

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian dengan menggunakan metode deskriptif, yaitu untuk menganalisis hubungan kekerabatan antar species pisang (*Musa spp.*) dengan cara merekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan sikuens DNA pada daerah ITS.

B. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 27 tanaman pisang dari 21 kultivar yang terbagi kedalam tiga species, yaitu *Musa acuminata*, *Musa balbisiana*, dan *Musa x paradisiaca*. Dua species dari genus yang berbeda yaitu *Ensete* digunakan sebagai *outgroup*. Sikuens DNA daerah ITS dari species *Ensete* diperoleh dari *GeneBank* NCBI dan dapat diakses di www.ncbi.nlm.nih.gov. Kultivar pisang yang digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

C. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada Bulan Februari sampai dengan Bulan April 2018. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Rekayasa Genetika Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung. Sikuensing produk hasil amplifikasi DNA daerah ITS dari seluruh sampel kultivar pisang dilakukan di Macrogen Inc., Seoul, Korea Selatan.

D. Alat dan Bahan

Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian terdapat di Laboratorium Rekayasa Genetika Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (Lampiran 1).

Tabel 3.1
Sampel Kultivar Pisang yang Digunakan dalam Penelitian

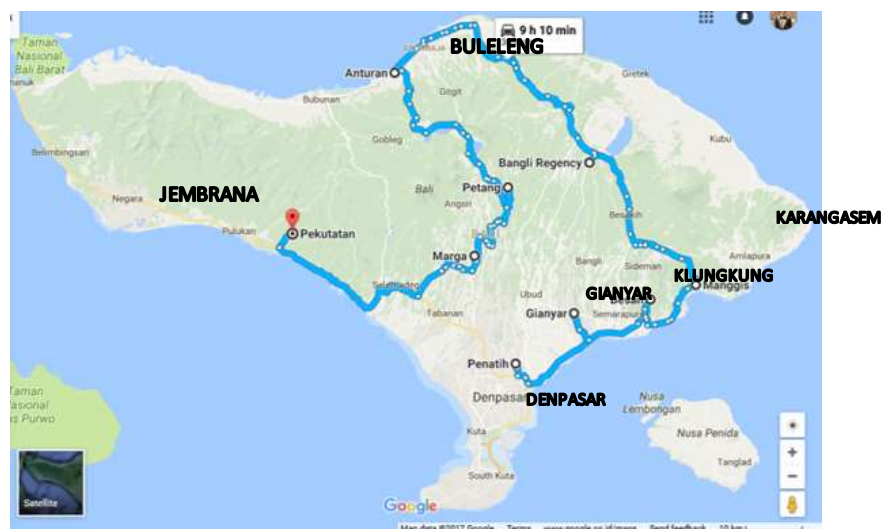
No.	Nama Kultivar	Species	Daerah	Genom	Keterangan
1	Hias	<i>Musa acuminata</i>	Gianyar	AAA	Ingroup
2	Sabe Macan	<i>Musa x paradisiaca</i>	Klungkung	AAB	Ingroup
3	Mas Bali	<i>Musa acuminata</i>	Gianyar	AA	Ingroup
4	Biu Sangket	<i>Musa acuminata</i>	Klungkung	AA	Ingroup
5	Biu Keladi	<i>Musa acuminata</i>	Klungkung	AA	Ingroup
6	Tulang	<i>Musa acuminata</i>	Gianyar	AAA	Ingroup
7	Tanduk	<i>Musa x paradisiaca</i>	Gianyar	AAB	Ingroup
8	Kepok Tanjung	<i>Musa x paradisiaca</i>	Klungkung	ABB	Ingroup
9	Rojo Molo	<i>Musa x paradisiaca</i>	Klungkung	AAB	Ingroup
10	Raja Buluh	<i>Musa acuminata</i>	Gianyar	AAA	Ingroup
11	Klopok/Sobo	<i>Musa x paradisiaca</i>	Klungkung	ABB	Ingroup
12	Biu Buah	<i>Musa acuminata</i>	Karangasem	AA	Ingroup
13	Ketip Kerta	<i>Musa acuminata</i>	Gianyar	AAA	Ingroup
14	Biu Poh	<i>Musa x paradisiaca</i>	Gianyar	ABB	Ingroup
15	Lumut	<i>Musa x paradisiaca</i>	Gianyar	AAB	Ingroup
16	Mas Marlin	<i>Musa acuminata</i>	Gianyar	AA	Ingroup
17	Awak	<i>Musa x paradisiaca</i>	Gianyar	ABB	Ingroup
18	Klutuk	<i>Musa balbisiana</i>	Denpasar	BB	Ingroup
19	Biu Kaiki	<i>Musa acuminata</i>	Karangasem	AA	Ingroup
20	Bunga	<i>Musa acuminata</i>	Karangasem	AA	Ingroup
21	Kole/Sebrina	<i>Musa acuminata</i>	Gianyar	AA	Ingroup
22	Ketip48	<i>Musa acuminata</i>	Gianyar	AAA	Ingroup
23	Arjuna50	<i>Musa acuminata</i>	Buleleng	AA	Ingroup
24	Bile52	<i>Musa x paradisiaca</i>	Buleleng	AB	Ingroup
25	Terigu53	<i>Musa acuminata</i>	Jembrana	AAA	Ingroup
26	Tanduk54	<i>Musa x paradisiaca</i>	Jembrana	AAB	Ingroup
27	Ketip Sari55	<i>Musa acuminata</i>	Jembrana	AAA	Ingroup
28	-	<i>Ensete glaucum</i>	-	-	Outgroup
29	-	<i>Ensete ventricosum</i>	-	-	Outgroup

E. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan Sampel

Sampel tanaman pisang didapatkan dari beberapa daerah di Bali, diantaranya Gianyar, Klungkung, Karangasem, Denpasar, Buleleng, Tabanan, Bangli, dan Jembrana (Gambar 3.1). Sampel yang diambil yaitu daun muda dari tanaman pisang. Daun-daun tersebut disimpan dalam kantung plastik yang masing-masing

sudah diberi label nama specimen dan disimpan didalam box berisi es untuk menjaga kesegaran sampel. Di laboratorium, sampel tanaman disimpan pada suhu -20°C sampai proses ekstraksi DNA. Penyimpanan pada suhu dibawah 0°C dimaksudkan agar sampel DNA tidak rusak dan dapat terjaga.



Gambar 3.1. Peta Lokasi Pengambilan Sampel

2. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode CTAB dengan beberapa modifikasi. Komponen *fresh buffer sample* seperti CTAB 100 μl , Tris-Cl 100 μl , NaCl 280 μl , EDTA 40 μl , dan Deion 475 μl dimasukkan kedalam mikrotube dan diinkubasi pada suhu 60°C . Sebanyak 40 mg daun muda dihaluskan dengan sedikit demi sedikit ditambahkan nitrogen cair hingga membentuk serbuk. Serbuk daun muda dimasukkan kedalam tabung yang telah berisi β -merkuptoetanol sebanyak 5.4 μl kemudian ditambahkan *fresh buffer sample*, kemudian sampel dihomogenkan menggunakan vortex selama satu menit lalu diinkubasi pada suhu 60°C selama lima menit. Proses vortex dan inkubasi dilakukan dengan tiga kali pengulangan.

Setelah proses inkubasi, sampel ditambah kloroform dan isoamil alkohol dengan perbandingan 1:1 sampai penuh. Larutan tersebut kemudian dihomogenkan dengan cara divortex selama sepuluh menit. Sampel disentrifugasi dalam suhu 4°C pada kecepatan 12.000 rpm selama dua puluh menit. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi dipindahkan kedalam tabung mikro baru kemudian ditambahkan isopropanol sebanding dengan volume sampel.

Ubaydillah Zedd Munshy, 2018

HUBUNGAN FILOGENETIK MOLEKULER KULTIVAR PISANG (*Musa spp.*) DI BALI BERDASARKAN SEKUEN DNA DAERAH ITS 1

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4⁰C dengan kecepatan 12.000 rpm. Proses pemindahan supernatan, penambahan isopropanol, dan sentrifugasi dilakukan dengan dua kali pengulangan.

Supernatan kemudian dibuang lalu ditambahkan 200 µl etanol 70% dingin. Setelah itu, disentrifugasi pada suhu 4⁰C selama lima menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Etanol dibuang dan ditambah TE *buffer* sebanyak 50 µl. Hasil isolasi DNA yang didapat disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20⁰C untuk penyimpanan jangka panjang.

3. Pengukuran Kemurnian dan Konsentrasi DNA

Kemurnian dan konsentrasi DNA dilakukan untuk menguji DNA secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer *nanodrop* untuk mengukur kemurnian DNA dan Quantus™ Fluorometer (Promega) untuk mengukur konsentrasi DNA. Pengukuran kemurnian dilakukan dengan meneteskan blanko (TE) sebanyak 2 µl pada satu bulatan *plate nanodrop*, kemudian sampel DNA sebanyak 2 µl pada bulatan *plate nanodrop* yang lain. *Plate nanodrop* dimasukan kedalam mesin yang telah diatur untuk mengukur nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Nilai absorbansi dicatat kemudian dihitung menggunakan rumus :

$$\frac{\text{Abs 260} - \text{Abs 260 Blangko}}{\text{Abs 280} - \text{Abs 280 Blangko}} = R1$$

Keterangan :

R1 = Nilai rasio kemurnian DNA

Abs 260 = nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang 260 nm

Abs 280 = nilai absorbansi sampel pada panjang gelombang 280 nm

Abs 260 Blangko = nilai absorbansi blanko pada panjang gelombang 260 nm

Abs 280 Blangko = nilai absorbansi blanko pada panjang gelombang 280 nm

Pengukuran konsentrasi DNA hasil ekstraksi dilakukan sesuai dengan protokol dari Promega. Bahan yang dibutuhkan terdiri dari larutan buffer TE 1X, larutan *working solution*, *blank sample*, *standard sample*, dan sampel yang akan diuji. Pelaksanaan pengujian dan persiapan sebelum pengujian dilakukan didalam ruang dengan kondisi gelap atau terhindar dari cahaya. Perhitungan konsentrasi DNA dilakukan dengan mencampurkan 2 µl DNA sampel dengan 200 µl QuantiFluor® dsDNA *Dye working solution*, kemudian sampel diuji dengan

volume akhir 2 μ l. Angka yang muncul pada alat merupakan nilai konsentrasi (μ g/ μ l) dari sampel yang diuji.

4. Elektroforesis Sampel Hasil Ekstraksi DNA

Elektroforesis sampel dilakukan untuk mengetahui kualitas DNA secara kualitatif dengan ditunjukkan oleh ada tidaknya keberadaan pita DNA pada saat proses elektroforesis. Pada tahap awal proses elektroforesis, dilakukan pembuatan gel agarose dengan konsentrasi gel yang digunakan adalah 1%, yaitu dengan melarutkan 0.5 g agarose kedalam 50 ml TAE 1X.

Sampel sebanyak 5 μ l dicampurkan dengan *gelred* dan dimasukkan kedalam sumur-sumur pada gel agarose yang sebelumnya sudah dicetak. Gel agarose kemudian dielektroforesis menggunakan TAE 1X dengan kuat arus 100V selama 30 menit. Gel hasil elektroforesis diamati dibawah UV transluminator lalu didokumentasikan.

5. Amplifikasi DNA dengan metode PCR

Amplifikasi DNA daerah ITS dilakukan dengan menggunakan mesin PCR *SelectCycler II Thermal Cycler (Select Bioproducts)*. Proses amplifikasi mengacu pada Sulistyaningsih (2014) dengan beberapa modifikasi dan menggunakan sepasang primer, yaitu ITS5 (5'-TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAA-3') sebagai primer *forward* dan ITS4 (5'-CCCGCCTGACCTGGGGTCGC-3') sebagai primer *reverse*. Proses pencampuran komponen untuk reaksi PCR dilakukan secara cepat dan steril, serta dilakukan didalam boks yang berisi es dengan tujuan untuk menjaga kondisi komponen yang digunakan. Komposisi larutan yang digunakan dalam amplifikasi memiliki volume akhir 50 μ l reaksi dengan rincian yang dapat dilihat pada Tabel 3.2

Amplifikasi dimulai dengan denaturasi awal pada suhu 94⁰C selama 5 menit (1 siklus), dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 94⁰C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55⁰C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72⁰C selama 30 detik, ketiga tahap tersebut dilakukan sebanyak 40 siklus. Tahapan amplifikasi diakhiri oleh 1 siklus proses pemanjangan (*final extension*) pada suhu 72⁰C selama 10 menit (Sulistyaningsih *et al.*, 2014).

Tabel 3.2
Komposisi Reaksi PCR

Komponen	Volume 50 μ l reaksi	Konsentrasi akhir
GoTaq Green Master Mix 2x	25 μ l	1x
ITS 5	2.5 μ l	0.5 μ M
ITS 4	2.5 μ l	0.5 μ M
Sampel DNA	5 μ l	-
Nuclease-free Water	Sampai 50 μ l	-
Jumlah	50 μ l	-

6. Elektroforesis Sampel Hasil PCR

Amplikon atau sampel DNA yang telah diamplifikasi diuji kualitasnya secara kualitatif menggunakan alat elektroforesis, uji ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui ukuran panjang basa yang dihasilkan. Konsentrasi gel agarose yang digunakan 0.8%, yaitu dengan melarutkan 0.8 g agarose kedalam 100 ml TAE 1X. Amplikon sebanyak 5 μ l dicampurkan dengan *gelred* sebanyak 2 μ l dan DNA ladder 1 Kb sebanyak 2 μ l dicampurkan dengan *gelred* sebanyak 2 μ l, kemudian campuran amplikon dengan *gelred* dan DNA ladder 1 Kb dengan *gelred* masing-masing dimasukkan kedalam sumur pada gel agarose. Proses elektroforesis dilakukan dengan arus sebesar 100 V selama 30 menit menggunakan TAE 1X. Gel hasil elektroforesis diamati dibawah UV transiluminator dan didokumentasikan.

7. Sikuensing DNA

Sebanyak 50 produk hasil amplifikasi DNA daerah ITS disikuensing di Macrogen Inc., Korea Selatan. Macrogen merupakan perusahaan yang menyediakan layanan penelitian dan pengembangan produk bioteknologi. Primer yang digunakan adalah ITS-4 (5'-CCCGCCTGACCTGGGGTCGC-3') sebagai

reverse primer dan ITS-5 (5'-TAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAA-3') sebagai *forward primer* untuk menentukan urutan basa secara dua arah.

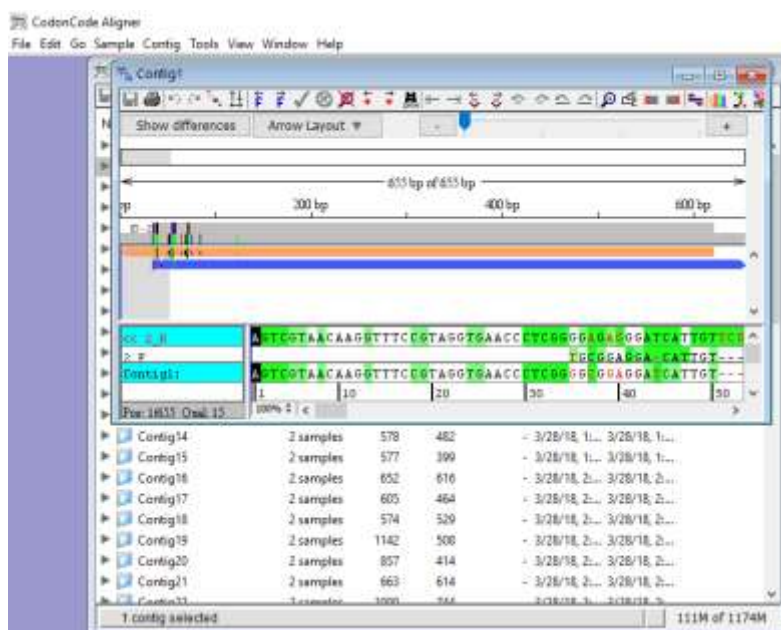
8. Analisis Data

a. *Contig*

Hasil sikuensing yang diperoleh dari MacroGen Inc. berupa dua set data urutan basa nukleotida. Masing-masing set data diperoleh dari hasil sikuensing menggunakan primer ITS 4 dan primer ITS 5. Sekuen DNA berdasarkan kedua primer tersebut kemudian di*contig* menggunakan program komputer CodonCode Aligner (Gambar 3.2.) dengan tujuan untuk memperoleh sikuens DNA yang utuh. Penggunaan kedua primer tersebut untuk meminimalisir kesalahan baca yang dilakukan oleh mesin *sequencer*.

b. Validasi Data Hasil Sikuensing

Validasi data dilakukan untuk memastikan bahwa sekuen DNA daerah ITS yang teramplifikasi merupakan DNA tanaman yang dianalisis. Validasi dilakukan dengan cara pensejajaran dengan sekuen DNA daerah ITS yang terdapat di *GeneBank* dengan menggunakan fitur *Basic Local Alignment Sequence Tool* (BLAST) yang dapat diakses pada blast.ncbi.nlm.nih.gov.



Gambar 3.2. Program *CodonCode Aligner* untuk *Contig* Sampel Hasil Sikuensing

Ubaydillah Zedd Munshy, 2018

HUBUNGAN FILOGENETIK MOLEKULER KULTIVAR PISANG (*Musa spp.*) DI BALI BERDASARKAN SEKUEN DNA DAERAH ITS 1

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

c. Pencarian Daerah ITS

Pencarian daerah ITS yang terdiri dari ITS 1 dan 5.8S dilakukan menggunakan program PAUP4. Sebelumnya diambil sekuen ITS 1 dan 5.8S dari genus tanaman lain dari *GeneBank* yang akan digunakan untuk menentukan sekuen daerah ITS 1 dan daerah 5.8S pada tanaman yang akan diteliti. Pencarian dilakukan dengan penjajaran sekuen DNA sampel yang sudah *dicontig* dengan DNA pembanding dari *GeneBank*. Hasil yang didapat berupa sekuen DNA daerah ITS 1 dan 5.8S dibuat fasta format menggunakan *notepad* dan dicatat *rangeny*.

d. Alignment

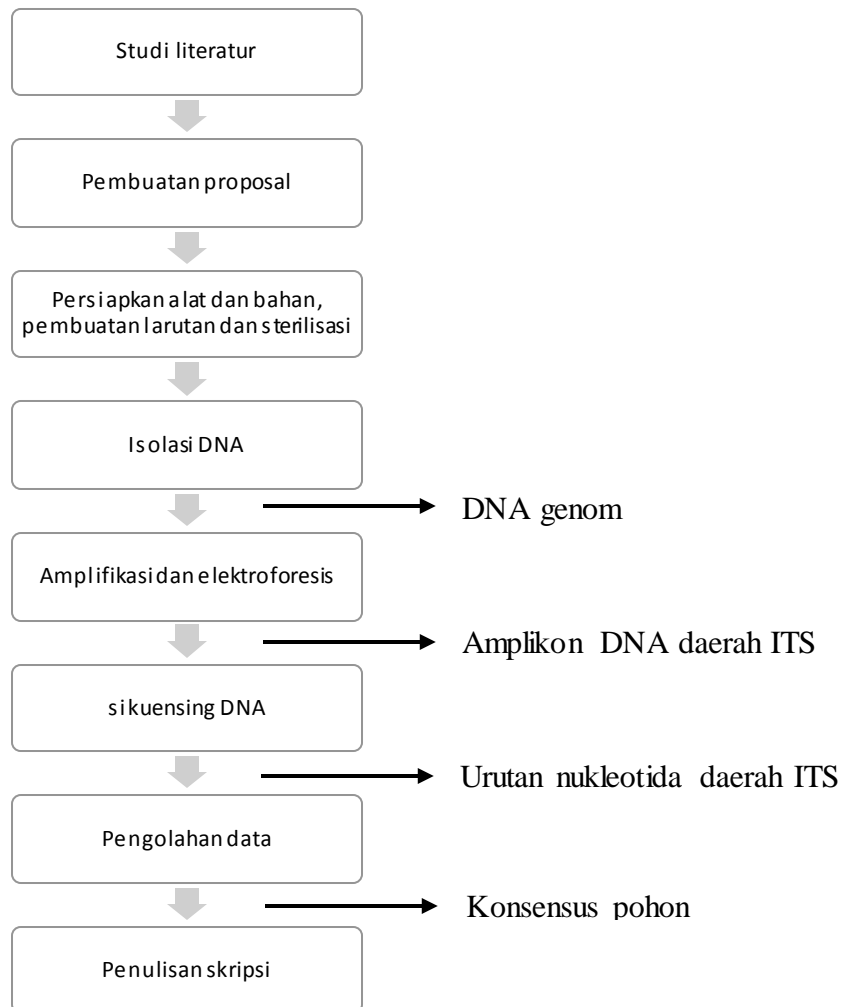
Proses *alignment* dilakukan pada saat sebelum pembentukan pohon filogenetik. Proses ini dilakukan untuk memperoleh data yang informatif dengan cara mengurutkan basa nukleotida sehingga berada pada posisi awal dan akhir yang bersamaan. Proses *alignment* ini dilakukan menggunakan program ClustalX. Program ini merupakan program yang mengikutsertakan *gap* diantara sikuens untuk dianalisis.

e. Pembentukan Pohon Filogenetik

Pembentukan pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan program PAUP4 pada sampel yang sebelumnya telah *dialignment*. Analisis pohon filogenetik dilakukan berdasarkan metode *Maximum Parsimony*. Pohon yang terbentuk kemudian disimpan dan dievaluasi menggunakan program *Treeview*.

F. Alur Penelitian

Tahapan serta hasil yang didapat dari setiap langkah pada penelitian ini ditunjukkan pada Gambar 3.3.



Gambar 3.3. Alur Penelitian