

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai bulan Maret 2014. Pengamatan morfologi dan pengambilan sampel daun tanaman salak dilaksanakan di kebun salak yang ada di Desa Bilaporah, Kecamatan Socah, Kabupaten Bangkalan yang terletak diantara 112°-113° BT dan 6°-7° LS serta berada pada ketinggian 2-10 m diatas permukaan air laut. Analisis isozim dilaksanakan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kamera digital, gunting/ cutter, spidol dan plastik label untuk pengambilan sampel, *ice box*, satu set alat elektroforesis, *high voltase power supply*, penangas air atau *microwave*, lemari es atau ruang pendingin, nampan tempat pewarnaan, mortar dan pestel, tabung eppendorf, *yellow tip*, *blue tip*, kertas saring, plastik, tissue, pipet, timbangan elektrik, pengaduk elektrik, gelas ukur, erlenmeyer, dan penggaris.

Bahan yang digunakan adalah sampel daun dari 6 (enam) jenis tanaman salak Bangkalan, yaitu Apel, Bunter, Cocor, Kerbau, Penjalin, dan Senase. Sedangkan bahan kimia yang digunakan adalah buffer pengekstrak, nitrogen cair, gel poliakrilamida (separating gel 7% dan stacking gel 5%), *Reducing Sample Buffer* (RSB), aquades, kertas aluminium foil, serta pewarna esterase (EST) dan peroksidase (PER).

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengamatan morfologi dan analisis isozim. Karakter morfologi yang diamati adalah karakter kualitatif berdasarkan Radford (1986) dan Departemen Pertanian Republik Indonesia (2006). Analisis isozim menggunakan metode Wendel dan Weeden (1989) dengan beberapa modifikasi menurut prosedur Fajriani (2008). Informasi yang diperoleh pada percobaan analisis isozim ini adalah variasi pola pita dari masing-masing

isozim yang dapat digunakan untuk mengetahui keragaman dan hubungan kekerabatan genotip salak Bangkalan pada tingkat protein.

3.4 Pelaksanaan

3.4.1 Pengambilan data morfologi

Pengambilan data morfologi tanaman salak berpedoman pada Radford (1986) dan Departemen Pertanian Republik Indonesia (2006) dalam Nurhayati (2008). Karakter morfologi yang diamati adalah karakter kualitatif pada tanaman salak betina. Karakter kualitatif tersebut meliputi warna pupus, warna permukaan atas daun, warna permukaan bawah daun, ketebalan lapisan lilin, warna pelepah, kekerasan daun, bentuk pangkal daun, bentuk ujung daun, pelipatan tepi helai daun, warna duri, ketajaman duri, kekerasan duri, duri mudah lepas, bentuk duri, kerapatan duri, warna seludang bunga, bentuk seludang bunga, warna mahkota bunga, warna kulit buah matang, bentuk buah, warna daging buah, rasa daging buah dan tekstur daging buah (Lampiran 4). Pengamatan dilakukan dengan membandingkan karakter antar tanaman yang diamati. Setiap jenis tanaman diamati 1 (satu) sampel, karena tanaman salak Bangkalan diperbanyak melalui cangkok, sehingga semua tanaman mirip/ identik dengan induknya.

3.4.2 Pengambilan Tanaman Contoh (Sampel Daun Salak)

Sampel daun yang digunakan ialah daun muda dari 6 (enam) jenis tanaman salak Bangkalan (salak betina). Pengambilan sampel daun salak dilakukan pagi hari pukul 05.00 hingga 06.00 WIB. Masing-masing sampel daun dicuci dengan menggunakan aquades atau air bersih lalu dibungkus tisu basah dan dimasukkan dalam plastik, kemudian diberi label berdasarkan masing-masing jenis tanaman salak. Sampel daun dimasukkan dalam *ice box* pada suhu 2⁰C – 4⁰C. Dilaboratorium contoh daun tersebut dipindahkan ke dalam lemari es untuk digunakan sebagai bahan ekstraksi enzim.

3.4.3 Analisis Isozim

Keragaman genetik tanaman salak dilakukan dengan analisis isozim dengan teknik elektroforesis. Tahapan kegiatan analisis isozim terdiri dari pembuatan buffer pengekstrak, ekstraksi enzim daun salak, pembuatan gel akrilamid, elektroforesis, pewarnaan dan pencucian, serta dokumentasi.

1. Pembuatan buffer pengekstrak

Buffer pengekstrak ini berfungsi membantu menghancurkan sel dalam suatu jumlah minimum tanpa menimbulkan panas terhadap ekstrak dan perubahan warna terhadap daun yang diekstrak. Buffer pengekstrak sebanyak 20 ml dibuat dengan melarutkan 2 ml EDTA (Ethylene Diamine tetra Asetate) 0,01 M, 2 ml KCl 0,1 M, 2 ml $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ 1 M, 2 ml Tris HCl 1 M pH 7,5, 20 ml β -mercaptoethanol, 0,6 gram PVP (Polyvinyl Piroolidone), 0,04 gram BSA (Bovine Serum Albumin), dan aquades hingga 20 ml.

2. Ekstraksi enzim daun salak

Sampel daun salak ditimbang 0,3 gram lalu digerus pada mortar steril, kemudian ditambahkan nitrogen cair dan digerus hingga halus. Setelah itu ditambahkan 0,8 ml buffer ekstraksi dan sampel ditumbuk sampai halus. Kemudian masing-masing sampel dimasukkan ke dalam eppendorf steril, dan di inkubasi pada suhu 0-2 °C selama 1 jam. Setelah itu di sentrifugasi dalam suhu dingin 4°C dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindah ke eppendorf steril baru, lalu ditambahkan buffer ekstraksi dengan perbandingan 1 : 15 (buffer ekstaksi : supernatan) dan dihomogenkan. Kemudian ekstrak enzim disimpan pada suhu kurang dari 20°C.

3. Pembuatan gel akrilamid

Pembuatan gel terdiri dari separating gel 7%, yaitu mencampur aquades, 2250 μ l tris HCl 1,5 M pH 8,8 dan 30% acrylamid 2130 μ l dan dihomogenkan dengan vorteks. Kemudian ditambah 10% APS (Amonium Persuphate) 45 μ l dan TEMED (Tetramethyldiamine) 4,5 μ l lalu dihomogenkan dengan vorteks. Setelah itu larutan dimasukkan ke dalam plate sampai batas dan ditambahkan aquades pada bagian atasnya. Larutan didiamkan hingga menjadi gel \pm 45 menit lalu aquades dibuang setelah larutan memadat (menjadi gel).

Untuk pembuatan stacking gel 5%, yaitu mencampur aquades, 750 μ l tris HCl 0,5 M pH 6,8 dan 30% acrylamid 420 μ l dan dihomogenkan dengan vorteks. Kemudian ditambah 10% APS (Amonium Persuphate) 30 μ l dan TEMED (Tetramethyldiamine) 3 μ l lalu dihomogenkan dengan vorteks. Setelah itu sisiran dipasang pada plate dan larutan dituangkan ke dalam plate. Larutan didiamkan hingga memadat (menjadi gel) \pm 15 menit.

4. Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan dua gel poliakrilamida (gel PAGE) dan running buffer. Gel poliakrilamida dicetak pada glass plate yang terdiri dari separating gel pada bagian bawah dan stacking gel pada bagian atas, kemudian disisipkan sisir elektroforesis untuk membentuk sumuran sebelum gel memadat. Gel diletakkan secara vertikal yang telah berisi larutan running buffer. Supernatan terlebih dahulu ditambah dengan *Reducing Sample Buffer* (RSB) sebelum dimasukkan kedalam sumuran pada gel yang tercetak, kemudian dielektroforesis dengan tegangan listrik 20 mA selama 3 - 4 jam. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada skema proses kerja elektroforesis pada Lampiran 6.

5. Pewarnaan (staining)

Setelah elektroforesis selesai, lembaran gel diletakkan dalam nampan kemudian memberi pewarna yang masing-masing telah disiapkan. Pewarna yang digunakan dalam penelitian ini adalah enzim esterase (EST) dan peroksidase (PER). Selanjutnya nampan ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu ruang sampai muncul pita-pita pada gel yang cukup jelas. Perendaman dalam larutan pewarna memerlukan waktu antara 1 - 2 jam.

6. Pencucian dan fiksasi

Setelah pewarnaan gel dicuci dengan aquades sampai bersih. Setelah bersih gel difiksasi dengan larutan destaining dan diletakkan pada shaker. Selanjutnya potongan gel yang berisi garis-garis atau pita-pita kemudian diamati dan ditentukan pola pitanya (Wendel dan Weeden, 1989).

7. Dokumentasi pola pita isozim

Karena daya tahan gel ini tidak bisa disimpan terlalu lama, maka sebaiknya setelah proses pencucian segera digambar atau didokumentasikan. Gel diletakkan di atas plastik bening dan diletakkan di atas lampu pengamatan untuk diambil data dan didokumentasikan.

3.5 Analisis Data

Data hasil karakterisasi morfologi kualitatif tanaman salak Bangkalan disajikan secara deskriptif. Selanjutnya data morfologi kualitatif diterjemahkan menjadi data biner dengan cara memberi nilai 1 (satu) untuk fenotip yang diekspresikan dan nilai 0 (nol) untuk fenotip yang absen. Sedangkan data hasil analisis isozim yang berupa pola pita kemudian digambar zimogramnya (pola pita isozim) untuk memperjelas visualisasi pola pita pada gel hasil elektroforesis. Data zimogram selanjutnya diterjemahkan menjadi data biner dengan cara memberi nilai 0 untuk genotipe (pita) yang tidak hadir/ muncul dan nilai 1 untuk nilai genotipe yang hadir/ muncul. Berdasarkan pada data biner pola pita isozim maupun data morfologi kualitatif selanjutnya dianalisis menggunakan *Cluster Simple Matching Coefficient Analysis* dengan metode *Unweighted Pair Group Methode with Arithmetic Average* (UPGMA) pada program komputer *Multi Variate Statistical Package* (MVSP) dan hasilnya disajikan dalam bentuk dendogram. Dendogram yang dihasilkan menunjukkan tingkat kemiripan atau nilai similaritas antar sampel dari jenis-jenis tanaman salak Bangkalan.

