

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. ISOLASI DNA GENOM PADI (*Oryza sativa* L.) KULTIVAR ROJOLELE, NIPPONBARE, DAN BATUTEGI

Isolasi DNA genom padi dari organ daun padi (*Oryza sativa* L.) kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi merupakan tahap awal dari seluruh tahapan penelitian (Gambar 6). Hasil visualisasi gel agarosa 0,8% memperlihatkan pita tunggal di atas pita penanda λ *Hind*III yang berukuran 23.130 bp (Gambar 7, lajur 1, 2, dan 3). Hal tersebut menandakan bahwa DNA genom padi memiliki ukuran yang lebih besar. Berdasarkan Goff *dkk.* (2002: 92), DNA genom padi memiliki ukuran sebesar 430 Mbp.

Hasil visualisasi gel agarosa 0,8% juga memperlihatkan pita tunggal yang jelas, tebal, dan tidak *smear* (Gambar 7, lajur 1, 2, dan 3). Hal tersebut menandakan bahwa DNA hasil isolasi memiliki kualitas yang baik karena tidak terlihat pola DNA yang terdegradasi. Hasil yang diperoleh pada penelitian sesuai dengan pernyataan Herison *dkk.* (2003: 40), bahwa kualitas DNA yang baik dan tidak terdegradasi pada hasil elektroforesis tidak menampilkan pola pita yang *smear*.

Kualitas DNA juga dapat diketahui melalui kemurnian berdasarkan perbandingan nilai absorbansi panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280}) pada pembacaan spektrofotometri. Berdasarkan hasil tersebut

kemurnian DNA genom hasil isolasi pada kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutege adalah 1,94; 2,2; dan 1,92 (Tabel 1). Hasil isolasi DNA genom kultivar Rojolele dan Batutege memiliki tingkat kemurnian yang baik, yaitu berkisar antara 1,8--2,0 (Sambrook & Russell 2001: A8.20--A8.21). Sampel DNA kultivar Nipponbare memiliki nilai kemurnian yang berada di atas kisaran DNA murni. Hal tersebut dapat terjadi karena ada kemungkinan masih terdapat kontaminasi RNA. Menurut Santella (2006: 1586), rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 (A_{260}/A_{280}) yang berada di atas kisaran nilai DNA murni menunjukkan terdapat kontaminasi RNA, sedangkan rasio di bawah 1,8 menunjukkan masih terdapat kontaminasi protein.

Menurut Sauer *dkk.* (1998: 25-26), kontaminasi RNA dapat dideteksi pada visualisasi gel agarosa, yaitu dengan terbentuknya pola bayangan *smear* di bawah pita DNA, namun hal tersebut tidak terlihat pada sampel Nipponbare. Hasil visualisasi gel agarosa 0,8% sampel Nipponbare pada Gambar 7 lajur 2 tidak menampakkan adanya kontaminasi RNA, karena tidak terlihat pola pita *smear* di bawah pita DNA. Hal tersebut mungkin disebabkan tingkat kontaminasi RNA rendah, sehingga tidak terlihat pada visualisasi gel agarosa 0,8%.

B. AMPLIFIKASI PROMOTER GEN *LEA3* DENGAN TEKNIK PCR

Promoter gen *lea3* diperoleh dengan cara amplifikasi DNA genom secara *in vitro* menggunakan teknik PCR. Hasil PCR yang divisualisasi pada gel agarosa 0,8% memperlihatkan pita fragmen target yang tebal dan spesifik serta berada di bawah pita 2.027 bp penanda λ *HindIII* (Gambar 8, lajur 2--10), sehingga diduga merupakan fragmen promoter gen *lea3* yang berukuran 1.291 bp. Kontrol negatif PCR berupa air (Gambar 8, lajur 1) tidak memperlihatkan adanya pita DNA. Hal tersebut menandakan bahwa pembuatan reaksi PCR tidak terkontaminasi komponen lain.

Hasil visualisasi gel agarosa 0,8% dari sampel ketiga kultivar memperlihatkan pola pita yang sama. Hal tersebut menunjukkan bahwa proses PCR mengamplifikasi daerah yang sama pada sampel. Hasil visualisasi juga memperlihatkan produk PCR yang spesifik karena hanya terbentuk satu pita tunggal (Gambar 8, lajur 2--10). Hal tersebut menandakan bahwa kondisi PCR telah optimal untuk amplifikasi fragmen promoter gen *lea3*. Berdasarkan Ahmed (2006: 112), kondisi optimal pada proses PCR dalam penelitian dipengaruhi oleh komponen reaksi PCR (konsentrasi DNA, primer, dNTP, dan Mg^{2+}), spesifisitas primer, dan jumlah siklus PCR.

Konsentrasi DNA yang digunakan sebagai cetakan dalam reaksi amplifikasi dapat memengaruhi hasil PCR. Hasil isolasi DNA genom memiliki konsentrasi yang cukup tinggi sehingga perlu diencerkan agar tidak

menghambat proses amplifikasi (Tabel 1). Proses optimasi terhadap konsentrasi DNA menggunakan faktor pengenceran 5x, 10x, 100x, dan 1000x, dapat dilihat pada Gambar 9, lajur 2, 3, 4, dan 5.

Hasil visualisasi gel agarosa 0,8% pada Gambar 9, lajur 4 menunjukkan bahwa faktor pengenceran 100x memperlihatkan pita tunggal yang jelas, spesifik, dan tebal dibandingkan dengan faktor pengenceran lainnya. Pengenceran 100x menghasilkan konsentrasi DNA sekitar 30 ng/ μ l. Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi yang sesuai untuk dijadikan cetakan pada proses PCR. Hal tersebut sesuai pernyataan Henegariu *dkk.* (1997: 510), bahwa konsentrasi optimal untuk DNA cetakan pada proses PCR sebesar 30--500 ng.

Konsentrasi primer, dNTP, dan $MgCl_2$ yang digunakan pada proses PCR adalah 0,1 μ M, 200 μ M, dan 1,5 mM. Berdasarkan penelitian Czerny (1996: 985), konsentrasi primer untuk menghasilkan produk PCR yang baik sebesar 0,1--1 μ M. Menurut Henegariu *dkk.* (1997: 508), konsentrasi primer yang lebih dari 1 μ M akan menyebabkan primer tersebut menempel pada sekuen yang tidak diinginkan, sedangkan konsentrasi primer yang lebih rendah menyebabkan proses PCR tidak berjalan efisien dan menghasilkan produk PCR dengan kuantitas yang sedikit.

Konsentrasi dNTP dan $MgCl_2$ yang digunakan dalam penelitian sesuai dengan penelitian Henegariu *dkk.* (1997: 508--509), yaitu sebesar 1,5 mM dan 200 μ M. Keempat dNTP yang digunakan juga harus memiliki konsentrasi yang sama. Hal tersebut bertujuan memperkecil kemungkinan

kesalahan penggabungan nukleotida selama proses amplifikasi (Yuwono 2006: 17). Sambrook & Russell (2001: 8.5), menyatakan bahwa konsentrasi dNTP yang tinggi dapat menghambat reaksi PCR dan menghasilkan produk PCR yang tidak spesifik. Konsentrasi dNTP yang rendah dapat mengurangi jumlah produk PCR.

Spesifitas primer menentukan keberhasilan proses PCR. Spesifisitas merupakan kemampuan primer untuk menempel pada sekuen target (Dieffenbach *dkk.* 2008: S30). Penempelan primer pada sekuen target dipengaruhi suhu *annealing*. Hasil optimasi PCR (hasil tidak ditampilkan) menunjukkan bahwa suhu 56° C menghasilkan pita yang jelas dan spesifik. Suhu *annealing* yang tepat untuk PCR diperoleh dari proses optimasi terhadap primer menggunakan PCR gradien pada kisaran suhu 44--59° C. Hal tersebut berdasarkan pernyataan Ahmed (2006: 112), bahwa suhu *annealing* yang umum digunakan untuk PCR adalah 40--60° C. Suhu *annealing* yang tepat dapat meminimalkan pelekatan primer pada sekuen nonspesifik dan meningkatkan jumlah produk PCR spesifik (Sambrook & Russell 2001: 8.8).

Jumlah siklus PCR juga menentukan spesifisitas produk PCR. Proses amplifikasi fragmen promotor gen *lea3* menggunakan 35 siklus. Hal tersebut bertujuan untuk memperoleh kuantitas produk PCR yang lebih besar. Jumlah siklus yang digunakan masih berada pada kisaran jumlah siklus optimal untuk proses PCR, yaitu 25--45 siklus (Fairbanks & Andersen 1999: 276). Jumlah siklus yang terlalu banyak dapat mengurangi aktivitas primer, dNTP,

dan *Taq* polimerase sehingga produk PCR tidak spesifik. Jumlah siklus yang terlalu sedikit akan mengurangi kuantitas produk yang diharapkan.

Fragmen promotor gen *lea3* dari ketiga kultivar dipurifikasi dari gel agarosa 0,8% setelah proses visualisasi menggunakan *Illustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification kit* berdasarkan prinsip presipitasi kolom yang dapat memurnikan fragmen DNA berukuran 50 bp--10 kbp (GE Health Care 2007: 8). Hasil visualisasi purifikasi fragmen promotor memperlihatkan adanya pita tunggal seperti pada hasil visualisasi produk PCR sebelum dipurifikasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa proses purifikasi berhasil karena memperlihatkan ukuran pita sebesar ± 1.291 bp (Gambar 10, lajur 1--6). Menurut Invitex (2008: 1), fragmen produk PCR perlu dipurifikasi dari gel untuk memurnikan produk PCR dari kontaminan seperti dNTP dan primer, garam-garam, enzim *Taq* DNA polimerase yang tersisa, dan etidium bromida.

Hasil visualisasi juga menunjukkan ketebalan pita yang relatif tinggi (Gambar 10, lajur 1--6). Berdasarkan protokol GE Health Care (2007: 10), fragmen produk PCR dengan panjang ± 1.000 bp akan menghasilkan produk purifikasi dengan tingkat *recovery* 94,7% dari fragmen asal. Hal tersebut juga menunjukkan bahwa DNA tidak terdegradasi selama proses purifikasi berlangsung.

C. LIGASI PROMOTER GEN *LEA3* DENGAN VEKTOR

pGEM-T *EASY* DAN TRANSFORMASI PLASMID REKOMBINAN

Reaksi ligasi menggunakan konsentrasi DNA sisipan sebesar 110 ng/ μ l, sedangkan DNA vektor sebesar 50 ng/ μ l (Lampiran 4). Berdasarkan konsentrasi kedua DNA tersebut maka volume fragmen promoter gen *lea3* dan vektor pGEM-T *Easy* yang seharusnya digunakan adalah 0,5 μ l dan 1 μ l pada penggunaan rasio molar DNA vektor dan sisipan sebesar 1:3. Namun, pada penelitian digunakan volume fragmen promoter gen *lea3* dan vektor pGEM-T *Easy* sebesar 2 μ l dan 1 μ l. Hal tersebut dilakukan untuk meningkatkan probabilitas masuknya DNA sisipan ke dalam DNA vektor. Menurut Knoche & Kephart (1999: 13), jumlah molekul DNA sisipan yang lebih banyak dibandingkan dengan vektor dalam proses ligasi akan meningkatkan frekuensi terbentuknya vektor rekombinan hingga 95%.

Vektor rekombinan yang terbentuk berukuran \pm 4.321 bp. Hasil ligasi langsung ditransformasi ke dalam sel *E. coli* DH5 α menggunakan metode CaCl₂ *heat shock*. Proses transformasi menggunakan kontrol sel kompeten untuk mengetahui kompetensi sel kompeten (Tabel 2). Hasil pengamatan kontrol positif menunjukkan hasil yang baik dengan tumbuhnya sel kompeten hingga menyelimuti seluruh medium (Gambar 11A). Kontrol negatif memperlihatkan tidak adanya koloni yang tumbuh (Gambar 11B). Hal tersebut menandakan bahwa sel tidak tersisipi plasmid lain dan memiliki kualitas baik untuk menerima plasmid rekombinan.

Hasil transformasi plasmid rekombinan ditumbuhkan pada medium LB yang mengandung ampisilin, IPTG, dan X-gal. Medium yang mengandung antibiotik ampisilin berfungsi untuk menseleksi plasmid rekombinan yang terbentuk. Plasmid rekombinan dapat tumbuh pada medium ampisilin karena memiliki gen *bla* yang berfungsi mengkode enzim β -laktamase. Enzim tersebut dapat menghidrolisis cincin β -laktam dari ampisilin, sehingga hanya sel *E. coli* DH5 α berisi plasmid rekombinan yang tumbuh pada medium (Sambrook *dkk.* 1989: 1.6).

Senyawa IPTG/X-gal pada medium berfungsi untuk seleksi biru putih. Menurut Sambrook & Russell (2001: 1.149--1.150), bakteri *E. coli* DH5 α pembawa vektor pGEM-T *Easy* sirkuler menonaktifkan represor lacZ oleh IPTG, sehingga gen *lac Z* pada *multiple cloning site* (MCS) menjadi aktif dan menghasilkan enzim β -galaktosidase yang fungsional. Enzim tersebut akan menghidrolisis laktosa dalam medium menjadi glukosa. Glukosa tersebut terikat pada senyawa X-Gal sehingga menghasilkan koloni berwarna biru. Bakteri *E. coli* DH5 α yang membawa vektor rekombinan tidak dapat menghasilkan enzim β -galaktosidase secara fungsional, karena gen *lac Z* pada daerah MCS telah inaktif akibat telah tersisipi fragmen promoter gen *lea3*, sehingga menghasilkan koloni berwarna putih.

Hasil pengamatan memperlihatkan 12 koloni berwarna biru dan 310 koloni berwarna putih pada sampel Rojolele (Gambar 11C), 6 koloni biru dan 335 koloni putih pada sampel Nipponbare (Gambar 11D), serta 1 koloni biru dan 116 koloni putih pada sampel Batutegi (Gambar 11E) (Tabel 2).

Koloni putih diduga sebagai koloni pembawa plasmid rekombinan yang mengandung fragmen sisipan promoter gen *lea3*. Hasil pengamatan menunjukkan terbentuknya koloni putih > 60%. Menurut Promega (2008: 10), terbentuknya koloni putih > 60% menunjukkan efisiensi transformasi yang tinggi. Hal tersebut menunjukkan bahwa proses ligasi fragmen promoter gen *lea3* dan vektor pGEM-T *Easy* berhasil dilakukan.

D. VERIFIKASI PLASMID REKOMBINAN DENGAN DIGESTI MENGUNAKAN ENZIM RESTRIKSI *EcoRI*

Verifikasi plasmid rekombinan dilakukan dengan proses digesti. Proses verifikasi bertujuan mengidentifikasi koloni berwarna putih pada medium seleksi yang diduga sebagai vektor rekombinan pembawa fragmen promoter gen *lea3*. Proses verifikasi dilakukan secara acak pada 10 koloni dari masing-masing sampel. Kesepuluh koloni tersebut dianggap sudah mewakili jumlah plasmid rekombinan. Koloni tersebut kemudian ditumbuhkan pada medium LB cair yang mengandung antibiotik ampisilin untuk dilakukan isolasi plasmid secara *minipreparation* menurut Sambrook *dkk.* (1989: 1.38).

Berdasarkan analisis restriksi pada plasmid rekombinan yang mengandung fragmen promoter gen *lea3* memperlihatkan bahwa terdapat tiga situs *EcoRI*, yaitu 2 situs pada vektor plasmid pGEM-T *Easy* dan 1 situs pada fragmen promoter gen *lea3* (Gambar 12). Berdasarkan analisis tersebut, diharapkan terdapat 3 potongan fragmen, yaitu fragmen berukuran 12 bp yang merupakan fragmen antara situs *EcoRI* pada sekuen

pGEM-T *Easy* dan situs *EcoRI* pada fragmen promoter gen *lea3*, fragmen berukuran 1.308 bp yang mengandung promoter gen *lea3* berukuran 1.291 bp dan sebagian fragmen pGEM-T *Easy* berukuran 17 bp, serta fragmen vektor pGEM-T *Easy* berukuran ± 3.001 bp (Gambar 13).

Hasil visualisasi gel agarosa 0,8% proses digesti pada Gambar 14 memperlihatkan kontrol fragmen promoter gen *lea3* berukuran ± 1.291 bp, vektor rekombinan berukuran ± 4.321 bp, dan vektor rekombinan yang telah dipotong dengan *EcoRI*. Vektor rekombinan yang telah dipotong *EcoRI* pada Gambar 14, lajur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61 secara umum memperlihatkan dua pita fragmen potongan, yaitu pita vektor pGEM-T *Easy* berukuran ± 3.001 bp dan fragmen berukuran ± 1.308 . Fragmen berukuran ± 1.308 tersebut mengandung fragmen promoter gen *lea3* berukuran ± 1.291 bp. Hasil visualisasi pada fragmen berukuran ± 1.308 memperlihatkan satu pola potongan pita yang mirip dengan kontrol fragmen promoter gen *lea3*. Hal tersebut menunjukkan bahwa 10 koloni dari masing-masing kultivar positif membawa plasmid rekombinan yang membawa sisipan fragmen promoter gen *lea3*.

Pita fragmen 12 bp tidak akan terlihat pada hasil visualisasi karena berukuran kecil. Hal tersebut disebabkan konsentrasi gel agarosa yang digunakan untuk proses visualisasi sebesar 0,8%. Berdasarkan Sambrook & Russell (2001: 5.6), gel agarosa 0,8% hanya dapat memisahkan DNA dengan ukuran 500 bp sampai 15 kb, sehingga fragmen sepanjang 12 bp

tidak akan terlihat pada hasil visualisasi. Namun, hal tersebut tidak memengaruhi hasil penelitian. Hasil yang diperoleh juga menunjukkan bahwa pemotongan sesuai dengan prediksi sebelumnya, sehingga dapat disimpulkan bahwa fragmen promotor gen *lea3* sudah berhasil diklona ke dalam pGEM-T *Easy*.

Hasil visualisasi pada sampel R1, R3, R4, R6, R7, R8, R9, B3, B8, B10, N1, N2, N3, N4, N6, N7, dan N10 memperlihatkan jumlah pita hasil potongan lebih dari dua pita (Gambar 14). Hal tersebut menunjukkan terjadinya proses digesti yang tidak sempurna. Proses digesti yang tidak sempurna dapat terjadi karena beberapa hal, yaitu kemurnian DNA plasmid yang rendah, konsentrasi DNA yang terlalu tinggi, dan adanya aktivitas star (*star activity*).

Kemurnian DNA plasmid yang rendah dapat menyebabkan proses digesti yang tidak sempurna. Kemurnian DNA yang rendah dapat terjadi karena adanya kontaminasi dari komponen lain. Menurut Ausubel dkk. (2002: 3.1.7), efisiensi reaksi pemotongan sangat bergantung pada kemurnian DNA plasmid. Kontaminan seperti protein, fenol, kloroform, etanol, EDTA, SDS, NaOH, dan kadar garam yang tinggi dapat menghambat kerja enzim restriksi.

Konsentrasi DNA plasmid yang tinggi dapat menyebabkan enzim restriksi tidak memotong dengan sempurna. Hal tersebut dapat terjadi karena jumlah enzim yang digunakan tidak cukup untuk memotong DNA dengan konsentrasi yang tinggi. Aktivitas star juga dapat menyebabkan

proses digesti menjadi tidak sempurna. Menurut Bowen (1991: 2), aktivitas star menyebabkan enzim restriksi memotong pada situs yang berbeda dari situs pengenalan normalnya karena proses digesti tidak dalam kondisi yang optimal. Enzim *EcoRI* merupakan salah satu enzim restriksi yang memperlihatkan aktivitas star. Beberapa hal yang dapat menyebabkan kondisi yang tidak optimal adalah pH yang terlalu tinggi (>8,0) atau kondisi ionik yang rendah, konsentrasi enzim yang terlalu tinggi, dan keberadaan pelarut organik seperti etanol dalam reaksi digesti. Berdasarkan hasil visualisasi, penyebab yang paling mungkin terjadi dalam penelitian adalah konsentrasi DNA yang tinggi.

E. SEQUENCING DAN ANALISIS SEKUEN

Sebanyak satu hasil klon yang positif mengandung sisipan fragmen promoter gen *lea3* dari masing-masing kultivar diverifikasi lebih lanjut dengan *sequencing*, yaitu sampel Rojolele R2, sampel Nipponbare N5, dan sampel Batutegi B2. Verifikasi *sequencing* dilakukan untuk memastikan fragmen yang diisolasi dari sampel padi kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi merupakan fragmen promoter gen *lea3*. Verifikasi juga diperlukan untuk mengetahui apabila terdapat perubahan basa yang signifikan selama proses amplifikasi dengan teknik PCR atau pada proses pengklonaan.

Hasil *sequencing* berupa elektroferogram, yaitu hasil analisis yang menampilkan grafik *peak* yang mewakili basa nukleotida hasil pembacaan mesin *sequencer*. *Peak* tersebut diterjemahkan menjadi basa-basa nitrogen

untuk memudahkan analisis sekuen dengan program BLASTN.

Elektroferogram memperlihatkan sekuen yang parsial dari masing-masing sampel, yaitu berupa sekuen *forward* dan *reverse* (Gambar 15,16, 17, 18, 19, dan 20). Hal tersebut terjadi karena proses reaksi *sequencing* dilakukan sebanyak dua kali, masing-masing dengan pembacaan primer M13 secara *forward* dan *reverse*. Primer M13 *forward* dan *reverse* digunakan karena merupakan primer universal dan sekuen pengenalan primer-primer tersebut tersedia pada vektor pGEM-T *Easy* (Promega 2008: 5).

Sekuen *forward* dan *reverse* tersebut kemudian disatukan untuk mendapatkan sekuen lengkap promotor gen *lea3*. Penyatuan sekuen dilakukan dengan bantuan software DNAMAN untuk mencari daerah *overlapping* dari kedua sekuen *forward* dan *reverse*, sehingga dapat menghasilkan satu set sekuen promotor lengkap. Usaha untuk menyatukan sekuen *forward* dan *reverse* promotor gen *lea3* mengalami kesulitan karena tidak terjadi *overlapping* di antara hasil sekuen *forward* dan *reverse*. Hal tersebut disebabkan pembacaan sekuen yang baik maksimal sekitar ± 500 – 600 bp. Meskipun pembacaan basa hasil *sequencing* pada penelitian mencapai ± 1.000 bp, tetapi sekuen hasil *sequencing* yang memiliki *peak* jelas dan dapat diterjemahkan menjadi basa-basa nitrogen pada kedua sekuen *forward* dan *reverse* hanya sekitar ± 500 bp sedangkan panjang fragmen promotor gen *lea3* sebesar ± 1.291 bp. Dengan demikian sulit untuk mencari daerah *overlapping* di antara kedua sekuen.

Hasil penyejajaran ganda (*multiple alignment*) terhadap sekuen

forward dan *reverse* tersebut memperlihatkan adanya daerah *gap*. Proses penyelarasan tersebut menggunakan sekuen yang telah diedit sehingga hanya sekuen promotor gen *lea3* dari masing-masing kultivar yang disejajarkan tanpa adanya sekuen vektor pGEM-T *Easy*. Daerah *gap* merupakan daerah kosong pada hasil penyelarasan ganda karena sekuen *forward* dan *reverse* tidak overlap. Daerah *gap* terjadi karena proses penyelarasan hanya menggunakan sekuen sebesar ± 500 bp dari sekuen *forward* dan *reverse*. Hasil penyelarasan ganda memperlihatkan adanya daerah *gap* sepanjang ± 200 bp (Lampiran 5). Oleh karena itu, perlu dilakukan proses *sequencing* lanjutan menggunakan primer internal yang berada di sekitar daerah *gap* untuk dapat membaca daerah *gap* tersebut.

Hasil penyelarasan ganda memperlihatkan terdapat beberapa perbedaan basa pada ketiga sampel dengan sekuen acuan. Perbedaan basa tersebut juga terlihat pada *peak* elektroferogram. Sampel kultivar Rojolele memiliki perbedaan basa pada sekuen *forward* posisi 110 elektroferogram, yaitu basa Adenin (A) pada sekuen acuan dan kultivar lain digantikan oleh basa Guanin (G) (Gambar 21). Sampel kultivar Nipponbare memiliki perbedaan basa pada sekuen *forward* posisi 202 elektroferogram, yaitu basa sitosin (C) pada sekuen acuan dan kultivar lain digantikan oleh basa timin (T) (Gambar 22). Sampel kultivar Batutegi memiliki perbedaan basa pada sekuen *forward* posisi 584 elektroferogram, yaitu basa G digantikan oleh basa A (Gambar 23). Sampel kultivar Batutegi juga memiliki perbedaan basa pada sekuen *reverse* posisi 61--64 elektroferogram, yaitu

basa TACC digantikan oleh AGTG, pada posisi 68 elektroferogram, yaitu basa G digantikan A (Gambar 24), serta posisi 166 elektroferogram, yaitu basa C digantikan oleh basa T (Gambar 25).

Penggantian basa TACC menjadi AGTG pada kultivar Batutegi menyebabkan tidak terdapatnya *start codon* (ATG) pada sampel Batutegi. Hal tersebut mungkin dapat terjadi karena kesalahan sintesis primer yang digunakan untuk mengamplifikasi sampel Batutegi. Kesalahan sintesis primer menyebabkan sekuen primer yang dibuat tidak sempurna, sehingga dalam satu tabung larutan primer memiliki campuran primer dengan susunan basa yang benar dan susunan basa yang salah. Oleh karena itu, perlu dilakukan *sequencing* ulang pada koloni yang berbeda pada sampel Batutegi untuk mendapatkan sekuen fragmen promotor gen *lea3* yang benar.

Ketiga sampel memiliki perbedaan basa dengan sekuen acuan pada posisi 1.215, yaitu adanya penambahan basa A pada ketiga sampel sedangkan pada sekuen acuan tidak terdapat basa A (Gambar 26). Namun, hasil BLAST memperlihatkan kesamaan ketiga basa dari setiap kultivar dengan sekuen genom dan sekuen BAC padi kromosom 5 subspecies Japonica kultivar Nipponbare GenBank (Acc. No. NC 008398.1 dan Acc. No. AC10471). Hal tersebut dapat terjadi karena sekuen promotor gen *HVA-like* yang digunakan sebagai acuan juga memiliki kemungkinan kesalahan pembacaan basa pada proses *sequencing*.

Perubahan basa yang terlihat pada hasil penyejajaran ganda kemungkinan dapat terjadi karena beberapa hal, yaitu kesalahan pada

pembacaan alat *sequencing* dan kemungkinan terjadinya mutasi. Kesalahan pembacaan alat *sequencing* dapat diklarifikasi dengan membandingkan *peak* yang terbentuk pada elektroferogram dengan sekuen acuan. Selain itu kesalahan pembacaan juga dapat diklarifikasi dengan melakukan pengulangan proses *sequencing* pada plasmid rekombinan dari koloni yang berbeda.

Perubahan basa juga dapat disebabkan kemungkinan terjadi mutasi pada fragmen promotor *lea3* hasil isolasi. Mutasi yang mungkin terjadi adalah mutasi spontan pada tanaman padi dan mutasi induksi pada saat penelitian. Mutasi spontan disebut juga mutasi alami. Mutasi alami dapat menghasilkan keragaman genetik diantara satu spesies. Mutasi tersebut dapat disebabkan karena ketidakstabilan nukleotida (bentuk tautomer) selama replikasi dan kesalahan replikasi. Mutasi spontan dapat berupa transisi dan transversi. Transisi merupakan perubahan basa purin/pirimidin menjadi basa purin/pirimidin lainnya, sedangkan transversi berupa perubahan basa purin menjadi basa pirimidin dan sebaliknya (Tamarin 2002: 328--329). Mutasi tersebut dapat terjadi karena adanya variasi genetik diantara kultivar. Variasi genetik tersebut mungkin dapat menyebabkan perbedaan pola ekspresi diantara kultivar, sehingga perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui hal tersebut.

Mutasi yang terjadi juga dapat disebabkan karena mutasi terinduksi. Mutasi tersebut dapat disebabkan oleh proses PCR menggunakan enzim *Taq* polimerase. Hal tersebut sesuai pernyataan Smith *dkk.* (1993: 254--255),

bahwa mutasi dapat terjadi karena kesalahan *Taq* polimerase dalam mengkombinasikan dNTP selama pemanjangan dan penggabungan untai nukleotida. Hal tersebut dapat menyebabkan terjadinya substitusi basa nukleotida pada hasil amplifikasi PCR, walaupun jarang terjadi.

Hasil *sequencing* juga dianalisis dengan program BLASTN pada situs NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) untuk melihat similaritas dengan sekuen GenBank. Sekuen *forward* dan *reverse* sampel Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi menunjukkan nilai *identities* sebesar 99% (Lampiran 6). Hasil BLASTN menunjukkan bahwa antara sekuen fragmen promotor gen *lea3* hasil *sequencing* dan sekuen acuan promotor gen *HVA-like* (Acc. No. DQ837728) memiliki similaritas yang tinggi. Menurut Hall (2001: 14), tingkat similaritas dapat ditentukan oleh nilai *identities*. Semakin tinggi nilai *identities* semakin menunjukkan kemiripan dengan sekuen acuan pada GenBank.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa fragmen sisipan pada proses pengklonaan adalah fragmen promotor gen *lea3* yang terinduksi kekeringan. Hal tersebut membuktikan keberhasilan proses isolasi dan pengklonaan fragmen promotor gen *lea3*. Hasil klon yang diperoleh dapat dimanfaatkan pada penelitian lebih lanjut untuk menguji pola ekspresi promotor gen *lea3* dari kultivar Rojolele dan Batutegi melalui fusi dengan vektor ekspresi pCAMBIA 1301 yang mengandung gen penanda (*gusA*). Selanjutnya, akan dimanfaatkan untuk upaya perakitan padi transgenik yang tahan kekeringan.