

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu/Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikologi, Divisi Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Jawa Barat. Pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Maret 2012 sampai juni 2012.

3.2. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang di gunakan selama penelitian untuk metode pengumpulan spesimen Plastic Zip Lock, Amplop, Label, Pensil, Hand Lens, Kertas Koran, dan Note Book, untuk metode observasi spesimen adalah Mikroskop Stereo, Objek Glass, Cover Glass, Pinset, Shears, dan Kutek. Untuk Isolasi Single Spora menggunakan Pinset, Jarum Ose, Jarum biak(jarum isolasi), Preparat Cekung, Bunsen, Alkohol 70 %, Air Steril, Media Water Agar dan Media Potato Dextrose Agar (PDA), dan untuk metode Ekstraksi dan PCR menggunakan Neraca digital (ACIS), penangas magnetic stirrer (Eyela), sentrifugasi (Mini spin eppendorf), microwave (Panasonic), PCR (Takara), Elektroforesis Horizontal (ATTA my power 300 AE-8130), autoklaf (Hirayama), kulkas (Sharp), Laminar Flow Cabinet (Esco) dan Laminar Air Flow (Sanyo), Waterbath Shaker (Taitec Personal-11), Potatoes Dextrose Broth (PDB), Akuades, Alkohol 96%, primer DNA, *Taq* DNA polymerase, *template* DNA, gel agarosa, *ethidium bromide*, DNA extraction kit Phytopure (UK).

3.3. Metode Pengumpulan data dan analisis data

3.3.1. Pengumpulan spesimen

Pengumpulan spesimen dilakukan di sekitar kota Bogor (Kebun Raya Bogor) pengumpulan spesimen dilakukan secara acak dengan mengumpulkan tanaman yang memiliki gejala atau tanda terserang-kapang *Pseudocercopora*. Tanaman yang ditemukan dimasukkan

kedalam amplop dibedakan sesuai jenis tanaman dan diberi label, kemudian dibawa ke laboratorium untuk diobservasi.

3.3.2. Observasi (Identifikasi Morfologi) spesimen

Spesimen yang dibawa dari lapang diamati di bawah mikroskop stereo (Olympus, SZ61), diamati ada atau tidaknya badan buah, badan buah yang terdapat pada bercak daun diambil menggunakan pinset dan diletakkan pada objek glass yang telah ditetesi shears lalu ditutup dengan cover glass, preparat kemudian diamati di bawah mikroskop (Olympus, CX41), observasi kapang *Pseudocercopora* menggunakan literatur Crous P.W. & Braun, U. 2003. *Mycosphaerella and its anamorphs: 1. Names published in Cercospora and Passalora*. CBS Biodiversity Series 1, Utrecht, Netherland: iv + 571 pages.

3.3.3. Isolasi single spora

Badan buah yang diidentifikasi sebagai kapang *Pseudocercopora* diisolasi dari daun, Badan buah yang terdapat pada bercak daun diambil dengan spatula steril (pinset) ke dalam setetes akuades steril di atas gelas obyek cekung, ratakan hingga terbentuk suspensi spora. Dengan menggunakan jarum ose tetes spora selanjutnya di tumbuhkan dalam media Water Agar (WA) membentuk pola segitiga, kemudian kultur di inkubasi selama 24 jam, konidia yang bergerminasi dan menunjukkan pertumbuhan diamati dan ditempatkan di tengah bidang pandang mikroskop. Dengan menggunakan spatula berujung bulat atau jarum transfer spora yang telah bergerminasi kemudian diambil dan di transfer dalam media isolasi (PDA) dan di tumbuhkan. (Ilyas *et al*, 2007).

3.3.4. Ekstraksi DNA

Isolat yang telah ditumbuhkan di media PDA kemudian ditumbuhkan ke media PDB (potato dextrose broth) dan diinkubasi di waterbath shaker selama 7-9 hari sampai miselium tumbuh banyak, kemudian miselium dapat dipanen, dimasukkan ke dalam endorf tube

dan ditambahkan 500 ml Mili Q water dan siap untuk diekstraksi, langkah – langkah untuk ekstraksi DNA adalah :

- Miselium yang sudah dipanen di dalam tube di sentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm/ 10 menit
- Supernatan diambil dengan mikropipet dan di gerus dengan pastel hingga menjadi koloid
- Koloid di tambahkan dengan Reagen 1 sebanyak 300 ml, dihomogenisasi dengan menggunakan tip dari mikropipet
- Ditambahkan RNase sebanyak 3 μ l, dihomogenisasi menggunakan tip dan diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C di waterbath
- Ditambah Reagen 2 sebanyak 200 μ l, di kocok kuat selama \pm 10 menit, diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang, diinkubasi dalam es atau dimasukkan dalam freezer selama 20 menit
- Ditambahkan kloroform sebanyak 250 μ
- Ditambahkan fenol sebanyak 250 μ
- Dihomogenisasi / dikocok selama \pm 3 – 4 menit
- Disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 14°C hingga terbentuk 3 lapisan (lapisan atas adalah DNA, lapisan tengah adalah protein, polisakarida, miselia, dan lapisan bawah adalah sisa protein dan polisakarida)
- Supernatan diambil, ditambah isopropanol sebanyak setengah dari volume sampel (biasanya 250 μ l)
- Dibolak – balik lambat hingga homogen, diamati terbentuk atau tidaknya DNA
- Disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, kemudian supernatant dibuang dengan dituang secara perlahan – lahan
- Mikrotube dibalik di atas tissue \pm 3menit
- Ditambah etanol 99% sebanyak 50 μ l, disentil hingga endapan lepas dari mikrotube
- Disentrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit, supernatant dibuang dengan cara dituang

- Dikeringanginkan dengan cara membalik mikrotube di atas tissue dengan dibuka tutupnya selama \pm 30 menit
- Ditambah Nuklease free water sebanyak 100 μ l (banyak) dan 50 μ l (sedikit)

3.3.5. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Setelah Ekstraksi DNA maka Template dapat digunakan untuk PCR, Analisis gen menggunakan primer ITS, primer untuk ITS adalah ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') dan ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.* 1990 dalam To-Anun *et al.* 2011).

Volume total untuk amplifikasi sebanyak 25 μ l yang terdiri dari *nuclease free water* 10 μ l, Go taq 12,5 μ l, primer forward dan reverse masing-masing 0,5 μ l, DMSO 0,5 μ l, dan template DNA 1 μ l. Amplifikasi PCR untuk ITS 4 dan 5 melalui tahap denaturasi pada suhu 94° C selama 3 min, 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 52° C selama 50 detik, ekstensi pada suhu 72° C selama 1 menit, dan 72° C selama 10 menit dengan siklus sebanyak 30 (To-Anun *et al.* 2011).

Produk PCR dielektroforesis, komponen elektroforesis adalah Gel agarose 1%, TAE 1x 100 ml, produk PCR dimasukkan kedalam agarose sebanyak 2 μ l, di elektroforesis selama 30 menit, di rendam ETBR selama 30 menit, dibilas dengan TAE 1x, dan di foto dengan *Gel documentation*. Produk PCR yang di peroleh kemudian dapat di sekuensing, sekuensing tidak dilakukan sendiri tetapi dikirim 1st Base, Malaysia.

3.3.6. Analisis Filogenetik

Hasil sekuensing berdasarkan primer ITS 4 dan ITS 5 setiap isolat disejajarkan kemudian diedit menggunakan piranti lunak ChromasPro 1.5 (Technelysium Pty Ltd.) dengan mengacu pada kromatogramnya dan diubah menjadi bentuk fasta. Data dalam bentuk fasta dilakukan dianalisis lebih lanjut dengan mencari kesamaannya menggunakan

program *basic local alignment search tool* (BLAST) di <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

BLAST untuk menentukan spesies yang memiliki homologi terdekat. Daerah yang ambigu pada sikuen yang telah sejajar ditiadakan dari analisis. Gap dianggap sebagai data yang hilang (Groenewald *et al.* 2005). Analisis Filogenetik NJ (Neighbour Joining) menggunakan program Mega 5.05. Filogram dikonstruksi melalui metode *distance*. Untuk mengetahui tingkat kepercayaan setiap percabangan dilakukan *bootstrap* 1000 kali.

