

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

Isolasi DNA genom tanaman padi T0 telah dilakukan pada 118 sampel. Berdasarkan hasil digesti DNA dengan enzim *EcoRI*, diperoleh sebanyak 74 sampel tanaman dari 118 tanaman T0 dinyatakan memiliki kualitas baik (Tabel 1). Sampel tersebut selanjutnya dapat digunakan dalam analisis *Southern hybridization* untuk mengetahui jumlah *copy* T-DNA yang terdapat di dalamnya (Gambar 5). Hasil uji spektrofotometer pada beberapa sampel DNA tanaman T0 membuktikan bahwa hasil isolasi DNA genom dengan metode Cornell (1994: 1) yang diperoleh cukup murni dengan kisaran 1,84--2,06 (Tabel 2).

Analisis *Southern hybridization* dilakukan pada 46 dari 74 sampel tersebut dan diperoleh 9 sampel tanaman T0 yang memiliki *single copy* T-DNA (Tabel 3). Hasil *Southern hybridization* dari 17 sampel dapat dilihat pada Gambar 6. Sebanyak 549 tanaman T1 telah diperoleh dari 9 tanaman T0 yang membawa *single copy* T-DNA. Isolasi DNA dan analisis PCR eksisi telah dilakukan pada 161 tanaman T1 dari 5 tanaman T0 (parental) sehingga diperoleh 110 tanaman yang diindikasikan memiliki aktivitas transposon *Ds* (Tabel 4). Hasil PCR eksisi dari 27 sampel dapat dilihat pada Gambar 7.

Uji seleksi yang dilakukan pada penelitian adalah uji GFP, basta, dan higromisin. Uji GFP telah dilakukan pada 549 kecambah tanaman T1

berumur sekitar 2 minggu. Uji GFP pada 549 kecambah tersebut menunjukkan hasil yang negatif. Uji basta dan higromisin dilakukan pada sampel daun tanaman T1 berumur 6 minggu. Kedua uji tersebut telah dilakukan pada 161 dari 549 tanaman T1 (Tabel 5). Berdasarkan hasil uji seleksi basta dan higromisin, diperoleh 78 tanaman padi mutan T1 yang mengandung transposon *Ds* stabil (positif uji basta-negatif uji higromisin). Ringkasan alur penelitian yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 9.

B. PEMBAHASAN

1. Isolasi DNA genom padi (*O. sativa*)

Penentuan metode isolasi DNA perlu disesuaikan dengan kuantitas DNA yang dibutuhkan. Volume DNA genom yang dibutuhkan untuk analisis tanaman padi (*O. sativa*) generasi pertama (T0) adalah sebanyak 200 µl. Volume tersebut digunakan untuk *Southern hybridization* dan stok DNA. Metode isolasi DNA genom tanaman T0 dilakukan dengan metode Cornell (1994: 1) karena metode tersebut telah berhasil dioptimasi untuk mendapatkan produk DNA sebanyak 200 µl. Optimasi tersebut dilakukan oleh Kelompok Padi, Puslit Biotek LIPI Cibinong.

Sampel DNA genom yang digunakan untuk keperluan analisis *Southern hybridization* harus merupakan DNA yang murni. Berdasarkan hasil spektrofotometri, rasio OD₂₆₀/OD₂₈₀ sampel DNA berkisar antara 1,84--2,06. Sampel DNA yang diperoleh tidak perlu dipurifikasi karena menurut

Sambrook & Russel (2001: A8.20--A8.21), DNA yang murni memiliki rasio OD_{260}/OD_{280} berkisar antara 1,8--2,0.

Metode isolasi DNA genom tanaman T1 dilakukan dengan metode Van Heusden *dkk.* (2000: 118--126). Volume DNA genom yang dibutuhkan untuk analisis tanaman T1 adalah sebanyak 30 μ l. Volume tersebut digunakan untuk PCR eksisi dan stok DNA. Metode isolasi DNA genom van Heusden telah dioptimasi untuk menghasilkan volume sebanyak 30 μ l. Optimasi metode tersebut dilakukan oleh Kelompok Padi, Puslit Biotek LIPI Cibinong.

DNA tanaman T1 tidak perlu dipurifikasi karena salah satu kelebihan teknik PCR adalah dapat bereaksi dengan menggunakan jumlah DNA yang sangat sedikit (Yuwono 2006: 1). Berdasarkan hasil PCR, sebanyak 0,5 μ l DNA sudah dapat memberi hasil reaksi yang baik. Keberhasilan reaksi PCR dapat dilihat setelah dielektroforesis pada gel agarosa 0,8% dengan voltase 100 volt, selama 1 jam. Pita-pita DNA yang muncul membuktikan bahwa reaksi PCR dapat bekerja dengan baik (Gambar 4).

2. Restriksi DNA

Genom DNA yang memiliki situs pengenalan untuk enzim restriksi nuklease dapat digunakan untuk berbagai kegiatan analisis molekuler (Simmer & Secko 2003: 1). Kualitas sampel DNA genom tanaman T0 padi ras Japonica kultivar Nipponbare dapat diketahui melalui proses restriksi DNA dengan enzim restriksi *EcoRI*. Enzim restriksi endonuklease yang digunakan

dalam proses digesti adalah *EcoRI* yang berasal dari *Escherichia coli strain* RY 13. Sampel DNA dinyatakan baik jika sampel DNA hasil restriksi berada di bawah pita DNA genom. Hal tersebut karena sampel DNA hasil digesti seharusnya memiliki ukuran yang lebih kecil dibanding DNA genom sehingga lebih cepat termigrasi pada gel agarosa.

Berdasarkan hasil elektroforesis dengan gel agarosa 0,8%, DNA genom tanaman T0 hasil digesti dapat divisualisasi. Menurut Yongbiao & Zhihong (2002: 161), ukuran DNA genom tanaman padi adalah sebesar 430 juta pb. Dengan demikian, dapat disimpulkan sampel DNA genom tanaman T0 pada lajur 1, 2, 4, 5, dan 6 memiliki kualitas yang baik. Hal tersebut karena sampel DNA genom menampilkan pita di atas marka λ *HindIII* 23.13 kpb sedangkan sampel DNA hasil restriksi berada di bawah pita DNA genom (Gambar 5)

Digesti pada 118 sampel tanaman T0 telah dilakukan dan diperoleh 74 sampel tanaman yang dinyatakan positif dapat didigesti dengan enzim restriksi *EcoRI*. Hasil yang negatif pada reaksi digesti selanjutnya tidak digunakan pada analisis *Southern hybridization*. Hasil yang negatif (lajur 3, 7, dan 8) dapat disebabkan kegagalan reaksi digesti. Kemungkinan konsentrasi DNA terlalu tinggi sehingga enzim yang digunakan tidak bekerja optimal. Hasil digesti yang negatif dapat juga disebabkan karena kualitas sampel DNA hasil isolasi yang kurang baik (banyak pengotor) (Simmer & Secko 2003: 1).

3. Penentuan jumlah *copy* T-DNA dengan teknik *Southern hybridization*

Tanaman generasi pertama (T₀) yang diteruskan dalam penelitian adalah yang memiliki *single copy* T-DNA. Menurut Kolesnik *dkk.* (2004: 203), penentuan fungsi gen dari fenotipe yang diekspresikan akan menjadi sulit apabila ada dua atau lebih posisi T-DNA dalam suatu genom. Jumlah *copy* T-DNA yang terinsersi dalam suatu genom dapat ditentukan melalui teknik *Southern hybridization*.

Teknik *Southern hybridization* merupakan teknik yang dapat digunakan untuk mendeteksi jumlah fragmen tertentu dalam suatu genom dengan menggunakan *probe* (pelacak) yang diberi label radioaktif (Brooker 2005: 525). Konstruksi T-DNA yang telah ditransformasikan pada genom DNA tanaman T₀ padi mengandung fragmen *hpt*. Dengan demikian, fragmen *hpt* dapat digunakan sebagai *probe* untuk mengetahui jumlah T-DNA yang terinsersi pada DNA genom.

Berdasarkan hasil *Southern hybridization* pada 46 sampel, diperoleh 9 tanaman T₀ yang memiliki *single copy* T-DNA. Hasil *Southern hybridization* lajur 3, 4, 5, 6, dan 10 adalah sampel yang memiliki *single copy* T-DNA (Gambar 4). Posisi pita yang muncul berbeda-beda karena ukuran hasil pemotongan dengan *EcoRI* dipengaruhi posisi T-DNA dalam genom. Enzim tersebut memotong untai DNA spesifik yang memiliki situs pengenalan berupa 5'-GATTC-3' (Simmer & Secko 2003: 3--4). Situs pengenalan

tersebut akan bersesuaian dengan promotor yang digunakan pada konstruksi T-DNA yang terdapat pada tanaman T0.

Hasil potong T-DNA dengan enzim *EcoRI* memiliki ukuran sekitar 3 kpb dari bagian *right border* (RB) dan tidak memotong di fragmen *hpt* pada konstruksi T-DNA (Gambar 6). Hal tersebut menyebabkan penggunaan *probe hpt* pada *Southern hybridization* DNA hasil potong dengan *EcoRI* menampilkan pita minimal berukuran 3 kpb (Komunikasi pribadi: Upadhyaya 2008). Dengan demikian, jumlah pita DNA hasil *Southern hybridization* menunjukkan jumlah *copy* T-DNA yang merupakan jumlah insersi T-DNA dalam genom.

Pereira & Aarts (1998) telah berhasil membuat konstruksi plasmid pTRA untuk mengklona gen *hpt* (*lihat Greco dkk. 2001: 217*). Fragmen *hpt* berukuran 1.138 pb diperoleh dari hasil restriksi plasmid pTRA dengan enzim restriksi *BamHI* (Komunikasi pribadi: Pereira 2007). Peta situs restriksi fragmen *hpt* dari plasmid pTRA dan visualisasi hasil isolasi fragmen *hpt* dapat dilihat pada Gambar 7.

Berdasarkan hasil *Southern hybridization* pada 46 sampel DNA genom tanaman T0, diperoleh 9 tanaman yang memiliki *single copy*. Visualisasi hasil *Southern blot* pada 17 sampel dapat dilihat pada Gambar 7. Lajur 1 menampilkan 4 pita artinya pada DNA genom sampel tanaman tersebut terdapat 4 *copy* (salinan) T-DNA. Lajur 2 terdapat 3 *copy* T-DNA, lajur 11 terdapat 2 *copy* T-DNA, Lajur 17 terdapat 3 *copy* T-DNA. Lajur 7, 8, 9, 13, 14, 15, dan 16 tidak menampilkan pita fragmen. Hal tersebut diduga karena

DNA sampel terdegradasi. Kemungkinan juga sampel DNA tersebut tidak mengandung insersi T-DNA. Menurut Marsch-Martinez dkk. (2002: 1546), kegagalan saat transformasi dapat mengakibatkan T-DNA tidak terinsersi pada genom DNA.

Berdasarkan hasil pengamatan, sampel pada lajur M tidak menampilkan pita karena *probe* yang digunakan hanya *probe hpt* sehingga tidak dapat menempel pada marka λ *HindIII*. Sampel lajur A yang merupakan kontrol negatif air juga tidak menampilkan pita. Hal tersebut menunjukkan bahwa tidak ada kontaminasi pada proses *running* sampel DNA.

Lajur P menampilkan pita kontrol positif plasmid pMO yaitu plasmid pembawa konstruksi T-DNA yang digunakan sewaktu transformasi. Pita yang tebal pada kontrol plasmid kemungkinan disebabkan konsentrasi DNA plasmid yang digunakan masih terlalu tinggi. Lajur F menampilkan pita kontrol positif fragmen *hpt*. Hasil yang positif pada lajur P dan F menunjukkan bahwa reaksi hibridisasi berjalan dengan baik. Menurut Greco dkk. (2003: 12), kontrol positif dapat memonitor keberhasilan reaksi hibridisasi.

4. Analisis aktivitas transposon *Ds* melalui PCR eksisi

Benih dari sampel yang telah dianalisis mengandung *single copy* T-DNA ditanam. Setelah tanaman berumur \pm 1 bulan, dilakukan isolasi DNA dari daun tanaman T1 (generasi kedua) tersebut. Metode PCR yang digunakan dalam penelitian disebut juga PCR eksisi karena tujuan analisis

PCR adalah untuk mengetahui aktivitas yaitu eksisi transposon *Ds* dari konstruksi T-DNA. Sampel yang diperoleh digunakan untuk analisis PCR dengan menggunakan 3 macam *primer* yang didesain oleh Kelompok Padi, Puslit Bioteknologi LIPI, Cibinong. Ketiga primer tersebut ialah RB-pMO G22-F (P1), Ac-Prom-R (P2), Ac-Lj-R (P3).

Prosedur PCR eksisi dilakukan dengan dua reaksi PCR. Reaksi PCR yang pertama yaitu *primer forward* P1 dengan *primer reverse* P2, sedangkan reaksi kedua yaitu *primer forward* dengan *primer reverse* P3. *Primer forward* P1 menempel pada bagian *right border* (RB) transposon *Ds*, *primer reverse* P3 menempel pada bagian *left junction* (LJ) transposon Ac, sedangkan *primer reverse* P2 menempel pada bagian promotor transposon Ac (Gambar 4). Ukuran dari *primer* P1 ke P3 adalah 350 pb, sedangkan ukuran dari *primer* P1 ke P2 adalah 4 kpb.

Berdasarkan hasil pengamatan, visualisasi terhadap reaksi PCR dengan primer P1/P2 tidak menampilkan pita berukuran 4 kpb. Ukuran dari P1 ke P2 kemungkinan terlalu besar sehingga reaksi PCR yang optimal pada T-DNA yang belum mengalami transposisi *Ds* tidak dapat berlangsung. Aktivitas elemen transposon *Ds* terjadi jika transposon *Ds* tereksisi dari konstruksi T-DNA pembawa transposon *Ac/Ds* (Greco *dkk.* 2003: 10). Ukuran dari P1 ke P2 jika transposon *Ds* telah tereksisi adalah 400 pb. Berdasarkan hasil PCR, positif reaksi P1P3 (350 pb) tampil sebagai pita yang berada di bawah positif reaksi P1P2 (400 pb).

Berdasarkan hasil PCR eksisi pada 161 tanaman T1 diperoleh 110 tanaman yang dianalisis memiliki aktivitas transposon *Ds* yaitu 32 sampel P1P3/P1P2 (-/+) dan 78 sampel P1P3/P1P2 (+/+). Sampel P1P3/P1P2 (-/+) diindikasikan sebagai tanaman padi mutan yang memiliki aktivitas transposon *Ds* karena hasil yang negatif pada reaksi P1P3 menunjukkan bahwa transposon *Ds* telah tereksisi dari konstruksi T-DNA, sedangkan reaksi P1P2 positif menunjukkan bahwa transposon *Ac* terdapat dalam konstruksi T-DNA. Sampel P1P3/P1P2 (-/+) dapat dilihat pada lajur 24 (Gambar 8).

Sampel P1P3/P1P2 (+/+) juga diindikasikan sebagai tanaman yang memiliki aktivitas transposon *Ds*, namun diduga merupakan individu yang *chimera*. Menurut Brooker (2005: 585), individu *chimera* dapat terjadi akibat pencampuran sel dari dua individu yang berbeda kandungan gennya. Aktivitas transposon *Ds* diduga mengakibatkan suatu individu mengandung sel dengan *Ds* yang sudah bertransposisi dan sel dengan *Ds* yang belum bertransposisi. Kemungkinan aktivitas *Ds* dapat juga terjadi saat pembelahan sel sehingga menyebabkan terjadinya *chimera* (Komunikasi pribadi: Pereira 2008). Sampel DNA P1P3/P1P2 (+/+) dapat dilihat pada lajur 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 17, 21, dan 25 (Gambar 8). Dengan demikian, hasil yang positif pada kedua reaksi PCR juga merupakan individu yang memiliki aktivitas transposon *Ds*.

Berdasarkan hasil PCR eksisi dari 161 tanaman T1, dianalisis terdapat 51 sampel yang belum memiliki aktivitas transposon *Ds* yaitu 10 sampel P1P3/P1P2 (-/+) dan 41 sampel P1P/P1P2 (-/-). Sampel P1P3/P1P2 (-/+)

diindikasikan belum memiliki aktivitas transposon *Ds*. Hasil yang negatif pada P1P3 menunjukkan bahwa amplifikasi fragmen masih berukuran 4 kpb sehingga tidak bekerja optimal. Hasil yang positif pada P1P2 menunjukkan bahwa transposon *Ds* masih terdapat pada konstruksi T-DNA.

Sampel P1P3/P1P2 (-/+) pada lajur 11, 16, 18, 23, 27 menunjukkan bahwa aktivitas transposon *Ds* belum terjadi. Menurut Nugroho, *dkk.* (2006: 241), hal tersebut dapat dipengaruhi oleh posisi insersi di genom atau dapat disebabkan oleh peristiwa *gene silencing*. Peristiwa tersebut mengakibatkan transposon *Ac* tidak mampu mengkode enzim transposase sehingga transposon *Ds* tidak dapat bertransposisi. Namun, tidak berarti sistem transposon *Ac/Ds* tidak dapat bekerja seterusnya. Perubahan posisi transposon *Ac/Ds* pada genom generasi berikutnya dari sampel tanaman tersebut, memungkinkan sistem transposon tersebut dapat bekerja (Greco *dkk.* 2003: 20).

Sampel P1P/P1P2 (-/-) juga diindikasikan sebagai sampel tanaman yang belum memiliki aktivitas transposon *Ds*. Menurut Qu *dkk.* (2008: 190) individu tersebut merupakan hasil segregasi yang kembali ke genotipe *wild type* sehingga tidak mengekspresikan insersi T-DNA. Berdasarkan hukum segregasi Mendel, generasi kedua akan memenuhi perbandingan 3:1 antara pembawa sifat dan yang bukan pembawa sifat (Brooker 2005: 26). Hal tersebut memungkinkan muncul kembali individu-individu yang memiliki genotipe *wild type* pada generasi kedua maupun generasi berikutnya.

Hasil P1P/P1P2 (-/-) dapat dilihat pada lajur 4, 5, 10, 12, 13, 19, 20, 22, dan 26 (Gambar 8).

Sampel pada lajur K (kontrol) merupakan sampel DNA pMO yaitu plasmid yang membawa konstruksi T-DNA. Berdasarkan hasil pengamatan, sampel tersebut juga memberi hasil positif pada reaksi P1P2 dan negatif pada P1P3. Sampel tersebut mengandung T-DNA dengan transposon *Ac/Ds* sehingga reaksi yang dapat berjalan adalah reaksi P1P2 (350 pb), sedangkan reaksi P1P3 memberi hasil negatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa reaksi P1P3 tidak dapat berjalan optimal karena ukurannya yang terlalu besar (4 kpb).

Berdasarkan analisis PCR eksisi, dapat disimpulkan bahwa sistem transposon *Ac/Ds* dalam T-DNA yang diinsersikan pada genom tanaman padi kultivar Nipponbare ras Japonica, telah terbukti dapat bekerja. Aktivitas transposon *Ds* ditunjukkan dengan terdapatnya sampel yang positif pada perlakuan P1P3 (berukuran 400 pb). Selanjutnya, tanaman yang mengandung transposon *Ds* stabil dapat dikonfirmasi dengan uji seleksi basta, higromisin, dan GFP.

5. Analisis keberadaan transposon *Ac/Ds* dengan marka reporter gen

Analisis keberadaan transposon *Ac/Ds* pada tanaman T1 dilakukan dengan memanfaatkan marka reporter gen *bar*, *hyg*, dan *gfp*. Hasil uji *bar* yang positif diindikasikan bahwa sampel mengandung transposon *Ds*. Gen *bar* (*bialaphos resistance*) mengkode sifat ketahanan terhadap herbisida

basta (senyawa bialaphos atau disebut juga *phosphinothricin*). Oleh karena itu, individu yang mengandung gen *bar* akan memiliki ketahanan jika bagian daunnya dipaparkan dengan larutan basta (Kolesnik *dkk.* 2004: 302; Upadhyaya *dkk.* 2006: 12).

Analisis gen *bar* dilakukan mengikuti metode Greco *dkk.* (2003: 12). Gen *bar* memproduksi enzim *phosphinothricin* asetiltransferase. Menurut CAMBIA (2008: 1), enzim yang dihasilkan tersebut memberi gugus asil kepada senyawa *phosphinothricin* yang dipaparkan sehingga berubah menjadi senyawa yang tidak berbahaya bagi tanaman. Senyawa *phosphinothricin* dapat menghambat kerja enzim dalam jalur sintesis glutamin sehingga dihasilkan senyawa toksik yaitu amoniak. Senyawa toksik tersebut yang mengakibatkan sel-sel tanaman menjadi mati sehingga mengalami gejala nekrosis (daun seperti terbakar).

Berdasarkan pengamatan sampel yang positif mengandung gen *bar* tidak mengalami reaksi setelah ujung daun dipaparkan dengan larutan basta. Hasil yang negatif gen *bar* nampak setelah 2--3 hari yaitu terjadi reaksi nekrosis. Gejala yang ditimbulkan yaitu ujung daun yang dipaparkan dengan larutan basta yang sama menjadi kekuningan dan akhirnya cokelat seperti terbakar (Gambar 11). Menurut Greco *dkk.* (2003: 13), tanaman yang tidak mengalami gejala tersebut disebabkan karena tidak memiliki resistensi terhadap senyawa *phosphinothricin*.

Sampel yang mengandung transposon *Ac* memberi hasil yang positif pada uji GFP dan *hpt* positif (Greco *dkk.* 2001: 216--217). Berdasarkan

pengamatan, seluruh benih yang diuji GFP tidak memberi hasil positif pada uji GFP. Versi gen *gfp* yang digunakan dalam konstruksi T-DNA adalah *mgfp5*. Menurut CAMBIA BioForge (? : 5), analisis sejumlah transforman padi dan *Arabidopsis* menunjukkan bahwa fluoresens yang dihasilkan oleh *mgfp5* memberi ekspresi yang sangat lemah. Dengan demikian, kemungkinan hasil uji GFP yang negatif pada penelitian disebabkan karena gen *gfp* yang dikonstruksikan memiliki ekspresi yang lemah.

Keberadaan transposon *Ac* dapat juga dideteksi dengan uji higromisin (Greco *dkk.* 2001: 217). Menurut Cooper (2004: 2), individu tanaman yang mengandung gen *hpt* memiliki ketahanan terhadap higromisin. Berdasarkan pengamatan, tanaman yang mengandung gen *hpt* tidak memberi reaksi saat bagian daunnya dipaparkan dengan larutan higromisin, sedangkan tanaman yang tidak mengandung gen *hpt* setelah 2--3 hari memberi reaksi nekrosis pada bagian daun yang dipaparkan oleh larutan higromisin (Gambar 11).

Tanaman yang memberi hasil positif uji basta-negatif uji higromisin merupakan tanaman yang mengandung transposon *Ds* stabil (Tabel 4). Tanaman padi mutan stabil adalah tanaman yang mengandung transposon *Ds* stabil, namun tidak disertai oleh transposon *Ac*. Transposon *Ds* tidak mampu menghasilkan transposase sehingga diharapkan stabil berada dalam genom (Sallaud *dkk.* 2004: 452). Tanaman padi mutan stabil yang diperoleh, selanjutnya dapat digunakan dalam berbagai penelitian khususnya yang berkaitan dengan analisis fungsi gen-gen padi.

Activation tag yang terdapat dalam konstruksi transposon *Ds* diharapkan memberi sifat *over-express* (ekspresi yang berlebihan) terhadap gen-gen di sekitar insersi transposon *Ds* (Jeoung *dkk.* 2002: 1636). Fenotipe yang diekspresikan oleh tanaman padi mutan akan memberi gambaran fungsi gen yang termutasi oleh *activation tag* pada transposon *Ds* (An *dkk.* 2004: 114). Dengan demikian, penelitian selanjutnya dapat dilakukan *fenotyping* terhadap tanaman-tanaman padi mutan stabil sehingga fungsi gen-gen padi dapat teridentifikasi.

