

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

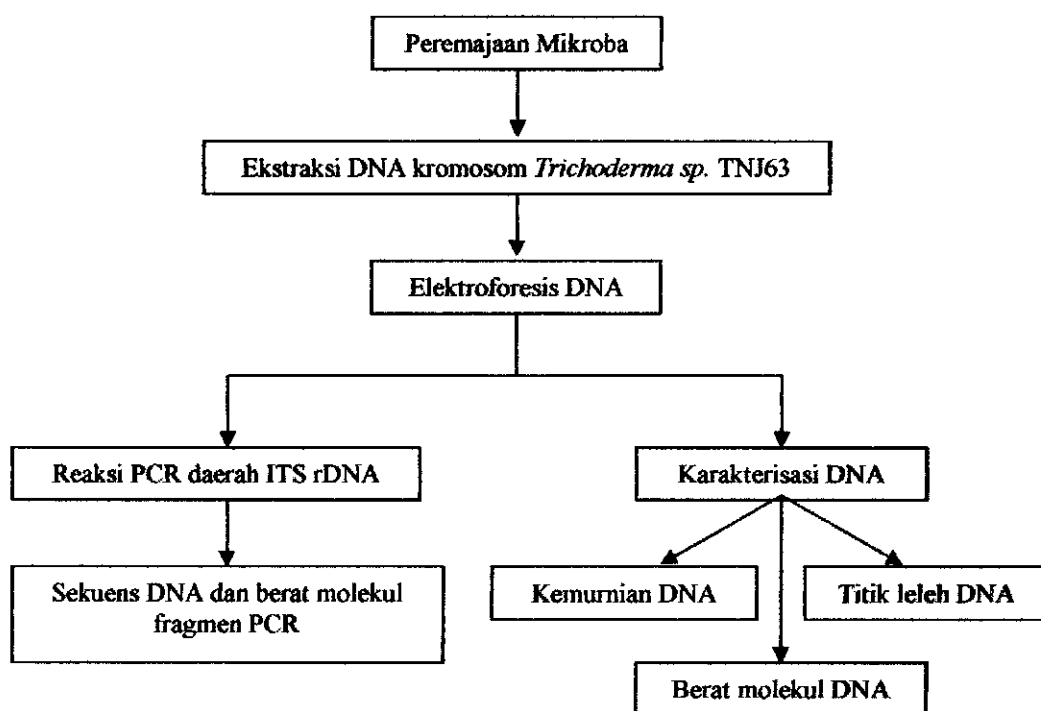
Peralatan yang digunakan adalah *Thermal cycler* model Eppendorf mastercycler 5330 ex. Eppendorf, Germany; *Tranluminator UV* model UVP TM-15 ex. UVP, Upland, USA; *Vortex Mixer Genie* model G-560E ex. Fischer scientific, USA; Unit gel elektroforesis horizontal (*submarine*) model Mini Sub™ Cell tipe 24E/1317 ex. Bio Rad, Italy; *Autoclaf All American* model 1925/KY-23D ex. ALP Co., Japan; *Microsentifuge* model biofuge D-37520 Osterode ex. Heraus, Germany; *Thermostat controlled water bath shaker* model Sibata WK-24 ex. Sibata, Japan dan model GFL 1092 ex. GFL, Germany; *UV Spectrofotometer* model Spectronic 21-DUV ex. Milton Roy, USA; *Polaroid camera GelCam System* model DS-34 tipe 607353 dengan filter no. 15 Orange ex. Peca Products Inc., USA; dan peralatan gelas lain yang diperlukan sesuai cara kerja.

Bahan yang digunakan adalah kultur *Trichoderma sp.* TNJ63 isolat perkebunan jeruk di Riau dan koleksi Laboratorium Biokimia, FMIPA, UNRI; enzim litikase *Arthrobacter luteus* ex. SIGMA-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA (Cat. No. L2524); *Wizard Genomic Purification Kit* ex. Promega, Madison, WI, USA (Cat. No. A1120); Film polaroid tipe 667 (ASA 3000), UK; 1 Kb DNA Ladder ex. Promega, Madison, WI, USA (Cat. No. G5771); *PCR Core System I* ex. Promega, Madison, WI, USA (Cat. No. M7660); primer ITS1, ITS2, ITS3, ITS4, dan ITS5 ex. PT. Sentra Biosains Dinamika, Jakarta; dan bahan kimia lain yang diperlukan sesuai cara kerja.

3.2. Rancangan Tahapan Penelitian

Untuk penelitian ini digunakan kultur *Trichoderma sp.* TNJ63 isolat perkebunan jeruk di Riau dan koleksi Laboratorium Biokimia, FMIPA, UNRI yang ditumbuhkan dalam media padat *Potato Dextrose Agar* (PDA). DNA kromosomal diisolasi menggunakan enzim litikase dan *Wizard Genomic*

Purification Kit. Sampel isolat DNA kromosomal tersebut dikarakterisasi menggunakan metode elektroforesis dan spektrofotometri untuk menentukan berat molekul, kemurnian, dan titik lelehnya. Bagian ITS-1, 5,8S, dan ITS-2 dari rDNA pada sampel DNA kromosomal diamplifikasi menggunakan reaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dalam dua arah bolak balik. Fragmen PCR yang diperoleh dikirim ke Lembaga Biologi Molekuler Eijkman di Jakarta untuk ditentukan sekuens DNANYa. Hasil sekuens DNA dilaporkan dalam situs GenBank. Secara garis besar bagan rancangan penelitian ditunjukkan gambar 8.



Gambar 8. Garis besar rancangan penelitian

3.3. Prosedur Kerja

3.3.1. Pembuatan media PDA

Untuk pembuatan media PDA dibutuhkan 125 g kentang, 10 g glukosa, 8,5 g agar kering, dan 500 mL aquadest. Kentang yang sudah dibersihkan direbus dalam 250 mL aquadest selama 30 menit lalu disaring dengan kain kasa untuk memperoleh filtrat kentang. Filtrat kentang ditambahkan glukosa dan agar kering, kemudian ditambahkan aquadest sampai volumenya menjadi 500 mL. Campuran

dipanaskan sampai agarnya larut, lalu disterilisasi di dalam autoklaf (121°C, 15 menit). Media dapat digunakan apabila tidak terdapat tanda-tanda kontaminasi.

3.3.2. Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi menggunakan enzim litikase dan kit Wizard Genomic dengan memecah dinding dan membran sel. Untuk isolasi DNA, kultur *Trichoderma sp.* TNJ63 ditumbuhkan pada media padat PDA dalam cawan petri selama 2-4 hari, lalu diambil sebanyak 500 mg miselia dalam tabung mikrosentrifuga. Ke dalam tabung mikrosentrifuga tersebut ditambahkan 293 µL EDTA 0,5 M (pH 8) dan 7,5 µL litikase (20 mg/ml). Sampel dicampurkan dengan dipipet naik turun secara hati-hati, kemudian diinkubasi pada 37°C selama 60 menit. Setelah inkubasi, campuran didinginkan hingga temperatur kamar, lalu disentrifuga 13.000 x g selama 2 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang, kemudian endapan ditambahkan 300 µL *Nuclei lysis solution*. Sampel dicampurkan dengan dipipet naik turun secara hati-hati. Pada campuran ditambahkan 100 µL *Protein precipitation solution* dingin lalu dikocok dengan vorteks dengan kecepatan tinggi selama 20 detik. Sampel didiamkan di es selama 5 menit, kemudian disentrifuga 13.000 x g selama 5 menit. Endapan yang diperoleh dibuang, lalu supernatan dipindahkan ke tabung mikrosentrifuga steril baru yang telah diisi 300 µL isopropanol. Sampel dicampurkan dengan membolak-balik tabung secara hati-hati, kemudian akan terlihat benang-benang jika lisis berhasil. Campuran kemudian disentrifuga pada 13.000 x g selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang lalu pelet DNA dalam tabung dikeringkan dengan membalikkan tabung di atas kertas saring. Pada pelet DNA yang tak kasat mata ditambahkan 300 µL etanol 70% kemudian tabung dibalikkan beberapa kali untuk mencucinya. Campuran kemudian disentrifuga pada 13.000 x g selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh dibuang lalu pelet DNA dikeringkan dengan membalikkan tabung di atas kertas saring selama 10-15 menit. Pada pelet DNA ditambahkan 50 µL larutan rehidrasi DNA dan 1,5 µL larutan RNase, kemudian dikocok dengan memukul dasar tabung pelan-pelan, lalu dilanjutkan

dengan divorteks selama 5 detik. Sampel diinkubasi pada 37°C selama 15 menit untuk menghilangkan RNA kemudian dilanjutkan pada 65°C selama 60 menit dengan sekali-kali memukul dasar tabung pelan-pelan untuk melarutkan DNA. Sampel DNA kemudian disimpan di lemari es pada temperatur 2-8°C.

3.3.3. Elektroforesis DNA

Metode elektroforesis yang digunakan adalah elektroforesis gel agarosa 0,8% dalam 1 x bufer TAE. Agarosa dipanaskan sampai larut lalu dituang ke dalam plat elektroforesis yang telah dipasang sisirnya. Larutan agarosa dibiarkan mengeras selama 30-40 menit, kemudian setelah itu gel dapat digunakan. Elektroforesis DNA dilakukan dengan volume total 10 µL, yang mengandung aquadest steril, sampel DNA, dan 3 µL loading bufer. Alat elektroforesis dijalankan dengan memberi sumber arus pada elektrodanya. Setelah elektroforesis, gel direndam dalam larutan ethidium bromida (EtBr) selama 15-30 menit. Gel kemudian diamati pada transluminator ultraviolet dan difoto dengan kamera polaroid menggunakan film kecepatan tinggi (ASA 3000). Untuk penentuan berat molekul DNA, elektroforesis dilakukan dengan mengelektroforesis sampel dan standar DNA yang telah diketahui berat molekulnya pada gel yang sama. Jarak migrasi sampel dan standar DNA diukur lalu dihitung berat molekul sampel melalui kurva standar DNA, yaitu kurva hubungan antara jarak migrasi standar DNA terhadap log jumlah pasangan basanya.

3.3.4. Penentuan kemurnian DNA

Kemurnian DNA ditentukan dengan metoda spektrofotometri yaitu mengukur absorbans pada panjang gelombang 260 dan 280 nm menggunakan kuvet kwarsa. Sampel DNA sebanyak 10 µL diencerkan dengan 990 µL aquadest lalu diukur absorbansnya. Kemurnian DNA ditentukan dengan mengukur absorbans pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Jika perbandingan $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2$, maka DNA dikatakan cukup murni (Runtunuwu dkk., 2002).

3.3.5. Penentuan titik leleh DNA

Titik leleh DNA ditentukan dari nilai tengah kurva T_m yang diperoleh dari pengukuran absorbans DNA pada panjang gelombang 260 nm pada berbagai variasi temperatur. Sampel DNA diencerkan dengan bufer Na-fosfat 0,1 M (pH 7) dengan perbandingan 1:30. Campuran kemudian disentrifuga pada 13.000 x g selama 10 menit. Setelah homogen, diukur absorbansnya pada temperatur kamar dengan bufer sebagai blanko. Temperatur campuran ditingkatkan antara rentang 30-90°C dengan pemanasan dalam penangas air selama 5-10 menit, lalu diukur absorbansnya hingga diperoleh nilai yang konstan. Titik leleh (T_m) ditentukan melalui kurva hubungan antara absorbans relatif terhadap temperatur. Untuk penentuan %(G+C) DNA, nilai T_m yang diperoleh digunakan untuk menghitung %(G+C) melalui rumus yang dikemukakan oleh De Ley (1970), yaitu : $\%(G+C) = (T_m - 63,7) / 0,41$.

3.3.6. Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction*

Bagian rDNA yang mengandung ITS-1, 5,8S, dan ITS-2 pada sampel DNA kromosomal diamplifikasi menggunakan kombinasi primer ITS5-ITS4 dan ITS1-ITS4 sesuai deskripsi White dkk. (1990). Amplifikasi dilakukan dengan volume total 50 μ L, yang mengandung sampel DNA, aquadest steril, 5 μ L campuran dNTP, 5 μ L bufer PCR, masing-masing primer, dan 0,5 μ L *Taq* DNA polimerase (Tabel 1).

Tabel 1. Campuran reaksi amplifikasi PCR

Komponen Reaksi	Volume (μ L)
Sampel DNA	3
H ₂ O steril	16,5
dNTP 2 mM	5
10 x PCR buffer + MgCl ₂	5
Primer <i>Forward</i> 2 pmol/ μ L	10
Primer <i>Reverse</i> 2 pmol/ μ L	10
<i>Taq</i> DNA Polimerase	0,5
Total Volume	50

Reaksi dilakukan dengan diawali denaturasi pada 95°C selama 5 menit, lalu diikuti 35 siklus yaitu 94°C selama 1,5 menit, 45°C selama 1 menit, dan 72°C selama 3 menit pada setiap siklusnya. Reaksi diakhiri dengan pemanjangan rantai pada 72°C selama 5 menit. Hasil PCR dianalisis pada elektroforesis gel agarosa 1,2% dalam 1 x bufer TAE, untuk mengukur berat molekul fragmen.

3.3.7. Sekuensing DNA

Produk amplifikasi PCR DNA dikirim ke Lembaga Biologi Molekuler Eijkman di Jakarta pada fasilitas jasa pelayanan sekuensing DNA untuk ditentukan urutan DNANYa. Penentuan urutan DNA dilakukan pada kedua arah rantai ganda produk PCR menggunakan primer ITS2, ITS3, ITS4, dan ITS5. Hasil urutan yang diperoleh diperiksa ulang dan diperbaiki dengan membaca spektrogram secara visual untuk mengoreksi kesalahan pembacaan yang kurang akurat oleh alat dan printer dan membaca dalam dua arah kedua rantai DNA untuk mengoreksi huruf N dan bila terdapat keraguan dalam pembacaan spektrogram.