

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. TANAMAN PADI (*Oryza sativa* L.)

1. Karakteristik dan klasifikasi tanaman padi

Menurut Tjitrosoepomo (2002: 440), klasifikasi padi secara umum adalah sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta
Subdivisi : Angiospermae
Kelas : Monocotyledoneae
Bangsa : Poales
Suku : Poaceae
Marga : *Oryza*
Jenis : *Oryza sativa* L.

Karakteristik umum padi yaitu, rumput berumpun kuat, berumur 1 tahun dengan tinggi 1,5--2 m. Helaian daun berbentuk garis dengan panjang 15--80 cm, kebanyakan dengan tepi daun yang kasar. Bunga malai dengan panjang sekitar 15--40 cm, tumbuh ke atas dengan ujung yang menggantung serta cabang yang menggantung. Anak bulir sangat beraneka ragam. Bakal buah beruang satu dan berbiji satu. Buah dinamakan buah padi (*caryopsis*). Habitat terdapat di tempat yang basah atau di rawa (Van Steenis 2005: 98).

2. Budidaya tanaman padi

Padi yang merupakan genus *Oryza* terdiri atas dua spesies hasil kultivasi dan 21 spesies *wildtype*. Dua spesies hasil kultivasi tersebut adalah *Oryza sativa* L. dan *Oryza glaberrima* Steud. *Oryza sativa* merupakan spesies yang telah dibudidayakan secara luas, sedangkan *O. glaberrima* merupakan padi Afrika dan hanya tumbuh di beberapa negara di Afrika Barat (Khush 1997: 27).

Kato *dkk.* (1928) (*lihat* Khush 1997: 29) membedakan *O. sativa* menjadi dua subspecies, yaitu Indica dan Japonica. Subspecies Indica dan Javanica dapat dibedakan berdasarkan sifat resistan terhadap potasium klorat (KClO₃), toleransi terhadap dingin, panjang rambut apikal, dan reaksi terhadap fenol. Morinaga (1954) (*lihat* Khush 1997: 29) menawarkan kelompok ketiga untuk memasukkan varietas Bulu dan Gundil asal Indonesia dalam kelompok Javanica, tetapi tidak memberikan deskripsi yang jelas. Glaszmann (1987) (*lihat* Khush 1997: 30) kemudian melaporkan bahwa subspecies Japonica terbagi menjadi dua berdasarkan analisis isozim, yaitu Japonica tropis (*tropical* Japonica) dan Japonica subtropis (*temperate* Japonica). Kelompok Javanica merupakan Japonica tropis.

Subspecies Indica banyak terdapat di negara-negara tropis seperti India, Vietnam, Kamboja, dan Indonesia dan contoh kultivar subspecies Indica adalah Minghui 63. Subspecies Japonica banyak ditemukan di Negara Jepang, dan contoh kultivar subspecies Japonica adalah Nipponbare dan

Koshihikari. Subspesies Javanica banyak dibudidayakan di Indonesia, khususnya di Pulau Jawa, dan contoh kultivar subspesies Javanica adalah Rojolele (Soerjani *dkk.* 1987: 448).

3. Tanaman padi kultivar Rojolele subspesies Javanica dan Batutege subspesies Indica

Padi kultivar Rojolele subspesies Javanica merupakan padi berkualitas yang telah banyak ditanam di berbagai wilayah di Indonesia. Menurut Graham (2002) (*lihat* Rachmawati *dkk.* 2004: 1193) padi kultivar Rojolele memiliki fenotipe daun yang ramping dan panjang, memiliki komposisi amilum yang sedang, temperatur intermediet untuk gelatinisasi, merupakan padi aromatik, dan memiliki rasa yang enak. Berdasarkan Rachmawati *dkk.* (2004: 1193), kultivar Rojolele memiliki karakteristik tinggi normal 165 cm, batang kuat dan tebal, daun kasar, sistem perakaran kuat, dan waktu panen yang cukup lama (150 hari setelah penanaman). Produksi padi Rojolele dapat mencapai 8--10 ton/ha sehingga cukup menguntungkan secara ekonomi. Kualitas Rojolele pada keturunannya juga cenderung stabil.

Padi kultivar Batutege subspesies Indica merupakan padi gogo yang hidup di lahan kering. Kultivar tersebut memiliki tinggi 120--128 cm, batang tegak, waktu panen berkisar 112--120 hari, dan potensi hasil 6 ton/ha. Kultivar tersebut tahan terhadap penyakit blas daun, blas leher, dan bercak daun. Selain itu, kultivar tersebut juga toleran terhadap keracunan aluminium dan tahan terhadap kekeringan (Suprihatno *dkk.* 2007: 61).

B. PROMOTER

1. Definisi dan karakteristik promoter

Promoter merupakan daerah pada *deoxyribonucleic acid* (DNA) sebagai tempat pelekatan RNA polimerase yang mengawali proses transkripsi. Promoter sangat penting untuk ekspresi suatu gen pada organisme prokariot dan eukariot. Promoter terdiri atas informasi untuk inisiasi transkripsi dan situs pengendalian ekspresi gen (Tamarin 2002: 248).

Organisme prokariot, seperti *E. coli*, memiliki dua macam sekuen DNA pada daerah promoternya. Sekuen tersebut secara umum ditemukan pada daerah -35 dan -10 dari titik awal transkripsi. Sekuen tersebut juga memiliki urutan basa-basa nukleotida yang *conserved*, disebut sekuen konsensus. Sekuen konsensus pada daerah -35 adalah 5'-TTGACA-3' dan sekuen konsensus pada daerah -10 adalah 5'-TATAAT-3' yang dikenal dengan sebutan *Pribnow box* (Gambar 1) (Russell 1990: 386).

Promoter organisme eukariot memiliki elemen promoter yang mengatur terjadinya transkripsi. Elemen promoter yang terletak dekat dengan situs inisiasi transkripsi adalah *TATA box* atau elemen TATA (disebut juga *Goldberg-Hogness box*), *CAAT box*, dan *GC box*. Elemen tersebut dinamakan sesuai dengan sekuen basa-basa DNA yang banyak ditemukan. Promoter berisi beberapa kombinasi dari elemen promoter. Sebagai contoh, tidak semua promoter terdiri atas elemen TATA dan beberapa promoter memiliki lebih dari satu kopi elemen CAAT atau GC (Russell 1990: 389).

TATA *box* memiliki sekuen konsensus 5'-TATAAA-3' dan berada pada posisi -30. CAAT *box* memiliki sekuen konsensus 5'-GGCCAATCT-3' dan berada pada posisi -75 pada banyak gen tetapi dapat juga ditemukan pada lokasi berbeda. GC *box* memiliki sekuen konsensus 5'-GGGCGG-3' dan berada pada posisi -90 serta umumnya memiliki lebih dari satu salinan (Gambar 2) (Russell 1990: 389--390).

2. Tipe-tipe promoter

Promoter dibedakan menjadi beberapa tipe berdasarkan tingkat kontrol ekspresi gen. Beberapa tipe promoter tersebut adalah:

a. Promoter konstitutif

Promoter konstitutif merupakan promoter yang mengendalikan ekspresi gen pada semua jaringan dan umumnya tidak bergantung pada faktor lingkungan dan fase perkembangan. Beberapa contoh promoter konstitutif adalah promoter CAMV 35S, *opine*, *ubiquitin* (Ubi), *actin1*, dan *alkohol dehidrogenase 1* (*adh-1*) (Roa-Rodriguez 2007: 7).

b. Promoter sintetik

Promoter sintetik merupakan promoter buatan yang terdiri atas elemen utama dari daerah promoter alami (TATA *box*, GC *box*, dan CAAT *box*) yang dapat berasal dari organisme yang berbeda. Hal tersebut memungkinkan

promoter sintetik digunakan pada organisme yang berbeda dalam rekayasa genetika untuk mengekspresikan suatu gen (Roa-Rodriguez 2007: 68).

c. Promoter terinduksi

Promoter terinduksi merupakan promoter yang mengendalikan ekspresi gen hanya pada saat terinduksi di bawah pengaruh suatu faktor tertentu dan pada keadaan normal aktivitas promoter dibatasi. Faktor abiotik seperti cahaya, tingkat oksigen, panas, dingin, dan luka mekanis dapat menginduksi promoter untuk mengekspresikan suatu gen. Promoter terinduksi juga dapat merespons senyawa kimia, yang tidak ditemukan secara alami pada organisme hidup, seperti respons terhadap antibiotik, alkohol, steroid, dan herbisida. Contoh promoter terinduksi adalah promoter *rd29A*, *cor15A*, *kin1*, dan *cor6.6* yang terinduksi kekeringan (Roa-Rodriguez 2007: 71; Xiao *dkk.* 2007: 44).

d. Promoter jaringan spesifik

Promoter jaringan spesifik merupakan promoter yang mengendalikan ekspresi gen pada jaringan spesifik atau fase perkembangan tertentu dan dapat diinduksi oleh faktor eksogen maupun endogen. Contoh promoter jaringan spesifik antara lain promoter gen *β -amilase* atau promoter gen *hordein* barley (untuk ekspresi gen pada biji), promoter gen *pz7* dan *pz130* tomat (untuk ekspresi gen pada ovarium), promoter gen *RD2* tembakau (untuk

ekspresi gen pada akar), promotor *TRX* pisang dan promotor *actin* melon (untuk ekspresi gen pada buah) (Roa-Rodriguez 2007: 117).

C. PROMOTER GEN *late embryogenesis abundant 3 (lea3)*

Promoter gen *lea3* merupakan salah satu promotor terinduksi kekeringan. Promoter terinduksi kekeringan hanya akan mengekspresikan suatu gen dengan adanya induser kekeringan. Promoter terinduksi kekeringan lainnya adalah promotor gen *rd29A*, promotor gen *cor15A*, promotor gen *kin1*, dan promotor gen *cor 6.6* (Xiao *dkk.* 2007: 44).

Promoter gen *lea3* akan mengekspresikan gen *lea3* yang memberikan ketahanan terhadap kekeringan pada tanaman. Ekspresi gen *lea3* akan menghasilkan protein LEA3. Protein LEA3 memiliki pola 11 asam-amino yang berulang, yaitu TAQAAKEKAGE. Pola tersebut membentuk struktur *amphiphatic alpha-helixed*. Protein LEA3 berperan melindungi struktur selular dari efek kehilangan air dan mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh konsentrasi ion yang tinggi pada sel yang mengalami dehidrasi. Mekanisme perlindungan dengan cara membuang sejumlah ion di sitoplasma saat sel tercekam kekeringan, membentuk jaringan sitoplasma yang tebal, dan menjaga kestabilan struktur membran plasma (Liu & Zheng 2005: 325).

Promoter gen *lea3* yang terinduksi kekeringan memiliki ekspresi kuat hanya pada kondisi kekeringan dan memiliki ekspresi rendah pada saat kondisi normal (Xiao & Xue 2001: 668). Hal tersebut berbeda dengan promotor konstitutif CAMV 35S yang mengendalikan ekspresi terus menerus

dan tidak bergantung pada faktor lingkungan tertentu (Roa-Rodriguez 2007: 2). Ekspresi yang terus menerus, pada kasus tertentu, dapat membawa dampak negatif untuk perkembangan tanaman karena produk ekspresi dapat menjadi racun untuk tanaman tersebut (Cheng *dkk.* 2001: 424).

Penelitian oleh Agalou *dkk.* (2008: 100) mengenai *over expression* gen *oshox* menggunakan promotor konstitutif CAMV 35S, membuktikan bahwa penggunaan promotor tersebut memengaruhi fase perkembangan generatif maupun vegetatif. Fase generatif (pembungaan) padi menjadi terlambat atau tidak terjadi. Padi juga memperlihatkan fase vegetatif yang panjang, dengan pembentukan daun baru yang berkelanjutan atau tidak ada pengguguran daun tua. Pemanjangan batang juga tereduksi dan padi tidak atau sedikit membentuk cabang dari batang utama.

Promoter gen *lea3* yang terinduksi kekeringan tidak membawa dampak negatif terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Xiao *dkk.* (2007: 38) telah berhasil mengisolasi promotor gen *Oslea3-1* pada padi kultivar IRAT 109 ras Japonica. *Over expression* gen *Oslea3-1* menggunakan promotor tersebut pada tanaman padi kultivar Zhonghua 11 subspecies Japonica meningkatkan ketahanan padi Zhonghua 11 terhadap kekeringan tanpa memengaruhi perkembangan padi. Fenotipe tanaman padi kultivar Zhonghua 11 tidak memperlihatkan abnormalitas dalam kondisi normal tanpa cekaman kekeringan.

D. CEKAMAN KEKERINGAN

Cekaman kekeringan merupakan cekaman terbesar yang memengaruhi pertumbuhan dan produksi tanaman pangan. Kondisi tersebut dapat memicu respons fisiologis, biokimia, dan molekuler (Kalefetoğlu & Ekmekçi 2005: 723). Cekaman kekeringan pada tanaman dapat terjadi karena ketersediaan air tidak cukup dan transpirasi yang berlebihan atau kombinasi kedua faktor tersebut. Tanaman juga dapat mengalami kekeringan walaupun tersedia air yang cukup. Hal tersebut dapat terjadi apabila kecepatan absorpsi air tidak seimbang dengan proses kehilangan air melalui proses transpirasi (Haryati 2003: 1).

Ciri morfologi pada tanaman yang mengalami cekaman kekeringan dapat dilihat pada organ daun dan akar. Cekaman kekeringan mengakibatkan penurunan pembentukan dan perluasan daun, peningkatan penebaran dan kerontokan daun, atau kombinasi keduanya. Panjang akar berpengaruh terhadap jumlah air yang diserap. Rendahnya kadar air tanah akan menurunkan panjang akar, kedalaman penetrasi, dan diameter akar (Haryati 2003: 1--2).

Respons tanaman terhadap cekaman kekeringan dipengaruhi dan bergantung pada spesies, genotipe, umur, fase perkembangan, organ, dan tipe sel, serta *celular compartment* (dinding sel dan membran sel). Respons pada cekaman kekeringan dapat terjadi hanya beberapa detik, beberapa menit, sampai beberapa jam. Gen responsif terhadap kekeringan dapat

dibedakan menjadi *early-response genes* dan *delayed-response genes* (Kalefetoğlu & Ekmekçi 2005: 729).

Early-response genes, yaitu gen yang cepat terinduksi. Induksi gen tidak membutuhkan sintesis protein baru karena semua komponen sinyal telah tersedia. *Delayed-response genes*, yaitu gen yang teraktivasi dengan lambat dan terdiri atas gen-gen terinduksi kekeringan lainnya.

Early-response genes umumnya mengkode faktor transkripsi yang mengaktivasi *delayed-response genes* (Kalefetoğlu & Ekmekçi 2005: 729).

Kehilangan air pada cekaman kekeringan akan memicu sintesis asam absisat (ABA). Beberapa gen terinduksi setelah terjadi akumulasi ABA pada tanaman selama cekaman kekeringan, yaitu gen-gen yang mengkode sintesis enzim untuk osmoprotektan dan protein LEA. Protein LEA akan meningkatkan toleransi jaringan vegetatif terhadap cekaman kekeringan (Xiong & Zhu 2003: 29).

E. TEKNIK MOLEKULER DAN KOMPONEN YANG DIGUNAKAN DALAM PROSES PENGKLONAN PROMOTER GEN *lea3*

1. Isolasi DNA genom

Deoxyribonucleic acid (DNA) genom adalah satu set lengkap atau keseluruhan informasi genetik yang terdapat pada suatu organisme (Weaver & Hedrick 1997: 616). Isolasi DNA merupakan tahap penting dalam setiap eksperimen. Isolasi DNA merupakan pemisahan molekul DNA dari molekul

lain, seperti dinding sel, membran sel, dan membran inti sehingga dapat dilihat strukturnya. Tahap-tahap dalam isolasi DNA tanaman yaitu pengambilan sampel, pelisisan dinding sel dan membran sel, purifikasi, serta presipitasi (Kephart 1999: 1).

Genom DNA padi yang diisolasi memiliki ukuran sebesar 430 Mbp (Goff *dkk.* 2002: 92). Untai DNA diekstraksi melalui proses sentrifugasi dan penggunaan *buffer* ekstraksi Cornell (Cornell University 1994: 1). *Buffer* ekstraksi pada metode tersebut mengandung NaCl, Tris-Cl, EDTA, SDS, dan Na-Bisulfit. Natrium klorida memberikan kondisi ionik yang stabil sehingga molekul DNA dapat terpisah dengan komponen lainnya. Tris-Cl berfungsi sebagai larutan penyangga untuk kestabilan pH. Larutan EDTA berfungsi mengikat kation divalen yang membentuk inhibitor enzim DNase sehingga akan menjaga struktur DNA agar tidak terdegradasi. Sodium dodesil sulfat (SDS) berfungsi melisiskan membran sel sehingga DNA dapat diisolasi. Natrium bisulfit akan meningkatkan daya presipitasi DNA terhadap alkohol dingin (Sambrook & Russell 2001: 6.61--6.62).

Kontaminasi protein pada DNA dihilangkan menggunakan larutan kloroform isoamil alkohol dengan perbandingan 24:1. Larutan kloroform akan melisiskan membran sel dan mendenaturasi protein sel sehingga memudahkan molekul DNA terpisah dari protein dan senyawa polisakarida. Isoamil alkohol digunakan untuk mengurangi pembusaan selama proses ekstraksi (Sambrook & Russell 2001: A1.23).

2. *Polymerase chain reaction* (PCR)

Polymerase chain reaction (PCR) ialah metode enzimatik untuk melipatgandakan suatu sekuens nukleotida secara eksponensial dengan cara *in vitro* (Yuwono 2006: 1). Teknik PCR juga meningkatkan jumlah amplicon secara eksponensial dalam waktu singkat (Brown 2006: 9). Prinsip teknik PCR yaitu enzim DNA polimerase memperbanyak bagian spesifik yang diinisiasi oleh pelekatan primer dengan menghubungkan deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) dalam reaksi termal (Raven & Johnson 2002: 67--68). Teknik PCR memerlukan beberapa komponen, yaitu DNA polimerase yang mampu mengkatalisis proses sintesis DNA dari cetakan DNA, dua oligonukleotida sebagai primer, dNTP sebagai sumber nukleotida, kation divalen (biasanya berupa $MgCl_2$) untuk mengaktifkan enzim polimerase, *buffer* PCR untuk mengaktifkan kestabilan pH, kation monovalen (biasanya berupa KCl) dalam *buffer* PCR, dan cetakan DNA yang mengandung sekuens target untuk diampifikasi (Sambrook & Russell 2001: 8.4--8.6).

Menurut Abd-Elsalam (2003: 94), primer memengaruhi spesifisitas dan sensitivitas reaksi PCR. Rancangan primer merupakan parameter yang menentukan kesuksesan reaksi PCR. Rancangan primer yang kurang baik menyebabkan reaksi PCR tidak bekerja dengan baik sehingga menyebabkan produk PCR yang tidak spesifik dan atau terbentuknya primer dimer. Sekuens primer yang baik ditentukan oleh beberapa hal, antara lain panjang primer (18--30 basa), nilai *melting temperature* (T_m) dari sepasang primer tidak lebih

dari 5° C dengan kisaran suhu optimal 52°--58° C, dan komposisi basa GC sebesar 40--65%.

Terdapat tiga tahapan dalam PCR, yaitu denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi. Denaturasi merupakan tahap pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal melalui pemutusan ikatan hidrogen antara basa-basa nitrogen yang terjadi pada suhu 92°--95° C. *Annealing* merupakan tahap penempelan primer pada kedua untai tunggal DNA pada suhu 55°--65° C (biasanya pada suhu 50° C). Polimerisasi merupakan proses sintesis untai DNA target dengan pemanjangan primer oleh *Taq DNA polymerase* dari arah 5' ke 3' dengan menambahkan basa-basa nukleotida pada suhu 72° C (Klug & Cummings 1994: 402; Fairbanks & Andersen 1999: 277).

Suhu pada tahap *annealing* merupakan parameter yang penting untuk spesifisitas dalam PCR. Suhu *annealing* dapat dioptimasi menggunakan PCR gradien. *Polymerase chain reaction* gradien merupakan suatu teknik PCR yang dapat digunakan untuk proses optimasi parameter PCR, seperti suhu. Proses PCR gradien dijalankan dengan suhu *annealing* berbeda pada satu waktu sehingga suhu optimal dapat diketahui dengan proses yang mudah dan cepat. Perbedaan antar suhu pada proses PCR gradien dapat mencapai 40° C (Whatman Biometra 2003: 2).

3. Enzim restriksi

Enzim restriksi merupakan endonuklease yang memecah ikatan fosfodiester pada situs pengenalan spesifik dari DNA (Wong 1997: 69). Situs

pengenalan spesifik enzim restriksi berjumlah 6--8 bp, disebut palindrom, yaitu sekuen yang identik dengan untai komplementernya ketika dibaca pada arah yang berlawanan (Paolella 1998: 177). Terdapat 3 tipe enzim restriksi dalam sel bakteri, yaitu tipe I, tipe II, dan tipe III. Hanya enzim restriksi tipe II yang digunakan dalam pengerjaan manipulasi DNA, karena mampu mengenali dan memotong untai DNA pada situs yang sama dan spesifik, serta tidak membutuhkan adenosin trifosfat (ATP) sebagai sumber energi (Fairbanks & Andersen 1999: 256).

Enzim restriksi juga dibedakan berdasarkan hasil pemotongan. Beberapa enzim memotong kedua untai DNA pada posisi yang sama dan akan menghasilkan ujung potongan yang disebut *blunt end*. Contoh enzim yang menghasilkan potongan *blunt end* adalah *HaeIII*, *HindII*, dan *SmaI*. Beberapa enzim memotong untai DNA pada posisi yang berbeda dan menghasilkan ujung potongan kohesif yang disebut *sticky end*. Contoh enzim yang menghasilkan potongan *sticky end* adalah *EcoRI*, *BglII*, *HindIII*, *SauI*, dan *PstI* (Wong 1997: 70; Griffiths *dkk.* 1998: 304).

4. Enzim ligase

Dua fragmen DNA dengan ujung kohesif yang berkomplemen dapat menjadi pasangan basa dengan menyatukan ujung-ujungnya menggunakan enzim ligase. Enzim ligase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi pembentukan kembali ikatan fosfodiester antar potongan fragmen DNA menggunakan *bacteriophage T4 DNA ligase* dengan bantuan ATP. Enzim

tersebut juga dapat bekerja pada ligasi *blunt end* tetapi dengan efisiensi yang rendah (Wong 1997: 70--71).

5. Transformasi gen

Proses introduksi DNA asing ke dalam sel inang disebut transformasi. Suatu DNA asing dapat lebih mudah diintroduksi ke dalam sel bakteri apabila sel bakteri tersebut telah diberi perlakuan CaCl_2 atau kombinasi garam lainnya. Sel bakteri yang telah diberi perlakuan tersebut dinamakan sel kompeten (Wong 1997: 133).

Terdapat beberapa metode transformasi. Pemilihan metode yang digunakan bergantung tipe sel inang yang digunakan. Transformasi DNA dapat dilakukan dengan metode CaCl_2 dan elektroporasi, dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens*, biolistik atau *particle bombardment*, mikroinjeksi, dan transfer dengan PEG (*poliethylen glikol*) (Wong 1997: 133).

Penggunaan larutan CaCl_2 pada metode CaCl_2 yang dipicu kejutan panas (*heat shock*) dapat menyebabkan DNA menempel pada membran luar sel kompeten, setelah diberi kejutan panas DNA dapat masuk ke dalam sel kompeten (Wong 1997: 133--134). Efisiensi transformasi metode kejutan panas berkisar antara 10^5 -- 10^6 transforman/ μg DNA dan dapat ditingkatkan hingga mencapai efisiensi 10^9 transforman/ μg DNA, bergantung pada kombinasi bahan-bahan kimia serta perlakuan secara fisik terhadap sel (Sambrook & Russell 2001: 1.24).

Transformasi dengan metode elektroporasi memanfaatkan kejutan listrik langsung pada sel kompeten. Kejutan listrik tersebut akan mengganggu kestabilan membran *E. coli* sehingga akan terbentuk pori-pori pada membran sel dan memungkinkan membran sel terbuka serta membuatnya menjadi permeabel sehingga molekul DNA dapat masuk ke dalam sel (Wong 1997: 134). Efisiensi transformasi yang diperoleh antara 10^7 -- 10^9 transforman/ μg DNA dan dapat mencapai 10^{10} transforman/ μg DNA bergantung pada besarnya kejutan listrik, konsentrasi DNA, serta komposisi larutan (Sambrook & Russell 2001: 1.25--1.26).

6. Pengklonaan

Pengklonaan merupakan proses pembuatan salinan dari suatu gen dengan prinsip teknologi DNA rekombinan (Brooker 2005: 490). Molekul DNA rekombinan dibuat dengan menyisipkan fragmen DNA yang mengandung gen target ke dalam vektor. Vektor berperan sebagai pembawa gen yang akan diklona ke dalam sel inang. Vektor rekombinan yang ditransformasi ke dalam sel inang ikut membelah setiap sel inang melakukan pembelahan sehingga koloni sel inang yang membawa vektor dengan gen target akan menghasilkan salinan identik gen target yang banyak (Wong 1997: 4).

Vektor dalam proses pengklonaan harus memiliki beberapa elemen struktural, yaitu penanda awal replikasi, sekuen pengenalan untuk enzim-enzim restriksi, penanda seleksi (biasanya berupa gen resistensi antibiotik),

dan daerah promotor yang memungkinkan berjalannya proses transkripsi DNA yang disisipkan. Dua tipe dasar dari vektor adalah plasmid dan faga. Vektor lain yang dapat digunakan dalam proses pengklonaan adalah kosmid, fagemid, *bacterial artificial chromosome* (BAC), dan *yeast artificial chromosome* (YAC) (Wong 1997: 98; Snustads & Simmons 2003: 486).

Vektor plasmid pGEM-T *Easy* merupakan vektor pengklonaan yang telah memiliki topologi linier dan memiliki deoksitimidin pada kedua ujung 3' (Gambar 3). Ujung 3'-T tersebut terletak pada situs sisipan dan berguna untuk meningkatkan efisiensi ligasi dengan produk PCR yang telah diberikan penambahan deoksiadenosin (A) pada ujung 3' (Promega 2008: 2). Vektor tersebut memiliki promotor T7 dan SP6 RNA polimerase yang mengapit daerah *multiple cloning site* (MCS) di dalam daerah α -peptida yang mengkode enzim β -galaktosidase. Adanya DNA sisipan pada daerah tersebut akan menginaktivasi pembentukan enzim β -galaktosidase, sehingga hasil klon dapat diidentifikasi pada medium penapisan. Vektor tersebut juga memiliki situs pengikatan primer universal M13 *forward* dan *reverse* untuk proses *sequencing* (Gambar 3) (Promega 2008: 2).

Vektor pGEM-T *Easy* juga memiliki *multiple* situs restriksi untuk proses digesti DNA sisipan pada vektor rekombinan. Vektor tersebut juga telah didesain untuk memudahkan verifikasi plasmid rekombinan dengan proses digesti menggunakan satu enzim restriksi. Enzim restriksi *EcoRI*, *BstZI*, dan *NotI* merupakan enzim yang dapat digunakan dalam proses digesti menggunakan satu enzim restriksi untuk melepaskan DNA sisipan pada

vektor rekombinan. Ketiga enzim tersebut memiliki dua situs restriksi pada kedua ujung 3' yang mengagap DNA sisipan (Gambar 3) (Promega 2008 : 2).

7. Seleksi vektor rekombinan hasil pengklonaan

Seleksi vektor rekombinan dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain dengan menguji sensitivitas dan resistensi terhadap antibiotik, menumbuhkan sel transforman pada medium selektif nutrisi, seleksi biru putih atau α -komplementasi, analisis restriksi dari DNA plasmid, dan hibridisasi asam nukleat. Uji sensitivitas dan resistensi antibiotik dapat dilakukan apabila vektor pengklonaan membawa sedikitnya satu gen penyebab resistensi terhadap antibiotik pada sel inang, misalnya ampisilin (amp^R). Ampisilin dapat menghambat sejumlah enzim yang memengaruhi sintesis dinding sel bakteri. Gen resisten ampisilin atau gen *bla* pada vektor mengkode enzim β -laktamase yang disekresikan ke dalam ruang periplasmik bakteri. Enzim tersebut akan mengkatalisis reaksi hidrolisis cincin β -laktam ampisilin sehingga bakteri menjadi resisten terhadap ampisilin (Sambrook *dkk.* 1989: 1.6 & 1.85).

Seleksi biru putih atau teknik α -komplementasi terjadi ketika dua fragmen inaktif enzim β -galaktosidase bersatu membentuk enzim fungsional. Enzim β -galaktosidase menghidrolisis laktosa menjadi glukosa. Aktivitas enzim tersebut dapat diuji dengan menggunakan senyawa 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktosidase (X-gal) yang menghasilkan warna biru pada medium. Enzim tersebut dihasilkan oleh gen *lacZ* pada MCS vektor

pengklonaan. Isopropil-1-tio- β -galaktosidase (IPTG) juga digunakan sebagai induser untuk menonaktifkan represor lacZ. Bakteri yang mengandung plasmid rekombinan tidak menghasilkan enzim β -galaktosidase sehingga pada medium akan berwarna putih, sedangkan bakteri yang tidak mengandung vektor rekombinan tetap menghasilkan enzim β -galaktosidase yang dapat memecah senyawa X-gal sehingga koloni akan berwarna biru (Sambrook & Russell 2001: 1.149--1.150).

8. Elektroforesis gel

Elektroforesis gel adalah teknik untuk memisahkan molekul organik seperti DNA, RNA, atau protein berdasarkan tingkat migrasi molekul bermuatan pada gel poliakrilamida atau gel agarosa yang dialiri arus listrik (Fairbanks & Andersen 1999: 278). Gel yang umum digunakan pada proses elektroforesis ada 2 jenis, yaitu gel poliakrilamida dan gel agarosa. Gel poliakrilamida efektif untuk pemisahan fragmen DNA yang berukuran kecil (5-500 bp). Gel agarosa memiliki kemampuan pemisahan yang lebih rendah dengan kisaran pemisahan yang lebih luas (200--50.000 bp) daripada gel poliakrilamida (Sambrook & Russell 2001: 5.2).

Elektroforesis gel agarosa memerlukan *running buffer* dan *loading buffer*. *Running buffer* dapat berupa Tris-borat EDTA (TBE) atau Tris-asetat EDTA (TAE). *Loading buffer* umumnya mengandung sukrosa dan bromfenol biru. Sukrosa berfungsi menambah berat jenis DNA, sehingga DNA tenggelam ke dasar sumur dan tidak terbawa oleh *running buffer*.

Bromofenol biru berfungsi sebagai pewarna yang setara dengan ukuran ± 300 bp, sehingga migrasi DNA pada gel dapat terlihat (Sambrook & Russell 2001: 5.8--5.9).

Fragmen DNA hasil elektroforesis dapat divisualisasikan dengan beberapa cara. Cara yang paling umum digunakan adalah pewarnaan dengan etidium bromida. Etidium bromida merupakan pewarna mutagenik yang dapat berinterkalasi di antara basa-basa DNA dan berwarna terang di bawah sinar ultraviolet (Fairbanks & Andersen 1999: 280). Ukuran molekul DNA dapat diketahui dengan cara membandingkan posisi pita yang terbentuk dengan posisi ukuran marka penanda. Marka yang biasa digunakan antara lain marka λ HindIII, λ BstEII, dan λ BstNI (Ausubel *dkk.* 2002: 2.5A.7).

9. Sequencing

Sequencing merupakan proses penentuan urutan basa nukleotida molekul materi genetik seperti fragmen DNA atau *ribonucleic acid* (RNA) (Russell 1990: 304). Metode *sequencing* yang telah dikembangkan sejak tahun 1970 adalah metode Maxam-Gilbert dan Sanger. Metode Maxam-Gilbert menggunakan bahan kimia spesifik untuk memotong untai DNA target, sedangkan metode Sanger menggunakan enzim DNA polimerase untuk membentuk salinan komplementer dari DNA target (Sambrook *dkk.* 1989: 13.7 & 13.11).

Metode Maxam-Gilbert sering disebut metode kimia. Metode Maxam-Gilbert melibatkan bahan radioaktif seperti fosfat, sejumlah senyawa kimia,

fragmen DNA, dan autoradiografi (Paolella 1998: 193). Metode Maxam-Gilbert pertama kali dilakukan dengan menandai fragmen DNA pada ujung 5'-nya melalui penempelan enzimatik radioaktif fosfat (^{32}P). Kelompok fragmen tersebut diberi reagen yang akan memodifikasi dan merusak ikatan DNA pada titik tempat basa tertentu berada (Wolfe 1995: 423--424).

Metode Sanger dinamakan juga metode *chain termination*. Metode tersebut menggunakan sintesis primer untuk memperpanjang sekuen DNA. Tahap awal metode Sanger adalah dengan membuat campuran reaksi pada empat tabung yang berbeda. Setiap tabung berisi *template* DNA, primer, DNA polimerase, label radioaktif ^{32}P , dan *dideoxynucleoside triphosphate* (ddNTP) keempat basa DNA. Setiap tabung memiliki satu jenis ddNTP. *Dideoxynucleoside triphosphate* (ddNTP) tidak memiliki gugus -OH pada ujung 3', hal tersebut berguna untuk menghentikan sintesis primer pada sekuen yang tidak memiliki gugus -OH (Paolella 1998: 193).

Sebagian besar pengerjaan DNA *sequencing* telah diotomatisasi dan dikomputerisasi sehingga dikenal sebagai *automated DNA sequencing*. Metode tersebut merupakan modifikasi dari metode Sanger. Metode tersebut menggunakan pewarna berfluoresens yang berbeda untuk memberikan label pada ddNTP. Pewarna berfluoresens menggantikan peran radioaktif fosfat. Pembacaan sekuen dilakukan oleh sistem komputer dengan membedakan panjang gelombang yang berbeda dari perpendaran fluoresens yang berbeda (Paolella 1998: 193).

10. Program *basic local alignment search tool* (BLAST)

Basic local alignment search tool (BLAST) merupakan program dari NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) yang digunakan untuk mencari similaritas suatu sekuen nukleotida atau protein (*query sequence*) dengan sekuen database (*subject sequence*) pada GenBank. Similaritas tersebut dapat digunakan untuk mengetahui fungsi suatu gen, memperkirakan anggota baru dari suatu famili gen, dan mengetahui hubungan kekerabatan (NCBI 2008: 1).

Tingkat similaritas suatu sekuen DNA dapat dilihat melalui beberapa parameter hasil BLAST, yaitu *bit score*, *expect value* (E), *identities*, dan *gaps*. *Bit score* merupakan nilai perhitungan statistik hasil perbandingan antara data *query sequence* dan *subject sequence*. Semakin tinggi nilai *bit score*, maka semakin tinggi nilai similaritas. Nilai E merupakan jumlah sekuen pada *subject sequence* yang tidak terkait dengan *query sequence*. Semakin kecil nilai E maka semakin tinggi tingkat kepercayaan terhadap kesamaan sekuen tersebut. *Identities* adalah persentase similaritas antara *query sequence* dan *subject sequence*. *Gaps* menunjukkan jumlah kekosongan basa yang muncul dari keseluruhan sekuen yang dibandingkan (Hall 2001: 13--14).