BAB III. METODE PENELITIAN

Waktu Dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan dari April sampai November 2009 di laboratorium Biologi Molekular dan Rekayasa Genetika, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI) di Jalan Taman Kencana No.1, Bogor.

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan untuk purifikasi produk PCR *PIN* adalah *Pure Link* ™ *Quick Gel Extraction* kit (Invitrogen), primer PIN F dan PIN R dan untuk verifikasi hasil dengan gel agarose bahan yang digunakan adalah serbuk agarosea, buffer TBE 0.5 X, etidium bromida (EtBr), *loading buffer* (Brom fenol biru 2.5%, sukrosa 40%), dan marker 1 kb plus (Invitrogen). Teknik kloning yang dilakukan dapat dibagi menjadi tiga tahap, yaitu tahap ligasi, transformasi dan seleksi transforman. Pada tahap ligasi bahan yang digunakan antara lain vektor pGEM-T *Easy* (Promega), T4 DNA ligase dan buffer ligasi. Sedangkan bahan yang digunakan pada tahap transformasi dan seleksi transforman adalah sel kompeten *E.coli* XL-1*Blue*, media LB agar *Low Salt* (LA) yang telah ditambahkan amp 50mg/l+IPTG 100mM +X-Gal 40 mg/l. Isolasi DNA plasmid ...ukan dengan *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). Digesti dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi dari *Biolabs*. Enzim yang digunakan adalah *Sal*I dan *BamH*I, *Asc*I dan *Pac*I Sedangkan transformasi dengan mengunakan p*Flap* sebelum ditransformasi ke p*BIN*$^{+}$ sebagai vektor ekspresi.

Peralatan yang digunakan pisau skapel, timbangan, sentrifus *Eppendorf* 5417R, penangas air. Peralatan untuk elektroforesis adalah sisir, cetakan agar, bak elektroforesis, adaptor 100 volt dan perangkat gel *doc*. Selain itu peralatan lain yang digunakan adalah *shaker incubator*, ruang laminar, autoklaf, pH meter, *magnetic stirer*, dan peralatan-peralatan gelas seperti cawan petri, gelas piala, labu erlenmayer dan gelas ukur.

Metode Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi 2 tahap, yaitu tahap disain primer dan tahap strategi konstruksi gen. Penelitian yang dilakukan sebelumnya yaitu menemukan gen *PIN* yang

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

akan digunakan untuk tahapan selanjutnya dengan cara mencari spesifikasi gen yang diinginkan pada bank data (www.ncbi.nlm.nih.gov). Kemudian disain primer berdasarkan informasi yang didapatkan dari NCBI, amplifikasi menggunakan primer spesifik. Setelah tahap I berhasil ditemukan maka dilanjutkan ke tahap berikutnya yaitu strategi konstruksi gen.

Amplifikasi dengan PCR

Reaksi PCR menggunakan kit Novagen (KOD Hot Start), dilakukan dengan total volume 25 µl yang terdiri dari 16,5 µl PCR Grade Water,2 µl cDNA hasil PCR koloni sebagai cetakan, pasangan primer spesifik gen *PIN* masing-masingnya sebanyak 1 µl, 2,5 µl buffer PCR 10 x, 1,5 µl $MgSO_4$, 1 µl dNTPS 10 mM, 0,5 µl Taq Kod Hot Start. Program PCR nya adalah sebagai berikut : initial denaturation 95 °C selama 2 menit, dilanjutkan dengan denaturation 95°C selama 20 detik, annealing 58°C selama 10 detik, dan extension 70°C selama 15 menit sebanyak 25 siklus, serta final extension 4°C selama 5 menit. Hasil RT-PCR kemudian diperiksa dengan gel agarose 1%.

Digesti Gen Tc*PIN* dan p*Flap* dengan Enzim Restriksi

Plasmid yang mengandung gen *PIN* dan pFlap digesti masing-masing menggunakan enzim restriksi *Sal*I dan *BamH*I dari Biolabs. Digesti DNA plasmid dan *pFlap* dilakukan dengan menambahkan 7 µL DNA plasmid dan untuk 7 µL pFlap dan masing-masing digesti ditambahkan dengan 8.8 µL dH_2O, 0.2 µL BSA, 2 µL buffer 3, 1 µL enzim *Sal*I dan 1 µL enzim *BamH*I sehingga volum total yang ada didalam tabung mikro tersebut masing-masing sebanyak 20 µL. Campuran diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya hasil digesti di elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 0.8%. Setelah itu gel ditempatkan di bawah lampu ultraviolet (UV) untuk melihat gen *PIN* yang sudah terpisah sempurna dengan vektor (pGEMT) dan p*Flap* yang sudah terpisah dari band yang lain. Tahap selanjutnya fragmen gen *PIN* dan p*Flap* masing-masing dipotong untuk purifikasi. Purifikasi produk digesti menggunakan *Pure Link* ™ *Quick Gel Extraction* dari Invitrogen.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Purifikasi Produk Digesti

Purifikasi produk digesti menggunakan *Pure Link* ™ *Quick Gel Extraction* dari Invitrogen. Fragmen dipotong dari gel dengan menggunakan *scalpel* dan ditimbang bobotnya. Gel yang sudah dipotong dilarutkan dengan menggunakan buffer GS1 dengan perbandingan antara sampel dan buffer yang ditambahkan adalah 1:3. Gel diinkubasi pada suhu 50°C selama 15 menit, dan setiap 3 menit dibolak-balikan secara perlahan agar bercampur rata dan larut. Setelah larut gel tersebut diinkubasi lagi selama 5 menit pada suhu ruang. Larutan ditransfer ke dalam kolom lalu disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit pada suhu 25°C. Setelah disentrifus, sebanyak 500 µL GS1 ditambahkan ke dalam kolom dan diinkubasi selama 1 menit lalu disentrifus lagi dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Sebanyak 700 µL W9 ditambahkan ke dalam kolom lalu diinkubasi selama 5 menit dan disentrifus kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Setelah itu tabung disentrifus kembali dalam keadaan kosong dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit untuk menghilangkan sisa etanol yang ada. Lalu di elusi dengan 30 µL buffer TE yang sudah dipanaskan (65-70°C). Setelah itu diinkubasi selama 1 menit dan disentrifus kembali dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Hasil elusi di cek pada gel agarosa 1 %.

Kloning dan pemeriksaan komponen DNA

Setelah diverifikasi pada gel agarosa menunjukkan hasil sesuai dengan yang diharapkan serta dimurnikan, selanjutnya komponen DNA diklon menggunakan vektor kloning p*flap* yang mempunyai promoter dan terminator. Sebanyak 3.5 µL insert (gen Tc*PIN*) ditambahkan dengan 5 µL buffer ligase, 0.5 µL vektor p*flap* dan 1µL T4 ligase. Sehingga total campuran sebanyak 10 µL. Setelah itu campuran diinkubasi semalam pada suhu 4°C.

Transformasi plasmid rekombinan yang diperoleh ke dalam sel kompeten (Doyle, 1996). Setelah disimpan semalam pada suhu 4°C, hasil ligasi dimasukkan ke dalam sel kompeten. Sebanyak 10 µL hasil ligasi dimasukkan ke dalam 200 µL XL1-*Blue* (sel kompeten). Kemudian dikocok perlahan hingga tercampur rata. Lalu diinkubasi di dalam es selama 30 menit, setelah itu diinkubasi dalam penangas air pada suhu 42°C selama 50 detik. Selanjutnya tabung tersebut segera dimasukkan ke dalam es selama 10 menit.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Setelah dimasukkan ke dalam es larutan tersebut ditambahkan dengan 800 µL SOC atau LB + glukosa dan dikocok selama 1.5 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm. Setelah dikocok, larutan diambil sebanyak 100 µL dan disebar menggunakan segitiga penyebar ke dalam media LA yang mengandung ampisilin 100 ppm, *X-Gal* 40 ppm, dan 0.1 mM *IPTG*. Selanjutnya diinkubasi semalam pada suhu 37°C.

Koloni terpilih kemudian dikultur dalam medium LB cair yang telah ditambahkan ampisilin dan diinkubasi pada *shaker-incubator* suhu 37°C, 150 rpm. Dari kultur bakteri yang tumbuh, selanjutnya dilakukan isolasi DNA plasmid menggunakan *Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche).

Kloning Gen *PIN* dari vektor kloning ke vektor ekspresi

Setelah verifikasi pada gel agarosa menunjukkan hasil sesuai dengan yang diharapkan, selanjutnya kloning gen dilakukan dengan menggunakan pBIN$^+$ sebagai vektor ekspresi. Sebanyak 2,0 µL insert (hasil elusi) ditambahkan dengan 5 µL buffer ligase, 2 µL vektor BIN$^+$ dan 1µL T4 ligase. Sehingga total campuran sebanyak 10 µL. Setelah itu campuran diinkubasi selama semalam pada suhu 4°C.

Setelah disimpan semalaman pada suhu 4°C, hasil ligasi dimasukkan ke dalam sel kompeten menggunakan metode Doyle (1996). Sebanyak 10 µL hasil ligasi dimasukkan ke dalam 200 µL XL1-*Blue* (sel kompeten). Kemudian dikocok perlahan hingga tercampur rata. Lalu diinkubasi di dalam es selama 30 menit, setelah itu diinkubasi dalam penangas air pada suhu 42°C selama 50 detik. Selanjutnya tabung tersebut segera dimasukkan ke dalam es selama 10 menit. Setelah dimasukkan ke dalam es larutan tersebut ditambahkan dengan 800 µL SOC atau LB + glukosa dan dikocok selama 1.5 jam pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm. Sel kemudian disebarkan diatas medium LB agar yang telah ditambahkan dengan kanamisin 25 ppm. Setelah itu diinkubasi semalam pada suhu 37 °C.

Seleksi transforman dilakukan dengan pengamatan terhadap koloni yang terbentuk. Koloni yang terbentuk adalah sel *E.coli* yang berhasil ditransformasi. Koloni yang berwarna putih kemudian dengan tusuk gigi steril diambil sedkit untuk kultur sel, kultur semalam pada 150 rpm pada suhu 37°C. Kemudian lakukan isolasi plasmid koloni dari *PIN BIN*$^+$ tersebut menggunakan *Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche).

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Digesti Gen *PIN BIN*$^{+}$ dengan Enzim Restriksi

Digesti dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi dari *Biolabs*. Plasmid yang mengandung gen *PIN* dan p*BIN*$^{+}$ dipotong menggunakan enzim restriksi *Asc*I dan *Pac*I. Digesti DNA plasmid dilakukan dengan menambahkan 8,8µL dH_2O, 7 µL DNA plasmid, 0.2 µL BSA, 2 µL buffer 4, 1 µL enzim *Asc*I dan 1 µL enzim *Pac*I sehingga volume total yang ada didalam tabung mikro tersebut masing-masing sebanyak 20 µL. Campuran diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya hasil digesti di elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 0.8%.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/