

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 (September 2007--Mei 2008).

B. BAHAN

1. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah organ daun dari tanaman generasi pertama (T0) dan generasi kedua (T1) padi (*O. sativa* L.) kultivar Nipponbare ras Japonica hasil transformasi T-DNA yang mengandung transposon *Ac/Ds* pembawa *activation tag*. Tanaman padi tersebut dikoleksi oleh kelompok padi Puslit Biotek LIPI, Cibinong.

2. Isolasi DNA

Komposisi larutan *buffer* isolasi DNA metode Cornell dapat dilihat pada Lampiran 1, sedangkan metode Van Heusden pada Lampiran 2.

3. Primer

Primer yang digunakan dalam PCR eksisi untuk mengetahui aktivitas transposon *Ds* adalah sebagai berikut :

RB-pMO G22-F (P1): 5'-GGAAACGACAATCTGATCTCTAGG-3'

Ac-Prom-R (P2): 5'-AACGAAACGGGATCATCCCG-3'

Ac-Lj-R (P3): 5'-CTCAGTGGTTATGGATGGGAGTTG-3'.

Posisi penempelan primer P1, P2, dan P3 dapat dilihat pada Gambar 4.

4. Larutan dan *buffer*

Semua larutan dan *buffer* (termasuk komposisinya) yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Lampiran 4.

5. Bahan kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan selama penelitian yaitu nitrogen cair, Na-klorida [Sigma], Na-hidroksida [Merck], Na-sitrat [Merck], Na-fosfat [Merck], etanol [Merck], Tris-Cl [Ultra Pure], EDTA (*ethylenediamine-tetraacetic acid*) [Merck], kloroform [Merck], *loading dye* 10x, isopropanol [Merck], agarosa [Sigma], EtBr (*etidium bromida*) [Sigma], *tris base* [Sigma], SDS (*sodium dodecil sulphat*) [Promega], asam klorida [Merck], magnesium klorida [Merck], enzim *EcoRI* [Fermentas], *buffer EcoRI* [Fermentas], RNase [Promega], marka λ *HindIII* [Fermentas & Promega], *one phor all buffer* [Pharmacia], urea [Merck], CDP *star* (*chemiluminescent detection of alkaline*

phosphatase) [Amersham Biosciences], larutan *developer* [ILFORD ILFOTEC LC29], *fixer* [ILFORD ILFOTEC LC29], *acetic acid glacial* (GAA) [Merck], higromisin [Roche], gelatin [Sigma], Triton x-100 [Merck], enzim *BamHI* [Promega], PCR kit *GoTaq Green M712B master-mix 2x* [Promega], *nuclease free water* [USB Corporation], *basta* [150 WSC], *blocking reagent* [Amersham Biosciences], gel/PCR DNA *fragments extraction kit* [Geneaid], kertas *glossy* [Mitsubishi], tisu [Paseo], *blotting paper* [Hybond], nilon *membranes* bermuatan positif (Hybond-N⁺) [Roche], aluminium foil [Total], dan KODAK Biomax *light film* [Sigma].

C. PERALATAN

Peralatan yang digunakan pada penelitian adalah timbangan digital [Precisa], autoklaf [All American No. 25X], oven [GFL 1601], inkubator [ROSI 1000], *hotplate* [Thermocline CIMAREC 2], *stirrer*, penggerus *pastle*, pH meter [Corning 320], pipet mikro [Eppendorf dan Gilson] berukuran 10 µL--1mL, tabung polipropilene [Nalgene] berukuran 50 ml, tabung polipropilene [Axygen] berukuran 1,5 dan 0,2 ml, pinset berbagai ukuran, sentrifus Sorvall [RC 26 plus, MC 12, dan RMC 14], rotator [Boekel Orbitron II 260250], *hipercasette* [Amersham Biosciences Biosciences], *transilluminator* [Dark Reader], *capsulefuge* [TOMY PMC 860], spektrofotometer Du 650 [Beckman], PCR [BIOMETRA T-Gradient], perangkat elektroforesis [Minicell EC 250], *power supply* [Mini EC 370 M & EC 250-90], perangkat dokumentasi hasil elektroforesis Bio Rad [Gel Doc 10000], mesin ABI Prism 310 *Genetic*

Analyzer, serta semua peralatan gelas [Duran, Iwaki, dan Pirex] yang umum digunakan di Laboratorium Biologi Molekuler Bioteknologi LIPI, Cibinong.

D. CARA KERJA

1. Isolasi DNA genom tanaman padi T0 dengan metode Cornell

Isolasi DNA genom tanaman padi T0 dilakukan berdasarkan metode Cornell (1994: 1--7) dengan proses yang telah dioptimasi oleh Kelompok Padi, Puslit Biotek LIPI, Cibinong. Sampel daun padi diambil dari tanaman T0 padi berusia 2 bulan yang ditanam di rumah kaca di Puslit Biotek LIPI, Cibinong. Sampel daun padi dipreparasi dalam *aluminium foil* masing-masing sebanyak 2 g dan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -45°C .

Sebanyak 2 g daun padi diletakkan dalam mortar kemudian ditambahkan nitrogen cair ± 10 ml sehingga daun membeku dan mengeras lalu digerus hingga menjadi bubuk daun. Bubuk tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabung polipropilene 50 ml yang telah berisi larutan *buffer* isolasi sebanyak 10 ml. Larutan *buffer* isolasi sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 65°C selama 30 menit. Tabung tersebut dibolak-balik secara perlahan hingga tercampur secara merata, lalu diinkubasi di dalam oven pada suhu 55°C selama 20 menit, dan tabung dibolak-balik setiap 5 menit sekali. Setelah 20 menit, tabung tersebut dikeluarkan dan didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit.

Sebanyak 10 ml larutan kloroform isoamil (24:1) ditambahkan ke dalam tabung berisi sampel daun padi dan *buffer* tersebut, kemudian tabung diputar dengan tangan secara perlahan sampai semua campuran tercampur dengan rata. Tabung disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 6.000 rpm dan suhu 4° C. Supernatan yang terbentuk kemudian dipindahkan ke dalam tabung polipropilene baru yang steril, lalu ditambahkan sebanyak 15 ml etanol absolut dingin. Tabung dibolak-balik secara perlahan-lahan hingga terbentuk untai DNA kemudian disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 6.000 rpm dan suhu 4° C.

Supernatan yang terbentuk dibuang secara perlahan-lahan supaya pelet tidak ikut terbang. Pelet yang terbentuk dicuci dengan etanol 70% sebanyak 10 ml dengan cara menambahnya ke atas pelet lalu tabung diputar dengan tangan secara perlahan. Supernatan yang terbentuk dibuang, lalu tabung tersebut dibalikkan untuk mengeringkan pelet dari supernatan. Sebanyak 200--300 µl Tris-EDTA ditambahkan ke dalam tabung, lalu DNA disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu -20° C.

2. Digesti DNA genom tanaman padi T0 dengan enzim restriksi

Sampel DNA tanaman padi T0 yang telah berhasil diisolasi kemudian didigesti dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Proses digesti dilakukan dengan menggunakan metode Sambrook *dkk.* (1989: 5.1).

a. Cara kerja digesti untuk pengujian kualitas DNA

Reaksi digesti dibuat dengan mencampurkan 2 μl *buffer EcoRI*, 2 μl sampel DNA, 0,5 μl enzim restriksi *EcoRI*, dan akuades dengan total volume 20 μl . Campuran tersebut dihomogenisasikan selama beberapa detik pada *capsulefuge* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dalam inkubator.

b. Cara kerja digesti untuk analisis *Southern hybridization*

Reaksi digesti dibuat dengan mencampurkan 5 μl *buffer EcoRI*, 35 μl sampel DNA, 1 μl enzim restriksi *EcoRI*, dan akuades dengan total volume 50 μl . Campuran tersebut dihomogenisasikan selama beberapa detik pada *capsulefuge* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam dalam inkubator.

3. *Southern hybridization* dengan probe *hpt*

a. Elektroforesis DNA hasil digesti pada gel agarosa

Sampel DNA tanaman padi hasil restriksi kemudian digunakan untuk *Southern hybridization* dilakukan dengan metode Sambrook *dkk.* (1989: 9.34). Sampel yang akan dielektroforesis telah direstriksi dengan enzim restriksi *EcoRI* selama 18 jam. Elektroforesis dilakukan pada gel agarosa 0,8%, 25 V selama 18 jam, sebanyak 20 μl marka λ *HindIII*, 10 μl kontrol positif fragmen *hpt* (*hygromycin phosphotransferase*), 7 μl kontrol positif plasmid pMO, dan 35 μl sampel DNA yang telah didigesti.

b. Pencucian gel dengan larutan depurinasi, denaturasi, dan netralisasi

Gel hasil elektroforesis kemudian dicuci dan diputar pada rotator dengan 200 ml larutan EtBr selama 15 menit, 300 ml akuades selama 10 menit, 300 ml akuades selama 5 menit, 500 ml depurinasi 15 menit, 300 ml akuades selama 20 menit, 250 ml denaturasi 20 menit dua kali, 300 ml akuades 20 menit, dan 250 ml netralisasi 20 menit dua kali.

c. Transfer pita DNA dari gel ke membran selama 18 jam (*blotting*)

Kertas saring (*blotting paper*) berukuran (15,5 x 38) cm² sebanyak 2 lembar diletakkan pada bak *blotting* membentuk jembatan dan ditumpuk dengan 1 lembar kertas saring berukuran (15 x 20) cm². Kertas saring tersebut diratakan di atas kaca dengan larutan *sodium chloride-sodium citrate* (SSC) 20x. Gel yang telah dicuci, diletakkan di atas kertas saring pada bak *blotting*. Satu lembar membran nilon bermuatan positif diletakkan di atas gel dan diratakan dengan larutan SSC 2x. Sebanyak dua lembar kertas saring kecil diletakkan di atas membran dan diratakan dengan larutan SSC 2x. Sebanyak tiga *roll* tisu yang telah dipotong berukuran (15 x 20) cm² diletakkan di atas kertas saring pada bak *blotting* kemudian diberi pemberat di atasnya berupa buku tebal atau kaca. Sebanyak 300 ml SSC 20x dituangkan ke bak *blotting*. Tumpukan *blotting* dibiarkan selama kurang lebih 18 jam, sampai larutan SSC nampak terserap pada seluruh tisu.

Blotting diangkat lalu gel dicuci dengan EtBr selama 15 menit, dan akuades 10 menit. Gel diletakkan pada Gel Doc untuk memastikan bahwa semua pita sudah tertransfer pada membran. Membran kemudian dicuci dengan SSC 2x selama 15 menit lalu dikeringanginkan di atas kertas saring bersih. Membran diletakkan pada UV *crosslinker* selama 6 menit.

d. Isolasi fragmen *hpt* dari plasmid pTRA

Tahap awal yang dilakukan yaitu digesti plasmid pTRA dengan enzim restriksi *Bam*HI. Reaksi digesti dibuat dengan mencampurkan 2 μ l *buffer* [one for all], 2 μ l plasmid pTRA 15', 1 μ l enzim restriksi *Bam*HI, dan akuades dengan total volume 20 μ l. Campuran tersebut dihomogenisasikan dengan *capsulefuge* lalu diinkubasi selama 24 jam, pada suhu 37° C dalam inkubator. Sampel hasil digesti lalu dielektroforesis dengan 2 μ l *loading dye*. Pita fragmen *hpt* pada gel dipotong di atas sinar UV lalu dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 1,5 ml yang beratnya telah ditimbang. Tabung tersebut kemudian ditimbang kembali untuk menghitung berat gel yang dimasukkan. Berat gel 300 mg yang mengandung fragmen *hpt* di dalam tabung siap diisolasi dengan kit Gel/PCR DNA *fragments extraction kit* (Geneaid 2003: 1). Prosedur isolasi fragmen adalah sebagai berikut:

(1) *Gel dissociation*

Gel ditambahkan dengan 500 μ l DF *buffer* lalu diinkubasi pada suhu 55° C selama 10--15 menit sampai gel larut. Tabung dibolak-balikkan setiap

2--3 menit sehingga gel melarut secara merata. Setelah larut, tabung dikeluarkan dan didinginkan pada suhu ruang selama \pm 3 menit.

(2) *DNA binding*

Gel yang telah dilarutkan (\pm 800 μ l) dipipet ke dalam DF *column* yang telah ditempatkan pada tabung lalu disentrifus selama 30 detik dengan kecepatan 13.000 rpm. Larutan pada tabung dibuang, lalu DF *column* ditempatkan kembali pada tabung.

(3) *Washing*

Sebanyak 600 μ l larutan *wash buffer* ditambahkan ke dalam DF *column* lalu disentrifus selama 30 detik dengan kecepatan 13.000 rpm. Larutan pada tabung dibuang, lalu DF *column* ditempatkan kembali pada tabung dan disentrifus kembali selama 3 menit dengan kecepatan 13.000 rpm untuk mengeringkan *column matrix*.

(4) *DNA elution*

Column tabung ditempatkan di atas tabung Eppendorf 1,5 ml dan ditambahkan 15--50 μ l *elution buffer* ke tengah-tengah *matrix*, lalu didiamkan selama 5 menit sampai semua *buffer* terserap dan masuk ke dalam tabung. Tabung tersebut kemudian disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 rpm untuk melarutkan *fragmen* yang diisolasi.

e. Pembuatan *probe hpt*

Pembuatan *probe* dilakukan sesuai dengan prosedur Amersham (2002: 2). Sebanyak 10 µl fragmen *hpt* didenaturasi dalam air mendidih selama 5 menit dan langsung dimasukkan ke dalam wadah berisi es selama 5 menit, lalu disentrifus dengan *capsulefuge*. *Probe* dibuat mengikuti prosedur yang terdapat pada kit *labelling and detection system*. Sebanyak 2 µl *labeling reagent* dan 10 µl *reaction buffer* dilarutkan ke dalam fragmen *hpt* yang telah didenaturasi lalu disentrifus dengan *capsulefuge*. Sebanyak 8 µl *working solution* dimasukkan ke dalam larutan fragmen tersebut lalu disentrifus dengan *capsulefuge* dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam.

f. Hibridisasi *probe hpt* terhadap membran selama 18 jam

Membran kemudian dimasukkan ke dalam botol hibridisasi yang telah berisi 25 ml kit *buffer* hibridisasi, 0,735 g NaCl, dan 1 g *blocking reagent*. Larutan tersebut sebelumnya telah diaduk secara perlahan dengan *hotplate* selama 1 jam pada suhu ruang, dan telah dipanaskan selama 1 jam dengan suhu 55° C di dalam oven. Membran dan *buffer* pada botol hibridisasi diputar selama 3 jam dengan suhu 55° C di dalam oven. Larutan *probe* dituangkan sebanyak 20 µl ke *buffer* yang terdapat pada botol hibridisasi. Selanjutnya, botol hibridisasi diletakkan horisontal pada alat pemutar dalam oven selama 18 jam dengan suhu 55° C.

g. *Expose* membran terhadap kertas film dalam kaset

Larutan *buffer* dikeluarkan dari botol hibridisasi, kemudian membran pada botol hibridisasi dicuci dua kali dengan larutan PWB sebanyak 50 ml selama 30 menit dan suhu 60° C dalam botol hibridisasi. Membran dikeluarkan dan dicuci dua kali dengan SWB 2x sebanyak 250 ml selama 10 menit dengan suhu ruang dalam *box plastic*. Membran diangkat dan dikeringanginkan di atas kertas saring bersih. Membran dibungkus dengan plastik tipis transparan setelah diteteskan 2 ml *chemiluminescent detection of alkaline phosphatase (CDP star)* secara merata, dan dibiarkan selama 5 menit. Membran diletakkan pada kaset yang telah berisi satu lembar kertas film kosong dan di-*expose* dalam ruang gelap minimal selama 4 jam.

h. Pencucian film dengan larutan *developer*, *stopper*, dan *fixer*

Kertas film dikeluarkan dari kaset di ruang gelap (hanya ada cahaya merah), lalu dicuci selama 5 menit dengan 300 ml larutan *developer*, 40 detik dengan 300 ml larutan *stopper*, 4 menit dengan 300 ml larutan *fixer*, dan dicuci dengan air sampai bersih. Pita *copy* T-DNA dapat dilihat pada kertas film yang dihasilkan.

4. Penanaman benih tanaman padi T1

Benih padi T1 dikecambahkan dalam botol selai selama 3 hari kemudian dilakukan uji GFP pada kecambah tersebut. Kecambah yang tumbuh kemudian ditanam di dalam *box* berisi tanah sebagai media tanam.

5. Isolasi DNA tanaman padi T1 dengan metode Van Heusden

Isolasi DNA tanaman padi T1 dilakukan berdasarkan metode Van Heusden (2000: 118--126). Sampel daun dari tanaman T1 berumur 1 bulan dipotong sepanjang ± 3 cm lalu dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf berukuran 1,5 ml. Daun digerus dengan menggunakan nitrogen cair dan *paste* (penggerus) hingga menjadi bubuk daun lalu ditambahkan *buffer* isolasi sebanyak 750 μ l. Tabung tersebut divorteks lalu diinkubasi pada suhu 65° C selama 1 jam.

Sebanyak 750 μ l larutan kloroform isoamil (24:1) ditambahkan ke dalam sampel, lalu dibolak-balik sampai membentuk emulsi dan disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang. Supernatan dipindahkan ke tabung steril yang baru, lalu ditambah 400 μ l isopropanol dingin dan dibolak-balik sampai terbentuk pita DNA. Sampel kemudian disentrifus selama 6 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Endapan DNA (pelet) yang terbentuk kemudian dicuci dengan alkohol 70% sebanyak 500 μ l. Pelet yang terbentuk dikeringanginkan selama 15 menit lalu ditambahkan TE

pH 8 sebanyak 30--50 μ l dan disimpan pada suhu -20° C (Van Heusden *dkk.* 2000: 118--126).

6. Pemeriksaan aktivitas transposon *Ds* pada tanaman padi T1 dengan metode PCR eksisi

Prosedur PCR eksisi pada DNA tanaman padi T1 dilakukan sesuai dengan prosedur Promega (2007: 1). Setiap sampel DNA diberi perlakuan dua reaksi yaitu dengan primer P1/P3 dan P1/P2. Reaksi PCR pertama yaitu 3,25 μ l *nuclease free water*, 6,25 μ l *PCR kit Go Taq green master* [Promega], dan 1,25 μ l *primer forward* RB-pMO G22-F (P1) ditambah dengan 1,25 μ l *primer reverse* Ac-Prom-R (P2), sedangkan reaksi PCR kedua dengan 1,25 μ l *primer reverse* Ac-Lj-R (P3). Sampel DNA masing-masing sebanyak 0,5 μ l kemudian dimasukkan ke dalam kedua reaksi PCR tersebut. Selain DNA sampel, dipersiapkan juga PCR pada DNA plasmid pMO sebagai kontrol positif, DNA tanaman Nipponbare sebagai kontrol negatif, dan air yang juga sebagai kontrol negatif. Program PCR eksisi dapat dilihat pada Tabel 1.

7. Uji seleksi

a. Uji GFP

Benih T1 ditumbuhkan selama 3 hari pada cawan berisi kertas saring yang dibasahi dengan akuades. Benih tersebut kemudian diamati di atas

cahaya transiluminator, di dalam ruang gelap. Benih yang berpendar hijau terang adalah yang positif mengandung gen *gfp*.

b. Uji higromisin

Daun pada tanaman padi T1 yang diujikan diberi tanda (X) untuk ditetesi dengan larutan kontrol dan tanda (—) untuk ditetesi dengan $\pm 10 \mu\text{l}$ larutan higromisin 0,2 mg/ml, lalu dilihat hasilnya setelah 2--3 hari setelah diberi perlakuan. Tanaman yang negatif gen *hpt*, akan mengalami nekrosis pada bagian daun yang diberi tanda (—) yaitu yang diberi perlakuan larutan higromisin, sedangkan tanaman yang positif mengandung gen *hpt* tidak mengalami nekrosis.

c. Uji basta

Ujung daun padi dicelupkan (± 1 menit) dalam larutan basta 0,2 mg/ml. Hasil uji basta dapat diamati setelah 2--3 hari kemudian. Daun yang diberi perlakuan diberi tanda (+), sedangkan yang tidak diberi perlakuan diberi tanda (-). Tanaman diindikasikan negatif gen *bar* jika mengalami nekrosis pada ujung daun yang diberi perlakuan, sedangkan tanaman yang positif gen *bar* tidak mengalami nekrosis.