi \log^2 pi$

Hak Cipta Dilindungi 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.

© Hak cipta milik UIN Suska Riau

Semua parameter tersebut dihitung dengan menggunakan softwere POPGEN versi 1.31 (*Yeh et al.*, 1999). Analisis kluster (pengelompokkan) dan pembuatan dendogram dilakukan dengan metode *Unweighted pair-group method arithmetic* (UPGMA) menggunakan softwere NTSYS *(Numerical Taxonomy and Multivariate System)*versi 2.00 (Rohlf., 1999).

Tabel 3.1 Skoring pola pita

Pola Pita DNA	Sampel																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	—		—	—		—		—			—	—		—			—	
2		—	—		—	—		—		—	—	—		—	—	—		—
3	—			—			—		—	—		—		—		—		

Tabel 3.2 Pemberian nilai pada hasil skoring

Pita DNA	Sampel																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
2	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
3	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0

State Islamic University of Sultan Syarif Kasim Riau
UIN SUSKA RIAU