

## BAB III

### BAHAN DAN CARA KERJA

#### A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Gen BPPT Serpong, selama 13 bulan dari April 2007 sampai Mei 2008.

#### B. BAHAN

##### 1. Sampel

Daun yang digunakan adalah daun muda (daun pertama pada pucuk) jarak pagar (*Jatropha curcas*) dari daerah Padang, Merauke, Kupang, Jayapura, Kendari, Purwakarta, Gunung Kidul, Tangerang, dan daun karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) klon PB 260 (*outgroup*) (koleksi BPPT, Serpong).

##### 2. Bahan

###### a. Isolasi DNA

Bahan habis pakai yang digunakan adalah *buffer* TE (Tris HCl:EDTA), kloroform isoamilalkohol (24:1), *buffer* ekstraksi (CTAB 2% [MERCK], EDTA 0,02 M pH 8,0, Tris HCl 0,1 M pH 8,0, NaCl 1,26 M, H<sub>2</sub>O steril, merkaptoetanol 1%, nitrogen cair, isopropanol, etanol absolut, dan alkohol

70%, sodium asetat, PVP [SIGMA], enzim RNase [Boehringer Mannheim, QBiogene], agarosa [Bio-rad], *buffer* TBE 0,5x, kertas parafilm [American National Can], *loading buffer*, dan SYBR safe [Invitrogen].

b. *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP)

Bahan yang digunakan untuk proses AFLP adalah enzim *EcoRI* [Invitrogen] dan *MseI* [Invitrogen], 5x *buffer* reaksi, akuades, larutan adapter ligasi, enzim T4 DNA ligase [Invitrogen], *buffer* TE, campuran primer pre-amplifikasi, 10x *buffer* PCR dengan  $MgCl_2$ , enzim *Long PCR mix* [Fermentas], 2 mM dNTP [Fermentas], primer *EcoRI*, dan primer *MseI*.

c. Elektroforesis gel poliakrilamid

Bahan yang digunakan adalah *acrylamide* [Bio Basic], *methylene bis-acrylamide* [Pharmacia Biotech],  $H_2O$ , *buffer* TBE 10x, ammonium persulfat [Pharmacia Biotech] 1,6%, dan TEMED [Pharmacia Biotech]. Bahan untuk gel *loading buffer* adalah *formamide dye*, dan gliserol [MP Biomedicals].

d. Perwarna *silver*

Bahan yang digunakan adalah *fix/stop solution* (10% asam asetat glasial [Merck]), *staining solution* dibuat dengan melarutkan *silver nitrate* [Promega] sebanyak 2 g dalam 2 l ddH<sub>2</sub>O dan menambahkan *formaldehyde* [Promega] 37% sebanyak 3 ml, *developing solution* dibuat dengan melarutkan *sodium carbonate* [Promega] sebanyak 60 g dalam 2 l ddH<sub>2</sub>O,

kemudian ditambahkan *sodium thiosulfate* [Promega] sebanyak 400  $\mu$ l dan *formaldehyde* 37% sebanyak 3 ml sesaat sebelum digunakan, *bind silane* [Pharmacia Biotech], etanol absolut [Merck], asam asetat [Merck] 0,5%, *repeel silane* [Pharmacia Biotech], tisu, dan kertas saring Whatman.

### C. PERALATAN

Alat yang digunakan adalah pipet mikro 0,1--2  $\mu$ l, 2--20  $\mu$ l, 20--200  $\mu$ l, 100--1.000  $\mu$ l [Finnipipette, Bio-rad, Gilson], tip 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1.000  $\mu$ l [Axygen], *freezer* -20° C [Angelantoni Scientifica], lemari pendingin 4° C [Sharp & Iberna], mesin PCR [TaKaRa], *thermostat & shaking bath* [Heto], *shaker* [Heto], tabung sentrifugasi 15 ml [Iwaki], tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml [Eppendorf], tabung mikrosentrifugasi 200  $\mu$ l [Axygen], desikator, pompa vakum [Kartell], rak tabung, mesin sentrifugasi [Beckman J2-HS, Tomy], timbangan [Mettler], vorteks [Heidolph], inkubator [Sanyo], *heat block* [VWR], spatula, gunting, elektroforesis *tray* [Bio-rad], *Sequi-Gen® GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell* [Bio-rad], *plastic tray*, *gel dryer* [HSI], *chamber* elektroforesis [Bio-rad], *scanner* [UMAX], *comb*, *sharktooth comb*, *gel documentation*, dan mortar. Alat gelas yang digunakan adalah gelas ukur, labu Erlenmeyer 250 ml, gelas Beaker 200 ml, dan tabung penyimpanan bahan 200 ml [Schott] serta peralatan gelas yang umum digunakan di Laboratorium Genetika.

## D. CARA KERJA

Skema kerja secara umum dapat dilihat pada Gambar 7.

### 1. Isolasi DNA genom

#### a. Isolasi DNA genom tanaman

Metode isolasi berdasarkan metode isolasi Bosquet (1990) (*lihat Roy dkk. 1992: 174*) dengan modifikasi. Daun dicuci dengan air mengalir lalu daun diiris, ditimbang beratnya, dan diletakkan ke dalam mortar. Sampel daun ditambahkan bahan PVP sebanyak 0,1 g. Sampel dan PVP ditumbuk secara perlahan sampai bahan PVP melekat pada sampel. Nitrogen cair dituangkan ke dalam mortar sampai sampel terendam, lalu sampel digerus sampai halus. *Buffer* ekstraksi dipanaskan dengan menggunakan alat *thermostat* dan *shaking bath* dengan suhu 65° C selama 30 menit. *Buffer* ekstraksi bersuhu 65° C ditambahkan ke dalam mortar yang berisi sampel. Sampel diaduk sampai membentuk pasta, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi 15 ml. Sampel kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 65° C.

Sampel didiamkan pada suhu ruang selama beberapa menit, kemudian sampel ditambahkan kloroform isoamilalkohol (24:1) sebanyak volume sampel (*equal volume*). Larutan dihomogenkan dengan menggunakan vorteks. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Langkah berikutnya adalah fase cair bagian

atas dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi berukuran 15 ml dan ditambahkan kloroform isoamilalkohol (24:1) sebanyak volume sampel . Larutan dihomogenkan dengan menggunakan alat vorteks. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Penambahan kloroform isoamilalkohol (24:1) sebanyak volume sampel kemudian diulangi satu kali lagi.

Fase cairan bagian atas setelah disentrifugasi, dipindahkan ke dalam tabung sentrifugasi 15 ml, kemudian ditambahkan dengan isopropanol sebanyak volume sampel. Tabung kemudian dibolak-balik secara perlahan. Sampel kemudian diinkubasi pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Sampel kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 15 menit. Hasil sentrifugasi berupa pelet. Pelet kemudian dikeringkan dengan pompa vakum selama 15 menit.

Pelet yang telah kering ditambahkan *buffer* TE sebanyak 500  $\mu\text{l}$  agar larut. Pelarutan pelet dapat dipercepat dengan memanaskan larutan pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$  dengan alat *thermostat* dan *shaking bath*. Setelah pelet larut, larutan dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Sampel kemudian ditambahkan sodium asetat sebanyak 50  $\mu\text{l}$  (1/10 volume) dan etanol absolut sebanyak 1.000  $\mu\text{l}$  (2 kali volume). Tabung dibolak-balik secara perlahan, kemudian sampel diinkubasi pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.

Langkah berikut adalah sampel disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Pelet yang didapatkan kemudian ditambahkan

dengan alkohol 70% sebanyak 200  $\mu$ l. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Pencucian dengan alkohol 70% dilakukan dua kali.

Pelet kemudian dikeringkan dengan menggunakan pompa vakum selama 15 menit. Setelah pelet kering, pelet ditambahkan *buffer* TE sebanyak 200  $\mu$ l. Pelet dipanaskan dengan alat *heatblock* dengan suhu 50° C untuk mempercepat pelarutan pelet.

Larutan DNA kemudian ditambahkan enzim RNase sebanyak 2  $\mu$ l (1/100 volume) dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam. Sampel kemudian ditambahkan kloroform isoamilalkohol (24:1) sebanyak 200  $\mu$ l. Larutan dihomogenkan dengan vorteks, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Cairan bagian atas kemudian dipindahkan pada tabung baru. Sampel kemudian ditambahkan isopropanol dengan volume yang sama dengan sampel. Tabung dibolak-balik perlahan kemudian diinkubasi pada suhu -20° C selama 30 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Pelet dikeringkan dengan vakum selama 15 menit. Setelah pelet kering kemudian ditambahkan *buffer* TE sebanyak 200  $\mu$ l, tabung dipanaskan pada suhu 50° C dengan *heatblock* sampai pelet larut.

#### b. Elektroforesis gel agarosa

Hasil isolasi DNA diuji dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% menurut Sambrook dan Russell (2001: 5.6; 5.9--5.13). Langkah pertama

elektroforesis gel agarosa adalah bahan agarosa ditimbang sebanyak 0,2 g dan dilarutkan dengan *buffer* TBE 0,5x sebanyak 25 ml di dalam labu Erlenmeyer. Larutan agarosa kemudian dipanaskan dengan *microwave* selama 30 detik. Gel agarosa didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Gel agarosa ditambahkan SYBR *safe* sebanyak 0,25  $\mu$ l. Gel agarosa dicetak ke dalam cetakan agarosa dan didiamkan agar membeku pada suhu ruang selama satu jam.

Gel agarosa yang telah dibekukan selama satu jam siap untuk digunakan. Gel agarosa diletakkan pada *chamber* elektroforesis yang telah diisi dengan *running buffer* TBE 0,5x. *Loading buffer* sebanyak 1  $\mu$ l dicampur dengan akuabides sebanyak 3  $\mu$ l dan sampel sebanyak 2  $\mu$ l. Pencampuran dilakukan di atas kertas parafilm. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam sumur pada gel agarosa. Marka yang digunakan adalah marka  $\lambda$  HindIII. Marka sebanyak 4  $\mu$ l dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa. Elektroforesis dilakukan dengan voltase 100 volt selama 20 menit. Hasil elektroforesis kemudian dilihat di bawah sinar UV.

Hasil positif elektroforesis gel agarosa adalah munculnya pita yang berpendar jika gel dilihat di bawah sinar UV. Hasil negatif elektroforesis gel agarosa adalah tidak adanya pita yang berpendar jika gel agarosa dilihat di bawah sinar UV. Analisis data dilakukan dengan cara membandingkan pita yang muncul dari sampel dengan *marker* sehingga dapat diketahui ukuran DNA jarak pagar yang didapatkan. Ketebalan dan intensitas keterangan pita DNA sampel dibandingkan dengan marka  $\lambda$  HindIII berukuran 23 kb yang

telah diketahui konsentrasinya. Perbandingan dilakukan dengan bantuan *software* Bio1D, sehingga didapatkan perbandingan ketebalan pita sampel dengan marka  $\lambda$  *HindIII*. Perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 1. Hasil isolasi DNA jarak pagar yang didapatkan disimpan pada suhu 4° C, dan dapat digunakan untuk aplikasi selanjutnya.

## 2. *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP)

### a. Digesti genom

Digesti genom dilakukan menurut Invitrogen (2003: 6). Digesti genom dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI/MseI*. Sampel genom (250 ng dalam  $\leq 18 \mu\text{l}$ ), enzim *EcoRI/MseI* (2  $\mu\text{l}$ ), 5x *buffer* reaksi (5  $\mu\text{l}$ ), dan ddH<sub>2</sub>O sampai volume 25  $\mu\text{l}$  dicampurkan di dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml. Campuran kemudian dicampur secara perlahan dan disentrifugasi singkat untuk menurunkan seluruh cairan dalam tabung. Sampel diinkubasi dalam inkubator selama 2 jam dengan suhu 37° C. Inkubasi sampel selama 15 menit pada suhu 70° C dilakukan untuk menginaktivasi enzim. Tabung diletakkan dalam kotak es sampai tahap selanjutnya.

### b. Ligasi adapter

Ligasi adapter dilakukan menurut Invitrogen (2003: 7). Sampel yang telah didigesti ditambahkan larutan ligasi adapter (24  $\mu\text{l}$ ) dan enzim T4 DNA ligase (1  $\mu\text{l}$ ). Sampel dicampur perlahan, disentrifugasi, kemudian diinkubasi



pada suhu  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam. Sampel diencerkan 10 kali dengan mengambil 10  $\mu\text{l}$  sampel kemudian dipindahkan ke tabung mikrosentrifugasi 1,5  $\mu\text{l}$  dan dilarutkan dengan 90  $\mu\text{l}$  *buffer* TE. Sisa sampel dapat disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### c. Preamplifikasi

Preamplifikasi dilakukan menurut Invitrogen (2003: 7) dengan modifikasi yaitu penambahan 2 mM dNTP. Preamplifikasi dilakukan dengan cara mencampurkan sampel DNA (16  $\mu\text{l}$ ), *pre-amp primer mix* (26  $\mu\text{l}$ ), 10x *buffer* PCR dengan  $\text{Mg}^{2+}$  (5  $\mu\text{l}$ ), 2 mM dNTP sebanyak 2,5  $\mu\text{l}$ , dan enzim *Long PCR Taq DNA polymerase* (5 unit/ $\mu\text{l}$ ) sebanyak 0,5  $\mu\text{l}$  di dalam tabung mikrosentrifugasi 200  $\mu\text{l}$ . Larutan dicampur secara perlahan. Sampel dimasukkan ke dalam mesin PCR [Takara] dengan 20 siklus seperti  $94^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik,  $56^{\circ}\text{C}$  selama 60 detik, dan  $72^{\circ}\text{C}$  selama 60 detik dengan temperatur akhir  $4^{\circ}\text{C}$  (Gambar 5). Hasil preamplifikasi disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  di *freezer*. Sebelum digunakan sebagai cetakan pada amplifikasi selektif, hasil preamplifikasi sebanyak 3  $\mu\text{l}$  diencerkan dengan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 2  $\mu\text{l}$ .

### e. Amplifikasi selektif

Amplifikasi selektif dilakukan menurut Invitrogen (2003: 8). Langkah pertama adalah membuat campuran pertama dengan komposisi primer *EcoRI* sebanyak 5  $\mu\text{l}$  dan primer *Msel* sebanyak 45  $\mu\text{l}$ . Campuran kedua

memiliki komposisi ddH<sub>2</sub>O sebanyak 79 µl, 10x *buffer* PCR sebanyak 20 µl, dan enzim *Taq* DNA *polymerase* 5 unit/µl sebanyak 1 µl. Reaksi amplifikasi dilakukan pada tabung mikrosentrifugasi 200 µl dengan komposisi DNA sampel hasil preamplifikasi yang telah diencerkan sebanyak 5 µl, campuran pertama sebanyak 5 µl, dan campuran kedua sebanyak 10 µl (Lampiran 7). Larutan dicampur perlahan. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR [Takara]. Program yang digunakan adalah sebagai berikut: satu siklus 94° C selama 30 detik, 65° C selama 30 detik dan 72° C selama 60° C. Tahap berikutnya suhu *annealing* diturunkan 0,7° C selama 12 siklus dan sisa 23 siklus dilakukan dengan suhu 94° C selama 30 detik, suhu 56° C selama 30 detik, dan suhu 72° C selama 60 detik dan diakhiri dengan suhu 4° C (Gambar 6).

### 3. Analisis gel

#### a. Elektroforesis gel poliakrilamid

Hasil amplifikasi selektif kemudian dianalisis dengan menggunakan elektroforesis gel poliakrilamid menurut Sambrook dan Russell (2001: 12.74--12.80). Langkah pertama adalah menyiapkan alat pencetak gel. Alat-alat pencetak gel terdiri atas dua buah lempeng kaca, dua buah pemisah, dan dua buah penjepit kaca. Gel poliakrilamid 6% dapat dibuat dengan cara mencampurkan 13,3 ml *acrylamide:methylenabisacrylamide* 45% (29:1), 41,4 ml ddH<sub>2</sub>O, 10x TBE 10 ml, dan urea 40 g. Larutan diinkubasi pada suhu 55°

C sampai seluruh urea larut. *Ammonium persulfate* 1,6% sebanyak 3,3 ml dan TEMED sebanyak 50 µl ditambahkan pada larutan gel dan diaduk selama 5 menit.

Pencetak gel disiapkan dengan cara, kaca panjang diberi campuran larutan *bind silane*, etanol absolut, asam asetat glasial sebanyak 1 ml dan disebar merata pada permukaan kaca dengan menggunakan tisu. Setelah 5 menit kaca diberi etanol absolut sebanyak 2 ml dan dilap dengan tisu. Pencucian dengan etanol dilakukan sebanyak 3 kali. Kaca pendek yang terhubung dengan tangki *buffer* diberi *repel silane* sebanyak 2 ml dan disebar merata pada seluruh permukaan kaca dengan tisu. Setelah 10 menit, kaca diberi ddH<sub>2</sub>O dan dilap dengan tisu.

Pencetak gel dirancang dengan cara, meletakkan pemisah setebal 0,4 mm diletakkan di atas kaca pendek. Kaca panjang diletakkan di atas kaca pendek dan pemisah. Kedua lempeng kaca kemudian dijepit dengan penjepit pada kedua sisi, kemudian bagian bawah kaca ditahan dengan menggunakan karet silikon. Pencetak gel diletakkan secara horizontal. Campuran gel dimasukkan ke pencetak gel dengan menggunakan syringe 60 ml. Gel kemudian didiamkan selama 30--60 menit. *Sharktooth comb* diangkat secara perlahan ketika gel sudah mengeras dan bagian *comb* yang tajam dimasukkan ke dalam gel 1 mm, sehingga terbentuk *well* yang rata.

Gel diletakkan pada tangki elektroforesis. Penampungan *buffer* atas diisi dengan 500 ml *buffer* 1x TBE, sedangkan penampungan *buffer* bawah diisi dengan 350 ml *buffer* 1x TBE. Sampel DNA dicampur dengan

*formamide dye* (20  $\mu$ l). Sampel didenaturasi pada suhu 94° C selama 5 menit kemudian langsung diletakkan ke dalam es. Sampel dimasukkan ke dalam *well* dengan *tips* dan mikropipet sebanyak 3  $\mu$ l. Elektroforesis dilakukan selama 3 jam 40 menit dengan daya 40 W. Setelah elektroforesis selesai, *buffer* dipindahkan dari tempat penampungan. Pemisah dan kedua kaca dilepaskan lalu gel menempel pada kaca panjang. Gel dan kaca dipindahkan ke dalam *plastic tray* untuk proses *staining*.

b. *Silver staining*

*Silver staining* digunakan mendeteksi DNA yang telah dielektroforesis. *Silver staining* dilakukan menurut Promega (2005: 10--12). Langkah pertama adalah gel diletakkan pada tempat *staining* dan ditambahkan *fix solution* sebanyak 1 l, kemudian digoyang 70 rpm secara perlahan selama 20 menit dengan alat *shaker* [Heto]. *Fix solution* kemudian dibuang dan gel dicuci dengan menggunakan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 1 l, lalu gel digoyang 70 rpm selama 2 menit. Pencucian dengan ddH<sub>2</sub>O dilakukan sebanyak tiga kali. Sebelum dilakukan pencucian berikutnya, gel dibiarkan mengering selama 10--20 detik.

Gel kemudian ditambahkan *staining solution* sebanyak 1 l dan digoyang 70 rpm selama 30 menit. Selama gel dalam *staining solution*, *developing solution* ditambahkan *formaldehyde* 37% sebanyak 3 ml dan *sodium thiosulfate* sebanyak 400  $\mu$ l, kemudian *developing solution* didinginkan dalam kotak es atau *freezer* sampai suhu 10° C.

Setelah 30 menit *staining solution* ditampung, kemudian gel dicuci dengan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 1 l, lalu air dibuang dan dimasukkan *developing solution* sebanyak 1 l. Proses pencucian gel dengan air sampai penambahan *developing solution* tidak lebih dari 10 detik. Gel digoyang 70 rpm sampai pita pertama muncul, kemudian *developing solution* dibuang dan ditambahkan *developing solution* baru sebanyak 1 l. Gel digoyang 70 rpm sampai seluruh pita terlihat. Setelah seluruh pita terlihat, *stop solution* ditambahkan langsung ke *developing solution* dan digoyang 70 rpm selama 3 menit.

Setelah 3 menit, larutan dibuang, gel dicuci dua kali dengan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 1 l dan digoyang 70 rpm selama 2 menit. Gel dibiarkan kering selama 1 hari kemudian dipindai dengan *scanner* [UMAX]. Gel yang telah dipindai kemudian direndam dalam NaOH 10% selama 30 menit, kemudian kertas saring dilekatkan pada seluruh permukaan gel, sehingga gel terangkat dari kaca dan menempel pada kertas saring. Gel yang telah menempel pada kertas saring dikeringkan dengan *gel dryer* selama 30 menit.

#### 4. Analisis pita AFLP

Hasil perwarnaan silver adalah pita-pita DNA yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi selektif. Analisis pita AFLP dilakukan dengan memberikan angka 1 untuk keberadaan pita dan angka 0 untuk tidak adanya pita pada tabel data binari. Jumlah seluruh pita dan baris yang mengandung

pita polimorfis dihitung, kemudian persentase polimorfisme dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase polimorfisme (\%)} = \frac{\sum \text{baris dengan pita polimorfis}}{\sum \text{baris dengan seluruh pita}} \times 100\%$$

Pita polimorfis adalah pita yang tidak terdapat seluruh sampel (Chen *dkk.* 2004: 160). Interpretasi pita dilakukan untuk mempermudah dalam melihat lokasi pita-pita spesifik. Data binari seluruh primer yang mengandung pita polimorfis dimasukkan ke dalam program *phylogenetic analysis using parsimony* (PAUP\*) dalam format *nexus*. Analisis data binari menghasilkan dendogram dengan nilai bootstrap (1.000 kali replikasi). Dendogram dilihat dengan menggunakan program *tree view*.