

III. METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Oktober 2013 hingga September 2014 dan dilaksanakan di:

- (1) Laboratorium Pemuliaan Tanaman Budidaya Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya untuk pengecambahan benih, dan
- (2) Laboratorium Pemuliaan Tanaman Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya bidang Bioteknologi, untuk ekstraksi DNA, amplifikasi RAPD dan elektroforesis.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat dan Bahan Pengecambahan Kacang Bogor

Bahan yang digunakan adalah benih dari masing-masing galur 10 benih per galur dari total 22 galur, tissue, kertas merang, dan air. Alat yang dibutuhkan adalah cawan petri dan *hand sprayer*.

Galur-galur kacang bogor (*Vigna subterranea* L. Verdcourt) yang digunakan adalah berasal dari galur,

Tabel 2. Daftar 22 Galur Kacang Bogor

No.	Kode Galur (Ekotipe)	Asal
1.	BBL 5.3.2,	
2.	BBL 6.1.1,	
3.	BBL 6.2.1,	BBL (Ds. Brengkok, Kec. Brondong, Kab. Lamongan, Jawa Timur)
4.	BBL 6.3.1,	
5.	BBL 10.1,	
6.	CCC 1.4.1,	CCC (Ds. Cijendil, Kec. Cugenang, Kab. Cianjur, Jawa Barat)
7.	CCC 1.5,	
8.	JLB 1,	JLB (Ds. Jukong, Kec. Labang, Kab. Bangkalan, Jawa Timur)
9.	TKB 1,	TKB (Ds. Telang, Kec. Kamal, Kab. Bangkalan, Jawa Timur)
10.	GSG 3.1.2,	
11.	GSG 3.2.1,	GSG (Ds. Gedangan, Kec. Sedayu, Kab. Gresik, Jawa Timur)
12.	GSG 3.3.1,	
13.	GSG 3.3.2,	
14.	PWBG 5.1.1,	
15.	PWBG 5.3.1,	PWBG (Ds. Melirang, Kec. Bungah, Kab. Gresik, Jawa Timur)
16.	PWBG 7.1,	

Tabel 2. Daftar 22 Galur Kacang Bogor (lanjutan)

17.	SS 2.3.2,	
18.	SS 3.1.2,	
19.	SS 3.2.2,	SS (Ds. Wanakerta, Kec. Situraja, Kab.
20.	SS 4.3.2,	Sumedang, Jawa Barat)
21.	SS 6.3.2	
22.	SS 8.2	

3.2.2 Alat dan Bahan Ekstraksi DNA

Bahan yang digunakan dalam ekstraksi DNA adalah nitrogen cair digunakan untuk melisis jaringan tanaman (daun) dan dinding sel, buffer lisis A (*lysis buffer A*) dan buffer lisis B (*lysis buffer B*) digunakan untuk melisis sampel dari jaringan, RNase A digunakan untuk memisahkan RNA, protein dan polisakarida dipresipitaskan atau diendapkan dengan larutan presipitasi (*Presipitation Solution*), selanjutnya hasil lisis dicampur dengan larutan pengikat DNA tanaman (*plant gDNA binding solution*) dan ethanol 96% untuk mengikat DNA, pengotor-pengotor DNA dimurnikan dengan menggunakan buffer pencuci A (*wash buffer A*) dan buffer pencuci B (*wash buffer B*), DNA kemudian disimpan dalam kondisi tegangan ion rendah dengan *elution buffer*,

Alat yang digunakan dalam ekstraksi adalah timbangan, piring untuk timbangan, mortar dan penumbuknya, spatula, pipet, gelas ukur, tips dan microsentrifuge tube, vortex, sentrifuge, oven dan *freezer*.

3.2.3 Alat dan Bahan PCR

Bahan yang digunakan dalam proses PCR adalah Taq polimerase, dd H₂O, primer, DNA template sedangkan alat yang digunakan adalah mesin PCR, tube PCR, tip dan micropipet. Primer yang digunakan dalam amplifikasi yaitu:

Tabel 3. Daftar Primer RAPD dan Kombinasi Gabungan 2 Primer RAPD

No.	Primer	5' Sequence 3'	Sumber
1.	OP A-08	GTGACGTAGG	
2.	OP B-10	CTGCTGGGAC	
3.	OP L-08	AGCAGGTGGA	
4.	OP O-04	AAGTCCGCTC	
5.	OP O-11	GACAGGAGGT	
6.	OP O-12	CAGTGCTGTG	
7.	OP P-08	ACATCGCCCA	
8.	OP P-11	AACGCGTCGG	
9.	OP P-13	GGAGTGCCCTC	
10.	OPAI-11	ACGGCGATGA	Amadou <i>et al.</i> (2001)

Tabel 3. Daftar Primer RAPD dan Kombinasi Gabungan 2 Primer RAPD (lanjutan)

11.	OP A-07	GAAACGGGTG	
12.	OP B-08	GTCCACACGG	
13.	OP L-12	GGGCGGTACT	
14.	OP P-04	GTGTCTCAGG	
15.	OP P-15	GGAAGCCAAC	
16.	OP P-19	GGGAAGGACA	Amadou <i>et al.</i> (2001);
17.	OPAI-15	GACACAGCCC	Mukakalisa (2010)
18.	OP A-04	AATCGGGCTG	
19.	OP C-02	GTGAGGCGTC	
20.	OP C-05	GATGACCGCC	
21.	OP C-08	TGGACCGGTG	
22.	OP D-20	ACCCGGTCAC	
23.	OP F-12	ACGGTACCAG	
24.	OP F-13	GGCTGCAGAA	
25.	OP H-14	ACCAGGTTGG	
26.	OP H-15	AATGGCGCAG	
27.	OP K-16	GAGCGTCGAA	
28.	OPAA-16	GGAACCCACA	
29.	OPAB-14	AAGTGCACC	
30.	OPAL-08	GTCGCCCTCA	
31.	OPAU-03	ACGAAACGGG	Rungnoi <i>et al.</i> (2012)
32.	OPO 04 x OPB 10		
33.	OPB 10 x OPA 07		
34.	OPA 07 x OPL 12		
35.	OPO 04 x OPL 12		
36.	OPH 15 x OPK 16		
37.	OPK 16 x OPC 02		
38.	OPC 02 x OPD 20		
39.	OPH 15 x OPD 20		

Kombinasi Gabungan
2 Primer

3.2.4 Alat dan Bahan Elektroforesis

Bahan yang digunakan dalam elektroforesis adalah DNA marker, sampel DNA hasil amplifikasi, gel agarosa 1,0% (0,4 gram), larutan *buffer* TAE 25x 20 ml, aquades 480 ml, *loading dye*, dan larutan *Etidium Bromid* (EtBr) sebagai pewarna.

Alat yang digunakan adalah timbangan, spatula, gelas ukur, labu erlenmeyer, sarung tangan, oven, seperangkat mikropipet beserta tipnya, kertas parafilm, cetakan agarose, sisir agarose, baki elektroforesis, *gel doc*, dan kamera digital.

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Pelaksanaan Pengecambahan Benih Kacang Bogor

Benih kacang bogor mula-mula dikecambahkan di cawan petri dengan menggunakan metode UDK (Uji Diatas Kertas) dengan menggunakan alas kertas merang. Perkecambahan ini bertujuan untuk mengecambahkan benih sampai muncul daun yang cukup untuk digunakan sebagai bahan ekstraksi DNA. Setiap cawan terdiri atas 10 benih kacang bogor yang berasal dari 1 galur, ada 25 galur yang dijadikan sebagai bahan sehingga ada sebanyak 25 cawan petri yang digunakan untuk mengecambahkan benih. Sampel yang digunakan dalam tahap selanjutnya diambil 1 dari 10 benih yang dikecambahkan sebagai perwakilan.

3.3.2 Pelaksanaan Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengacu pada protokol yang ada pada produk *GeneJet Plant Genomic DNA Purification Mini Kit* yang diadaptasi dari prinsip ekstraksi DNA oleh Doyle dan Doyle (1987). Protokol ekstraksi DNA yaitu sebagai berikut:

1. Menggerus 100 mg daun kacang bogor dengan nitrogen cair
2. Memasukkan hasil gerusan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml
3. Menambahkan 350 μ L *Lysis Buffer A* dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml
4. Menghomogenkan campuran dengan vortex
5. Menambahkan 50 μ L *Lysis Buffer B* dan 20 μ L *RNAse A*
6. Menginkubasi selama 10 menit pada suhu 65°C
7. Menambahkan 130 μ L larutan presipitasi (*Presipitation Solution*)
8. Menghomogenkan secara perlahan sebanyak 2-3 kali
9. Menginkubasi selama 5 menit pada *freezer*
10. Sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm
11. Memasukkan supernatan volume antara 450-550 μ L dalam *microcentrifuge tube* baru
12. Menambahkan 400 μ L Larutan pengikat gDNA tanaman (*Plant gDNA Binding Solution*)
13. Menambahkan 400 μ L ethanol 96% dan dihomogenkan
14. Memindahkan larutan ekstraksi sebanyak 600-700 μ L ke dalam *tube filter*
15. Sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm

16. Membuang larutan yang lolos dari filter
17. Memasukkan sisa larutan ekstraksi dari *microcentrifuge* tube ke dalam tube filter
18. Sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm
19. Membuang larutan yang lolos dari filter
20. Menambahkan 500 μ L *Wash Buffer* I ke dalam *tube* filter
21. Sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm
22. Membuang larutan yang lolos dari filter
23. Menambahkan 500 μ L *Wash Buffer* II ke dalam *tube* filter
24. Sentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14.000 rpm
25. Membuang larutan yang lolos dari filter
26. Sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8.000 rpm
27. Membuang *tube* penampung yang berisi larutan dan mengganti dengan tube baru
28. Menambahkan 100 μ L *Elution Buffer* ke dalam *tube* filter
29. Menginkubasi pada suhu ruang selama 5 menit
30. Sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 10.000 rpm
31. Larutan DNA adalah larutan yang lolos dari filter
32. Menyimpan dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml dalam *freezer*

3.3.3 Pelaksanaan PCR (*Polimerisation Chain Reaction*)

31 primer RAPD dan 8 kombinasi campuran 2 primer RAPD digunakan dalam *screening* awal dengan sampel sebanyak 3 sampel yang memiliki karakter yang berbeda untuk menentukan primer yang akan digunakan dalam PCR terhadap seluruh sampel kacang bogor. Dari *screening* pendahuluan akan didapatkan primer yang memiliki persentase amplifikasi dan jumlah band polimorfik paling baik yang selanjutnya primer tersebut akan digunakan dalam PCR sampel total.

3.3.3.1 Pengenceran Primer

Pengenceran primer dilakukan dengan tahap sebagai berikut:

1. Pengenceran primer tahap I dilakukan dengan menambahkan AE elution buffer sebanyak volume rekomendasi masing-masing primer dalam tube primer dengan konsentrasi menjadi 10% dari konsentrasi semula

2. Primer yang sudah diencerkan kemudian divortex agar homogen
3. Hasil pengenceran tahap I kemudian diencerkan lagi menjadi 10% dengan volume campuran 100 μ L primer ditambahkan 900 μ L AE elution buffer.
4. Hasil pengenceran tahap I disimpan di freezer sedangkan hasil pengenceran tahap II digunakan dalam proses PCR

3.3.3.2 Pelaksanaan PCR

Proses PCR sebagai berikut:

1. Menghomogenkan seluruh bahan terdiri atas Taq polimerase 10 μ L per tube PCR, ddH₂O 7 μ L per tube PCR, primer 1 μ L per tube PCR, dan dna 1 μ L per tube PCR dengan vortex, dilanjutkan dengan sentrifuge dan kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR.
2. Melakukan pemanasan pertama selama 2 menit pada suhu 94°C (Rungnoi *et. al.* 2012) dan dilanjutkan dengan 35 siklus PCR yang terbagi atas 3 fase yaitu denaturasi, annealing, dan ekstensi, sebagai berikut:
 - a. Denaturasi dilakukan dengan pemanasan pada suhu 94°C selama 30 detik. Pada suhu ini DNA utas ganda akan memisah menjadi utas tunggal (Rungnoi *et. al.* 2012),
 - b. Annealing atau penempelan primer dilakukan dengan menurunkan suhu denaturasi ke suhu annealing 35°C selama 30 detik (Rungnoi *et. al.* 2012) untuk memberikan kesempatan bagi primer untuk menempel pada DNA template,
 - c. Ekstensi atau pemanjangan, dilakukan dengan menaikkan suhu ke kisaran suhu kerja optimum enzim DNA polimerase. Suhu diatur mencapai 72°C selama 1 menit (Rungnoi *et.al.* 2012). Pada tahap ini DNA polimerase akan memasang dNTP (dNTP penyusun DNA yang baru terdiri atas 4 macam sesuai dengan basa penyusun DNA, yaitu dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) yang sesuai pada pasangannya.
3. Inkubasi pada suhu 72°C selama 10 menit dan DNA hasil amplifikasi telah didapatkan (Rungnoi *et.al.* 2012).

3.3.4 Pelaksanaan Elektroforesis Gel Agarosa

1. Menyiapkan alat dan bahan
2. Pengenceran TAE 25x menjadi TAE 1x dengan penambahan 480 ml aquades
3. Membuat gel agarosa 1% 0,4 g agarose untuk pengecekan DNA dan 1,5% 0,6 g agarose untuk melihat hasil PCR dengan bufer TAE 1x hingga volume 40 ml selanjutnya larutan agarose dididihkan di oven selama 1 menit sambil tiap 30 detik diambil dan dikocok hingga agarose larut sempurna.
4. Menyiapkan baki agarose dan sisir yang digunakan sebagai cetakan media beserta baki elektroforesisnya.
5. Memasang sisir elektroforesis pada salah satu ujung baki dengan posisi sisir hampir menyentuh dasar baki
6. Jika suhu larutan agarose sudah turun ditandai dengan sudah tidak adanya asap panas dari larutan agarose selanjutnya larutan agarose dituangkan ke dalam cetakan agarose dan didiamkan hingga mengeras di cetakan
7. Setelah agarose memadat, sisir diambil dengan hati-hati sehingga membentuk sumur
8. Baki agarose dimasukkan dalam tangki elektroforesis yang berisi buffer TAE 1x hingga seluruh permukaannya terendam buffer TAE 1x
9. Mencampurkan 5 μ l sampel DNA dan 1 μ l *loading dye* secara merata pada kertas parafilm dengan mikropipet kemudian memasukkannya ke dalam sumuran gel agarose
10. Memasukkan DNA sesuai dengan nomer sampel ke dalam sumuran agarose
11. Memasangkan kabel dari sumuran arus ke tangki elektroforesis dengan menyambungkan kutub negatif dekat dengan sumuran
12. Mengatur voltase sekitar 50 volt sehingga waktu running sekitar 45 menit.
13. Melepaskan sumber arus dan mengeluarkan gel agarose dari baki
14. Agarose dengan hasil running DNA kemudian direndam pada larutan TAE 1x dan Etidium Bromida (Et.Br) selama 10-15 menit

15. Agarose diangkat dari rendaman dan diletakkan di kaca *gel doc* yang terhubung dengan seperangkat komputer untuk melihat hasil pita-pita DNA yang akan tervisualisasi dan mendokumentasikan hasil.

3.4 Variabel Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan mengamati jumlah band (pita) yang terbentuk, jumlah band yang polimorfik dengan marker DNA yang sudah diketahui susunan *basepair*nya. Setiap band yang polimorfik dengan marker diberikan skor 1 dan jika tidak muncul diberikan skor 0, perhitungan koefisien kemiripan dan perhitungan jarak genetik.

3.5 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan penafsiran dan interpretasi band (pita) yang didapatkan dan mentransformasi data kedalam data biner (0 dan 1) pada satu posisi yang sama antar sampel. Band yang dipakai dalam data untuk analisis adalah band yang stabil atau telah diulangi. Secara prinsip, perhitungan koefisien kemiripan dapat dihitung dengan rumus koefisien kesamaan Nei dan Li (1979) sebagai berikut:

$$S_{xy} = \frac{2N_{xy}}{N_x + N_y}$$

Keterangan rumus:

S_{xy} = koefisien kesamaan genetik

N_{xy} = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu x dan individu y

N_x = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu x

N_y = Jumlah larik yang dihasilkan oleh individu y

Hasil perhitungan tersebut berupa koefisien kemiripan yang dimasukkan dalam matriks koefisien dan digunakan untuk membentuk dendrogram UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages*). Perhitungan koefisien kemiripan dan jarak genetik dalam UPGMA dendrogram dan matriks koefisien kemiripan dan jarak genetik juga dapat dilakukan dengan menggunakan software NTSYS pc 2.0. Hasil analisis kekerabatan dengan teknik RAPD kemudian dibandingkan dengan hasil dari analisis kekerabatan menggunakan penanda karakter morfologi.