

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Agustus 2017 di Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Tanaman (BB BIOGEN) Bogor, Jawa Barat.

3.2 Cara Kerja

3.2.1 Penanaman Padi

3.2.1.1 Persemaian

Persemaian dilakukan pada padi yang terbukti tahan kekeringan pada penelitian sebelumnya sebanyak 28 biji tiap nomor terpilih. Benih padi dikecambahkan didalam air hangat dan diinkubasi selama 24 jam. Benih yang berhasil diimbibisi akan terbentuk radikula. Biji yang telah tumbuh dipindah ke dalam media padat dengan perbandingan 1:1 antara tanah dan kompos dan disiram selalu selama satu minggu di dalam wadah botol bekas minuman 200 mL.

3.2.1.2 Penanaman

Penanaman dilakukan setelah satu minggu ditanam di botol gelas plastik dan dipindahkan ke dalam bak berukuran 0,5x2,5 m dengan perbandingan media yang sama. Satu bak diisi sesuai dengan Lampiran 1. Benih ditanam dengan jarak 2-3cm antar benih. Penanaman diaklimatisasi selama satu minggu di dalam rumah kaca.

3.2.1.3 Penyiraman fase vegetatif

Penyiraman dilakukan selama empat hari agar tanaman dapat tumbuh dengan normal sebelum diberikan cekaman. Air yang diberikan dengan takaran yang sama yaitu 2 L per bak. Pada kondisi normal tanaman disiram dengan takaran normal tiap hari.

3.2.1.4 Perlakuan cekaman kekeringan dan skoring pada masa vegetatif

Perlakuan kekeringan ketika padi sudah memasuki tahap 2 pertumbuhannya atau ketika anakan pertama mulai muncul. Perlakuan cekaman kekeringan dilakukan selama dua minggu di dalam rumah kaca. Perlakuan cekaman dilakukan dengan cara tidak menyiram air

selama dua minggu. *Skoring* dilakukan sesuai dengan *Standart Evaluation System for Rice* (SES) yang setiap harinya selama proses cekaman kekeringan fase vegetatif. Setelah pengeringan tanaman disiram dan diaklimatisasi selama satu minggu.

3.2.1.5 Perlakuan kekeringan pada masa generatif

Perlakuan kekeringan masa generatif dilakukan ketika tanaman sudah memasuki tahap 4 atau ketika tahap pembentukan malai dan kondisi kekeringan dipertahankan hingga panen.

3.2.2 Pengamatan

3.2.2.1 Fase vegetatif

Pengamatan fase vegetatif pada fase pengeringan antara lain:

1. Skoring gejala mengeringnya daun

Skoring daun yang mengering dengan *Standart Evaluation System for Rice* (SES) 2014 pada Tabel 1 terdapat gejala dan kategori yang ditimbulkan oleh tanaman tersebut.

Tabel 1. Skor respon tanaman terhadap cekaman kekeringan berdasarkan gejala megeringnya daun dengan SES

Skala	Gejala	Kategori
0	Tidak ada gejala daun mengering	Sangat toleran
1	Ujung daun mengering	Toleran
3	¼ ujung daun mengering	Agak toleran
5	¼-½ ujung daun ada yang kering	Agak peka
7	½ - 2/3 ujung daun ada yang kering	Peka
9	Semua daun mengering	Sangat peka

2. Skoring daun menggulung

Skoring daun yang menggulung dengan *Standart Evaluation System for Rice* (SES) 2014 pada tabel 2 terdapat gejala dan kategori yang ditimbulkan oleh tanaman tersebut.

Tabel 2. Skor respon tanaman terhadap cekaman kekeringan berdasarkan menggulungnya daun dengan SES

Skala	Gejala	Kategori
0	Daun sehat	Sangat toleran
1	Daun mulai menggulung (bentuk v dangkal)	Toleran
3	Daun menggulung (bentuk v dalam)	Agak toleran
5	Daun menggulung bentuk U	Agak peka
7	Daun menggulung dimana tepi daun saling menyentuh (bentuk 0)	Peka
9	Daun menggulung penuh	Sangat peka

3. Skoring tanaman yang tumbuh kembali
 Skoring daun yang mengering dengan *Standart Evaluation System for Rice* (SES) 2014 pada tabel 1 terdapat gejala dan kategori yang ditimbulkan oleh tanaman tersebut.

Tabel 3. Skor respon tanaman terhadap cekaman kekeringan berdasarkan tanaman tersebut tumbuh kembali dengan SES

Skala	Gejala
1	$\geq 90\%$ tumbuh kembali
3	50-90% tanaman tumbuh kembali
5	40-50% tanaman tumbuh kembali
7	$<40\%$ tanaman tumbuh kembali
9	Tanaman mati atau tidak tumbuh

4. Panjang tajuk
 Panjang tajuk diukur mulai dari pangkal akar hingga ujung daun tertinggi.

3.2.2.2 Fase Generatif

Pengamatan fase generatif pada fase pengeringan antara lain:

1. Skoring daun mengering

Skoring daun yang mengering dengan *Standart Evaluation System for Rice* (SES) 2014 pada tabel 1 terdapat gejala dan kategori yang ditimbulkan oleh tanaman tersebut.

2. Skoring daun menggulung

Skoring daun yang menggulung dengan *Standart Evaluation System for Rice* (SES) 2014 pada tabel 2 terdapat gejala dan kategori yang ditimbulkan oleh tanaman tersebut.

3. Panjang tajuk

Panjang tajuk diukur mulai dari pangkal akar hingga ujung daun tertinggi.

4. Jumlah anakan

Jumlah anakan produktif dilihat dari anakan yang tumbuh dengan baik dan menghasilkan malai dengan gabah yang baik

3.2.3 Pengamatan Marka Molekuler dengan Metode *Simple Sequence Repeat* (SSR)

3.2.3.1 Isolasi DNA

Sebanyak 100mg daun hijau segar diambil (bukan daun bendera). Daun diberi nitrogen cair dan kemudian digerus. Kemudian diberi *Buffer extract* berupa CTAB sebanyak 800 μ L dan ditambah 0.38 μ L Na-disulfid. Inkubasi dalam *waterbath* suhu 65°C selama 15 menit. Sampel daun diinkubasi 65°C selama 30 menit. Sampel daun yang telah diinkubasi ditambahkan CI (Chloroform:Isoamil alcohol = 24:1) 800 μ L kemudian divortex. Sampel daun disentrifugasi 12000rpm, 4°C selama 15 menit dan diambil supernatannya.

Supernatan diambil sebanyak 450 μ L ditambah NaO asetat sebanyak 1/10 volume supernatan (45 μ L). Ditambahkan 900 μ L (2 kali volume supernatan) etanol absolut dingin dan didiamkan di *freezer* selama minimal 1 jam kemudian disentrifugasi 12000 rpm, 4°C selama 10 menit dan diambil pelletnya. Pellet dicuci dengan Etanol 70% dingin 12000rpm, 4°C selama 5 menit kemudian dikeringkan di atas tisu dengan keadaan *tube* terbalik selama satu malam. Pelet yang kering ditambah RNAse 50 μ L dan 20 μ L buffer TE pH 7.6 dan disimpan dalam suhu -20°C.

DNA yang telah diisolasi diuji kualitatif dan kuantitatif dengan agarose 1% dan elektroforesis selama 110 menit pada arus 1A. Uji kuantitatif dibantu dengan alat nanodrop serta diencerkan sesuai dengan konsentrasi DNA yang terkandung.

3.2.3.2 PCR

DNA hasil pengenceran 200ng/ μ L diambil dan dicampurkan dengan PCR mix yang dibuat dengan komposisi untuk 1 PCR tube (2 μ L 10x PCR buffer, 2 μ L dNTPs, 0.1 μ L MgCl₂, 0.5 μ L GC Rich, 1 μ L primer, 0.2 μ L Taq-polimerase, 12.2 μ L ddH₂O, 2 μ L DNA). Primer yang digunakan RM13596 dan RM 13599 dan QTLs qRPF2.1 dengan ukuran 99. Kemudian sampel DNA di-*running* dan diatur pada lima tahap. Tahap I pada suhu 94°C selama 5 menit, Tahap II 94°C selama 45 detik, Tahap III 55°C selama 45 detik, tahap IV pada suhu 72°C selama 1 menit 45 detik (tahap II-IV diulang sebanyak 34 kali) dan terakhir tahap V pada suhu 70 selama 10 menit.

3.2.3.3 Elektroforesis gel

Elektroforesis gel dimulai dari pembuatan gel poli akrilamida. Gel dibuat dengan dicampurkannya 50 mL akrilamid 8% (premix), ditambah 500 μ L APS 10% dan 50 μ L TEMED kemudian dihomogenkan. Sebelum gel mengeras seketika itu dituangkan ke dalam cetakan gel elektroforesis dan diberi sisiran sesuai ukuran yang dibutuhkan kemudian dibiarkan mengeras atau hingga warna menjadi sedikit buram. Sampel yang telah ditambah *loading dye* dimasukkan ke dalam PCR tube sebanyak 1 μ L. *well* telah diisi dengan sampel DNA maka di-*running* selama 110 menit pada arus 1A.

3.2.3.3 Pewarnaan pita DNA

3.2.3.3.1 EtBr

Gel hasil elektroforesis dikeluarkan dari cetakannya. Pewarnaan gel dibuat dengan menyampurkan 100-200 mL ddH₂O dengan 60 μ L EtBr 10% dan dihomogenkan. Gel yang sudah dilepas dari cetakannya, perlahan dipindah ke baki berisi EtBr dan digojok selama 10 menit. Gel yang telah digojok dengan EtBr kemudian dibilas dengan cara digojok selama lima menit. Setelah itu didokumentasikan dengan UV menggunakan Bio-Rad dan aplikasi Quantity One.

3.2.3.3.2 Silver Staining

Gel hasil elektroforesis dikeluarkan dari cetakan. Persiapan pewarnaan gel dibuat dengan mencampurkan 0.2 g AgNO₃ dengan 200mL ddH₂O kemudian di-*stirer* dan dipindahkan ke dalam baki. Gel elektroforesis yang telah dikeluarkan dari cetakannya digojok dengan larutan AgNO₃ sampai pita-pita DNA terlihat dan diperhatikan jangan sampai terlalu gelap terwarnai karna akan sulit untuk mengamati hasil yang didapatkan. Gel kemudian diamati di atas meja dengan penerangan khusus untuk melihat jelas hasil pewarnaan.

3.2.4 Menyeleksi Hasil Persilangan

Seleksi dilakukan dengan cara mengamati hasil *foreground* dari seluruh sampel yang memiliki seluruh gen target. Hasil *foreground* akan dilanjutkan dengan seleksi *background* yang menggunakan sebanyak-banyaknya gen yang terkait kepada kromosom tetua pemulih. Hasil *background* akan dievaluasi dengan hasil daya tahan tanaman pada cekaman kekeringan di rumah kaca.

3.3 Analisis Data Hasil Amplifikasi DNA

Hasil amplifikasi dianalisis dengan aplikasi *Genome Genotyping* (GGT). Aplikasi GGT berfungsi untuk memetakan hasil amplifikasi sesuai dengan profil kromosomnya. Cara menggunakan aplikasi ini ialah seluruh hasil amplifikasi yang telah di-*scoring* dimasukkan ke dalam *sheet* beserta posisi primer dan keberadaannya di dalam kromosom (dari website gramene.org).