

III. MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan April - Mei 2018. Analisis DNA dilakukan di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau Pekanbaru dan untuk PCR dilaksanakan di Laboratorium Genetika Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau.

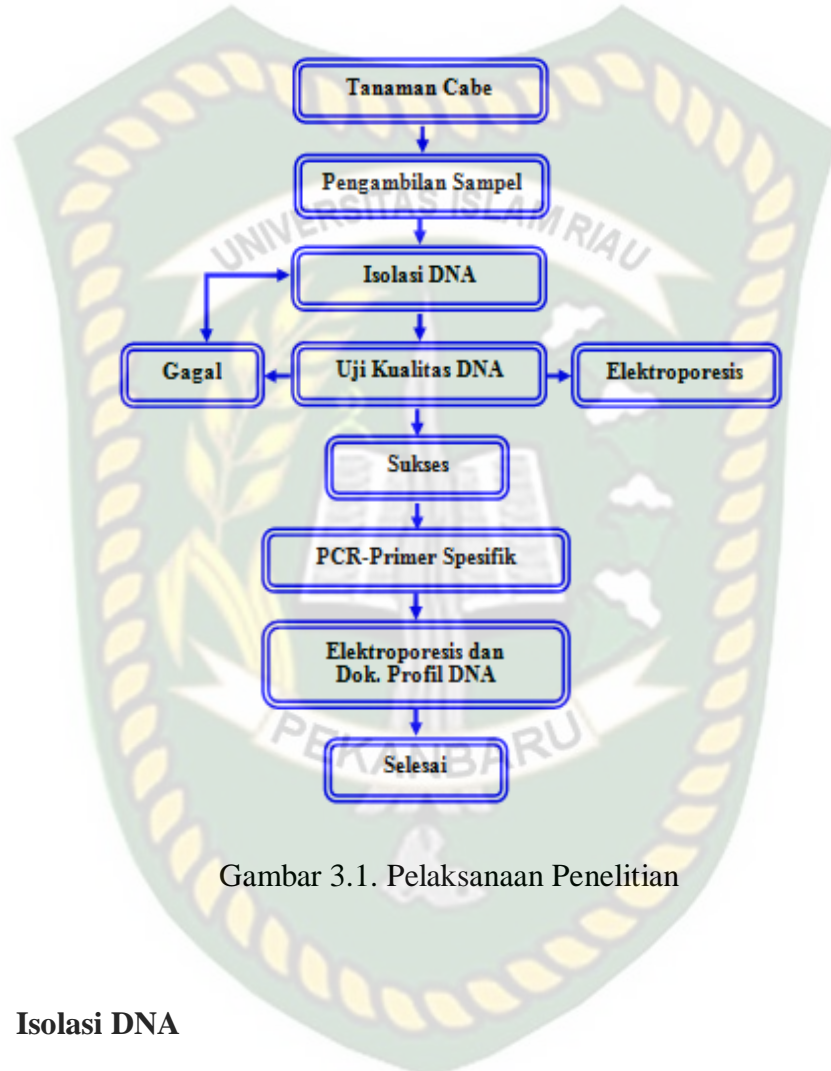
3.2 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 16 genotipe cabai yang berasal dari koleksi Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Fakultas Pertanian dan Peternakan Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau Pekanbaru. Bahan yang digunakan untuk PCR dan elektroporesis yaitu : agarose, TAE, *loading dye*, *etidium bromide*, *Hot Star Taq Plus Master Mix Kit (Qiagen)*, *Leader* dan 4 primer spesifik yang digunakan untuk mendeteksi tanaman yang cabai tahan terhadap kekeringan yaitu Primer Pair 2 (LOC107843194), DREB2A, P5CS dan TIL.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi mortar dan pastel, pipet, mikro berbagai ukuran, tabung mikro, *glove*, *waterbath*, sentrifus, timbangan analitik, *hot plat*, gelas piala, gelas ukur 100 ml, peralatan elektroporesis, *power supply*, mesin *PCR CFX 9600 (Bio-rad)*, serta *Gel Doc (Bio-rad)*.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian yang dilakukan di laboratorium Genetika dan pemuliaan UIN Suska Riau melalui beberapa tahapan yaitu dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Isolasi DNA

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap kegiatan yang harus dilakukan secara berurut diantaranya adalah :

1) Persiapan Sampel

Masing-masing sampel diambil dari bagian daun muda ada tanaman cabai yang sudah disemai selama dua minggu (2 minggu), sampel diambil dari daun muda dan sehat yang akan digunakan untuk isolasi DNA. Sampel di masukkan

kedalam tempat/mikrotube yang sudah disediakan dan berisi buffer. Masing-masing sampel diberi label pada mikrotube tersebut agar tidak tertukar. Sampel siap dibawa ke laboratorium untuk penelitian selanjutnya.

2) Ekstraksi DNA

Bahan yang digunakan adalah 16 sampel daun segar galur cabai (*Capsicum annum* L) yang sudah disimpan didalam larutan buffer, metode yang digunakan dalam ekstraksi DNA berdasarkan metode Doyle and Doyle (1990) yang telah dimodifikasi. Tahapan ekstraksi DNA diantaranya sebagai berikut :

Tahap 1 → daun cabai yang sudah di siapkan digerus dengan menambah 500 µl buffer ekstraksi yang telah dipanaskan di dalam *waterbath* sampai daun Cabai menjadi bubur. Kemudian dimasukkan kedalam tube, dan ditambah kembali 500 µl buffer ekstraksi.

Tahap 2 → setelah penggerusan, sampel di inkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 65⁰C selama 45-60 menit dimana setiap 15 menit dikocok perlahan-lahan, setelah itu didinginkan pada suhu kamar.

Tahap 3 → Setelah itu diberi 500 µl larutan kloroform IAA (*isoamil alcohol*) dengan perbandingan 24:1 dan dikocok. Campuran disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 11.000 rpm. Dan diambil fase atas. Tahap ini diulangi selama 3x.

Tahap 4 → selanjutnya ditambahkan dengan 200 µl NaCl 5 M, dan 500 µl isopropanol dingin kemudian disimpan dalam freezer 30 menit pada suhu -20⁰C, selanjutnya disentrifuge selama 3 menit dengan kecepatan 11.000 rpm. tahap ini akan terbentuk pellet DNA.

Tahap 5 → Kemudian fase cairan dibuang, pellet DNA dicuci dengan 300 µl etanol 100%, kemudian disentrifuge pada kecepatan 11.000 rpm selama 3 menit.

Tahap 6 → tahap kelima diulangi tetapi dengan menggunakan etanol 70%, dan disentrifuge pada kecepatan 11.000 selama 3 menit.

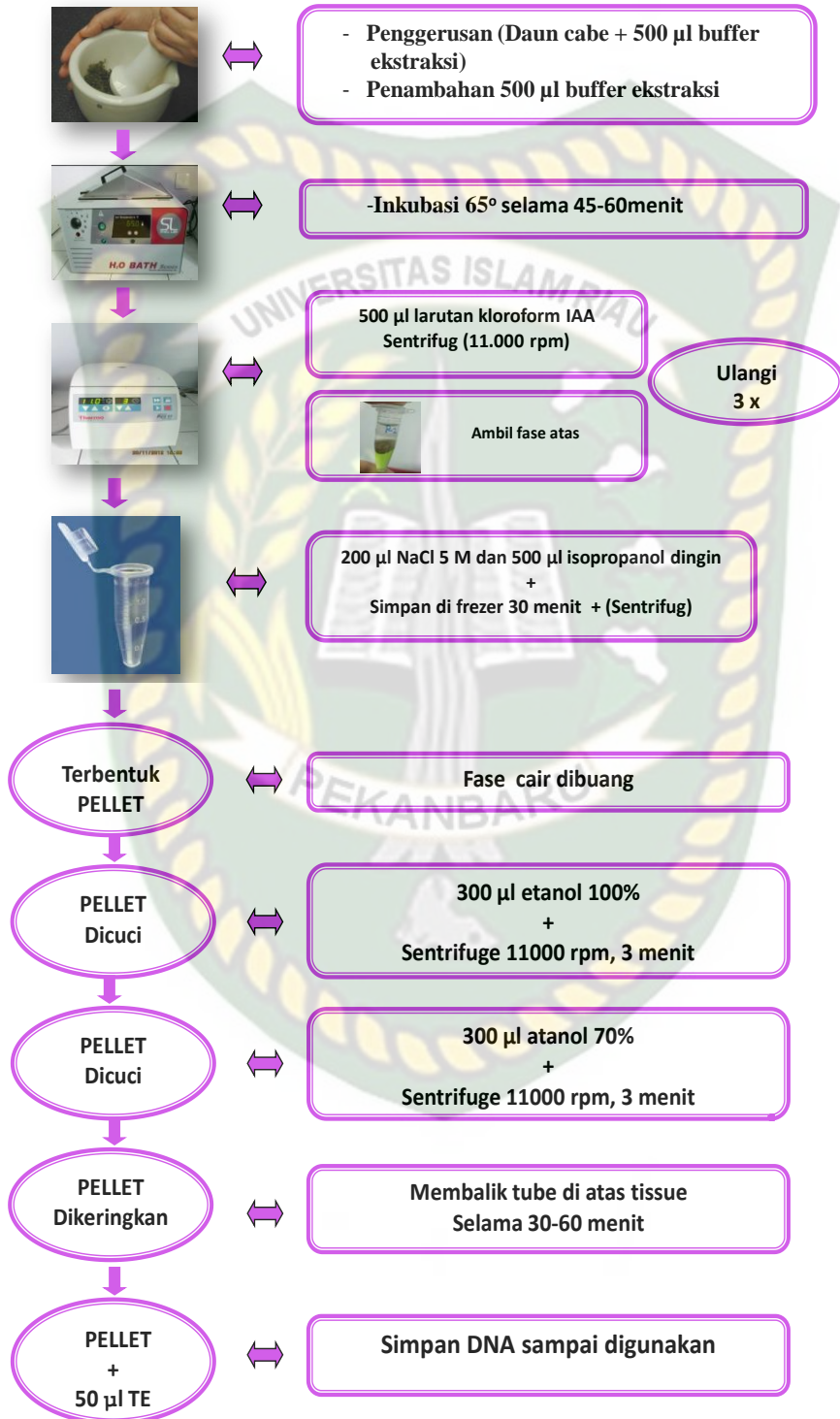
Tahap 7 → Selanjutnya pellet yang terbentuk dikeringkan dengan membalik tabung di atas tisu, dengan hati-hati selama 30-60 menit

Tahap 8 → Setelah cukup kering DNA dilarutkan dengan menggunakan 50 µl larutan TE. Selanjutnya disimpan di dalam *freezer* pada suhu -20°C sampai DNA digunakan. Bagan kegiatan isolasi DNA untuk dapat dilihat pada Gambar 3.2.

3) Uji Kualitas DNA

Uji kualitas DNA dilakukan dengan tujuan untuk melihat bagaimana kualitas DNA yang terbentuk, layak atau tidaknya DNA untuk digunakan pada tahap selanjutnya. Jika pita terbentuk dengan jelas dan tegas, maka DNA layak untuk digunakan untuk tahap selanjutnya.

Pengujian kualitas DNA diuji dengan melakukan elektroporesis pada gel agarose dengan konsentrasi 0,8 % (w/v). Pembuatan gel agarose 0,4 g agarose ditambah 50 ml TAE 1x. Campuran dipanaskan dengan menggunakan *microwave* selama 2 menit hingga larutan bening. Larutan di atas dituang ke dalam cetakan gel yang telah disiapkan (posisi sisir pembuatan sumur diletakkan dengan jarak 0,5-1 mm dari dasar cetakan. Gel dibiarkan memadat selama 1 jam.



Gambar 3.2. Bagan Isolasi DNA

Elektroporesis dilakukan dengan menggunakan buffer TAE 1x pada tegangan 100 volt selama \pm 30 menit (perjalanan dari arah kutub negatif ke arah kutub positif). Setelah elektroporesis, gel direndam dalam larutan *etidium bromide* (5 μ l/500 ml air) selama \pm 20 menit, lalu dibilas dengan menggunakan air kran selama \pm 15 menit. Setelah itu gel diletakkan diatas UV transmilator. Kemudian didokumentasi dengan menggunakan *Gel Doc* (Bio-rad).

3.3.2 Primer Spesifik

primer yang digunakan yaitu :

- Primer Pair 2 (LOC107843194) dan DREB2A

Primer ini dirancang dengan menggunakan gen heat stress transcription factor A-3 [*Capsicum annum*] dengan ID: LOC107843194 sebagai gen target dan XM_016687411, *Capsicum annum* cultivar Zunla-1 chromosome 9, Pepper Zunla 1 (NC_029985.1). Dua di antara daerah tersebut dipilih untuk dasar merancang sepasang primer. Perancangan ini dapat dilakukan dengan program computer *GeneRunner* ataupun secara semimanual dengan memperhatikan parameter-parameter yang umum, antara lain jumlah nukleotida 15-22 mers, kandungan GC 50% atau lebih. Tidak terdapat kemungkinan adanya saling komplemen antara basa di dalam satu rantai primer ataupun antara primer yang satu dengan lainnya.

- P5CS dan TIL

Primer ini merupakan primer yang digunakan pada penelitian terdahulu yang digunakan tanaman yang berkerabat solanum. Sehingga memungkinkan dapat digunakan sebagai penanda.

3.3.3 PCR

Volume reaksi PCR adalah 15 µl yang terdiri dari 7,5 µl *Hot Star Taq Plus Master Mix (Qiagen)*, 1,8 µl primer (5 µl), 1,5 µl coral load 10x, 2 µl DNA template, dan 2,2 µl H₂O bebas T-Nase. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan *PCR CFX 9600 Bio-rad* pengaturan program mesin PCR adalah sebagai berikut: : pre-denaturasi 95°C selama 5 menit, diikuti 30 siklus yang terdiri dari denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* 36°C selama 1 menit, *extention* 72°C selama 1 menit dan *final extention* 72°C selama 8 menit.

Hasil PCR (5 µl) kemudian dielektroporesis lagi. Pembuatan gel sama pada saat uji kualitas DNA, hanya saja konsentrasi yang berbeda. Pada saat PCR, menggunakan gel dengan konsentrasi 1% (w/v) dan buffer TAE 1x sebanyak 50 ml. Setelah itu lakukan elektroporesis selama 30 menit pada tegangan 100 volt sampai penanda *loading dye* berada sekitar 1 cm atas batas gel bagian bawah. Kemudian gel direndam dalam larutan *etidium bromide* (5 µl/500 ml air) selama 20 menit, kemudian direndam menggunakan air kran selama ± 15 menit. Setelah itu gel diletakkan di atas UV transmulator, didokumentasi menggunakan *Gel Doc* (Bio-Rad).

3.4 Konfirmasi Hasil yang diperoleh

Hasil PCR yang dapat dilihat dengan hasil elektroporesis, kemudian kemunculan pita dikonfirmasi dengan hasil dilapangan yang diteliti oleh mahasiswa S1 Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau yaitu penelitian Mainamnah (2017) dan Liani (2017).