

III. MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2015 sampai dengan April 2016 dilaboratorium *Plant Protection Section (PPS)*, divisi *Research and Development (R&D)*, PT. Arara Abadi Perawang, Jalan Raya Minas Perawang, KM. 26 Kecamatan Tualang Perawang, Kabupaten Siak, Provinsi Riau.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah isolat bakteri endofit (*Enterobacter* dan *Pectobakterium*), *ampicillin*, *chloramphenicol*, *beef ekstrak*, glukosa, pepton, CaCl_2 , plasmid *pGREEN*, es batu.

Alat yang digunakan adalah *laminar air flow*, autoklaf, inkubator, *shaker*, *water bath*, mikro pipet, *centrifugasi*, oven, neraca listrik, mikro wive, tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, gelas kimia, *wieghing dishes*, lampu bunsen, klip plastik, jarum ose dan spatula.

3.3. Metode Pelaksanaan Penelitian

3.3.1. Penyiapan kultur dan Kompeten sel

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri dari spesies *Enterobacter* dan *Pectobakterium* yang telah dikulturkan pada media NA dengan komposisi *beef ekstrak* 3 g, glukosa 2,5 g, pepton 5 g, agar 20 g dan air 1 L. Isolat yang telah dikulturkan diambil sebanyak satu koloni kemudian diinokulasi ke dalam 5 ml media NB (*Beef ekstrak* 3 g, glukosa 2,5 g, pepton 5 g dan air 1 L) dan *dishaker* selama 24 jam dengan kecepatan 180 rpm pada suhu 37°C .

Suspensi bakteri diambil 1 ml, dicampurkan ke dalam 50 ml media NB dan dilakukan pengecekan *optical density (OD)* pada kultur sel. Nilai kultur sel sebaiknya berada pada kisaran OD_{600} 0.4-0.5 (*shaker* dengan 180 rpm, 37°C , 3 jam). Diamkan suspensi di dalam es selama 30 menit pada ruang suhu, kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C , kemudian supernatan dari hasil sentrifugasi dibuang. Pellet yang terbentuk dilarutkan 8 ml CaCl_2 0,1 M, didiamkan kembali di dalam es selama 30 menit, dan

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan yang sama. Pellet dilarutkan dalam 800 μl CaCl_2 0,1 M, kemudian transfer pellet ke dalam tube 1,5 ml (100 μl /tube) untuk transformasi (Mangunwardoyo, 2002). Sel yang telah kompeten hanya dipakai untuk sekali proses transformasi.

3.3.2. Transformasi plasmid pGREEN

3.3.2.1. Transformasi metode *heat shock*

Suspensi sel bakteri yang ditransformasi menggunakan metode *heat shock* sebanyak 200 μl . Plasmid pGREEN ditambahkan 1 μl / 100 μl sel kompeten, lalu divortex guna menghomogenkan suspensi. Perlakuan *heat shock* dilakukan dengan cara tube yang berisi suspensi ditenamkan diatas wadah yang berisi es selama 25 menit pada suhu ruang, setelah itu diletakkan pada air selama 90 detik dengan suhu 42⁰C dan letakkan kembali ke dalam es batu selama 2 menit. Tube yang berisi suspensi ditambahkan 400 μl media NB kemudian diinkubasi pada *shaker incubator* dengan kecepatan 200 rpm dengan suhu 37⁰C selama 2 jam. Transforman disebarakan pada cawan petri (berisi media NA yang telah diberi antibiotik *ampicillin*) sebanyak 100 μl dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 27⁰C (Tsien, 1998).

3.3.2.2. Transformasi metode *freeze-thaw*

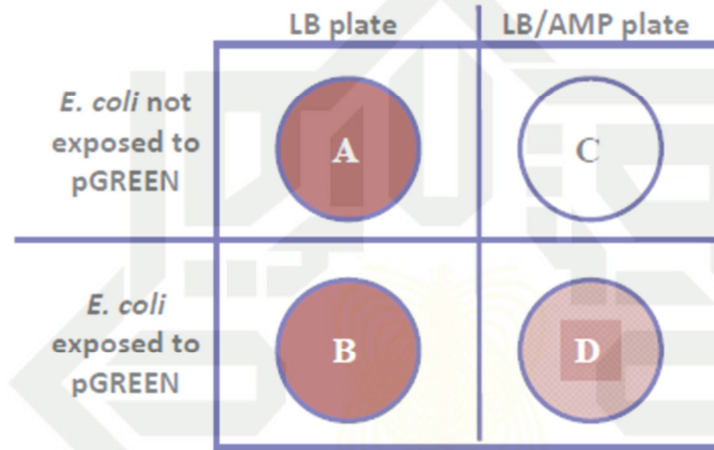
Suspensi sel bakteri yang ditransformasi menggunakan metode *freeze-thaw* sebanyak 200 μl , kemudian inkubasi pada es selama 10 menit pada suhu ruang. Plasmid pGREEN ditambahkan 1 μl / 100 μl sel kompeten, inkubasi kembali pada es selama 30 menit kemudian dibekukan menggunakan nitrogen cair (-196⁰C) selama 5 menit dan dilakukan pemanasan pada suhu 37⁰C selama 5 menit. Tube yang berisi suspensi ditambahkan 500 μl media NB yang telah diberi antibiotik, *shaker* pada suhu 28⁰C dengan kecepatan 160 rpm selama 2 jam. Transforman disebarakan pada cawan petri (berisi media NA yang telah diberi antibiotik *ampicillin*) sebanyak 100 μl dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 27⁰C (Hofgen dan Willmitzer, 1988).

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

3.4. Uji Bakteri Setelah Transformasi

3.4.1. Uji antibiotik

Seleksi awal uji antibiotik pada bakteri setelah ditransformasi yaitu menggunakan antibiotik *chloramphenicol* dan *ampicillin* dengan konsentrasi 50 ul/ml. Indikator keberhasilan transformasi gen *green fluorescent protein* dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Cara melihat keberhasilan transformasi.

Gambar 3.1 menjelaskan bahwa bakteri sebelum ditransformasi akan hidup pada media kontrol yang tidak mengandung antibiotik seperti Gambar 3.1 (A) dan mati pada media yang mengandung antibiotik pada Gambar 3.1 (C). Setelah bakteri ditransformasi akan hidup pada media kontrol dan media yang mengandung antibiotik (Gambar 3.1 ;B dan D).

3.4.2. Uji dibawah sinar ultra violet

Bakteri yang telah ditransformasi yang telah hidup pada media yang mengandung antibiotik kemudian diberikan sinar ultra violet dengan intensitas penyinaran 100 % .

3.5. Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan adalah melihat bakteri endofit (transforman) yang hidup pada media yang mengandung antibiotik dan berpendar di bawah sinar *ultra violet* (UV).