

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

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

##### 1. Karakteristik dan klasifikasi tanaman padi

Padi merupakan tanaman semusim (*perennial*) yang berumpun kuat dengan tinggi batang yang beragam (0,5--2 m). Helai daun berbentuk garis, kebanyakan bertepi kasar dan panjangnya 15--80 cm, serta memiliki malai dengan panjang 15--40 cm yang tumbuh ke atas dan ujungnya menggantung. Malai berupa bulir yang beraneka ragam, kadang tidak berjarum, berjarum pendek atau panjang, licin atau kasar berwarna hijau atau coklat, gundul atau berambut, dengan ukuran 7--10 cm. Bulir yang masak akan menghasilkan buah yang kaya akan pati. Tanaman padi umumnya tumbuh di tempat basah atau rawa, dan ada juga yang tumbuh di darat seperti padi gogo (Heywood 2001: 286; Van Steenis 2005: 117). Tanaman padi menurut Heywood (2001: 86) diklasifikasikan pada divisi Spermatophyta, subdivisi Angiospermae, kelas Monocotyledoneae, bangsa Poales (Glumiflorae), suku Gramineae, marga *Oryza*, dan jenis *Oryza sativa* L.

##### 2. Budidaya tanaman padi

Budidaya tanaman padi di dunia hanya terjadi pada dua jenis saja yaitu *O. sativa* dan *O. glaberrima*. Tanaman padi *O. sativa* lebih

dibudidayakan secara luas di seluruh dunia daripada *O. glaberrima* yang hanya dibudidayakan di Afrika. Budidaya tanaman padi jenis *O. sativa* menghasilkan tiga ras padi yang berbeda yaitu Javanica, Indica, dan Japonica. Ras Indica umumnya terdapat di negara-negara tropis seperti India, Vietnam, Kamboja, dan Indonesia. Ras Javanica banyak dibudidayakan di pulau Jawa, sedangkan ras Japonica lebih banyak ditemukan di negara Jepang (Soerjani 1987: 448).

### 3. Tanaman padi kultivar Nipponbare ras Japonica

Tanaman padi kultivar Nipponbare ras Japonica sering digunakan sebagai model penelitian bagi tanaman monokotil. Beberapa alasan yang mendukung penggunaan tanaman tersebut antara lain ukuran genomnya relatif kecil (430 Mbp), mudah ditransformasi, memiliki ketersediaan informasi molekuler dan genetik, serta memiliki nilai ekonomi yang tinggi (Kolesnik *dkk.* 2004: 301). *International Rice Genome Sequence Project (IRGSP)* pada tahun 2002, telah mempublikasikan secara lengkap sekuen genom padi kultivar Nipponbare ras Japonica dan Indica. Secara keseluruhan, diprediksi terdapat sekitar 32.000--55.000 gen dalam genom tanaman padi. Informasi tersebut dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya yaitu identifikasi fungsi gen-gen padi (Greco *dkk.* 2003: 10--11).

## B. TRANSPOSON

### 1. Definisi dan karakteristik transposon

Transposon adalah segmen DNA spesifik yang dapat bertransposisi dari satu lokasi ke lokasi lain di dalam genom sel dengan cara memotong segmen suatu DNA, kemudian meligasinya (Greco *dkk.* 2003:11).

Transposon (*transposable element*) yang berasal dari tanaman jagung (*Zea mays* L.) merupakan agen mutagenesis penginsersi yang umum digunakan dalam identifikasi fungsi suatu gen. Struktur transposon pada dasarnya terdiri atas gen transposase yang diapit oleh sepasang urutan basa bukan pengkode yang disebut *inverted repeat* (panjangnya 20--40 nukleotida) (Hodgkin & Anderson 2006: 1). Struktur transposon dapat dilihat pada Gambar 1.

Gen transposase mengkode produksi enzim transposase yang memberi *cis sequence* ke daerah *inverted repeat* sehingga suatu transposon dapat pindah dari suatu lokasi ke lokasi lain dalam genom (Watson *dkk.* 2004: 313). Enzim transposase memotong segmen DNA target pada suatu lokasi di dalam genom dan menghasilkan segmen DNA yang tidak berpasangan. Transposon tersebut kemudian dipotong atau direplikasikan pada tempat semula. Transposon yang telah dipotong atau disalin kemudian dihubungkan dengan ujung-ujung untai tunggal yang terletak pada segmen DNA yang terpotong tersebut. Celah-celah yang terbentuk pada untai DNA

tersebut akan diisi kembali oleh DNA polimerase dan ditutup kembali dengan enzim ligase (Hodgkin & Anderson 2006: 1).

Transposon memiliki selektivitas yang berbeda-beda terhadap tempat targetnya tetapi sebagian besar transposon dapat berpindah ke berbagai lokasi di dalam DNA. Kemampuan untuk menyebarkan gen-gen tertentu ke seluruh bagian genom membuat transposisi sepenuhnya berbeda dibandingkan dengan mekanisme pencampuran genetik lainnya. Transposon akan menimbulkan mutasi apabila menyisip ke dalam urutan pengkode dari suatu gen atau ke dalam daerah DNA yang mengatur ekspresi gen (Rubin & Levy 1997: 6294).

## 2. Tipe-tipe transposon

### a. DNA-mediated transposition

- (1) *Bacterial replicative transposons*, menyalin elemen DNA kemudian menyisip ke dalam lokasi target yang baru, contohnya: Tn3, Phage Mu
- (2) *Bacterial cut-and-paste transposons*, pemotongan DNA di lokasi asal kemudian menyisip ke lokasi baru, contohnya: Tn5, Tn10, Tn7, IS911, Tn917
- (3) *Eukaryotic transposons*, pemotongan DNA di lokasi asal kemudian menyisip ke lokasi yang baru, contohnya: *P elements (Drosophilla)*, *hAT family elements* dan *Tc 1/Mariner elements*

(Watson dkk. 2004: 329).

b. RNA-mediated transposons

(1) *Viral-like retrotransposons*: transkripsi ke dalam RNA dari promoter diikuti transkripsi balik dan penyisipan pada lokasi target, contohnya:

*Ty elements (yeast)*

(2) *Poly-A retrotransposon*: transkripsi ke dalam RNA dari promoter internal diikuti transkripsi balik primer target oleh pembelahan endonuklease, contohnya: *F dan G elements (Drosophilla)*, dan *Alu sequence (manusia)*

(Watson *dkk.* 2004: 329).

3. Transposon *Ac/Ds*

Transposon *Ac (activator)* telah mengalami delesi pada bagian *inverted repeat* sehingga bersifat tidak mampu pindah (*immobile*), namun mampu menghasilkan enzim transposase (otonom) (Greco *dkk.* 2003: 11).

Transposon *Ds (dissociaton)* mengalami delesi pada bagian gen transposase sehingga tidak mampu menghasilkan enzim transposase (non-otonom) namun mampu pindah (*mobile*) (Brooker 2005: 481). Transposon *Ds* bersifat non-otonom karena hanya dapat bertransposisi di dalam suatu genom apabila terdapat enzim transposase yang disandi oleh transposon lainnya seperti transposon *Ac*. Dengan demikian, dalam suatu genom transposon *Ds*

tidak mampu bertransposisi (stabil) tanpa keberadaan transposon *Ac* (Rubin & Levy 1997: 6294; Yongbiao & Zhihong 2002: 162).

Sistem mutagenesis dengan transposon *Ac/Ds* telah banyak diterapkan sebagai strategi *reverse genetics* analisis fungsi gen-gen suatu tanaman. Populasi tanaman dengan genotipe mutan yang bervariasi dapat dihasilkan melalui sistem transposon tersebut (Gambar 2). Dengan demikian, identifikasi mutasi gen dapat dilakukan tanpa melakukan transformasi secara berulang-ulang (Greco *dkk.* 2001: 216).

### **C. ACTIVATION TAG**

*Activation tag* adalah potongan DNA yang mampu meningkatkan aktivitas transkripsi gen-gen yang ada di sekitar daerah insersinya (*transcriptional activator*) sehingga terjadi *over-express* pada gen-gen tersebut. *Activation tag* terbentuk oleh minimal empat *active domain* dari sekuen promotor 35S *cauliflower mosaic virus* (CaMV). Penyisipan *activation tag* dapat berfungsi sebagai peningkat ekspresi gen tertentu dalam genom padi (Marsch-Martinez *dkk.* 2002: 1544).

Suatu gen pada tanaman yang tidak mengandung *activation tag* (*wild type*) akan diinduksi oleh promotor gen untuk mengkode satu salinan protein. Sedangkan pada tanaman yang mengandung *activation tag*, promotor gen diaktivasi oleh *activation tag* sehingga gen mengkode berlipat kali ganda salinan protein (Gambar 3). Hal tersebut memungkinkan munculnya sifat *over-express* dari gen-gen pengkode sehingga fenotipe yang muncul dapat

lebih jelas diamati dan dibedakan dengan tanaman kontrol. Dengan demikian, gen yang terkait dapat lebih mudah diidentifikasi (Jeoung *dkk.* 2002: 1637; Nugroho *dkk.* 2006: 236).

#### D. MARKA REPORTER GEN DALAM UJI SELEKSI

Marka reporter gen merupakan gen-gen yang dapat digunakan sebagai marka atau penanda keberadaan suatu T-DNA. Reporter gen yang dapat digunakan dalam penelitian yaitu marka reporter gen *bar*, *hyg*, dan *gfp*. Gen *bar* terdapat di dalam transposon *Ds*, sedangkan gen *hyg* dan *gfp* terdapat dalam transposon *Ac* pada konstruksi T-DNA.

##### 1. Gen *gfp*

Gen *gfp* (*green fluorescent protein*) diklona dari ubur-ubur *Aequorea victoria* L. yang mampu mendeteksi *tag fluorescent* tanpa membutuhkan substrat atau kofaktor yang berasosiasi. Gen *gfp* semakin banyak digunakan sebagai *reporter* ekspresi gen dan mempelajari lokasi suatu protein di dalam tubuh makhluk hidup (*in vivo*) (CAMBIA Bioforge ? : 4). Gen *gfp* jika terpapar oleh sinar UV akan menerima energi dari ion  $Ca^{2+}$  *photoprotein aequorin* teraktivasi mengekspresikan *tag fluorescent*. Bentuk ekspresi *tag fluorescent* dari gen *gfp* ialah berpendar hijau terang. Dengan demikian, kecambah padi yang mengandung gen *gfp* akan berpendar hijau ketika terkena sinar UV (Ausubel 1998: 9.6.10).

## 2. Gen *hpt*

Gen *hpt* (*hygromycin phosphotransferase*) dapat diisolasi dari *Escherichia coli*. Gen tersebut dapat memberi ketahanan terhadap higromisin karena gen tersebut mengkode enzim kinase yang dapat menonaktifkan higromisin melalui fosforilasi. Higromisin dapat menghambat sintesis protein pada translasi mRNA lalu menginduksi terjadinya kesalahan pembacaan dari *aminoacyl*-tRNA dengan merubah ribosomal situs A. Higromisin juga berpengaruh pada proses translokasi ribosomal. Hal tersebut mengakibatkan tanaman yang tidak memiliki gen *hpt* akan mengalami nekrosis (terbakar) pada sel atau jaringannya jika terpapar atau ditumbuhkan pada medium yang mengandung higromisin (Cooper 2004: 2).

## 3. Gen *bar*

Gen *bar* (*bialaphos resistance*) dapat diisolasi dari bakteri *Streptomyces* dan *Alcaligenes*. Gen *bar* dapat memberi ketahanan terhadap senyawa antibiotik *bialaphos* yang terdapat pada herbisida nonselektif basta. Nama lain senyawa *bialaphos* ialah *glufosinate* atau *phosphinothricin*. Gen *bar* mengkode enzim *phosphinothricin acetyl transferase* (PAT) yang dapat mendetoksifikasi *phosphinothricin* melalui asetilasi pada kelompok asam amino. *Phosphinothricin* menghambat kerja enzim dalam jalur sintesis glutamin sehingga dihasilkan senyawa toksik yaitu amoniak yang dapat mematikan sel-sel (CAMBIA 2008: 1). Bakteri dan sel tumbuhan yang tidak

memiliki gen *bar*, akan mengalami nekrosis jika terpapar oleh herbisida yang mengandung senyawa *phosphinothricin* (Kolesnik *dkk.* 2004: 302).

## E. TEKNIK-TEKNIK BIOLOGI MOLEKULER

### 1. Isolasi DNA

DNA genom merupakan seluruh materi genetik yang dimiliki oleh suatu organisme termasuk di dalamnya DNA yang berinteraksi dengan protein dan RNA, yang terdapat pada suatu sel secara bersama-sama (Weaver & Hedrick 1997: 616). Isolasi DNA genom merupakan tahapan awal yang dilakukan untuk mendapatkan DNA genom yang akan dianalisis lebih lanjut. Genom DNA tanaman padi yang akan diisolasi memiliki ukuran sebesar 430 juta bp (Yongbiao & Zhihong 2002: 161). Isolasi DNA adalah pemisahan molekul DNA dari molekul lain seperti dinding sel, membran sel, dan membran inti sehingga strukturnya dapat dilihat dengan jelas. Tahap-tahap dalam isolasi DNA tanaman yaitu pengambilan sampel (jaringan), lisis dinding sel dan membran sel, purifikasi, serta presipitasi (Kephart 1999: 1). Prosedur isolasi DNA dapat berbeda-beda tergantung pada tujuan isolasi DNA dan kuantitas yang dibutuhkan.

Isolasi DNA tanaman padi dapat dilakukan dengan metode Cornell University (1994: 1) dan metode Van Heusden *dkk.* (2000: 118--126). Kedua metode tersebut menggunakan bantuan nitrogen cair untuk membekukan jaringan-jaringan dari organ daun padi tersebut sehingga memudahkan dalam

proses penggerusan (Ausubel *dkk.* 1998: 2.3.1). Hasil proses penggerusan tersebut adalah berupa serbuk-serbuk daun padi yang merupakan kumpulan sel penyusun organ daun padi tersebut (Eamens *dkk.* 2004: 10).

*Buffer* isolasi DNA pada metode Cornell mengandung NaCl, Tris-Cl, EDTA, SDS, Na-bisulfit, dan akuades, sedangkan *buffer* metode Van Heusden yaitu Tris-Cl, EDTA, NaCl, CTAB, sorbitol, sarkosil, dan akuades. Penambahan NaCl dalam *buffer* isolasi bertujuan memisahkan molekul DNA dari komponen lainnya dengan cara membentuk ikatan ionik dengan asam nukleat (kondisi ionik yang lebih stabil). Larutan Tris-Cl berfungsi sebagai larutan penyangga yang menjaga kestabilan pH. Larutan EDTA berfungsi mengikat kation divalen membentuk inhibitor enzim DNase. Dengan demikian, EDTA berfungsi menjaga struktur DNA supaya tidak terdegradasi (Sambrook & Russel 2001: 6.61--6.62).

Senyawa lainnya yang ditambahkan pada *buffer* isolasi yaitu SDS dan Na-bisulfit. Larutan SDS merupakan senyawa deterjen yang dapat berasosiasi dengan protein membran sehingga akan melarutkan protein tersebut sehingga membran sel akan dengan mudah dilisiskan. Na-bisulfit berfungsi untuk menyelubungi ion negatif pada ujung struktur DNA sehingga dapat meningkatkan daya presipitasi DNA terhadap alkohol dingin (Sambrook & Russel 2001: 6.61--6.62).

*Buffer* lisis pada isolasi DNA metode Van Heusden memiliki kadar ionik yang cukup tinggi karena mengandung NaCl yang lebih besar dari 0,7 M yaitu 5 M. Menurut Van Heusden *dkk.* (2000: 120), larutan yang memiliki

kadar ionik tinggi tersebut menyebabkan CTAB membentuk suatu kompleks dengan protein serta polisakarida, tetapi tidak mengendapkan asam nukleat. Senyawa tersebut juga dapat digunakan dalam purifikasi DNA yang berasal dari organisme yang mengandung banyak polisakarida seperti tanaman padi.

Pemberian larutan kloroform: isoamil (24: 1) berfungsi untuk memisahkan DNA dari membran sel yang memiliki berat molekul lebih besar. Penambahan senyawa kimia kloroform dapat menyebabkan lisisnya membran sel serta terdenaturasinya protein-protein sel seperti endonuklease. Lisisnya membran sel akan memudahkan molekul DNA terpisah dari kompleks CTAB, protein, dan senyawa-senyawa polisakarida (Ausubel *dkk.* 198: 2.3.6). Isoamil alkohol digunakan untuk mengurangi pembusaan ketika ekstraksi berlangsung (Sambrook & Russel 2001: A1.23).

Senyawa kloroform merupakan senyawa yang tidak larut dalam air sehingga memungkinkan adanya pemisahan antara fasa cair dan fasa organik setelah dilakukan proses sentrifus. Proses sentrifus yang dilakukan bertujuan untuk memisahkan campuran menjadi dua fase yaitu fase terlarut dan fase organik. Fase terlarut (supernatan) mengandung DNA genom karena memiliki berat molekul yang lebih ringan dibandingkan dengan fase organiknya. Fase organik (pelet) yang terbentuk berada pada bagian dasar tabung. Menurut Seidman & Moore (2000: 499), pelet yang terbentuk tersebut merupakan molekul-molekul protein dan polisakarida yang terdenaturasi.

DNA genom yang dihasilkan dari supernatan kemudian dipresipitasi dengan bantuan alkohol absolut. Penambahan senyawa alkohol akan memudahkan tervisualisasinya DNA genom dari supernatan yang terbentuk. Produk DNA genom selanjutnya dipresipitasi kembali dengan bantuan senyawa etanol 70% (Van Heusden *dkk.* 2000: 118--126). Menurut Ausubel *dkk.* (1998: 2.1.8), presipitasi dengan menggunakan etanol 70% sangat berguna untuk meningkatkan konsentrasi DNA genom yang terbentuk serta dapat memisahkan DNA dari sisa-sisa molekul organik yang tidak dibutuhkan lagi seperti kloroform dan garam-garam organik lainnya.

Sampel DNA genom yang telah berhasil diisolasi dapat disimpan untuk jangka waktu tertentu sehingga sampel tersebut dapat digunakan sesuai dengan keperluan analisis yang dilakukan. Proses penyimpanan sampel DNA genom dapat dilakukan dengan menambahkan Tris-EDTA dan RNase ke dalam sampel kemudian diletakkan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Penambahan senyawa Tris-EDTA dilakukan untuk menghindari kerusakan DNA genom hasil isolasi dari endonuklease selama proses penyimpanan. Senyawa Tris berfungsi untuk mempertahankan pH, sedangkan senyawa EDTA yang terkandung untuk menghambat aktivitas DNase. Sebaliknya, senyawa RNase ditambahkan untuk mendegradasi RNA yang masih terdapat pada sampel DNA. Asam nukleat RNA dapat mengganggu hasil analisis DNA sehingga perlu dihilangkan dari sampel DNA yang diperoleh (Seidman & Moore 2000: 505).

## 2. Spektrofotometri

Konsentrasi dan kemurnian molekul DNA dapat diukur dengan menggunakan metode spektrofotometri. Spektrofotometer merupakan alat yang digunakan untuk menghitung jumlah cahaya yang diserap oleh sampel (absorbansi). Alat tersebut bekerja dengan cara melewatkan cahaya melalui sampel dan menghitung cahaya yang diserap (absorbansi) ataupun yang dilewatkan (transmitans) (Sambrook & Russel 2001: A8.20).

Absorbansi sinar UV secara maksimal oleh molekul DNA dapat diukur pada panjang gelombang 260 nm. Hal tersebut disebabkan asam nukleat mengabsorpsi kuat radiasi sinar UV pada panjang gelombang 260 nm. Tingkat kemurnian DNA dapat diukur dengan membandingkan rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. Sampel DNA yang murni akan menghasilkan rasio absorbansi berkisar antara 1,8--2,0 (Sambrook & Russel 2001: A8.20--A8.21).

## 3. Digesti DNA dengan enzim restriksi

DNA genom yang telah diisolasi dari organ daun, kemudian didigesti dengan menggunakan enzim restriksi. Enzim restriksi adalah endonuklease yang dapat memotong ikatan fosfodiester pada daerah nukleotida spesifik atau yang disebut sebagai palindrom (Kumar 1997: 263). Palindrom adalah segmen DNA spesifik (umumnya 4--8 pb), sekuen basa yang terbaca pada

arah 5'--3' pada satu untai sama seperti sekuen basa yang terbaca pada arah 5'--3' pada untai komplementernya (Freifelder 1987: 124--125).

Berdasarkan situs pengenalan dan situs pemotongannya, ada tiga tipe enzim restriksi yang diisolasi dari bakteri, yaitu enzim restriksi tipe I, II, dan tipe III. Enzim restriksi tipe I dan III memotong DNA sepanjang ratusan pasangan basa di luar situs pengenalan (*recognition site*) sehingga DNA yang dipotong tidak selalu sama posisinya dari situs pengenalannya. Enzim tipe tersebut bersifat kompleks dan jarang sekali digunakan dalam rekayasa genetika. Enzim restriksi tipe II memotong DNA tepat di antara situs pengenalan sehingga enzim restriksi tersebut umumnya digunakan dalam rekayasa genetika (Brown 1999: 40). Beberapa enzim restriksi endonuklease yang umum digunakan dalam kegiatan molekuler adalah *Bam*HI, *Eco*RI, dan *Hind*III (Kumar 1997: 263).

#### 4. Elektroforesis

Sampel DNA genom yang telah diisolasi dan didigestii dengan menggunakan enzim restriksi endonuklease, kemudian dianalisis melalui elektroforesis dengan gel agarosa. Elektroforesis merupakan metode standar yang digunakan untuk memisahkan berbagai molekul organik seperti DNA dengan medan listrik sehingga berat molekul fragmen dapat diidentifikasi (Ausubel *dkk.* 1998: 2.5A.5--2.5A.6). Molekul DNA bermuatan negatif (anion) sehingga jika dimasukkan ke dalam sumur gel dan diberi

medan listrik, maka DNA akan bermigrasi melalui gel dari kutub negatif (anoda) ke kutub positif (katoda) (Clark 1997: 235).

Lokasi DNA di antara gel dapat ditentukan secara langsung oleh pewarnaan dengan konsentrasi rendah seperti perwarna etidium bromida. Pita-pita yang mengandung sedikitnya 1--10 ng DNA dapat dideteksi secara langsung pada gel yang dipaparkan sinar UV. Etidium bromida akan berinterkalasi di antara basa-basa DNA dan dapat berpendar di bawah sinar UV. Pita-pita yang mengandung DNA jika diperlukan dapat diisolasi dari gel dan dapat digunakan sebagai *probe* (pelacak) pada hibridisasi DNA (Sambrook *dkk.* 1989: 6.2; Ausubel *dkk.* 1998: 2.5.7).

Elektroforesis dapat menggunakan gel agarosa atau poliakrilamid yang disesuaikan dengan ukuran fragmen DNA yang akan dipisahkan. Gel poliakrilamid sangat efektif untuk memisahkan fragmen DNA yang memiliki ukuran 5--500 pasangan basa (pb). Gel tersebut memiliki resolusi yang tinggi dan dapat memisahkan fragmen DNA dengan ukuran 1 pb. Gel agarosa memiliki resolusi yang lebih rendah daripada poliakrilamid, tetapi memiliki kisaran pemisahan yang besar. Gel agarosa dapat memisahkan fragmen DNA yang besarnya 200 pb--50 kpb (Sambrook *dkk.* 1989: 6.2--6.3).

Elektroforesis menunjukkan hasil yang positif jika menghasilkan pola pita-pita (*bands*) yang jelas dan tidak *smearing* (berbayang) (Klug & Cummings 1994: 397). Beberapa faktor yang memengaruhi laju migrasi DNA pada gel agarosa antara lain ukuran fragmen DNA, konformasi DNA, besarnya arus listrik, konsentrasi dan jenis gel, lamanya waktu elektroforesis,

serta komposisi *buffer* yang digunakan. Molekul DNA penanda atau marka digunakan untuk mengetahui ukuran molekul-molekul DNA hasil isolasi, restriksi, maupun purifikasi. Ukuran molekul DNA dapat diketahui dengan membandingkan posisi pita yang terbentuk dengan posisi marka pada gel yang digunakan untuk elektroforesis. Marka DNA yang biasa digunakan dalam kegiatan analisis genetika molekuler di antaranya adalah marka  $\lambda$  (lambda) *Hind*III, *Bst*II, dan *Bst*NI (Ausubel *dkk.* 1998: 2.5A.5--2.5A.7).

Konsentrasi gel agarosa yang digunakan dalam penelitian yaitu 0,8%. Penentuan konsentrasi gel berhubungan dengan konformasi dari molekul DNA yang akan bermigrasi di atas matriks gel serta ukuran dan berat dari DNA tersebut. Konformasi DNA tanaman yang linear cepat bermigrasi di atas matriks gel agarosa dibandingkan gel poliakrilamida atau jenis gel lainnya. Menurut Ausubel *dkk.* (1998: 2.5A.5), konsentrasi gel 0,5--1,0 % digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran 0,5--30 kpb.

Gel agarosa 0,8% yang telah dibuat kemudian diletakkan di atas cetakan yang telah dilengkapi dengan sumur sesuai dengan jumlah sampel yang tersedia. Sampel sebelum diletakkan ke dalam sumur terlebih dahulu ditambahkan dengan *buffer loading*. Komposisi utama dari *buffer* tersebut adalah sukrosa, bromofenol biru, dan EDTA. Sukrosa yang digunakan berfungsi sebagai penambah densitas dari sampel DNA yang akan dielektroforesis sehingga sampel akan tepat berada pada dasar sumur (Birren & Lai 1993: 79--81). Bromofenol biru digunakan sebagai pewarna pada *buffer loading* berfungsi untuk memonitor atau visualisasi pergerakan

molekul DNA selama dielektroforesis. Penambahan EDTA pada *buffer loading* berfungsi untuk menghentikan seluruh aktivitas reaksi enzimatik selama proses elektroforesis berlangsung (Wilson 1995: 2.3.1).

Selama proses elektroforesis berlangsung digunakan *buffer* TBE (*tris base borate acid-EDTA*). *Buffer* tersebut terdiri atas *tris base*, asam borat, dan EDTA. *Buffer* tersebut berfungsi untuk menjaga kestabilan pH dari sampel DNA yang dielektroforesis dan menghubungkan antara elektroda sehingga proses migrasi dapat berlangsung (Ausubel *dkk.* 1998: 2.5A.6).

Sampel DNA yang telah berada di dalam sumur elektroforesis dihubungkan dengan arus listrik searah (DC) dengan voltase sebesar 25 volt selama 18 jam. Penentuan voltase tersebut sesuai dengan ukuran dan berat sampel DNA. Menurut Ausubel *dkk.* (1998: 2.5A.6), untuk memisahkan molekul DNA yang memiliki ukuran besar digunakan konsentrasi gel serta voltase yang cukup rendah. Dengan demikian, elektroforesis sampel DNA berukuran 430 juta pb dilakukan pada gel 0,8%, dengan voltase 25 V, selama 18 jam.

Hasil migrasi sampel DNA di atas gel agarosa divisualisasikan dengan pewarnaan etidium bromida yang hanya dapat terlihat di bawah sinar UV. Pewarnaan etidium bromida bertujuan untuk meningkatkan daya fluoresensi DNA sehingga hasil migrasi sampel dapat terlihat di bawah sinar UV (Wilson 1995: 2.3.1). Pewarna etidium bromida digunakan dalam visualisasi pita-pita DNA yang terbentuk di atas gel agarosa karena pewarna tersebut dapat menyisip di antara partikel-partikel basa DNA sehingga dapat memendarkan

cahaya merah-oranye ketika disinari dengan cahaya UV (Seidman & Moore 2000: 507).

#### 5. *Southern hybridization*

*Southern hybridization* merupakan teknik mempelajari organisasi gen dengan pemetaan situs restriksi di dalam atau di sekitar segmen DNA genom yang mengandung *probe* (pelacak) spesifik (Sambrook & Russell 2001: 6.33). *Southern hybridization* juga digunakan untuk mendeteksi jumlah *copy* (salinan) T-DNA yang terkandung dalam genom tanaman transgenik. Deteksi tersebut dilakukan melalui hibridisasi *probe* yang dapat berikatan dengan gen yang terkonstruksi pada T-DNA (Greco *dkk.* 2003: 12).

Sampel DNA direstriksi dengan enzim restriksi kemudian fragmen-fragmen dipisahkan melalui gel elektroforesis. Fragmen-fragmen DNA yang dihasilkan dapat ditransfer melalui pipa kapiler dalam gel ke suatu membran (nitroselulosa atau nilon) yang ditempatkan di atas gel. Gerak kapiler menyebabkan *buffer* melewati gel dan mentransfer pola fragmen-fragmen DNA dari gel ke membran (Freifelder 1987: 301).

Gel hasil elektroforesis direndam dengan larutan depurinasi yang mengandung HCl 1M. Pemberian larutan HCl dalam waktu yang singkat dapat melepaskan basa purin melalui hidrolisis ikatan N-glikosidik antara basa purin dengan deoksiribosa. Proses depurinasi bertujuan memotong DNA menjadi fragmen yang lebih kecil. Menurut Garret & Grisham (1995: 213), perendaman dengan larutan depurinasi merupakan tahap yang perlu

dilakukan jika sampel DNA berukuran lebih besar dari 15 kpb. Ukuran yang terlalu besar dapat menyulitkan proses *blotting* (transfer DNA ke membran).

Denaturasi DNA pada gel perlu dilakukan supaya dapat fragmen yang komplemen dapat berlekatan dengan *probe*. Proses denaturasi DNA dilakukan dengan merendam gel dalam larutan denaturasi dan diletakkan di atas rotator selama 40 menit. Larutan denaturasi mengandung dapar alkali (Natrium hidroksida/NaOH). Natrium hidrioksida bersifat basa sehingga dapat menyebabkan rusaknya ikatan hidrogen antar untai DNA dan menyebabkan pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal (Strickberger 1985: 85).

Sebelum DNA pada gel di-*blotting*, kondisi pH gel dinetralisasi dengan larutan netralisasi yang mengandung Tris-Cl dan NaCl. Netralisasi gel dilakukan selama 40 menit di atas rotator. Metode transfer DNA yang digunakan dalam penelitian adalah metode transfer kapiler (Sambrook *dkk.* 1989: 9.35). Prinsip transfer kapiler adalah memindahkan DNA dari gel agarosa ke membran berdasarkan perbedaan konsentrasi larutan. Transfer DNA dari gel ke membran nilon dilakukan menggunakan dapar garam ionik yaitu *sodium chloride-sodium citrate* (SSC). Menurut Brown (1995: 2.9.12), *bufer* ionik tinggi seperti SSC merupakan *buffer* yang cocok untuk membran nilon. Larutan *buffer* tersebut akan bergerak dari konsentrasi tinggi (SSC 20X) ke konsentrasi rendah (SSC 2X) membawa DNA dari gel dan mengimobilisasi DNA pada membran (Klug & Cummings 1994: 399).

Hasil yang diperoleh dari proses *blotting* adalah membran yang membawa replika pita DNA dari gel agarosa. Gel yang telah melalui proses *blotting* selanjutnya diperiksa kembali di bawah sinar UV. Gel yang tidak menampilkan pita-pita menunjukkan proses *blotting* telah berjalan dengan baik dan semua DNA pada gel sudah tertransfer ke membran. Penetapan pita DNA pada membran dapat dilakukan dengan menggunakan *cross linker* dengan prinsip teknik iradiasi sinar UV dosis rendah (254 nm) selama 6 menit. Penyimpanan membran dengan kondisi kering pada suhu ruang dapat dilakukan dalam waktu yang cukup lama ( $\pm 2$  minggu) (Bothwell *dkk.* 1990: 29; Clark 1997: 15).

Hibridisasi membran dengan *probe* dalam dapar hibridisasi dilakukan selama 18 jam pada suhu  $55^{\circ}$  C yang merupakan suhu optimal dalam proses tersebut. *Probe* merupakan DNA untai tunggal yang digunakan dalam hibridisasi. *Probe* DNA merupakan fragmen DNA yang diperoleh melalui pengklonan dan dilabel dengan unsur radioaktif atau non-radioaktif (Freifelder 1987: 135). Teknik non-radioaktif seperti digoxigenin-11-dUTP (DIG-11-UTP) merupakan teknik yang umum digunakan untuk analisis tanaman.

Pembuatan *probe* dengan kit *chemiluminescent* meliputi tiga tahap (Amersham Biosciences 2002: 2). Tahap pertama, fragmen untai ganda didenaturasi menjadi untai dengan cara pemanasan dalam air mendidih selama 5 menit lalu langsung dimasukkan ke dalam wadah berisi es (suhu  $\pm 4^{\circ}$  C). Fragmen yang telah didenaturasi diperlakukan dengan *blocking*

*reagent* untuk menghalangi terikatnya antibodi secara non spesifik pada membran. Tahap kedua, larutan fragmen diinkubasi dengan label non radioaktif *labelling reagent* yang memberi anti-DIG-AP, yaitu fragmen Fab yang akan terkonjugasi ke alkalin fosfatase pada larutan deteksi. Tahap terakhir, fragmen yang diperlakukan dengan *working solution* yang meningkatkan reaksi *probe* saat hibridisasi berlangsung (Boehringer Mannheim 1995: 58). Selanjutnya, *probe* yang telah dilabel tersebut siap dihibridisasi dengan membran.

Hibridisasi terjadi apabila *probe* menempel pada DNA target yang terdapat pada membran. Penambahan NaCl dan *blocking agents* pada dapar hibridisasi bertujuan untuk meningkatkan konsentrasi dapar. Menurut Sambrook *dkk.* (1989: 9.50), konsentrasi yang tinggi dapat meningkatkan daya pelekatan *probe* dengan fragmen target. Hibridisasi dilakukan dengan putaran yang konstan dalam tabung hibridisasi, sehingga dapar hibridisasi terlarut merata di permukaan membran (Amersham Biosciences 2002: 2.3).

Membran yang digunakan ialah membran nilon yang bermuatan positif. Membran yang digunakan untuk hibridisasi asam nukleat pada dasarnya ada dua macam yaitu membran nilon dan membran nitroselulosa. Membran nilon ada dua macam yaitu membran nilon tidak bermuatan dan membran nilon bermuatan positif. Menurut Sambrook *dkk.* (1989: 9.42), tipe membran nilon bermuatan positif dapat memberikan hasil paling optimal.

Muatan positif di permukaan membran memberi kapasitas yang lebih besar untuk pengikatan DNA yang bermuatan negatif.

Membran yang telah dihibridisasi selanjutnya dicuci dengan larutan *primary wash buffer* (PWB) dan *secondary wash buffer* (SWB). Pencucian dengan PWB dilakukan pada suhu 60° C selama 40 menit selanjutnya pencucian dengan SWB dilakukan pada suhu ruang selama 20 menit. Dua tahap pencucian tersebut berfungsi melarutkan sisa-sisa *probe* yang tidak menempel pada fragmen target di permukaan membran (Sambrook *dkk.* 1989: 9.58).

Fragmen DNA yang terhibridisasi oleh *probe* dapat dideteksi dengan reaksi *chemiluminescent*. Larutan deteksi yang digunakan adalah kit CDP-*star* (*for the chemiluminescent detection of alkaline phosphatase*) (Amersham Biosciences 2002: 2). Larutan deteksi CDP-*star* dapat mendeteksi *probe* yang telah dilabel dengan label non radioaktif *reagent label* yang tersedia pada *kit* tersebut. Pita pada membran selanjutnya di-*expose* ke kertas X-ray *film* minimal selama 4 jam dengan kondisi gelap. Lokasi DNA yang terlabel tampil sebagai pita gelap pada kertas X-ray *film* (Brooker 2005: 526).

## 6. *Polymerase chain reaction* (PCR)

### a. Definisi dan karakteristik teknik PCR

Reaksi berantai polimerase atau PCR adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida

tertentu dengan cara *in vitro* (Yuwono 2006: 1). Teknik PCR pertama kali dikembangkan oleh Karry Mulis pada tahun 1985. Prinsip teknik PCR yaitu enzim DNA polimerase memperbanyak bagian spesifik yang diinisiasi oleh pelekatan primer dengan menghubungkan dNTP-dNTP dalam reaksi termal (Russel 1994: 306).

Teknik PCR sangat sensitif sehingga dapat digunakan untuk melipatgandakan satu molekul DNA. Metode tersebut juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuen genom. Reaksi PCR memungkinkan dapat bekerja untuk suatu fragmen DNA (110 bp,  $5 \times 10^{-19}$  mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit. Hal tersebut menunjukkan bahwa pelipatgandaan suatu fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat (Yuwono 2006: 1).

Kelebihan lain metode PCR adalah bahwa reaksi tersebut dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah yang sangat sedikit, misalnya DNA cetakan sekitar 5  $\mu$ g maka oligonukleotida yang dibutuhkan hanya 1 mM dan reaksi tersebut biasa dilakukan dalam volume 50--100  $\mu$ l. Sampel DNA cetakan yang digunakan juga tidak perlu dimurnikan terlebih dahulu bahkan metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuen DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri di dalam tabung PCR (Brooker 2005: 522--523; Yuwono 2006: 1).

#### b. Komponen-komponen dalam PCR

Empat komponen utama pada proses PCR adalah: (1) DNA cetakan yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, (2) primer oligonukleotida, yaitu suatu sekuen nukleotida pendek (15--20 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) enzim *Taq* DNA polimerase (enzim yang termostabil), yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA, dan (4) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri atas dATP (deoksiadenosin trifosfat), dTTP (deoksitimidin trifosfat), dCTP (deoksisitidin trifosfat), dan dGTP (deoksiguanosin trifosfat). Masing-masing primer oligonukleotida akan membentuk basa komplemen yang spesifik. Primer oligonukleotida dATP akan membentuk basa nukleotida adenin, dTTP akan membentuk basa komplemen timin, dCTP akan membentuk basa komplemen timin, dan dGTP akan membentuk basa komplemen guanin (Sambrook & Russel 2001: 8.5; Yuwono 2006: 2).

### c. Tahap-tahap dalam siklus PCR

Siklus PCR terdiri atas tiga tahap utama yaitu denaturasi, *annealing* (pelekatan), dan polimerisasi. Denaturasi merupakan pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal melalui pemutusan ikatan hidrogen antara basa-basa nukleotida yang dilakukan pada suhu tinggi (90--95° C). *Annealing* merupakan pengikatan primer pada kedua untai tunggal DNA pada suhu 40--50° C. Beberapa peristiwa yang terjadi pada tahap *annealing* yaitu pelekatan primer pada situs yang tepat, pelekatan DNA polimerase sehingga terjadi

pembentukan beberapa basa, dan terbentuknya ikatan hidrogen yang sangat kuat antara primer dan DNA cetakan (Russel 1994: 304--306). Polimerisasi merupakan proses sintesis pemanjangan primer oleh *Taq* DNA polimerase dari arah 5' ke 3' dengan menambahkan dNTP-dNTP pada suhu  $\pm 72^{\circ}\text{C}$  (Klug & Cummings 1994: 402).

#### d. Peranan primer dalam PCR

Primer adalah rantai tunggal pendek yang mengandung nukleotida spesifik yang berfungsi untuk menginisiasi polimerisasi dalam PCR. Primer pada fase *annealing* berikatan dengan sekuen tertentu pada kondisi suhu yang tepat yaitu  $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$ . Primer didesain secara khusus untuk fragmen yang ingin diperbanyak. Primer yang berpasangan yaitu *reverse* dan *forward* akan berikatan dengan sekuen tertentu pada cetakan DNA dalam kondisi suhu yang tepat yaitu  $40\text{--}50^{\circ}\text{C}$  pada fase *annealing* (Russel 1994: 304--306).

Faktor penting untuk menghasilkan produk PCR yang akurat adalah desain primer yang digunakan (Yuwono 2006: 18). Primer yang kurang spesifik dapat mengakibatkan kesalahan amplifikasi DNA target. Primer yang digunakan harus berupa primer spesifik untuk fragmen DNA yang diamplifikasi. Panjang primer yang baik yaitu berkisar antara 18--24 basa. Primer yang baik untuk digunakan juga tidak memiliki homologi dengan primer pasangannya. Pasangan primer yang homolog dapat menyebabkan tidak tepatnya cetakan target (Klug & Cummings 1994)

Komposisi basa GC pada primer harus seimbang supaya proses *annealing* yang spesifik terhadap fragmen target dapat terjadi serta dapat dihasilkan suhu leleh  $T_m$  (*melting temperature*) yang efisien selama proses amplifikasi berlangsung. Pasangan primer yang ideal umumnya memiliki suhu leleh yang relatif sama. Hal tersebut untuk memastikan bahwa proses *annealing* primer-primer sudah bersesuaian pada fragmen target (Klug & Cummings 1994: 402).

e. Teknik PCR eksisi

Prosedur teknik PCR eksisi dilakukan seperti teknik PCR biasa, namun dilakukan dua reaksi dengan tiga macam *primer*. Tujuan PCR eksisi adalah untuk mengetahui aktivitas transposon *Ac/Ds* yang terinsersi dalam genom tanaman. Reaksi PCR yang pertama yaitu *primer forward* dengan *primer reverse 1*, sedangkan reaksi kedua yaitu *primer forward* dengan *primer reverse 2*. Urutan basa ketiga primer tersebut didesain sehingga dapat menempel pada bagian-bagian terminal dari konstruksi transposon. Aktivitas elemen transposon *Ds* terjadi jika transposon *Ds* terekscisi dari konstruksi T-DNA pembawa transposon *Ac/Ds* (Greco *dkk.* 2003: 10).