

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

A. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong selama 9 bulan (Maret 2008--November 2008).

B. BAHAN

1. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah organ daun padi (*Oryza sativa* L.) kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi berumur 2 bulan (Gambar 4). Tanaman padi tersebut ditanam dan dikoleksi oleh kelompok padi Puslit Biotek LIPI, Cibinong.

2. *Buffer* isolasi DNA genom padi

Komposisi larutan *buffer* isolasi DNA metode Cornell (Cornell University 1994: 1--7) dapat dilihat pada Lampiran 1.

3. Vektor proses pengklonaan

Vektor proses pengklonaan yang digunakan dalam penelitian adalah pGEM-T *Easy* [Promega].

4. Primer

Primer yang digunakan dalam proses PCR gradien dan PCR standar adalah sebagai berikut:

LEAP F: 5'ATGAATTCACGAAAGGGCCTCCATAACCTACG3'

LEAP R: 5'CAAGATCTACCATTGATCCTAAGCTTCAAAAATTAAC3'

Posisi penempelan primer dapat dilihat pada Gambar 5.

5. Larutan dan *buffer*

Semua larutan dan *buffer* (termasuk komposisinya) yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Lampiran 2.

6. Kultur bakteri

Kultur bakteri yang digunakan dalam penelitian adalah *Escherichia coli* strain DH5 α yang ditumbuhkan dalam medium Luria Bertani (LB).

7. Medium

Semua medium (termasuk komposisinya) yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Lampiran 2.

8. Bahan kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan selama penelitian yaitu nitrogen cair; natrium klorida (NaCl) [Sigma]; etanol [Merck]; Tris-Cl [Ultra Pure];

ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) [Merck]; *loading dye* 6x; isopropanol [Merck]; bubuk agarosa [Sigma]; kloroform [Merck]; etidium bromida (EtBr) [Sigma]; trise base [Sigma]; *sodium dodesil sulfat* (SDS) [Promega]; asam klorida (HCl) [Merck]; natrium oksida (NaOH) [Merck]; magnesium klorida ($MgCl_2$) [Merck]; *acetic acid glacial* (GAA) [Merck]; enzim *EcoRI* [Fermentas]; enzim *BglII* [Fermentas]; *buffer* Orange [Fermentas]; marka λ *HindIII* [Fermentas]; PCR kit GoTaq Green M712B *mastermix* 2x [Promega]; *nuclease free water* [USB Corporation]; *Illustra GFX PCR DNA & Band Purification* [GE Health Care]; kertas Glossy [Mitsubishi]; tisu [Paseo]; aluminium foil [Total]; RNase [Promega]. Larutan-larutan dan *buffer* yang digunakan selama penelitian adalah NaCl 5 M, HCl 1 M; Tris Cl 1 M; TE pH 8; TBE 5x; TBE 0,5x; gel agarosa 0,8%; *solution* I; *solution* II; *solution* III; larutan kalsium klorida ($CaCl_2$); serta medium Luria Bertani (LB) padat dan cair.

C. PERALATAN

Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah pipet mikro [Eppendorf] berukuran 10 μ l--1 ml; *hotplate* [Thermocline CIMAREC No. 25X]; oven [GFL 1601]; autoklaf [All American No. 25X]; perangkat elektroforesis [Midicell EC 350]; perangkat dokumentasi [Bio Rad (Gel Doc 1000)]; *laminar airflow*; pH meter [Corning 430]; tabung polipropilene [Nalgene]; sentrifugasi [Sorvall RC 26 plus]; rotor [Sorval SA-600]; timbangan digital [Precise 202]; *microwave* [Panasonic]; oven [GFL 7601]; inkubator

[ROSI 1000]; vorteks; rotator [Tomy PMC 860 & 060]; PCR [Whatman Biometra T-Gradient]; mortar; spatula; pinset berbagai ukuran dan peralatan gelas [Duran, Iwaki, dan Pyrex] yang umum digunakan di Laboratorium Biologi Molekuler Bioteknologi LIPI Cibinong.

D. CARA KERJA

Skema cara kerja secara umum dapat dilihat pada Gambar 6.

1. Penyejajaran sekuen dan desain primer

Sekuen primer promotor gen *lea3* didesain berdasarkan sekuen promotor gen *HVA-like* dari padi kultivar IRAT 109 (GenBank Acc. No. DQ837728) serta telah disesuaikan dengan sekuen BAC kromosom No. 5 padi kultivar Nipponbare (GenBank Acc. No. AC104713). Sekuen primer juga didesain dengan mengikutsertakan *start codon* (ATG) dari sekuen mRNA gen *lea3* (GenBank Acc. No. DQ789359) pada situs <http://www.ncbi.nlm.gov> serta penambahan sekuen *EcoRI* ($G^{\downarrow}AATTC$) dan *BglII* ($A^{\downarrow}GATCT$). Sekuen primer yang telah didesain disejajarkan dengan sekuen acuan dan dikoreksi menggunakan *software* DNAMAN (Lampiran 3).

1. Isolasi DNA genom tanaman padi kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi

Isolasi DNA genom tanaman padi dilakukan menurut metode Cornell University (1994: 1--7) yang telah dioptimasi oleh Kelompok Peneliti Padi,

Puslit Biotek LIPI, Cibinong. Sampel daun padi diambil dari tanaman yang berumur 2 bulan. Sebanyak 2 g sampel daun dipreparasi menggunakan pembungkus *aluminium foil*.

Sebanyak 2 g daun padi diletakkan di dalam mortar kemudian ditambahkan nitrogen cair hingga daun membeku dan mengeras kemudian digerus hingga menjadi serbuk. Serbuk daun dimasukkan ke dalam tabung polipropilen 50 ml yang telah berisi larutan *buffer* isolasi sebanyak 10 ml. Larutan *buffer* isolasi telah dipanaskan terlebih dahulu pada oven dengan suhu 65° C selama 30 menit. Komposisi larutan *buffer* dapat dilihat pada Lampiran 1.

Tabung yang telah berisi *buffer* dan serbuk daun kemudian dibolak-balik secara perlahan hingga tercampur merata, lalu diinkubasi di dalam oven pada suhu 65° C selama 20 menit, dan tabung dibolak-balik setiap 5 menit sekali. Setelah 20 menit tabung dikeluarkan dan didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit. Tabung tersebut kemudian ditambahkan 10 ml larutan campuran kloroform isoamil (24:1), lalu tabung dibolak-balik perlahan sampai campuran merata dan terbentuk emulsi.

Tabung kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 4° C. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke tabung polipropilen baru yang steril, lalu ditambahkan 15 ml etanol absolut dingin. Tabung dibolak-balik perlahan hingga terbentuk untai DNA. Tabung kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 4° C.

Pelet yang terbentuk dicuci dengan 10 ml etanol 70% lalu tabung diputar perlahan. Etanol 70% kemudian dibuang perlahan dan tabung yang berisi pelet dibalikkan untuk mengeringkan pelet. Setelah kering, tabung berisi pelet kemudian ditambahkan 200--300 μ l Tris EDTA. Tabung berisi pelet tersebut mengandung DNA genom. Hasil isolasi DNA genom kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -20° C.

3. *Polymerase chain reaction* (PCR) gradien dan PCR standar

Teknik PCR digunakan untuk memperbanyak sekuen promotor LEA3 sepanjang 1.291 bp. Reaksi PCR gradien maupun PCR standar menggunakan *PCR kit Go Taq Green Master Mix 2x* dengan total volume reaksi sebanyak 25 μ l. Komposisi reaksi PCR ialah 6,5 μ l *nuclease free water*, 12,5 μ l *Go Taq Green Master 2x*, 2,5 μ l untuk masing-masing primer LEAP F (0,1 μ M) dan LEAP R (0,1 μ M) promotor gen *lea3*, serta 1 μ l *template* DNA hasil isolasi. Sampel DNA yang digunakan adalah sampel DNA dari padi kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi.

Sebelum primer LEAP F (0,1 μ M) dan LEAP R (0,1 μ M) digunakan, terlebih dahulu dilakukan optimasi terhadap suhu *annealing* menggunakan PCR gradien pada sampel padi kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi. Hasil PCR gradien terlihat pada elektroforesis gel agarosa 0,8% (b/v), 100 V, selama 30 menit. Pita dengan ketebalan paling baik menunjukkan bahwa suhu tersebut optimal untuk proses amplifikasi sehingga digunakan pada program PCR selanjutnya.

Tahap awal PCR gradien dilakukan dengan proses denaturasi awal pada suhu 95° C selama 3 menit. Tahap selanjutnya yaitu denaturasi pada suhu 95° C selama 1 menit. Proses *annealing* menggunakan suhu yang berbeda-beda, yaitu 44,8° C, 45,9° C, 47,5° C, 49,3° C, 51,1° C, 52,9° C, 54,7° C, 56,4° C, 58,1° C, dan 59,1° C. Proses PCR kemudian dilanjutkan dengan tahap polimerisasi awal pada suhu 72° C selama 1 menit kemudian dilanjutkan dengan polimerisasi akhir pada suhu 72° C selama 10 menit dan diakhiri dengan suhu 10° C. Hasil dari PCR gradien setelah divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% (b/v), 100 V, selama 1 jam memperlihatkan ketebalan pita yang paling baik pada kisaran suhu *annealing* 56,4° C. Proses PCR standar menggunakan suhu *annealing* 56° C.

Kondisi PCR standar diawali dengan denaturasi awal pada suhu 95° C selama 3 menit. Tahap selanjutnya yaitu denaturasi pada suhu 95° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 56° C selama 1 menit, dan polimerisasi awal pada suhu 72° C selama 1 menit. Ketiga tahap tersebut diulangi hingga 35 siklus. Tahap PCR kemudian dilanjutkan dengan polimerisasi akhir pada suhu 72° C selama 10 menit serta diakhiri dengan suhu 10° C. Hasil PCR standar terlihat pada elektroforesis gel agarosa 0,8% (b/v), 100 V, selama 1 jam. Hasil positif proses PCR menghasilkan pita tunggal berukuran ± 1.291 bp pada visualisasi gel agarosa 0,8%.

4. Purifikasi DNA hasil PCR menggunakan *Illustra PCR DNA & Gel Band Purification kit*

Purifikasi DNA hasil PCR menggunakan *Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification kit* berdasarkan GE Health Care (2007: 18--22). Tahap pertama ialah pemotongan gel agarosa yang mengandung fragmen DNA target, kemudian dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml. *Capture buffer* tipe 2 ditambahkan sebanyak 10 μ l untuk setiap 10 mg gel, kemudian diinkubasi selama 15 menit pada suhu 55°--65° C hingga gel larut.

Gel yang telah larut kemudian didinginkan pada suhu ruang. Larutan tersebut kemudian dilewatkan melalui kolom *GFX microspin* yang telah dipasang pada kolom koleksi. Tabung diinkubasi pada suhu ruang selama satu menit. Tabung kemudian disentrifugasi selama 30 detik dengan kecepatan 12.000 rpm. Cairan yang terdapat pada kolom koleksi kemudian dibuang. Sebanyak 500 μ l *wash buffer* tipe 1 ditambahkan pada kolom *GFX microspin*. Tabung kemudian disentrifugasi kembali selama 30 detik dengan kecepatan 12.000 rpm.

Kolom *GFX microspin* dipindahkan ke tabung Eppendorf 1,5 ml kemudian sebanyak 10--50 μ l *buffer* elusi ditambahkan ke dalam kolom *GFX microspin* melewati matriks kolom. Tabung berisi kolom DF diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang agar matriks kolom dapat menyerap *buffer* elusi. Tabung disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 23.000 rpm. Supernatan yang terbentuk pada tabung Eppendorf 1,5 ml merupakan DNA

murni hasil purifikasi. Hasil purifikasi DNA terlihat pada elektroforesis gel agarosa 0,8% (b/v), 100 V, selama 30 menit.

5. Ligasi vektor pGEM-T *Easy* dengan promoter gen *lea3*

Reaksi ligasi dibuat dalam tabung Eppendorf 1,5 ml berdasarkan metode Promega (2008: 9). Total volume reaksi ligasi sebanyak 10 μ l. Komposisi reaksi ligasi ialah 1 μ l *nuclease free water* (NFW), 5 μ l 2x *rapid ligation buffer* T4 DNA ligase, 1 μ l vektor pGEM-T *Easy*, 2 μ l insert promoter gen *lea3* hasil purifikasi PCR, dan 1 μ l T4 ligase. Tabung yang telah berisi campuran reaksi diinkubasi semalaman dalam lemari es pada suhu 4° C.

6. Pembuatan sel kompeten

Sel kompeten dibuat menurut Sambrook *dkk.* (1989: 1.8.1). Sel kompeten yang digunakan adalah sel *E. coli* DH5 α . *Escherichia coli* DH5 α ditumbuhkan pada media LB cair, kemudian diinkubasi semalaman dalam *shaker incubator* (200 rpm, 37° C). *Escherichia coli* DH5 α yang tumbuh kemudian disubkultur pada medium Luria Bertani (LB) (1% kultur diinokulasi pada 25 ml LB), kemudian diinkubasi selama 3 jam dalam *shaker incubator* (200 rpm, 37° C). Pertumbuhan sel dipantau melalui pembacaan densitas optik (*optical density/OD*) pada panjang gelombang 600 nm (OD₆₀₀) hingga mencapai 0,3 dengan menggunakan spektrofotometer.

Sebanyak 1,5 ml hasil subkultur dipindahkan pada tabung Eppendorf 1,5 ml. Tabung kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan

5.000 rpm. Pelet yang diperoleh kemudian diresuspensi dengan 1 ml larutan CaCl_2 dingin, kemudian diinkubasi dalam es selama 20 menit. Suspensi sel kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Pelet kemudian diresuspensi kembali dalam 200 μl larutan CaCl_2 dingin kemudian diinkubasi dalam es selama 10 menit.

7. Transformasi dengan *heat shock*, pengklonaan, dan seleksi hasil transforman

Proses transformasi dilakukan berdasarkan Sambrook *dkk.* (1989: 1.8.1). Sebanyak 3--5 μl DNA plasmid dan DNA hasil ligasi dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 200 μl sel kompeten kemudian diinkubasi dalam es selama 30 menit (setiap 15 menit tabung dijentik). Proses *heat shock* dilakukan pada suhu 42°C selama 1 menit dan tabung langsung dimasukkan ke dalam es selama 2 menit. Sel kemudian dipulihkan dengan menambahkan 250 μl LB cair dan diinkubasi dalam *shaker incubator* (200 rpm, 37°C) selama 1 jam.

Seluruh campuran kemudian disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 5.000 rpm. Pelet yang terbentuk kemudian diresuspensi dalam 200 μl LB cair dan dicawakan pada media LB padat /IPTG/X-Gal yang telah ditambahkan antibiotik ampisilin (50 mg/ml), kemudian diinkubasi semalaman dalam inkubator pada suhu 37°C . Koloni berwarna putih yang tumbuh pada medium LB+ampisilin+IPTG/X-Gal merupakan *E. coli* DH5 α yang membawa plasmid rekombinan yang mengandung sisipan promoter gen *lea3*.

8. Isolasi DNA plasmid rekombinan

Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan metode *alkaline lysis solution* menurut Sambrook *dkk.* (1989: 1.38). Tahap pertama dalam isolasi plasmid adalah menumbuhkan bakteri pada 100 ml medium LB cair yang mengandung antibiotik ampisilin (50 mg/ml) dalam *shaker incubator* (200 rpm, 37° C). Kultur bakteri diinkubasi selama 16 jam kemudian dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml. Kultur bakteri tersebut disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 4° C. Supernatan yang terbentuk dibuang sehingga hanya tersisa pelet. Pelet kemudian ditambahkan 100 µl *solution* I dan divorteks sampai homogen. Sebanyak 200 µl *solution* II ditambahkan dan dikocok perlahan hingga menjadi sedikit kental. Sebanyak 150 µl *solution* III (dalam keadaan dingin) ditambahkan, lalu dikocok hingga homogen, kemudian diinkubasi dalam es selama 15 menit.

Tabung kemudian disentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan ke tabung baru, kemudian ditambahkan 450 µl larutan campuran fenol, kloroform, dan isoamil alkohol dengan perbandingan 25: 24: 1. Tabung yang berisi campuran tersebut dikocok kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 9.000 rpm pada suhu 4° C. Supernatan yang terbentuk kemudian diambil dan dipindahkan ke tabung baru.

Supernatan yang telah dipindahkan kemudian ditambahkan 1 ml etanol absolut. Sebanyak 50 μ l CH_3COONa 3 M ditambahkan dan kemudian diinkubasi dalam es selama 30 menit. Tabung kemudian disentrifugasi selama 4 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4° C. Supernatan yang terbentuk dibuang sehingga hanya tersisa pelet dan kemudian ditambahkan 500 μ l etanol 70%. Tabung tersebut disentrifugasi kembali selama 4 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4° C. Supernatan yang terbentuk dibuang kembali sehingga hanya tersisa pelet, kemudian dikeringanginkan selama 15 menit. Sebanyak 40 μ l Tris EDTA dan 1 μ l RNase ditambahkan ke dalam tabung. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -20° C.

9. Verifikasi DNA plasmid rekombinan dengan proses digesti menggunakan enzim *EcoRI*

Proses verifikasi dilakukan dengan proses digesti menurut Ausubel *dkk.* (2002: 3.1.1) menggunakan enzim *EcoRI*. Reaksi digesti dibuat dengan total volume reaksi sebanyak 20 μ l. Komposisi reaksi restriksi ialah 2 μ l DNA plasmad rekombinan, 2 μ l *buffer EcoRI*, 0,5 μ l enzim *EcoRI* dan 15,5 μ l *nuclease free water* (NFW) yang dimasukkan ke tabung Eppendorf 1,5 ml. Tabung tersebut kemudian diinkubasi semalaman pada suhu 37° C. Hasil restriksi dapat dilihat dengan teknik elektroforesis gel agarosa 0,8% (b/v), 100 V, selama 1 jam.

10. Sequencing dan analisis sekuen

Sequencing sampel plasmid rekombinan di Departemen Bioteknologi P.T. Charoen Pokphand Indonesia. Sebelum dilakukan proses *sequencing* plasmid rekombinan dipurifikasi dengan *Illustra PCR DNA & Gel Band Purification kit* sesuai cara kerja 4. Urutan nukleotida hasil *sequencing* berupa sekuen *forward* dan *reverse* disatukan untuk mendapatkan sekuen promoter gen *lea3* yang lengkap menggunakan bantuan *software* DNAMAN. Hasil dari penyatuan sekuen dari masing-masing kultivar dibandingkan dengan sekuen acuan promoter gen *HVA-like* dari kultivar IRAT 109 (GenBank Acc. No. DQ837728) menggunakan *penyejajaran ganda (multiple alignment)* dengan bantuan *software* DNAMAN. Data sekuen yang diperoleh juga dibandingkan dengan database DNA GenBank melalui program BLASTN pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov untuk mengetahui similaritas sekuen yang diperoleh dengan sekuen acuan.