

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Jenis penelitian**

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian dasar dengan metode penelitian deskriptif.

#### **3.2 Objek Penelitian**

Tujuh puluh tiga kultivar mangga (*Mangifera indica*) yang digunakan dalam penelitian ini dikoleksi dari kebun Cukurgondang Balai Penelitian Tanaman dan Buah di Pasuruan, Jawa Timur. Sampel mangga yang digunakan adalah hasil persilangan mangga AR 143 dengan varietas mangga merah dan induknya.

#### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

##### **3.3.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Genetika Molekuler Sekolah Ilmu Teknolodi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

##### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Prapenelitian dilakukan selama dua bulan, dimulai dari bulan Juli 2009 sampai bulan September 2009. Selanjutnya penelitian dilakukan selama empat bulan, dimulai dari bulan Oktober 2009 sampai bulan Januari 2010.

### 3.4 Alat dan Bahan

#### 3.4.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1 Alat yang digunakan dalam penelitian ini**

No.	Alat
1.	Autoklaf
2.	Lumpang Alu
3.	Timbangan digital
4.	Alat Sonikasi
5.	Vorteks
6.	<i>Thermocycler</i>
7.	Mikrosentrifuga
8.	<i>UV-transilluminator</i>
9.	Spektrofotometer
10.	<i>Horizontal</i> elektroforesis
11.	Oven
12.	<i>Waterbath</i>
13.	<i>Waterpass</i>
14.	Mikropipet + Tips
15.	Botol Duran 50, 100, 250, 500 dan 1000 mL
16.	Tabung Mikrosentrifuga 1,5 mL
17.	Lemari Es

#### 3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.2.

**Tabel 3.2 Bahan yang digunakan dalam penelitian ini**

No	Bahan
1.	Daun mangga ( <i>Mangifera indica</i> )
2.	Nitrogen cair

Lanjutan Tabel 3.2

No.	Bahan
3.	<i>Buffer</i> ekstraksi (CTAB, Tris HCl, NaCl, EDTA, $\beta$ -Mercapthanol)
4.	TE <i>buffer</i>
5.	“Ethanol absolute”
6.	Polyvinilpyrrolidone (PVP)
7.	CIAA (kloroform isoamil alkohol)
8.	5X Colorless Buffer
9.	MgCl <sub>2</sub>
10.	dNTPs mix 10mM
11.	Primer <i>forward-reverse</i> mikrosatelit
12.	<i>Taq</i> polimerasi
13.	6-FAM flourecent 200 nmole
14.	DNA <i>template</i>
15.	1 kb DNA <i>ladder</i>
16.	Loading dye
17.	Alkohol 70%
18.	Asam asetat glacial
19.	Gel agarosa
10	Es batu
11.	TAE 1X
12.	Ethidium Bromide (EtBr)
13.	<i>Deion water</i>

### 3.5 Cara Kerja

#### 3.5.1 Persiapan alat dan bahan

Sebelum melakukan penelitian, alat dan bahan yang diperlukan dipersiapkan di Laboratorium Genetika Sekolah Ilmu Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Alat seperti tabung mikrosentrifuga 1,5 mL, tabung PCR, tips, botol Duran, dan beberapa bahan yang harus disterilkan terlebih dahulu sebelum digunakan. Bahan-bahan untuk untuk isolasi DNA disiapkan dan disimpan dalam suhu ruangan, di dalam lemari es (4°C), di

dalam *freezer* ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) dan ( $-80^{\circ}\text{C}$ ), sedangkan semua bahan untuk PCR disimpan dalam *freezer* ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Sampel induk mangga dalam penelitian ini merupakan jenis varietas mangga Arumanis dan mangga merah (Tabel 3.3) yang disilangkan dan menghasilkan 63 turunan F1 (Tabel 3.4).

**Tabel 3.3 Sampel induk mangga yang digunakan dalam penelitian**

No.	Nama individu	Jenis varietas
1	AR 143	Mangga Arumanis
2	Apel	Mangga Merah
3	Delima	Mangga Merah
4	Gedong Gincu	Mangga Merah
5	Haden	Mangga Merah
6	Irwin	Mangga Merah
7	Keith	Mangga Merah
8	Krisapati Maldah	Mangga Merah
9	Liar	Mangga Merah
10	Saigon	Mangga Merah

**Tabel 3.4 Sampel mangga turunan F1 yang digunakan dalam penelitian**

No.	Nama Individu	Induk
1.	F1-1	Haden x AR 143
2.	F1-2	Haden x AR 143
3.	F1-3	Apel x AR 143
4.	F1-7	AR 143 x Apel
5.	F1-8	Irwin x AR 143
6.	F1-9	Irwin x AR 143
7.	F1-10	Irwin x AR 143
8.	F1-11	Haden x AR 143
9.	F1-13	Apel x AR 143
10.	F1-14	Irwin x AR 143
11.	F1-15	AR 143 x Haden
12.	F1-16	AR 143 x Kirsapati Maldah
13.	F1-18	AR 143 x Gedong Gincu
14.	F1-19	Manalagi x Haden

Lanjutan Tabel 3.4

No.	Nama Individu	Induk
15.	F1-21	AR 143 x Haden
16.	F1-22	AR 143 x Irwin
17.	F1-23	Apel x Manalagi
18.	F1-25	AR 143 x Delima
19.	F1-26	AR 143 x Haden
20.	F1-27	AR 143 x Haden
21.	F1-28	AR 143 x Kirsapati Maldah
22.	F1-29	Irwin x AR 143
23.	F1-30	Haden x AR 143
24.	F1-31	Irwin x AR 143
25.	F1-33	AR 143 x Gedong Gincu
26.	F1-35	AR 143 x Irwin
27.	F1-36	Irwin x AR 143
28.	F1-37	Apel x AR 143
29.	F1-38	Apel x AR 143
30.	F1-39	Apel x AR 143
31.	F1-41	Apel x AR 143
32.	F1-42	Haden x AR 143
33.	F1-43	Irwin x AR 143
34.	F1-44	AR 143 x Liar
35.	F1-45	AR 143 x Saigon
36.	F1-46	AR 143 x Haden
37.	F1-47	AR 143 x Liar
38.	F1-48	Keith x AR 143
39.	F1-49	AR 143 x Saigon
40.	F1-50	AR 143 x Liar
41.	F1-51	AR 143 x Delima
42.	F1-52	AR 143 x Keith
43.	F1-53	AR 143 x Saigon
44.	F1-54	AR 143 x Keith
45.	F1-55	Apel x AR 143
46.	F1-59	AR 143 x Gedong Gincu
47.	F1-61	AR 143 x Gedong Gincu
48.	F1-62	AR 143 x Gedong Gincu
49.	F1-65	AR 143 x Gedong Gincu

Lanjutan Tabel 3.4

No.	Nama Individu	Induk
50.	F1-66	AR 143 x Gedong Gincu
51.	F1-67	AR 143 x Gedong Gincu
52.	F1-68	AR 143 x Keith
53.	F1-69	AR 143 x Irwin
54.	F1-72	AR 143 x Kartikia
55.	F1-73	AR 143 x Gedong Gincu
56.	F1-77	AR 143 x Podang
57.	F1-82	AR 143 x Gedong Gincu
58.	F1-83	AR 143 x Gedong Gincu
59.	F1-85	AR 143 x Gedong Gincu
60.	F1-86	AR 143 x Haden
61.	F1-87	AR 143 x Gedong Gincu
62.	F1-88	AR 143 x Haden
63.	F1-94	AR 143 x Haden

### 3.5.2 Pra penelitian

Pada tahap pra penelitian, dilakukan pengambilan sampel, optimasi isolasi DNA dan perancangan primer. Sampel diambil dari kebun Cukurgondang di Jawa Timur. Sampel daun mangga dikirimkan dalam bentuk berat kering dan ditambahkan *silica gel* agar sampel tidak rusak. Selanjutnya dilakukan optimasi Isolasi DNA untuk mencari metode yang tepat. Masing-masing 73 sampel DNA mangga diamplifikasi dengan menggunakan primer yang didesain menggunakan program primer 3 dan *DNA calculator*. Primer ini didesain dengan mengoleksi 139 motif mikrosatelit yang dikoleksi dari GeneBank, kemudian diolah dengan *software* Primer3 dan dihitung kecocokannya dengan menggunakan *software DNA calculator* sehingga didapatkan empat pasangan primer (Tabel 3.5).

Selanjutnya pada tahap pra penelitian juga dilakukan percobaan isolasi DNA mangga untuk mencari metode yang tepat untuk mengisolasi DNA mangga.



**Tabel 3.5 Primer yang digunakan dalam proses amplifikasi DNA mangga.**

No	Nama Primer	No. Akses Gene Bank	Motif Mikrosatelit	Jenis primer	Urutan Basa Primer (5' → 3')	P.Basa	Tm(°C)	%GC	Product Size	Tipe Mikrosatelit
1.	MiM 1.1	EU421196	(GA)5(A)7	Forward	5'tgtaaacgacggccagtCCGATTAGCAAACCACTTC3'	37bp	55.8	47.4 %	250 bp	Campuran
				Reverse	5'GGATTAGCTAGCCTCGAGTT3'	20 bp	55.5	50.0 %		
2.	MiM 4.2	EU421198	(CT)11(T)12	Forward	5'tgtaaacgacggccagtGAGCTTAGGCATGTTTTACC3'	38 bp	54.2	45.0 %	221 bp	Campuran
				Reverse	5'TTACTCACTGTCAACGCAAG3'	20 bp	55.0	45.0 %		
3.	MiM 2.4	EU421186	(A)9	Forward	5'tgtaaacgacggccagtTTCTGTATTCTTCCGTCACC3'	38 bp	55.2	45.0 %	112 bp	Mono
				Reverse	5'CTTGCTGCTCTTACTTGTT3'	20 bp	55.0	45.0 %		
4.	MiM 4.4	AY942819	(AAC)8	Forward	5'tgtaaacgacggccagtACTTTTCTTCCACTGCTCCT3'	38 bp	55.7	45.0 %	183 bp	Tri
				Reverse	5'CAAGTACCTGCTGCAACTAGA3'	21 bp	55.9	47.6 %		

Keterangan: warna merah menunjukkan urutan basa primer *forward* yang akan berikatan dengan primer universal (FAM)



### 3.5.3 Isolasi DNA

DNA mangga diisolasi dengan menggunakan Metode Doyle & Doyle, 1990 (Annisa, 2005). Proses pertama tahap isolasi DNA mangga yaitu menggerus 0,5 gr sampel daun (berat kering) hingga halus menggunakan lumpang alu. Nitrogen cair ditambahkan untuk mempermudah penggerusan sampel daun mangga. Hasil gerusan tersebut dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga ukuran 1,5 ml. Setelah itu secara berturut-turut ditambahkan 800  $\mu$ l buffer CTAB 2% (60°C) dan 5 mg PVP, kemudian diinkubasi pada suhu 60°C selama 25 menit, lalu diamkan pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan Chloroform:Isoamilalkohol (24:1) dengan volume sama dengan volume campuran sebelumnya, lalu dihomogenkan. Kemudian campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 8300 rpm selama 15 menit hingga didapat supernatannya. Supernatant dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifuga baru dan ditambahkan 0,5 M NaCl dengan volume sama dengan campuran sebelumnya, lalu dihomogenkan. Selanjutnya ditambahkan ETOH absolut dua kali volume campuran sebelumnya, lalu dihomogenkan. Kemudian campuran diinkubasi pada suhu -80 °C selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 3 menit dan 6000 rpm selama 3 menit sehingga didapat pelet di dasar tabung. Pelet selanjutnya dicuci dengan ETOH 70 % (50 mL), lalu ethanol dibuang dengan hati hati dan dikeringkan. Selanjutnya ditambah TE sebanyak 50 mL dan disimpan dalam *freezer* (-20°C).

### 3.5.4 Karakterisasi DNA hasil isolasi

Setelah dilakukan isolasi terhadap DNA mangga, selanjutnya dilakukan karakterisasi secara kualitatif hasil isolasi DNA mangga tersebut dengan cara elektroforesis. Sampel DNA dicampurkan dengan *loading dye* dengan perbandingan 5:1 (v/v). Campuran tersebut dimasukkan dengan hati-hati ke dalam sumur-sumur yang ada pada gel agarosa. Selain itu, dimasukkan pula *marker* 1kb DNA *Ladder* sebanyak 5  $\mu$ L. Sampel DNA dielektroforesis pada gel agarosa 0,8% dalam buffer TAE 1x (Buffer TAE 50x diencerkan dengan aquades dengan perbandingan 1:49 v/v) selama 30 menit pada tegangan 100 volt. Setelah selesai elektroforesis, pewarnaan DNA dilakukan dengan cara merendam gel agarosa pada larutan ethidium bromida (10  $\mu$ g/ml) selama dua menit kemudian dibilas dengan aquades selama enam menit. Selanjutnya gel diamati pada “UV-Transiluminator” dan didokumentasikan menggunakan kamera digital.

### 3.5.5 Mengukur Konsentrasi DNA

Sebelum digunakan sebagai *template* untuk proses amplifikasi, sampel DNA yang telah diisolasi selanjutnya diukur konsentrasi DNA-nya menggunakan alat spektrofotometer sehingga dapat diketahui konsentrasi DNA yang terkandung dalam masing-masing sampel. Selanjutnya semua sampel diencerkan dengan TE hingga konsentrasi DNA-nya 100 ng/ $\mu$ L. sedangkan sampel yang konsentrasi DNA-nya kurang dari 100ng/ $\mu$ L tidak perlu diencerkan.

### 3.5.6 Amplifikasi DNA menggunakan Penanda Mikrosatelit

Amplifikasi sampel DNA mangga pada penelitian ini dilakukan dengan metode *Touch-Down PCR* berdasarkan Rahman *et al.* (2000). Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer mikrosatelit yang telah didesain. DNA selanjutnya diamplifikasi melalui proses PCR dengan komposisi reaksi berdasarkan penelitian sebelumnya (Annisa, 2005). Komposisi reaksi amplifikasi dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.6.

**Tabel 3.6 Komposisi Reaksi Amplifikasi**

No.	Bahan	Konsentrasi awal	Konsentrasi akhir	Volume reaksi( $\mu$ l)
1.	5x Colorless buffer	-	1X	4
2.	MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2mM	2
3.	dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,4
4.	Primer <i>Forward</i>	10 mM	0,5 mM	0,4
5.	Primer <i>Reverse</i>	10 mM	1 mM	2
6.	FAM	10 mM	1 mM	2
7.	Go Taq Polimerase	5 u/ $\mu$ l	1,25 unit	0,2
8.	DNA template	-	50 ng	1,0
9.	Air Deion steril	-	-	8
10.	<b>Total volume</b>			<b>20</b>

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan 4 primer yang telah didesain pada saat pra penelitian. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan alat *thermocycler* yang diprogram untuk melaksanakan beberapa kondisi. Proses amplifikasi ini diawali dengan tahap denaturasi awal selama tiga menit pada suhu 94°C diikuti dengan dua siklus denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, tahap penempelan primer pada DNA templat (*annealing*) 56-47°C (sesuai *temperature annealing* primer) selama 30 detik,

dan tahap pembentukan kopi DNA templat yang diawali dari daerah primer (*extension*) pada suhu 72 °C selama 30 detik; kemudian diikuti 18 siklus masing-masing 15 detik pada suhu 94°C selama 30 detik, 56-47 °C (sesuai Ta primer) selama 15 detik dengan penurunan suhu 0,5 °C tiap siklusnya dan 72 °C selama 15 detik; selanjutnya diikuti 27 siklus pada suhu 94°C selama 30 detik, 53 °C selama 45 detik dan 72 °C selama 45 detik; diikuti dengan tahap ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit. DNA yang telah diperbanyak melalui proses Amplifikasi selanjutnya dielektroforesis pada gel agarosa 2%.

### **3.5.7 Elektroforesis DNA hasil PCR**

DNA yang telah diperbanyak melalui proses amplifikasi (PCR) selanjutnya dielektroforesis untuk melihat kehadiran larik DNA yang telah teramplifikasi. Elektroforesis ini dilakukan pada gel agarosa 2% dalam 0,5x buffer TAE. Sebelum dimasukkan ke dalam sumur gel, DNA sampel dicampurkan dengan “loading dye” dengan perbandingan 5:1 (v/v). DNA marker yang digunakan adalah 1 kb DNA *ladder*. Campuran tersebut dielektroforesis selama 1 jam pada tegangan 120 volt.

Pewarnaan gel agarosa dilakukan dengan merendam gel dalam larutan ethidium bromide selama 15 menit. Kemudian gel agarosa dicuci dengan akuadest selama 1 menit. Selanjutnya gel dikeringkan dengan posisi vertikal lalu diamati dengan alat UV transilluminator hingga terlihat pita DNA yang berukuran 100-250 pb (lebih rendah dibandingkan basa terendah pada *Ladder* 1 kb DNA), lalu didokumentasikan.

### 3.5.8 Sekuensing

Hasil amplifikasi 73 sampel mangga menggunakan 4 primer dimasukkan ke dalam plat khusus sekuensing yang masing-masing plat memiliki 96 *well*. Dalam satu *well* dimasukkan masing-masing 20  $\mu$ l sampel yang telah diamplifikasi. Plat ditutup dengan menggunakan *cap tube* dan *sill* khusus sekuensing sehingga setiap *well* tertutup dengan baik. Selanjutnya plat dikemas dalam *black box* dan dikirimkan ke Macrogen Korea untuk disekuensing.

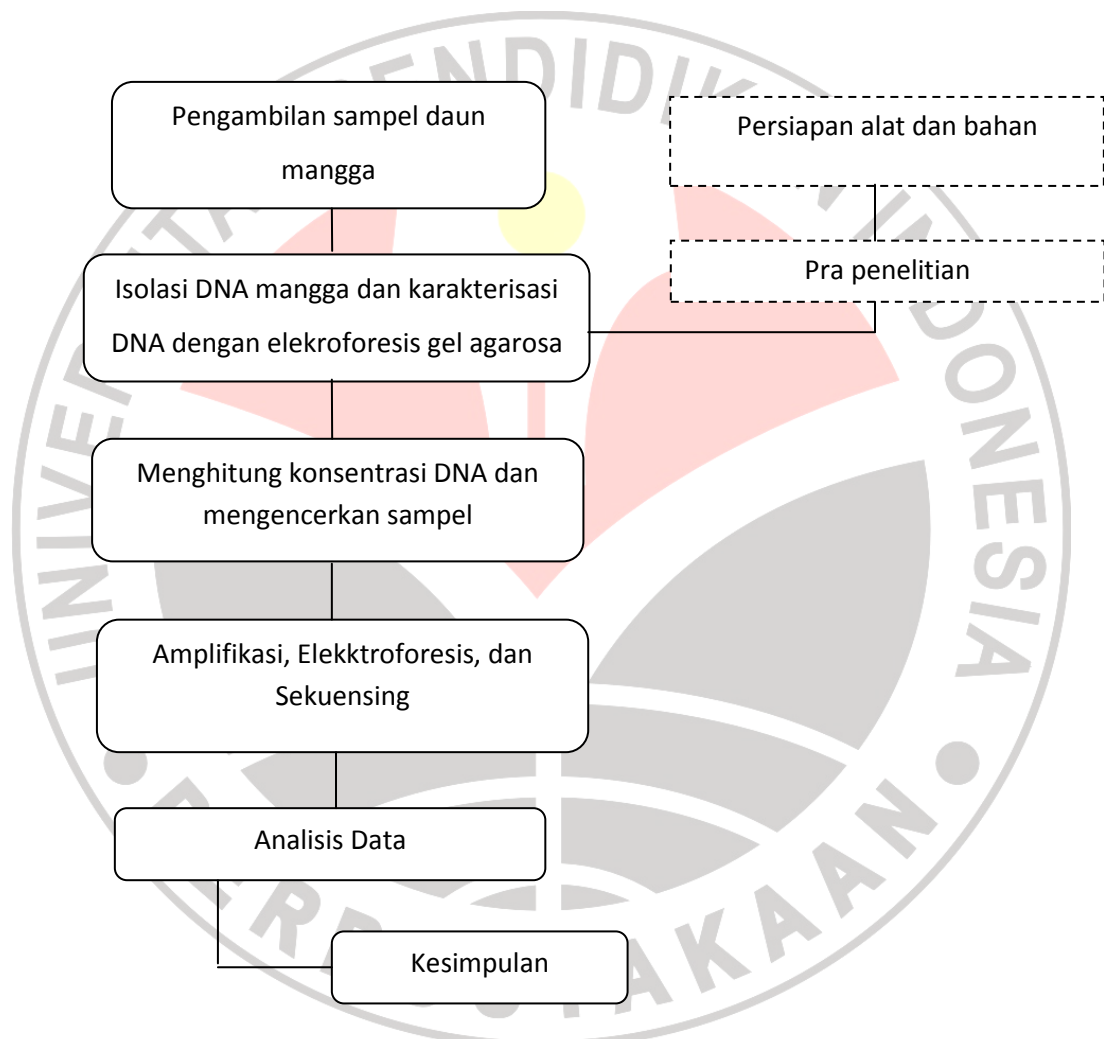
Visualisasi hasil amplifikasi DNA mangga dilakukan dengan mengirimkan hasil amplifikasi dengan primer yang diberi ekor penanda fluoresens 6-FAM ke Macrogen – Korea untuk disekuensing dengan ABI Prisma *automatic DNA sekuenser*.

### 3.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan hasil sekuensing. Hasil sekuensing yang diolah dengan program *Genemarker* akan menunjukkan puncak pendaran alel-alel mikrosatelit. Selanjutnya data diinterpretasikan dalam bentuk data matriks biner. Angka satu (1) untuk kehadiran puncak mikrosatelit dan angka nol (0) untuk ketidakhadiran puncak mikrosatelit. Pemilihan puncak alel mikrosatelit dilakukan dengan memilih dua alel yang memiliki *score* dan *height* tertinggi. Analisis yang kemudian dilakukan adalah perhitungan total alel yang diperoleh per lokus dan menentukan nilai PIC dengan rumus (Botstein, 1980):  $PIC = 1 - \sum p_i^2 - (\sum p_i^2)^2 + \sum p_i^2$ , dimana  $P_i$  = frekuensi dari alel-alel ke-i. Selain itu juga diperoleh nilai *Expected Heterozygosity* ( $H_e$ ) dan *Observed Heterozygosity* ( $H_o$ )

berdasarkan perhitungan dilakukan dengan menggunakan bantuan program GeneMarker dan Cervus 3.03. Selanjutnya dilakukan analisis *Principial Coordinate Analysis* (PCO) berdasarkan jarak genetik untuk melihat kekerabatan 73 sampel mangga dari empat primer tersebut dengan menggunakan program GeneAlex 6.3.

### 3.6 Alur Penelitian



**Gambar 3.1 Alur Penelitian**