

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 IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

BAB III

METODE PENELITIAN

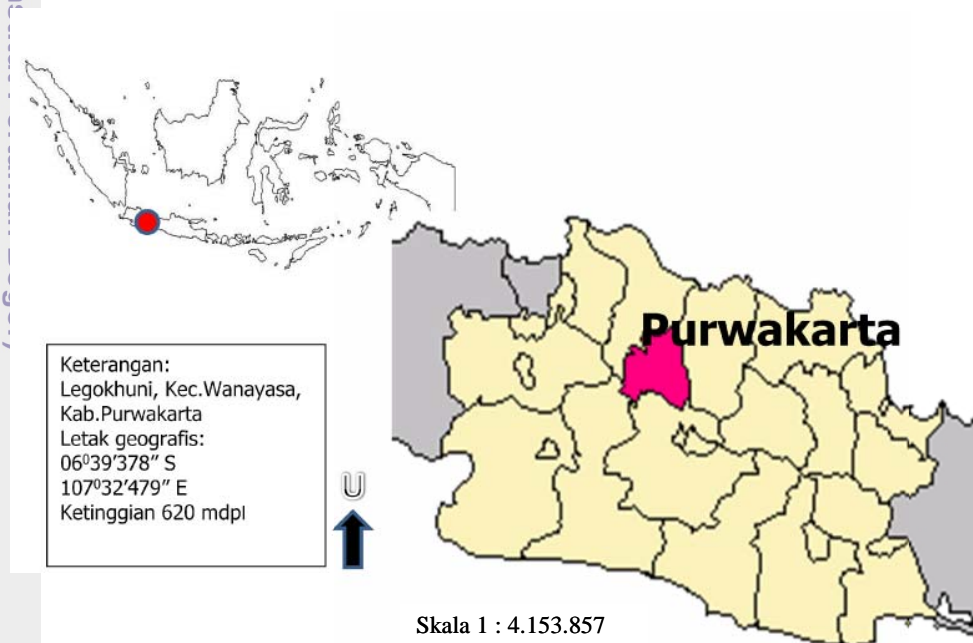
3.1 Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Agustus 2010 – Agustus 2011. Penelitian ini bertempat di Laboratorium Analisis Genetika, Departemen Silvikultur, Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor.

3.2 Alat dan bahan

3.2.1 Populasi penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah pohon induk mindi sebanyak 10 pohon induk dan keturunannya masing-masing 5 anakan. Lokasi pengambilan sampel berada di Desa Legok Huni, Kecamatan Wanayasa, Kabupaten Purwakarta, Provinsi Jawa Barat. Umur pohon induk yang digunakan berkisar antara 8 - 10 tahun. Peta lokasi pengambilan sampel disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5 Peta Lokasi Pengambilan Sample Mindi (*Melia azedarach* Linn.). Sumber : Kuswanto FS 2011 dan Kabupaten Purwakarta 2011.

3.2.2 Alat dan bahan

Alat dan bahan yang digunakan untuk analisis genetik dengan teknik Mikrosatelit dalam penelitian ini meliputi beberapa tahapan, yaitu ekstraksi DNA,

- 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 IPB.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

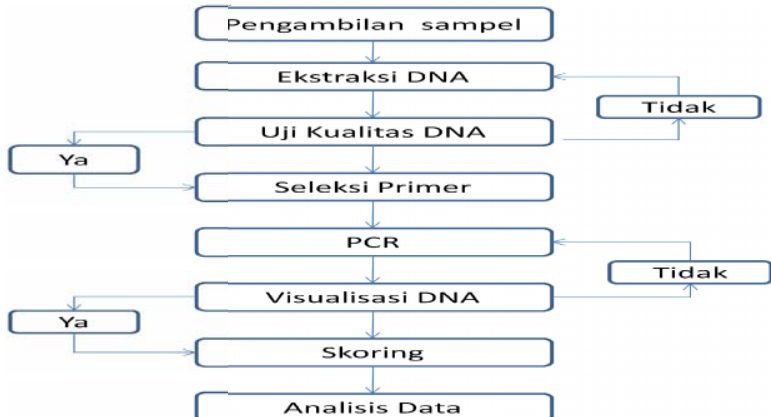
uji kualitas DNA, PCR, visualisasi DNA dan analisis data. Deskripsi alat dan bahan yang digunakan pada analisis genetik disajikan pada Tabel 1. Adapun gambar peralatan yang digunakan disajikan pada Lampiran 1.

Tabel 1 Alat dan bahan yang digunakan dalam teknik mikrosatelit

Tahapan Kegiatan	Analisis genetik dengan penanda Mikrosatelit	
	Alat	Bahan
Ekstraksi DNA	Sarung tangan, masker, gunting, tube 2 ml, mortar, sudip, mikropipet, tips, rak tube, <i>vortex</i> , <i>waterbath</i> , mesin sentrifugasi, <i>freezer</i> , alat tulis.	Buffer ekstrak, PVP 1 %, fenol, kloroform, isopropanol dingin, NaCl, etanol 96 %, buffer TE.
Uji kualitas DNA	Sarung tangan, masker, timbangan analitik, gelas ukur, erlenmeyer, cetakan agar, <i>microwave</i> , mikropipet, mesin elektroforesis, bak EtBr, kamera, mesin UV, laptop.	<i>Agarose</i> , buffer TAE 1 x, DNA hasil ekstraksi, blue juice 10 x, EtBr.
PCR	Sarung tangan, masker, mikropipet, tube 0.2 ml, spidol permanen, alat tulis, rak tube, tips, mesin sentrifugasi, mesin PCR.	DNA, primer spesifik <i>forward</i> dan <i>reverse</i> (Ai5, Ai34 dan SM45), <i>Green go taq polymerase</i> , <i>Nucleas free water</i>
Visualisasi DNA	Sarung tangan, masker, piringan kaca kecil, tissue, mikropipet, tips, mesin sentrifugasi, mesin elektroforesis, mesin UV, <i>magnetic stirrer</i> , kontainer/bak plastik, <i>shaker</i> , mesin cahaya, kamera.	Acrylamid, bisacrilamid, buffer TBE 10 x, aquadest, buffer TBE 1 x, TEMED, APS, DNA hasil PCR, ethanol 96 %, sigmacote, bind silane, acetic acid, silver nitrat, NaOH, formaldehid.
Analisis data	Laptop, software POPGENE 32 versi 1.31, NTSys versi 2.0 (Rohfl, 2008) dan software MLTR for windows (Ritland, 2008)	

3.3 Prosedur penelitian

Secara umum, prosedur penelitian dengan metode Mikrosatelit disajikan dalam Gambar 6.



Gambar 6 Prosedur analisis genetik dengan penanda mikrosatelit.

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 IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

3.3.1 Pengambilan sampel daun

Sampel daun muda diambil dari pohon induk dan keturunannya sebanyak 4–5 helai kemudian dimasukkan ke dalam plastik klip yang telah berisi *silica gel*. Sampel disimpan dalam *freezer* apabila tidak langsung digunakan. Total sampel yang diambil berjumlah 60 sampel yang terdiri dari 10 pohon induk dan 5 anakan untuk masing-masing pohon induk.

3.3.2 Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA merupakan proses untuk mendapatkan pellet DNA. Ekstraksi DNA dilakukan dengan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*). Metode ini menggunakan bufer CTAB yang berfungsi untuk melisis jaringan tanaman. Sampel daun berukuran 2 cm x 2 cm digerus dengan mortar. Hasil gerusan kemudian dimasukkan ke dalam *tube* yang telah diberi PVP 1% 100 μ l dan *buffer ekstrak* 500 μ l lalu divortex selama 1 menit. Setelah itu dilakukan proses inkubasi selama 1 jam dengan *waterbath*. Suhu yang digunakan dalam proses inkubasi adalah 65⁰C. Proses inkubasi berfungsi untuk merusak jaringan tanaman yang tidak rusak pada saat penggerusan. Selama proses inkubasi, setiap 15 menit sekali *tube* dibolak-balik untuk memastikan seluruh jaringan terinkubasi. Setelah proses inkubasi selesai, *tube* didiamkan selama 15 menit.

Proses selanjutnya adalah pemurnian DNA. *Tube* yang telah didinginkan kemudian diberi kloroform 500 μ l dan fenol 20 μ l lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Proses ini dilakukan sebanyak 2 kali untuk mendapatkan DNA yang murni. Pada saat disentrifugasi, bahan tanaman dalam *tube* akan terpisah menjadi dua bagian yaitu supernatan dan pelet. Bagian yang digunakan untuk tahap selanjutnya yaitu supernatan.

Supernatan yang telah diambil kemudian diendapkan dengan bantuan NaCl 300 μ l dan isopropanol dingin 500 μ l lalu disimpan dalam *freezer* selama 1 jam. Penyimpanan ini bertujuan untuk pengendapan dan pembentukan benang-benang DNA. Hasil pengendapan kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Setelah itu, buang fase air secara perlahan-lahan agar pelet DNA tidak ikut terbuang.

Pelet DNA yang telah diperoleh kemudian dicuci dengan ethanol 300 μ l. Pelet kemudian disentrifugasi dan dibuang cairan ethanolnya. Proses pencucian

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 IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

ini dilakukan sebanyak 2 kali. Setelah itu pelet dikeringkan di desikator selama 15 menit. Setelah dikeringkan, pelet DNA ditambahkan bufer TE sebanyak 50 μ l lalu disentrifugasi. Penambahan bufer TE ini bertujuan untuk memekatkan dan melarutkan DNA (Aritonang *et al.* 2007)

3.3.3 Uji kualitas DNA

Pelet DNA hasil ekstraksi kemudian diuji kualitasnya dengan menggunakan alat elektroforesis. Media yang digunakan untuk uji kualitas berupa gel agarose. Gel dicetak dengan bantuan sisir untuk meletakkan DNA pada saat *running*. Gel ini terbuat dari campuran 0,15 gram agarose serbuk dan 15 ml bufer TAE atau 0,33 gram agarose serbuk dan 33 ml bufer TAE tergantung dari jumlah sisir yang akan digunakan. Campuran tersebut kemudian dipanaskan dengan *microwave* selama 1 - 2 menit. Campuran kemudian dituangkan ke dalam pencetak dan ditunggu sampai kering.

Gel yang telah siap kemudian dimasukkan ke dalam alat elektroforesis. Sisir-sisir pencetak diisi dengan campuran DNA 3 μ l dan *blue juice* 2 μ l. *Blue juice* berfungsi untuk mewarnai DNA. DNA kemudian dirunning dalam bak elektroforesis yang berisi larutan bufer TAE. Bak elektroforesis kemudian dialiri listrik. DNA akan berpindah dari kutub negatif ke kutub positif. Proses *running* dilakukan sampai DNA berada di ujung gel. Gel yang telah dirunning kemudian difoto dengan bantuan alat *UV transilluminator*.

3.3.4 PCR

PCR atau *Polimerase Chain Reaction* merupakan proses terpenting dalam kegiatan analisis genetik. Pada proses ini DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan primer spesifik. Primer merupakan potongan rantai DNA antara 18-24 nukleotida yang didesain berkomplemen dengan rantai DNA *template* dan menjadi titik batas multiplikasi DNA target (Aritonang *et al.* 2007). Komponen bahan-bahan penyusun yang diperlukan untuk proses PCR meliputi *master mix* (*green go taq*) 7.5 μ l, *nuclease free water* 2.5 – 5 μ l, primer spesifik 1.5 μ l, dan DNA *template* 2 μ l.

Pendekatan primer spesifik perlu dilakukan untuk tanaman yang belum mempunyai primer spesifik. Pendekatan ini dilakukan melalui seleksi primer. Untuk mindi, jenis primer spesifik yang dipakai dalam proses seleksi primer

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 IPB.
2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

berasal dari dua jenis tanaman kerabat mindi yaitu mahoni (Lemes *et al.* 2002) dan mimba (Boontong *et al.* 2008). Adapun primer yang digunakan dalam proses seleksi primer tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2 Pasang sekuen untuk seleksi primer (Lemes *et al.* 2002 dan Boontong *et al.* 2008)

No	Lokus	Repeat	PCR Primer (5' to 3')	Allelic range size (bp)	T _a (°C)
1	sm01	(AG) ₁₉	5'-GCGCGATTGATTGACTTC-3' 5'-GCGCTTAGCATTATTCTCC-3'	261 – 295	56
2	sm22	(AG) ₁₈	5'-TCTGCTACAGAGCTGGATGC-3' 5'-GTATGCTCGAAGAAGTCGTTG-3'	119 – 161	56
3	sm31	(AG) ₃₁	5'-CTTCTAATGTTCTGATGCCTG-3' 5'-AGCAACTCGTGAGGAATTAC-3'	80 – 138	56
4	sm32	(AG) ₂₀	5'-CACCTTATGTACACCACACAG-3' 5'-GAAGGAGACACCAGCAATC-3'	146 – 184	56
5	sm34	(AG) ₁₉	5'-GCACTCAAGGTACTATGAT-3' 5'-TACGTGTGAATGCGTCTAT-3'	40 – 96	56
6	sm40	(AG) ₁₉	5'-TGCTACTGTCAAGAGTGTAT-3' 5'-GACAAACATGTACCACAAG-3'	120 – 146	56
7	sm45	(AG) ₂₁	5'-CCTTATGTTACCACACAGTA-3' 5'-GAGACACCAGCAATCCAG-3'	140 – 178	56
8	sm46	(AG) ₂₀	5'-GCAGTACTCGCCTATCTTCA-3' 5'-TGAGAACTGCAGAATCCTTT-3'	190 – 226	56
9	sm47	(AG) ₂₄	5'-GCCATTGGTCTCAATCTTAC-3' 5'-GGAAGAGTCTTAGAACACAG-3'	114 – 150	56
10	sm51	(AG) ₂₂	5'-GCAATTTCCAGAAGAAACC-3' 5'-CTGTAGGCGATAACAATCAG-3'	138 – 182	56
11	Ai5	(CA) ₁₅	5'-GAAAGGAGGGTTTTCAAATCA-3' 5'-TCGGCCGAACACAATTTTA-3'	130 – 182	55
12	Ai34	(GA) ₁₈	5'-ATTTGTGTGTGCGTGCTAGG-3' 5'-CGAGGAACTGAGACTCCTGAA-3'	146 – 168	55
13	Ai48	(CA) ₁₀	5'-TCCCAGTTATTCAACGTAGGC-3' 5'-TCTTAATCATGGATTGCTTCACA-3'	105 – 125	55

Ket: T_a : Suhu *annealing*

Prinsip dasar proses PCR adalah adanya sifat komplementasi rantai DNA dengan pasangannya dan dimanipulasi melalui tiga tahapan suhu yaitu denaturasi (pemisahan rantai), *annealing* (penempelan primer) serta *extension* (perpanjangan rantai DNA polymerase) (Aritonang *et al.* 2007). Adapun tahapan suhu tersebut disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 Tahapan PCR

Tahapan	Suhu	Waktu	Siklus
<i>Pre-denaturation</i>	95°C	2 menit	1
<i>Denaturation</i>	95°C	2 menit	
<i>Annealing</i>	52°C – 56°C	1 menit	39
<i>Extension</i>	72°C	2 menit	
<i>Final Extension</i>	72°C	5 menit	1

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 IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

3.3.5 Visualisasi DNA

Visualisasi DNA dilakukan melalui beberapa tahapan meliputi pembuatan gel akrilamid, *running*, dan pewarnaan. Gel akrilamid dibuat dengan bantuan kaca pencetak. Kaca ini terdiri dari dua piringan dimana salah satu kaca berfungsi sebagai tempat menempelnya gel. Proses awal yang harus dilakukan yaitu pembersihan kaca pencetak agar. Permukaan kaca terlebih dahulu dibersihkan dengan ethanol. Pemberian etanol ini berfungsi untuk menghilangkan sisa-sisa bahan kimia. Setelah itu, salah satu kaca diberi larutan Sigmacote 50 μ l dan satunya lagi diberi larutan Bind silane 50 μ l. Pemberian Sigmacote bertujuan untuk melicinkan gel, sementara Bind silane digunakan agar gel akrilamid tertempel pada permukaan kaca. Bahan-bahan penyusun gel akrilamid disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4 Bahan-bahan penyusun gel akrilamid

No	Nama bahan	Volume*
	Akrilamid	5,7 gr
	Bis-akrilamid	0,3 gr
	TEMED	50 μ l
	APS (Ammonium persulfat)	500 μ l
	Aquadest	60 ml
	Buffer TBE 10 x	10 ml

* untuk sekali reaksi = 20 sampel

Untuk membuat larutan gel akrilamid, bahan-bahan seperti akrilamid, bis-akrilamid, *buffer* TBE 10 x dan aquadest dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu *distirrer* selama 15 menit. Pada menit ke-10 dimasukkan TEMED dan pada menit ke-14 dimasukkan APS. APS berfungsi sebagai pengeras gel sehingga dimasukkan paling akhir. Setelah itu larutan gel segera dituangkan ke dalam cetakan kaca yang telah dipersiapkan lalu sisir untuk mencetak tempat DNA disisipkan diujung kaca. Gel didiamkan sampai mengeras.

Untuk proses *running*, gel yang telah siap kemudian dipasangkan ke alat elektroforesis dengan bantuan penjepit. *Buffer* yang digunakan dalam proses *running* adalah *buffer* TBE 100x. DNA hasil PCR kemudian dimasukkan ke dalam lubang sisir. DNA yang dibutuhkan dalam proses *running* sebanyak 5 μ l. DNA dirunning dengan voltase 350 V, 40 mA, 80 W selama \pm 120 menit.

Gel yang telah selesai *dirunning* kemudian diwarnai dengan metode pewarnaan perak nitrat yang telah dimodifikasi. Metode pewarnaan perak nitrat merupakan metode yang digunakan oleh Benbouza et al (2006) dalam

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 IPB.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

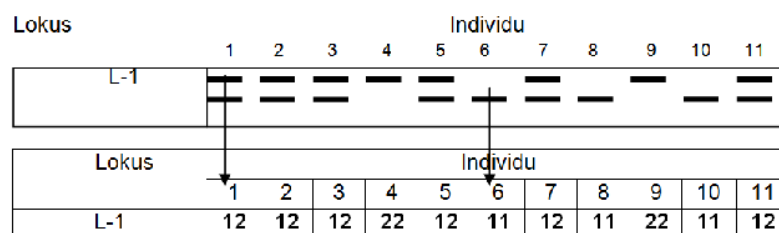
penelitiannya. Gel yang telah dirunning diwarnai dengan urutan seperti yang tertera pada Tabel 5. Selama proses pewarnaan, bak digoyang-goyang dengan bantuan shaker. Tahapan pewarnaan disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5 Tahapan pewarnaan gel akrilamid dengan metode perak nitrat

Nomor bak	Komposisi bahan		Lama pencelupan (penggoyangan)
	Nama bahan	Volume	
Bak I : Asam asetat	Aquadest	450 ml	10 – 15 menit
	Etanol	50 ml	
	Acetic acid	25 µl	
Bak II : Aquades	Aquadest	500 ml	5 menit
Bak III : Perak nitrat	Aquadest	500 ml	10 – 20 menit
	Formaldehid	0,6 ml	
	Silbernitrat	0,5 gr	
Bak IV : NaOH	Aquadest	500 ml	Sampai keluar pita
	Formaldehid	1 ml	
	NaOH	7,5 gr	

3.3.6 Analisis data

Hasil dari kegiatan teknik mikrosatelit pada daun selanjutnya difoto dan dianalisis dengan melakukan skoring pada pola pita yang muncul. Hasil interpretasi foto kemudian dianalisis dengan menggunakan *software* POPGENE 32 versi 1.31 (Yeh dan Yang, 1999), NTSys Ver 2.0 (Rohlf 2008), dan MLTR (*Multilocus Mating System Programme*) *software* (Ritland 1996). Cara skoring pita DNA disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7 Cara skoring pita DNA.

Untuk mengetahui tingkat keakuratan pendugaan lokasi amplifikasi DNA pada gel akrilamid maka digunakan persamaan kuadrat. Persamaan kuadrat ini diperoleh melalui pengukuran manual pita DNA yang terbentuk pada gel akrilamid. Pengukuran dilakukan dengan mistar. Hasil pengukuran kemudian diolah dengan Minitab 14 untuk mendapatkan nilai persamaannya. Persamaan kuadrat yang digunakan sebagai acuan skoring yaitu :

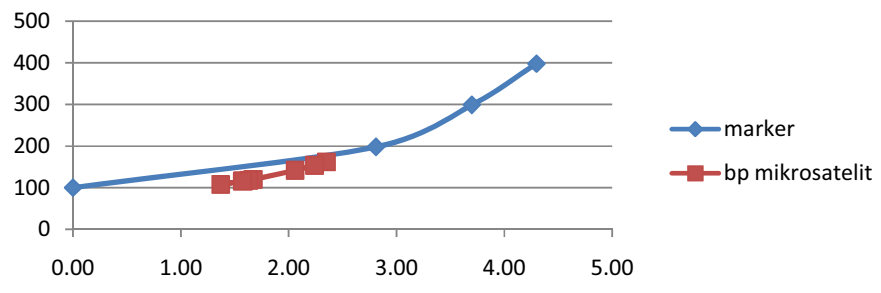
$$f(x) = 23.17x^2 + 30.48x - 100.2$$

Keterangan : $f(x)$ = Panjang *basepair*; x = Panjang pita dalam pengamatan

Hasil pengukuran dan pendugaan panjang fragmen DNA hasil amplifikasi disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6 Hasil pengukuran dan pendugaan panjang fragmen DNA hasil amplifikasi

Allele	Foto (cm)	Basepair (Boontong <i>et al.</i> , 2008 dan Lemes <i>et al.</i> 2002)	Basepair (persamaan)
Ai-5 ₁	2,35	130 – 182	162
Ai-5 ₂	2,24	130 – 182	154
Ai-5 ₃	2,06	130 – 182	142
Ai-34 ₁	1,67	146 – 168	120
Ai-34 ₂	1,58	146 – 168	116
Ai-34 ₃	1,37	146 – 168	108
SM45 ₁	1,63	140 – 178	118
SM45 ₂	1,57	140 – 178	116



Gambar 8 Grafik panjang fragmen hasil amplifikasi mikrosatelit.

- 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 IPB.
 2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.