



UNIVERSITAS INDONESIA

**TRANSFORMASI GEN *Osdep1-Tc* (*Oryza sativa dense and erect panicle1-Truncated*) KE KALUS PADI cv. TAIPEI 309
MENGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens***

SKRIPSI

**ADE TRI ARYANI
0706263605**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**TRANSFORMASI GEN *Osdep1-Tc* (*Oryza sativa dense and erect panicle1-Truncated*) KE KALUS PADI cv. TAIPEI 309
MENGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**ADE TRI ARYANI
0706263605**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan
semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Ade Tri Aryani

NPM : 0706263605

Tanda Tangan : 

Tanggal : 8 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :

Nama : Ade Tri Aryani
NPM : 0706263605
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Transformasi Gen *Osdep1-Tc* (*Oryza sativa dense and erect panicle1-Truncated*) ke Kalus Padi cv. Taipei 309 Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*.

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Dr. Tri Joko Santoso (.....)

Pembimbing II : Dr. Andi Salamah (.....)

Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc (.....)

Penguji II : Dra. Lestari Rahayu, M.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 8 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas semua nikmat, rahmat, karunia, dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW, Rahmat bagi semesta alam. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Begitu banyak bantuan moril dan material serta bimbingan dari berbagai pihak yang tidak dapat diungkapkan hanya dengan kata-kata. Walau demikian, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Tri Joko Santoso dan Dr. Andi Salamah selaku Pembimbing I dan II yang telah membimbing dan membantu penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi ini. Terima atas segala bimbingan, doa, dukungan, perhatian, semangat, dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. dan Dra. Lestari Rahayu, M. Sc. selaku Penguji I dan II, atas segala saran dan perbaikan-perbaikan, dukungan, dan doa yang diberikan kepada penulis untuk pembuatan dan perbaikan skripsi ini.
3. Ibu Retno Lestari, M. Si. selaku Penasihat Akademik atas segala kasih sayang dan saran-saran, serta semangat yang selalu diberikan.
4. Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku Koordinator Seminar, Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining B. Prinhantini, M. Sc. selaku Sekretaris Departemen, Dra. Titi Soedjiarti, SU. selaku Koordinator Pendidikan, dan segenap staf pengajar atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis selama berada di Biologi. Tak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada Dr. Abinawanto. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada Mbak Asri, Ibu Ida, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, atas segala bantuan yang telah diberikan.

5. Seluruh peneliti serta staf Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor yang telah memberikan kesempatan kepada saya, tidak lupa terima kasih kepada Bu Atmitri dan Bu Aniversari. Terima kasih juga kepada BB-Biogen Family: Mbak Dewi Praptiwi, Kak Falin Fakhрина, Kak Ganty, Kak Uthe, Fina, Eja, Taufan, Kak Joel, Kak Diyah, Kak Taufiq, Kak Sugih atas bantuan dan dukungannya kepada penulis. Canda tawa yang kalian hadirkan di lab telah memberikan keceriaan pada penulis.
 6. Keluarga tercinta, Mama (Azizah) dan Alm. Papa (Husni) atas kasih sayang, cinta, dan dukungan, nasihat, dan doa yang tak hentinya dicurahkan kepada penulis. Untuk kakak-kakakku (Nia dan Cici) atas perhatian dan doa yang diberikan. Skripsi ini penulis persembahkan untuk Mama dan Alm. Papa yang selalu penulis rindukan.
 7. Rekan dan sahabat seperjuangan, Gita Wideani. Terima kasih atas segala dukungan, bantuan, dan doa, serta menjadi tempat curahan suka dan duka penulis.
 8. Sahabat-sahabatku Estriningtyas, Nova Wildawati, dan Arty Dwi Januari, terima kasih karena selalu bersedia menemani penulis di saat baik dan buruknya; kepada sahabatku Rizki Hutami dengan segala kesabarannya; Fika, Ikrimah, Naya, Putsan, Tewe, Febrial, Fajar, Tami, Tiwi, Wahyu, dan seluruh teman-teman di Laboratorium Genetika Biologi UI, serta seluruh BLOSSOM '07 (you're the best, guys).
 9. Seluruh kakak senior dari Biologi angkatan 2004, 2005, dan 2006, serta teman-teman angkatan 2008, 2009, 2010 atas bantuannya, terima kasih.
- Akhir kata, penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para perkembangan ilmu pengetahuan.

Penulis

2011

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ade Tri Aryani
NPM : 0706263605
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

Transformasi gen *Osdep1-Tc (Oryza sativa dense and erect panicle1-Truncated)* ke Kalus Padi cv. Taipei 309 Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan karya ilmiah saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 8 Juli 2011

Yang menyatakan



Ade Tri Aryani

ABSTRAK

Nama : Ade Tri Aryani
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul : Transformasi gen *Osdep1-Tc* (*Oryza sativa dense and erect panicle1-Truncated*) ke Kalus Padi cv. Taipei 309 Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*.

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk melakukan transformasi gen *Osdep1-Tc* ke kalus padi cv. Taipei 309 menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Transformasi gen *Osdep1-Tc* dilakukan menggunakan *A. tumefaciens strain* LBA4404 yang membawa plasmid rekombinan pCAMBIA1301-*Osdep1-Tc*, mengandung gen reporter (*gus*), gen *nptII* dan *hptI*. Gen *Osdep1-Tc* yang telah dikloning ke vektor pengklonaan pGEM-T *Easy* pada penelitian sebelumnya digunakan sebagai sampel untuk kemudian disubkloning ke pCAMBIA 1301 dan ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli* DH5 α sehingga dihasilkan vektor rekombinan pCAMBIA-*Osdep1-Tc*. Vektor rekombinan kemudian dielektroporasi ke *A. tumefaciens* dan ditransformasi ke kalus embriogenik padi. Aktivitas GUS pada kalus berhasil dideteksi 3 hari setelah infeksi dengan *A. tumefaciens*. Analisis PCR kalus transforman menunjukkan bahwa gen *hptI* berhasil terintegrasi dengan stabil pada kelima kalus uji.

Kata kunci : *Agrobacterium tumefaciens*, cv. Taipei 309, gen *Osdep1-Tc*, kalus embriogenik, transformasi, uji GUS.
xiii + 68 halaman : 19 gambar; 1 tabel
Daftar Referensi : 49 (1987--2011)

ABSTRACT

Name : Ade Tri Aryani
Study Program : Biology
Title : Transformation of *Osdep1-Tc* (*Oryza sativa dense and erect panicle1-Truncated*) Gene into cv. Taipei 309 Rice Calli Using *Agrobacterium tumefaciens*.

Research about transformation of *Osdep1-Tc* gene into rice calli cv. Taipei 309 using *Agrobacterium tumefaciens* had been done. Transformation of *Osdep1-Tc* was carried out using *A. tumefaciens* strain LBA4404, harbored recombinant plasmid pCAMBIA1301-*Osdep1-Tc*, which contained a reporter gene (*gus*), *hptI* and *nptII* gene. *Osdep1-Tc* gene had been cloned previously into the pGEM-T Easy cloning vector. The gene was being subcloned into pCAMBIA 1301 and transformed into *Escherichia coli* DH5 α in order to obtain recombinant vectors pCAMBIA-*Osdep1-Tc*. Furthermore, the recombinant vectors was electroporated into *A. tumefaciens* and transformed into rice embryogenic calli. GUS activity in rice calli was detected 3 days after infection with *A. tumefaciens*. PCR analysis of the transformant calli revealed that all five calli tested showed a succeeded stable integration of *hptI* gene.

Keywords : *Agrobacterium tumefaciens*, cv. Taipei 309, embryogenic calli, GUS assay, *Osdep1-Tc* gene, transformation.
xiii + 68 pages : 19 pictures; 1 table
Bibliography : 49 (1987--2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tanaman Padi (<i>Oryza sativa</i> L.)	4
2.2 Gen <i>DENSE AND ERECT PANICLE1 (DEP1)</i>	5
2.3 Transformasi Gen	7
2.4 Metode Transformasi Genetik yang diperantarai <i>Agrobacterium</i>	8
2.5 Subkloning	10
2.6 Gen Reporter <i>gus</i>	11
2.7 Teknik Molekuler dan Komponen yang digunakan	12
2.7.1 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	12
2.7.2 Elektroforesis Gel	14
2.7.3 Isolasi DNA	15
2.7.4 Spektrofotometri	15
2.7.5 Enzim Restriksi	16
2.7.6 Enzim Ligase	16
3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	18
3.2 Bahan	18
3.2.1 Sampel.....	18
3.2.2 Vektor Ekspresi	18
3.2.3 Primer.....	18
3.2.4 Kultur Bakteri	19
3.2.5 Kalus Embriogenik	19
3.2.6 Medium	19
3.2.7 Larutan dan <i>Buffer</i>	19
3.2.8 Bahan Penunjang	19
3.3 Peralatan.....	20
3.4 Cara kerja	21
3.4.1 Ligasi Vektor pCAMBIA 1301 dengan Fragmen Gen <i>Osdep1-Tc</i>	21

3.4.2	Transformasi dengan <i>Heat shock</i>	21
3.4.3	Seleksi Koloni Bakteri Transforman dengan PCR	22
3.4.4	Pengecekan Hasil Amplifikasi PCR dengan Gel Elektroforesis	22
3.4.5	Isolasi DNA Plasmid.....	23
3.4.6	Verifikasi DNA Plasmid dengan Digesti Menggunakan Enzim Restriksi.....	24
3.4.7	Persiapan Sel Elektrokomenpeten	24
3.4.8	Elektroporasi.....	25
3.4.9	Persiapan Bakteri <i>A. tumefaciens</i> dan Ko-kultivasi.....	25
3.4.10	Seleksi Kalus pada Media Seleksi	26
3.4.11	Uji Histokimia GUS (<i>histochemical GUS assay</i>).....	26
3.4.12	Isolasi DNA Transforman	26
3.4.13	Verifikasi Hasil Isolasi DNA Transforman dengan PCR	27
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
4.1	Digesti Klon pGEM-T- <i>Osdep1-Tc</i> dengan Enzim Restriksi.....	28
4.2	Digesti Klon pCAMBIA- <i>OsDREB1A</i> dengan Enzim Restriksi.....	29
4.3	Ligasi Vektor pCAMBIA dengan Fragmen Gen <i>Osdep1-Tc</i>	30
4.4	Transformasi Hasil Ligasi	32
4.5	Verifikasi Hasil Transformasi Menggunakan Metode PCR	35
4.6	Isolasi DNA Plasmid	38
4.7	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan PCR dan Proses Digesti menggunakan Enzim Restriksi.....	40
4.7.1	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan PCR.....	40
4.7.2	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Digesti Menggunakan Enzim Restriksi	41
4.8	Elektroporasi DNA Plasmid ke Sel Elektrokomenpeten <i>A. tumefaciens</i>	43
4.9	Isolasi DNA Plasmid Hasil Elektroporasi dan Verifikasi dengan Teknik PCR.....	45
4.10	Persiapan Bakteri <i>A. tumefaciens</i> dan Ko-kultivasi	46
4.11	Uji Histokimiawi GUS.....	48
4.12	Isolasi DNA Kalus Transforman	49
4.13	Verifikasi Hasil Isolasi DNA Transforman dengan PCR	51
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
5.1	Kesimpulan	54
5.2	Saran	54
	DAFTAR REFERENSI	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tanaman padi (<i>Oryza sativa</i> L.)	5
Gambar 2.2	Peta gen <i>DEP1</i> pada kromosom no. 9.....	6
Gambar 2.4	Sistem vektor biner	9
Gambar 2.5	Vektor ekspresi pCAMBIA 1301	11
Gambar 2.6	Reaksi pemecahan senyawa <i>X-Gluc</i> oleh enzim β -glukoronidase	12
Gambar 4.1	Hasil elektroforesis gel agarosa hasil digesti plasmid rekombinan pGEM-T- <i>Osdep1-Tc</i>	28
Gambar 4.2	Hasil elektroforesis gel agarosa hasil digesti plasmid rekombinan pCAMBIA- <i>OsDREB1A</i>	30
Gambar 4.3	Posisi daerah gen <i>Osdep1-Tc</i> dalam vektor ekspresi pCAMBIA 1301.....	31
Gambar 4.4	Transformasi plasmid rekombinan pCAMBIA- <i>Osdep1-Tc</i> pada sel kompeten <i>E. coli</i> DH5 α	34
Gambar 4.5.1	Posisi penempelan primer OsDep-S-F dan OsDep-Tc-R pada gen <i>Osdep1-Tc</i>	35
Gambar 4.5.2	Hasil elektroforesis gel agarosa produk PCR menggunakan pasangan primer OsDep-S-F dan OsDep-Tc-R terhadap hasil transformasi plasmid rekombinan.....	36
Gambar 4.6	Hasil elektroforesis gel plasmid rekombinan pCAMBIA- <i>Osdep1-Tc</i> hasil isolasi.....	39
Gambar 4.7.1	Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan PCR.....	41
Gambar 4.7.2	Verifikasi plasmid rekombinan dengan digesti menggunakan enzim restriksi <i>Bam</i> HI dan <i>Sal</i> I	42
Gambar 4.8	Koloni sel <i>Agrobacterium</i> yang mengandung plasmid rekombinan pCAMBIA- <i>Osdep1-Tc</i> pada medium seleksi.....	44
Gambar 4.9	Visualisasi gel agarosa verifikasi hasil elektroporasi plasmid ke bakteri <i>A. tumefaciens</i>	46
Gambar 4.10	Kalus-kalus tahan pada media seleksi higromisin	48
Gambar 4.11	Hasil uji GUS positif pada kalus transforman	49
Gambar 4.13	Visualisasi gel agarosa verifikasi PCR kalus transforman.....	52

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Perhitungan konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi kalus transforman.....	50
-----------	--	----

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja penelitian secara umum	60
Lampiran 2. Genotipe sel <i>Escherichia coli</i> DH5 α	61
Lampiran 3. Komposisi larutan/ <i>buffer</i> /medium yang digunakan	62
Lampiran 4. Komposisi media.....	64
Lampiran 5. Perhitungan persentase keberhasilan ligasi	66
Lampiran 6. Perhitungan persentase uji histokimiawi GUS	67
Lampiran 7. Perhitungan nilai kemurnian DNA hasil isolasi kalus transforman .	68



BAB 1 PENDAHULUAN

Padi (*Oryza sativa* L.), sebagai salah satu bahan pangan pokok di dunia, memiliki konsumen yang terus meningkat dengan laju peningkatan 1,8% per tahun. Namun, laju pertumbuhan produksi padi di dunia justru mengalami penurunan. Produksi padi diperkirakan harus mengalami peningkatan hingga 50% pada tahun 2025, untuk mencegah ketidakseimbangan pangan di dunia. Hal tersebut mengarahkan dunia pada teknologi rekayasa genetika untuk perbaikan genetik padi sebagai pelengkap metode konvensional. Teknologi rekayasa genetika diharapkan dapat mengembangkan varietas padi yang memiliki kualitas bulir yang baik, dengan ketahanan terhadap tekanan biotik dan abiotik, serta hasil produksi yang tinggi, salah satunya melalui peningkatan bulir padi pada panikula (Saharan *et. al.* 2004: 572).

Arsitektur panikula (malai) pada tanaman padi memegang peranan penting dalam peningkatan hasil. Panikula tanaman padi berperan sebagai organ fotosintesis, dan juga sebagai tempat penyimpanan hasil fotosintesis. Studi berkelanjutan terus dilakukan, terkait dengan berbagai aspek arsitektur panikula, seperti panjang panikula, jumlah cabang primer per panikula, panjang bulir, lebar bulir, rasio set biji, diameter panikula, dan kepadatan spika. Padi yang berarsitektur panikula tegak memiliki kelebihan tersendiri, karena dapat meningkatkan penerimaan energi cahaya, sehingga fotosintesis berjalan lebih efektif. Selain itu, panikula yang tegak juga memberikan pengaruh pada aerasi CO₂ yang baik, sehingga kelebihan tersebut mengarah pada peningkatan hasil tanaman padi (Guo & Hong 2010: 533; Piao *et. al.* 2009: 1497).

Studi genetik terkait karakter panikula yang tegak pada tanaman padi telah dilakukan para peneliti, meskipun hasil yang diperoleh sangat terbatas. Gen dominan dan resesif diketahui berpengaruh terhadap karakter panikula yang tegak. Studi genetik tersebut antara lain dilakukan oleh Yan *et.al.* (2007), yang menemukan *Quantitative Trait Loci* (QTL) *qPE9-1*, yang terdapat di antara penanda STS H90 dan penanda SSR RM5652, serta Chen *et.al.* (2008) menemukan panikula tegak yang dikembangkan dari *Oryza glaberrima*, padi

kultivar asal Afrika. Gen yang mengontrol karakter panikula tegak tersebut dipetakan antara RM5879 dan RM3332 pada kromosom 4. Huang *et.al.* (2009), berhasil melakukan kloning gen yang terdapat pada QTL kromosom 9 padi. Gen tersebut dinamakan *DENSE AND ERECT PANICLE1 (DEP1)*, mengkode trunkasi (pemotongan) *phosphatidylethanolamine binding protein-like domain protein* (Piao *et. al.* 2009: 1497). Efek alel yang terdapat pada lokus *DEP1* adalah mempertinggi aktivitas merismatik, sehingga terjadi reduksi panjang internodus infloresens, peningkatan jumlah bulir per panikula, dan peningkatan hasil bulir padi (Huang *et.al.* 2009: 494).

Studi ekspresi gen pada tanaman dapat dilakukan melalui introduksi gen yang ingin dipelajari menggunakan teknik transformasi, salah satunya menggunakan vektor bakteri *Agrobacterium*. *Agrobacterium tumefaciens* adalah bakteri patogen Gram-positif penyebab penyakit *crown gall* pada tanaman. Bakteri tersebut memindahkan suatu bagian DNA yang disebut *transfer DNA (T-DNA)* bersama dengan protein virulens setelah menginfeksi tanaman (Bhatti & He 2009: 403). Teknik transformasi genetik yang diperantarai *Agrobacterium* merupakan teknik umum yang digunakan untuk perbaikan genetik tanaman. Keuntungan teknik tersebut meliputi kemampuan memindahkan fragmen DNA berukuran besar, biaya eksperimen yang relatif murah, dan ekspresi transgen tanaman transgenik yang lebih tinggi (53%) dibanding dengan metode penembakan partikel (*particle bombardment*) (23%) (Lee *et.al.* 2010: 2).

Gen *DENSE AND ERECT PANICLE1 (DEP1)* adalah gen yang terdapat dalam lokus *DEP1* pada padi. Gen *DEP1* yang digunakan dalam penelitian adalah gen *DEP1* yang diisolasi dari tanaman padi subspecies *Indica* varietas Inpari-1 menggunakan primer spesifik untuk *Oryza sativa dense and erect panicle1-Truncated (Osdep1-Tc)*. Gen *Osdep1-Tc* tersebut dikonstruksi kembali ke dalam vektor ekspresi pCAMBIA 1301 untuk selanjutnya diintroduksi kembali ke tanaman padi sehingga akan meningkatkan ekspresi gen yang terkait dengan tiga karakteristik tanaman padi (kepadatan panikula, jumlah bulir per panikula dan panikula yang tegak), sehingga akan meningkatkan produksi padi.

Penelitian yang dilakukan menggunakan gen *Osdep1-Tc* yang telah dikonstruksi secara *in vitro* menggunakan teknik PCR dan berhasil dikloning ke

Universitas Indonesia

dalam vektor kloning pGEM-T *Easy* pada penelitian terdahulu (Data belum dipublikasi). Gen *Osdep1-Tc* diharapkan dapat disisipkan ke dalam vektor ekspresi pCAMBIA 1301 untuk menghasilkan subkloning pCAMBIA-*Osdep1-Tc* dan ditransformasikan ke kalus padi cv. Taipei 309. Vektor ekspresi pCAMBIA 1301 memiliki reporter *gusA* sehingga keberhasilan transformasi dan deteksi gen *Osdep1-Tc* pada tanaman yang diregenerasi dapat dilakukan (CambiaLabs 2006: 1). Tanaman padi hasil regenerasi yang diperoleh tersebut diharapkan dapat memiliki peningkatan terhadap karakteristik tertentu, yaitu kepadatan panikula, jumlah bulir per panikula dan panikula yang tegak pada tanaman padi.

Penelitian bertujuan untuk melakukan introduksi gen *Osdep1-Tc* ke kalus padi cv. Taipei 309 menggunakan *A. tumefaciens*. Hipotesis penelitian yang diajukan adalah gen *Osdep1-Tc* dapat diintroduksi ke kalus padi cv. Taipei 309 menggunakan *A. tumefaciens*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.)

Padi merupakan makanan pokok penduduk Indonesia. Menurut van Steenis (2005: 117), padi memiliki beberapa karakteristik, antara lain rumput berumpun kuat, berumur 1 tahun, dari ruas keluar banyak batang yang berakar, tinggi antara 1,5--2 m. Helai daun tanaman padi berbentuk garis dengan panjang 15--80 cm, kebanyakan dengan tepi kasar. Malai tanaman padi memiliki panjang bervariasi, antara 15--40 cm, tumbuh ke atas akhirnya ujung menggantung.

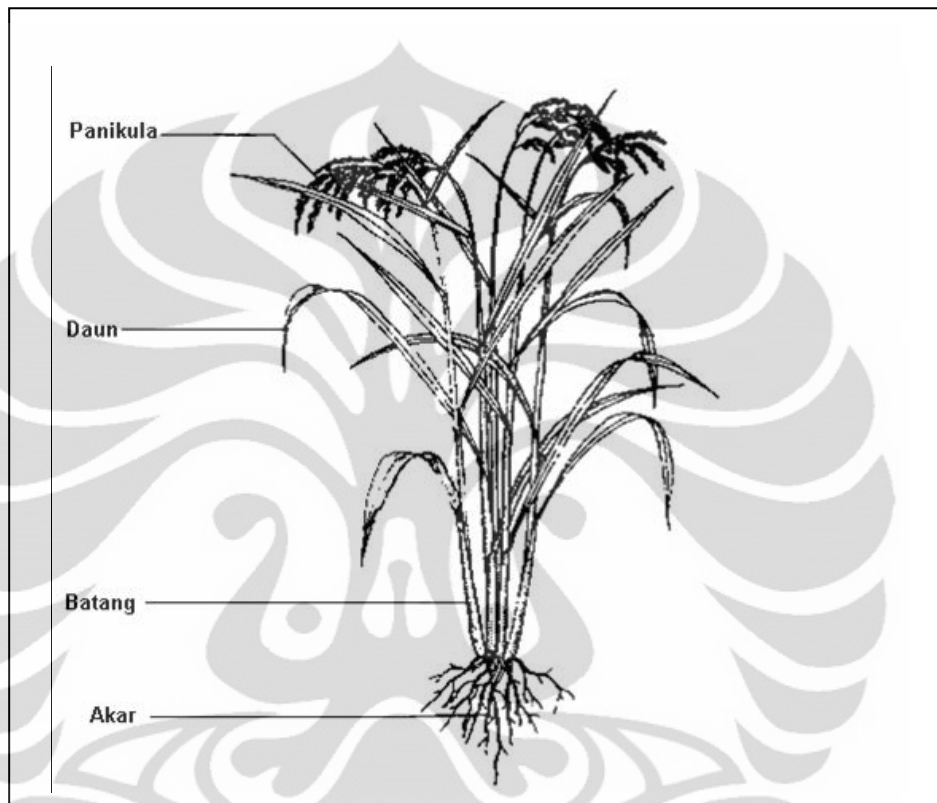
Klasifikasi tanaman padi (*Oryza sativa* L.) menurut Plants Database (2006: 1) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Bangsa	: Cyperales
Suku	: Poaceae
Marga	: <i>Oryza</i>
Spesies	: <i>Oryza sativa</i> L.

Padi (*Oryza sativa* L.) dibedakan menjadi dua subspecies utama, yaitu Indica dan Japonica. Subspecies Indica tumbuh di sepanjang daratan Asia khususnya Asia tropis dan subtropis, sementara subspecies Japonica tumbuh di bagian utara Asia Tenggara dan Cina bagian selatan (Khush 1997: 30). Morinaga (1954) (*lihat* Khush 1997: 29) menyatakan bahwa terdapat kelompok peralihan diantara keduanya, yaitu Javanica, yang di dalamnya terdapat varietas Bulu dan Gundil asal Indonesia.

Padi subspecies Japonica memiliki bulir yang pendek dan membulat. Salah satu kultivar subspecies Japonica adalah Taipei 309 (T309). Kultivar Taipei 309 memiliki beberapa kelebihan yaitu kemampuan membentuk kalus yang tinggi, karena mudah dan responsif untuk dikulturkan secara *in vitro*. Selain itu,

Taipei 309 memiliki daya regenerasi yang tinggi. Kelebihan tersebut menjadikan Taipei 309 menjadi salah satu kultivar yang umum digunakan dalam proses pengkulturan dan sering dijadikan target dalam proses transfer gen ke tanaman (Purnamaningsih 2006: 75--76).

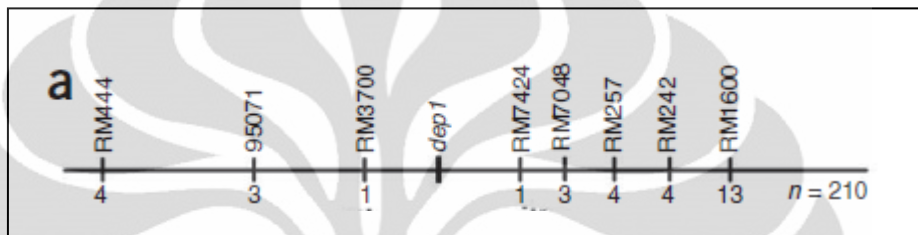


Gambar 2.1 Tanaman padi (*Oryza sativa* L.)
[Sumber: Heinrichs 2009: 1. Telah dimodifikasi.]

2.2 Gen *DENSE AND ERECT PANICLE1 (DEP1)*

Usaha peningkatan hasil tanaman padi telah banyak dilakukan oleh para peneliti dunia, salah satunya melalui perbaikan arsitektur panikula. Studi tentang arsitektur panikula dilakukan meliputi beberapa aspek, diantaranya panjang panikula, jumlah cabang primer per panikula, panjang bulir, lebar bulir, rasio set biji, diameter leher panikula, dan kepadatan panikula. Studi tersebut dilakukan pada dua subspecies padi yaitu Indica dan Japonica (Piao *et.al.* 2009: 1497--1498).

DENSE AND ERECT PANICLE1 (DEP1) adalah gen yang terdapat dalam lokus *DEP1*. Lokus *DEP1* merupakan lokus yang bertanggung jawab terhadap tiga karakter tanaman padi, yaitu kepadatan panikula, jumlah bulir per panikula, dan ketegakan panikula. Gen tersebut dipetakan pada kromosom no. 9 padi, berada di antara penanda RM3700 dan RM7424 (Gambar 2.2) (Huang *et.al.* 2009: 495).



Gambar 2.2 Peta gen *DEP1* pada kromosom no. 9 padi
[Sumber: Huang *et.al.* 2009: 495.]

Alel dominan yang terdapat pada lokus *DEP1* merupakan mutasi *gain-of-function* yang menyebabkan pemotongan *phosphatidylethanolamine-binding protein-like domain protein*, suatu protein pengontrol pergantian morfologi antara pertumbuhan tunas dan struktur bunga pada tanaman. Efek alel tersebut menyebabkan reduksi panjang internodus infloresensia, dan peningkatan jumlah bulir per panikula sehingga terjadi peningkatan hasil bulir padi (Huang *et.al.* 2009: 494--495; EBI 2011: 1).

Selain gen *DEP1*, gen yang diidentifikasi terkait dengan sifat panikula yang tegak pada tanaman padi adalah *ERECT PANICLE 2 (EP2)* dan *ERECT PANICLE 3 (EP3)*. *Erect panicle 2 (EP2)* terletak pada kromosom no. 7 padi. Mutasi *loss-of-function* gen tersebut menyebabkan fenotip panikula yang tegak pada tanaman padi. Kloning pada lokus *EP2* menunjukkan bahwa lokus tersebut mengkode protein *EP2* yang terletak di retikulum endoplasma, namun fungsi biokimiawinya belum diketahui. Gen *EP2* diekspresikan terutama pada berkas pembuluh (Zhu *et. al.* 2009: 344).

Gen *ERECT PANICLE 3 (EP3)* terletak di antara penanda STS5803-5 dan STS5803-7. Mutasi *ep3* menyebabkan peningkatan jumlah pembuluh vaskular dan penebalan parenkim pada pedunkulus, sehingga memperlihatkan fenotip panikula yang tegak. Mutan tersebut telah diisolasi dari Hwasunchalbyeo, salah satu kultivar padi subspecies Japonica, dan mengkode protein putativ F-box (Piao *et. al.* 2009: 1497).

2.3 Transformasi Gen

Transformasi merupakan suatu tahapan yang dilakukan setelah DNA asing diinsersikan ke dalam vektor. DNA rekombinan yang dihasilkan kemudian diintroduksi ke sel inang yang sesuai. Metode transformasi yang dipilih tergantung pada sistem sel inang yang digunakan. Transformasi DNA dapat dilakukan dengan metode perlakuan kalsium klorida (CaCl_2) dan elektroporasi, melalui perantara *Agrobacterium*, teknik biolistik, dan mikroinjeksi (Wong 1997: 125--129).

DNA asing dapat dengan mudah diintroduksi ke sel bakteri apabila DNA plasmid telah diberi perlakuan dengan sel kompeten. Sel kompeten dibuat dengan cara memberi perlakuan kation divalen seperti kalsium klorida (CaCl_2) ke sel. DNA plasmid kemudian dicampur dengan sel kompeten tersebut. Sel kompeten kemudian diberi perlakuan kejutan panas (*heat shock*) pada suhu $42\text{ }^\circ\text{C}$, sehingga DNA dapat memasuki sel. Sel kemudian ditempatkan ke medium yang mengandung antibiotik untuk diidentifikasi (Harisha 2007: 431).

Elektroporasi merupakan teknik transformasi menggunakan aliran listrik bertegangan tinggi. Aliran listrik tersebut dapat melubangi membran sel bakteri, merusak lapisan lipid, sehingga DNA dapat memasuki sel atau jaringan (Fisk & Dandekar 2004: 79). Aliran listrik dialirkan menuju suspensi sel dan DNA kemudian ditempatkan di kuvet. Aliran listrik kemudian memecah pori pada membran, sehingga DNA dapat memasuki sel. Sel dapat berfungsi secara normal kembali setelah pori tersebut tertutup (Spencer 1991: 45).

2.4 Metode Transformasi Genetik yang diperantarai *Agrobacterium*

Metode transformasi genetik yang diperantarai oleh *Agrobacterium* menggunakan kemampuan bakteri tanah *A. tumefaciens* untuk mentransfer DNA plasmid ke sel tanaman. *A. tumefaciens* bersifat patogen terhadap tanaman, sehingga setelah menginfeksi tanaman, bakteri tersebut menyebabkan penyakit yang disebut *crown gall*. Proses tersebut dimulai saat *A. tumefaciens* mentransfer DNA plasmid ke sel tanaman, kemudian plasmid terintegrasi di dalam untai ganda DNA tanaman yang terinfeksi. Plasmid tersebut mengandung gen yang menyebabkan tumor, sehingga dinamakan plasmid Ti (*tumor inducing*) (Omoto & Lurquin 2004: 80).

Plasmid Ti yang tidak dimodifikasi tidak cocok untuk menjadi vektor kloning, dikarenakan dua alasan: (1) Sel tanaman yang terinfeksi plasmid Ti berkembang menjadi sel tumor yang tidak dapat diregenerasikan menjadi tanaman utuh, dan (2) Ukuran plasmid Ti bervariasi dari 150 hingga 200 kb, sehingga sulit digunakan dalam proses manipulasi genetik (Wong 1997: 113). Para peneliti kemudian menghilangkan gen penyebab tumor dari plasmid Ti dan mengganti gen penyebab tumor tersebut dengan gen asing. Plasmid Ti tersebut kemudian menjadi vektor yang alami untuk transformasi tanaman (Omoto & Lurquin 2004: 80).

Gen *vir* diperlukan untuk pemotongan daerah T-DNA, serta proses masuk ke sel tanaman dan integrasi plasmid ke genom tanaman (Lodge *et. al.* 2007: 392). Plasmid penolong (*helper plasmid*) merupakan plasmid Ti tanpa bagian T-DNA, sementara plasmid donor merupakan plasmid *E. coli* yang membawa bagian T-DNA yang terpotong dan mengandung situs transfer serta membawa gen asing yang diapit oleh sekuens batas (*border sequence*). Sistem tersebut dikenal sebagai sistem vektor biner, karena membutuhkan dua plasmid pada *strain A. tumefaciens* yang digunakan pada proses transformasi ke tanaman (Gambar 2.4). Plasmid penolong dibawa oleh *strain Agrobacterium*, sedangkan plasmid donor merupakan vektor bakterial, yang mengandung: (1) situs *origins of replication E. coli* dan *Agrobacterium*, (2) penanda seleksi untuk bakteri dan tanaman, (3)

sekuens batas T-DNA plasmid Ti, dan (4) situs kloning untuk insersi gen asing (Wong 1997: 112--113).

Penanda genetik diperlukan dalam sistem vektor biner. Penanda genetik dapat dibagi menjadi dua kelompok, yaitu:

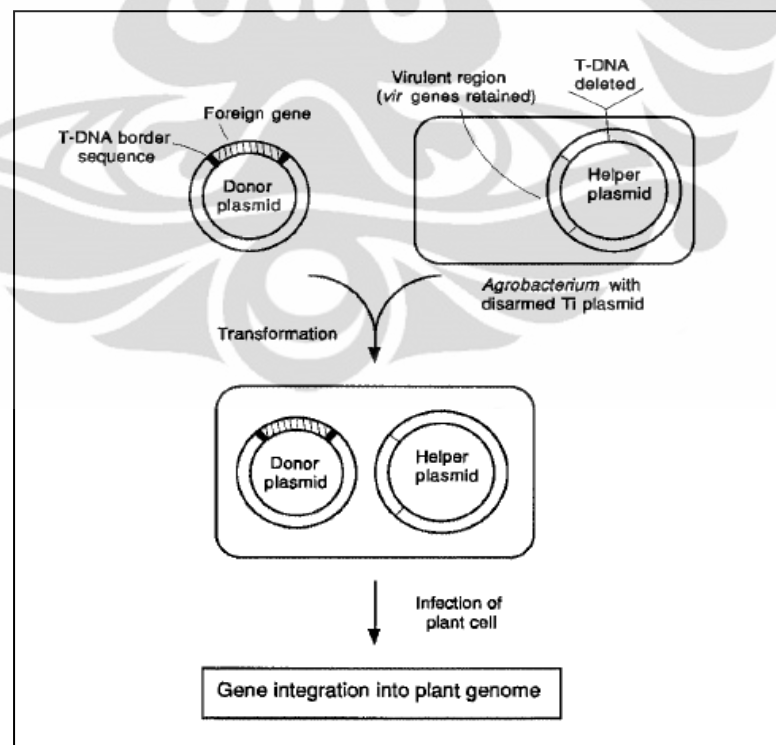
a. Penanda seleksi dominan (*Dominant selectable markers*)

Sel tanaman atau jaringan yang mengekspresikan gen penanda seleksi akan tetap bertahan walaupun terdapat antibiotik tertentu pada medium. Misalnya gen *hpt* mengkode higromisin fosfotransferase (HPT) untuk resistensi terhadap antibiotik higromisin.

b. *Screenable markers*

Aktivitas transkripsional pada tanaman sangat bervariasi dan terpengaruh oleh perubahan lingkungan, sehingga deteksi histokimiawi aktivitas enzimatik jaringan tanaman oleh *screenable markers* diperlukan. Penanda tersebut disebut dengan gen reporter.

(Wong 1997: 117--119).

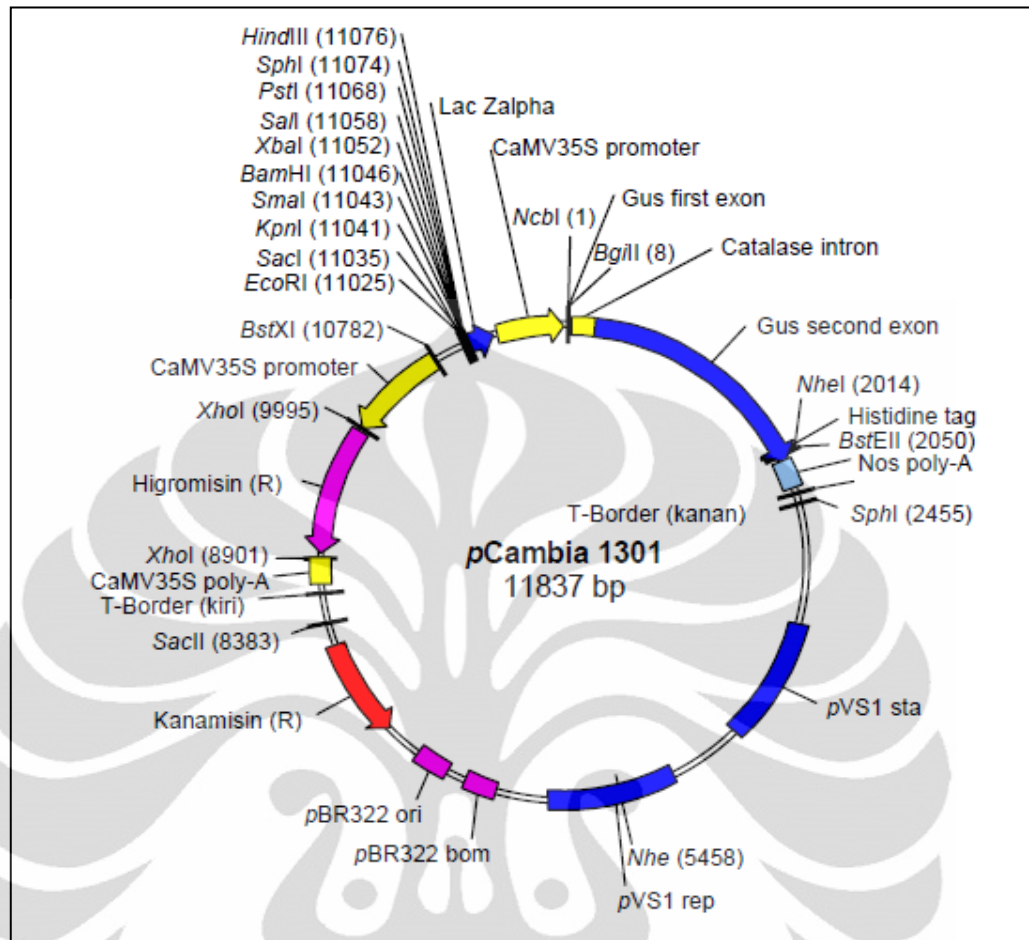


Gambar 2.4 Sistem vektor biner
[Sumber: Wong 1997: 109.]

2.5 Subkloning

Subkloning adalah suatu teknik pemindahan fragmen DNA dari satu vektor ke vektor lain. Hal tersebut umumnya dilakukan agar fragmen DNA dapat diekspresikan pada vektor (Brooker 2005: 501). Vektor merupakan perantara introduksi gen ke sel inang (Wong 1997: 4). Salah satu vektor yang umum digunakan sebagai vektor kloning maupun vektor ekspresi adalah plasmid. Plasmid merupakan molekul DNA yang ditemukan pada bakteri, namun terpisah dari kromosom bakteri. Plasmid memiliki tiga karakteristik penting, yaitu: (1) memiliki situs penanda awal replikasi (*origin of replication*), yang memastikan vektor bereplikasi ke dalam sel; (2) memiliki penanda selektif, umumnya berupa gen resisten terhadap antibiotik sehingga memungkinkan sel-sel yang mengandung vektor untuk dapat diseleksi atau diidentifikasi; dan (3) satu atau lebih situs restriksi dimana fragmen DNA dapat diinsersikan (Singh 2009: 36--38).

Vektor ekspresi merupakan vektor yang dirancang untuk memaksimalkan ekspresi gen asing yang dibawa (Weaver 2005: 80). Vektor ekspresi memiliki daerah promotor pada situs kloning (*multiple cloning site*), sehingga memungkinkan transkripsi dan translasi DNA yang diinsersikan ke vektor (Wong 1997: 94). Contoh vektor ekspresi yang umum digunakan adalah pCAMBIA 1301, suatu vektor plasmid yang cocok untuk insersi *gene of interest* beserta promotor dan terminator yang dimiliki gen tersebut (Gambar 2.5) (CambiaLabs 2006: 1).

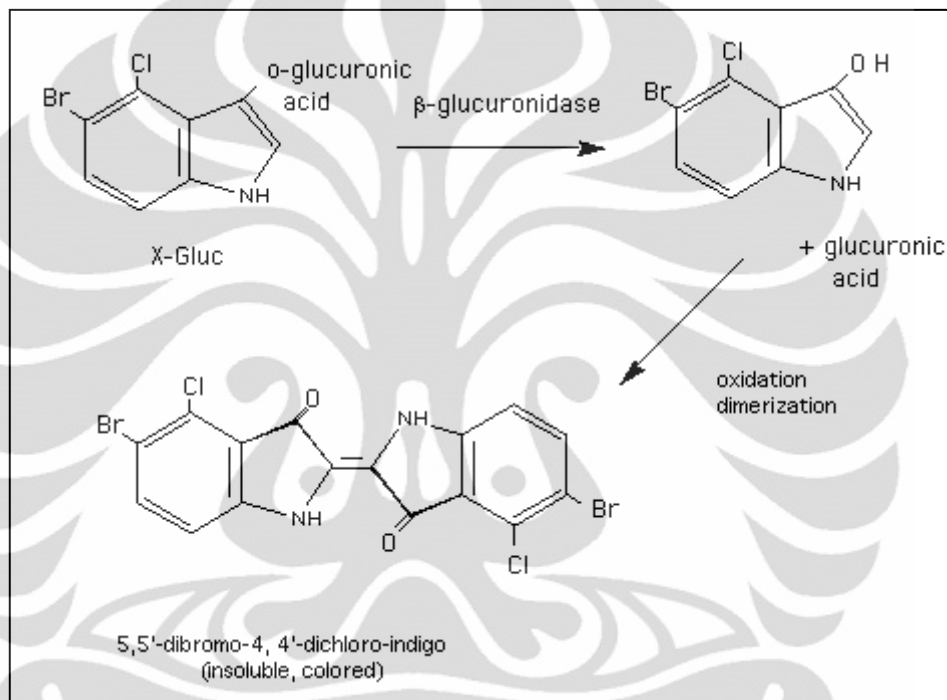


Gambar 2.5 Vektor ekspresi pCAMBIA 1301
[Sumber: Listanto *et. al.* 2005: 46.]

2.6 Gen Reporter *gus*

Gen *gus* merupakan gen yang berasal dari *E. coli*, mengkode enzim β -glukoronidase yang memecah senyawa histokimiawi, seperti *5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucoronide (X-Gluc)*, menjadi komponen berwarna biru (Gambar 2.6). Gen *gus* berperan sebagai gen reporter, karena gen tersebut melaporkan aktivitas biokimiawi elemen genetik tertentu yang menjadi target pada sel tanaman maupun jaringan atau keseluruhan tanaman. Penggabungan gen *gus* dengan promoter memungkinkan visualisasi ekspresi gen menjadi lebih leluasa, dan analisis mendalam terhadap ekspresi sel spesifik (Wong 1997: 119).

Vektor ekspresi pCAMBIA 1301 mengandung konstruksi reporter *gusA* untuk analisis yang lebih sederhana dan sensitif terhadap fungsi atau kehadiran gen pada tanaman yang diregenerasi. Konstruksi vektor tersebut menggunakan *gusA E. coli* dengan intron di dalam sekuens pengkode untuk memastikan ekspresi aktivitas glukuronidase berasal dari sel eukariot, bukan dari sel residu *A. tumefaciens* (Cambialabs 2006: 1).



Gambar 2.6 Reaksi pemecahan senyawa *X-Gluc* oleh enzim β-glukoronidase

[Sumber: Karcher & Gelvin 2000: 1.]

2.7 Teknik Molekuler dan Komponen yang digunakan

2.7.1 *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan metode amplifikasi fragmen DNA tertentu secara *in vitro*. PCR dapat melipatgandakan jumlah fragmen DNA target dalam waktu singkat. Prinsip metode PCR adalah

Universitas Indonesia

amplifikasi segmen DNA spesifik menggunakan pelekatan dua primer yang komplementer dengan sekuens khusus gen target. Kedua primer tersebut berlekatan dengan untai DNA target, sehingga memungkinkan DNA polimerase untuk melakukan elongasi sekuens DNA tersebut. Hasil dari setiap siklus menunjukkan peningkatan eksponensial dari keseluruhan jumlah kopi yang disintesis (Agrawal 2008: 55).

Teknik PCR memerlukan beberapa komponen, yaitu DNA polimerase yang dapat mengamplifikasi untai baru DNA, dua primer oligonukleotida, kation bivalen (umumnya $MgCl_2$) sebagai aktivator DNA polimerase dan membantu dalam proses *annealing*, *buffer* PCR untuk menjaga kestabilan pH, kation monovalen dalam *buffer* PCR, dan cetakan DNA yang mengandung sekuens target untuk diamplifikasi (Sambrook & Russell 2001: 8.4--8.6; Agrawal 2008: 58--59). *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR) merupakan variasi PCR yang digunakan untuk memperbanyak sekuens RNA menjadi cDNA. Salinan cDNA dari RNA dihasilkan menggunakan enzim *reverse transcriptase*, lalu cDNA tersebut yang digunakan untuk proses amplifikasi (Singh 2009: 161).

Salah satu kunci keberhasilan dalam proses PCR adalah rancangan primer yang baik. Sekuens primer serta panjang primer menentukan *melting temperature* (T_m) dan keseluruhan hasil produk PCR. Rancangan primer yang kurang baik dapat berujung pada hasil PCR yang tidak baik atau tidak menghasilkan produk sama sekali, juga kemungkinan dapat terjadi pembentukan dimer primer. Primer yang baik memiliki panjang 20--30 basa, semakin panjang primer, maka semakin tidak efisien proses *annealing* yang terjadi. Primer yang baik memiliki kandungan basa GC sebesar 45--55%. Selain itu, sepasang primer yang baik memiliki nilai T_m yang sama, karena semakin tinggi perbedaan nilai T_m , proses amplifikasi semakin berjalan kurang efisien (Agrawal 2008: 61--64; Sambrook & Russell 2001: 8.81). Jumlah siklus PCR juga mempengaruhi produk PCR yang dihasilkan. Menurut Agrawal (2008: 56, 69), jumlah siklus PCR sebaiknya berkisar antara 30--40 siklus. Jumlah siklus yang melebihi 40 siklus akan menghasilkan jumlah produk non-spesifik dari PCR, sebaliknya jika jumlah siklus dibawah 30, akan menghasilkan produk yang sedikit.

Terdapat tiga tahapan dalam PCR, yaitu denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi. Denaturasi terjadi pada suhu 90--94 °C, untai ganda DNA berpisah menjadi untai tunggal, dan seluruh aktivitas enzimatik berhenti (misalnya: pemanjangan dari siklus sebelumnya). Tahap *annealing* ditandai dengan pelekatan primer ke sekuens komplementer pada kedua sisi sekuens target, pada suhu 50--65 °C. Suhu *annealing* yang baik adalah 5--10 °C di bawah nilai T_m amplifikasi primer. Polimerisasi merupakan tahap pemanjangan untai DNA baru yang dimulai oleh pemanjangan primer dengan bantuan DNA polimerase, yaitu *Taq DNA polymerase*, dari arah 5' ke 3' yang terjadi pada suhu 72 °C (Klug & Cummings 1994: 402; Agrawal 2008: 56--58).

2.7.2 Elektroforesis Gel

Elektroforesis gel merupakan metode standar untuk menganalisis, mengidentifikasi, dan memurnifikasi fragmen DNA. Elektroforesis gel juga dapat digunakan untuk memisahkan dan menganalisis RNA dan oligonukleotida. Prinsip kerja elektroforesis adalah migrasi partikel bermuatan pada gel yang dialiri arus listrik. Beberapa molekul biologis seperti asam amino, peptida, nukleotida, serta asam nukleat memiliki partikel bermuatan yang dapat bermigrasi baik ke katoda ataupun anoda, tergantung dari sifat muatan yang dimilikinya, dibawah pengaruh arus listrik (Agrawal 2008: 81).

Gel yang umum digunakan pada proses elektroforesis ada dua jenis, yaitu agarosa dan poliakrilamid. Gel poliakrilamid digunakan untuk memisahkan fragmen dengan ukuran kurang dari 500 bp. Gel agarosa digunakan untuk memisahkan fragmen dengan ukuran 100--60.000 bp (Agrawal 2008: 87, 90).

Terdapat dua *buffer* yang digunakan dalam elektroforesis gel agarosa, yaitu *loading buffer* dan *running buffer*. *Loading buffer* mengandung sukrosa, gliserol atau ficoll, dan pewarna seperti bromofenol biru. Sukrosa menambah berat jenis DNA, sehingga dapat tenggelam ke dasar sumur, sedangkan bromofenol biru berfungsi sebagai pewarna sehingga migrasi DNA mudah terlihat. *Running buffer* yang biasanya digunakan berupa TAE *buffer* (Agrawal 2008: 87--88).

Fragmen DNA yang bermuatan negatif akan bermigrasi ke elektroda positif pada gel. Fragmen DNA hasil elektroforesis dengan berbagai panjang berbeda dapat divisualisasikan dengan autoradiografi ataupun dengan penggunaan pewarna fluoresens, misalnya etidium bromida (EtBr). Panjang fragmen DNA kemudian dapat ditentukan melalui posisi pita yang terbentuk, dibandingkan dengan posisi ukuran marka penanda (Agrawal 2008: 81).

2.7.3 Isolasi DNA

Percobaan rekayasa genetika selalu memerlukan suatu sumber asam nukleat dalam prosesnya, baik itu berupa DNA maupun RNA. Suatu metode pengisolasian dibutuhkan dalam proses tersebut, dimana komponen asam nukleat diisolasi dari sel makhluk hidup. Terdapat tiga syarat dasar dalam suatu proses isolasi, yaitu: (1) pengisolasian asam nukleat dari sel sampel, (2) pemisahan asam nukleat dari komponen sel lainnya, dan (3) pemulihan dan pemurnian DNA (Nicholl 2002: 34--35).

Tahapan pertama dari proses isolasi adalah perusakan materi awal (dapat berasal dari virus, bakteri, tanaman, maupun hewan) untuk membuka sel yang membawa materi asam nukleat. Tahapan selanjutnya adalah pemisahan asam nukleat dari pengotor berupa protein, karbohidrat, dan lipid. Proses tersebut dapat dilakukan menggunakan campuran fenol dan kloroform (van Pelt-Verkuil *et. al.* 2008: 36). Selanjutnya, proses pemurnian DNA dapat dilakukan dengan menggunakan RNase, untuk mendapatkan DNA dengan tingkat kemurnian yang tinggi (Nicholl 2002: 35).

2.7.4 Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan teknik pengukuran konsentrasi zat terlarut menggunakan gelombang cahaya. Spektrofotometri dapat digunakan untuk mengukur konsentrasi asam nukleat terlarut, dengan cara menentukan absorbansi pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}) (Nicholl 2002: 35). Nilai A_{260} sama dengan 1 menunjukkan konsentrasi DNA untai ganda sebesar 50 $\mu\text{g/ml}$ atau

konsentrasi DNA/RNA untai tunggal sebesar 40 µg/ml. Kemurnian DNA dapat dihitung dengan cara membandingkan nilai A_{260} dan A_{280} . DNA dikatakan murni apabila nilai $A_{260} : A_{280}$ berkisar antara 1,8 hingga 2,0. Apabila nilai $A_{260} : A_{280}$ di bawah 1,7 atau di atas 2,0, maka kemungkinan terdapat kontaminan seperti sisa fenol ataupun protein di dalam larutan (Sambrook & Russell 2001: A8.20).

2.7.5 Enzim Restriksi

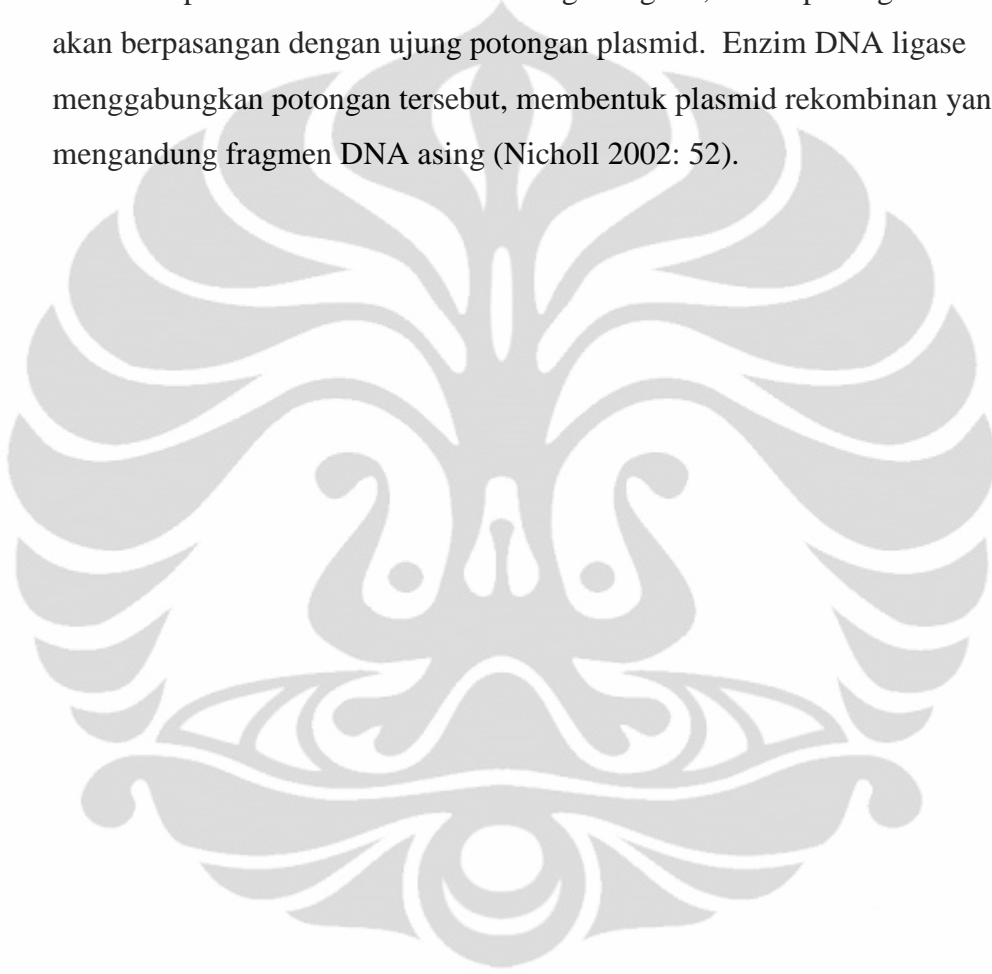
Enzim restriksi (disebut juga endonuklease restriksi) merupakan enzim yang mengenali dan memecah ikatan gula-fosfat molekul DNA pada sekuens nukleotida spesifik. Enzim tersebut diproduksi oleh bakteri dan digunakan sebagai pertahanan melawan virus, dengan cara mengenali DNA viral dan memotong DNA tersebut. Tiga tipe enzim restriksi telah diisolasi dari bakteri, yaitu tipe I, tipe II, dan tipe III. Enzim restriksi tipe I mengenali sekuens spesifik DNA, namun memotong DNA tersebut pada situs acak, biasanya 1000 bp atau lebih dari sekuens spesifik. Enzim restriksi tipe III mengenali sekuens spesifik DNA, dan memotong DNA tersebut kira-kira 25 bp dari sekuens spesifik. Enzim restriksi tipe II mengenali sekuens spesifik DNA, dan memotong DNA tersebut tepat pada sekuens spesifik, sehingga hanya tipe II yang dapat digunakan untuk pengerjaan DNA rekombinan (Singh 2009: 17).

Sekuens pengenalan enzim restriksi umumnya memiliki ukuran 4--8 bp. Kebanyakan sekuens pengenalan merupakan palindromik, yaitu sekuens yang identik dengan untai komplementernya ketika dibaca pada arah berlawanan. Seluruh enzim restriksi tipe II mengenali sekuens palindromik (Singh 2009: 19).

Beberapa enzim restriksi memotong untai DNA pada posisi yang berbeda, sehingga menghasilkan potongan dengan ujung kohesif, disebut juga *sticky end*. Contoh enzim yang menghasilkan potongan kohesif adalah *HindIII*, *BamHI*, dan *EcoRI*. Dua fragmen DNA dapat bergabung dengan ujung kohesif tersebut secara permanen dibantu oleh DNA ligase. Beberapa enzim memotong untai DNA pada posisi yang sama, menghasilkan potongan dengan ujung *blunt end*. Contoh enzim yang menghasilkan *blunt end* adalah *PvuII*, *DraI*, dan *SmaI* (Singh 2009: 20).

2.7.6 Enzim Ligase

Enzim ligase berfungsi untuk meligasi vektor dengan fragmen DNA yang telah didigesti dengan enzim restriksi yang sama (Agrawal 2008: 265). Kloning restriksi menghasilkan ujung potongan *sticky end* pada DNA asing dan plasmid. DNA dan plasmid tersebut kemudian digabungkan, beberapa fragmen DNA asing akan berpasangan dengan ujung potongan plasmid. Enzim DNA ligase menggabungkan potongan tersebut, membentuk plasmid rekombinan yang mengandung fragmen DNA asing (Nicholl 2002: 52).



BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Jl. Tentara Pelajar no. 3A, Bogor 16111, selama 5 bulan (Januari 2011--Mei 2011).

3.2 Bahan

3.2.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah gen *Osdep1-Tc* yang telah diklona ke vektor pGEM-T *Easy cloning vector*, yaitu klon pGEM-T-*Osdep1-Tc*. Sampel diperoleh dari Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor.

3.2.2 Vektor Ekspresi

Vektor ekspresi yang digunakan dalam penelitian adalah pCAMBIA 1301 [CambiaLabs].

3.2.3 Primer

Primer yang digunakan dalam proses PCR adalah sebagai berikut:

OsDep-S-F : 5'GGATCCATGGGGGAGGAGGCGGTG3'
OsDep-Tc-R : 5'GTCGACAAAAAACCATCTAGAAGCAGCTGTACA3'
hpt-F : 5'GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG3'
hpt-R : 5'GCATCTCCCGCCGTGCAC3'

3.2.4 Kultur Bakteri

Kultur bakteri yang digunakan adalah *Escherichia coli strain DH5 α* yang ditumbuhkan dalam medium Luria Bertani (LB). *Strain* bakteri *A. tumefaciens* yang digunakan dalam proses transformasi adalah *strain* LBA4404.

3.2.5 Kalus Embriogenik

Kalus embriogenik yang digunakan dalam penelitian adalah kalus yang berasal dari embrio matang (*mature embryo*) padi subspecies Japonica cv. Taipei 309 yang telah disiapkan oleh peneliti Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor.

3.2.6 Medium

Medium yang digunakan adalah Luria Bertani (LB) cair dan Luria Bertani (LB) padat. Komposisi medium yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.2.7 Larutan dan *Buffer*

Larutan-larutan dan *buffer* yang digunakan selama penelitian adalah TAE 1x; gel agarosa 1% dan 1,2%; *solution* I; *solution* II; *solution* III, larutan kalsium klorida (CaCl₂); larutan sorbitol 1 M; larutan 2,4-D; glukosa; larutan *X-gluc*; etanol absolut; etanol 70%; asetosiringon; gliserol 10%; serta *buffer* TrisEDTA. Komposisi larutan dan *buffer* yang digunakan dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.2.8 Bahan Penunjang

Bahan penunjang yang digunakan selama penelitian adalah isopropanol [Merck]; MQ water; *loading dye*; RNase [Invitrogen]; bubuk agarosa [Amresco]; etidium bromida (EtBr) [Sigma]; penanda DNA *Ladder* 1 kb *Plus* [DNA Plus

Ladder Invitrogen]; PCR kit [FastStart Roche Diagnostics GmBh]; enzim *Bam*HI, *Sall*, *Hind*III dan *Eco*RI [Roche Diagnostics GmBh]; sorbitol 1 M [Merck]; gliserol 10% [Merck]; antibiotik karbenisilin [Sigma]; kanamisin [Sigma]; rifampisin [Sigma]; higromisin [Sigma]; cefotaxim-vancomisin [Sigma]; tisu [Tessa]; aluminium foil [Reynold Wrap].

3.3 Peralatan

Peralatan yang digunakan selama penelitian adalah pipet mikro 0,2--2 μ l, 2--20 μ l, 20--200 μ l; 100--1000 μ l [Pipetman]; perangkat elektroforesis [Bio-Rad]; perangkat dokumentasi [Bio-Rad (Chemi Doc)]; *laminar airflow*; tabung polipropilene [Axygen]; elektroporator [Bio-Rad MicroPulser]; sentrifugasi [Beckman GS-15 R Centrifuge]; timbangan digital [KERN 770]; *microwave* [Sanyo]; inkubator [EYELA windyoven WFO-450nd]; vorteks; PCR [DNA Engine Tetrad 2]; tabung 17 x 100 mm; spatula; skalpel; sarung tangan karet [Sensi Gloves]; spidol permanen [Faber Castell]; penangas air [Water Bath SWB]; tips [Molecular Bioproducts]; dan peralatan gelas [Duran, Iwaki, dan Pyrex] yang umum digunakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen), Bogor.

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Ligasi Vektor pCAMBIA 1301 dengan Fragmen Gen *Osdep1-Tc*

Gen *Osdep1-Tc* dipotong dari plasmid pGEM-T-*Osdep1-Tc* dengan enzim restriksi *Bam*HI-*Sal*I dan disisipkan ke dalam plasmid pCAMBIA-OsDREB1A yang telah dipotong dengan enzim restriksi *Bam*HI-*Sal*I untuk menghasilkan plasmid biner pCAMBIA-*Osdep1-Tc*. Reaksi ligasi vektor pCAMBIA dengan fragmen gen *Osdep1-Tc* menggunakan 4 µl MQ water, 2 µl 10x *buffer* ligasi, 3 µl fragmen gen pCAMBIA-OsDREB1A, dan 9 µl fragmen gen pGEM-T- *Osdep1-Tc*, dan 2 µl T4 ligase. Total volume reaksi ligasi sebanyak 20 µl. Tabung campuran reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 10 °C selama satu malam.

3.4.2 Transformasi dengan *Heat shock*

Sel kompeten dilakukan menggunakan metode kalsium klorida (CaCl₂) berdasarkan prosedur Sambrook & Russell (2001: 1.116--1.118). Kultur bakteri yang digunakan sebagai sel kompeten adalah *E.coli* DH5α. *E.coli* DH5α sebanyak 3 ml ditumbuhkan ke dalam medium LB cair kemudian diinkubasi selama satu malam pada *shaker incubator* (200 rpm, 37°C). *E.coli* DH5α yang tumbuh kemudian sebanyak 1 ml dilakukan subkultur pada medium LB cair yang baru dan diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 3 jam.

Sebanyak 1 ml subkultur *Escherichia coli* DH5α pada medium LB dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang. Larutan CaCl₂ 0,1 M dingin sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan dan dilarutkan dengan pelet. Tabung diinkubasi selama 15 menit pada suhu 4 °C. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang. Larutan CaCl₂ 0,1 M dingin sebanyak 50 µl kemudian ditambahkan dan dilarutkan dengan pelet. Sebanyak 10 µl hasil ligasi dimasukkan ke dalam tabung berisi sel kompeten. Hasil campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu

ruang. Proses *heat shock* dilakukan pada suhu 42 °C selama 90 detik dan tabung langsung dimasukkan ke dalam es. Sel kemudian ditambahkan 950 µl medium LB cair dan diinkubasi selama 1 jam dalam *shaker incubator* (200 rpm, 37°C). Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 8.000 rpm selama 1 menit. Sebanyak 800 µl campuran dibuang, kemudian sebanyak 100 µl campuran ditumbuhkan di medium LB padat dengan metode sebar. Medium tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu malam.

3.4.3 Seleksi Koloni Bakteri Transforman dengan PCR

Seleksi koloni bakteri transforman yang tumbuh dilakukan menggunakan PCR kit *FastStart* dengan total volume reaksi sebanyak 20 µl. Komposisi reaksi PCR adalah 9,04 µl MQ water, 2 µl 10x PCR *buffer*, 1,2 µl MgCl₂, 0,5 µl dNTPs, 1 µl untuk masing-masing primer S-F dan Tc-R, 0,16 µl *Taq DNA polymerase*, dan 5 µl *template* DNA. Kondisi PCR diprogram, diawali dengan denaturasi pada suhu 94 °C selama 2 menit. Siklus PCR sebanyak 34 siklus dimulai dengan denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 54 °C selama 1 menit, dan polimerisasi awal pada suhu 72 °C selama 1 menit 30 detik. Siklus PCR diakhiri dengan polimerisasi akhir suhu 72 °C selama 5 menit dan penurunan suhu inkubasi menjadi 15 °C.

3.4.4 Pengecekan Hasil Amplifikasi PCR dengan Gel Elektroforesis

Hasil reaksi PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v). Gel agarosa dibuat dengan mencampurkan bubuk agarosa [Amresco] dengan *buffer* TAE 1x dalam labu Erlenmeyer dan dipanaskan menggunakan *microwave*. Larutan kemudian dituang ke dalam cetakan elektroforesis yang telah dipasang sisir gel dan dibiarkan hingga mengeras. Sebanyak 10 µl produk PCR dihomogenkan dengan *loading dye* menggunakan ujung tips pipet mikro, lalu campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa yang telah direndam dengan *buffer* TAE 1x pada tangki elektroforesis.

Tangki elektroforesis kemudian dihubungkan dengan tegangan listrik 80 volt selama 45 menit. Gel agarosa kemudian direndam dalam larutan etidium bromida dengan konsentrasi akhir 10 mg/L selama 5 menit, lalu direndam kembali dalam air selama 5 menit. Hasil elektroforesis berupa pita-pita DNA dapat dilihat dan didokumentasikan dibawah sinar UV menggunakan ChemiDoc Gel System.

3.4.5 Isolasi DNA Plasmid

Isolasi DNA plasmid menggunakan metode minipreparasi lisis alkali berdasarkan Sambrook & Russell (2001: 1.32--1.34). Sebanyak 30 µl hasil transformasi dimasukkan ke dalam 5 ml medium LB cair yang mengandung antibiotik kanamisin (100 µg/ml) sebanyak 5 µl. Kultur bakteri tersebut diinkubasi di *shaker incubator* selama 16 jam pada suhu 37 °C.

Sebanyak 2 ml kultur bakteri hasil inkubasi dimasukkan ke tabung mikrosentrifugasi 2 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4 °C. Supernatan didekantasi, kemudian sebanyak 2 ml kultur bakteri hasil inkubasi dimasukkan kembali ke tabung mikrosentrifugasi 2 ml dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dibuang, kemudian pelet diresuspensi dengan penambahan 100 µl *solution* I dingin. Sebanyak 200 µl *solution* II dingin yang baru dibuat ditambahkan ke dalam campuran, tabung dibolak-balik beberapa kali. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 4 °C selama 5 menit. Sebanyak 150 µl *solution* III dingin ditambahkan ke dalam campuran. Tabung kemudian divorteks selama 10 detik, lalu tabung diinkubasi pada suhu 4 °C selama 5 menit. Selanjutnya tabung disentrifugasi (12.000 rpm, 4 °C, 5 menit). Supernatan kemudian ditempatkan di tabung mikrosentrifugasi baru.

Larutan kloroform (1:1) sebanyak 450 µl ditambahkan ke dalam tabung, kemudian tabung disentrifugasi (12.000 rpm, 21 °C, 15 menit). Supernatan kemudian ditempatkan di tabung mikrosentrifugasi baru. DNA kemudian dipresipitasi dengan menambahkan 700 µl etanol absolut pada suhu ruang. Campuran kemudian divorteks, dan tabung disentrifugasi (12.000 rpm, 21 °C, 15 menit). Supernatan dibuang, kemudian pelet dicuci dengan 200 µl etanol 70%

dan disentrifugasi (12.000 rpm, 4 °C, 5 menit). Supernatan kemudian dibuang, pelet dikeringkan dengan cara diinkubasi pada suhu 60 °C selama 5 menit. Pelet kemudian dilarutkan dengan 100 µl TE yang mengandung RNase (20 µg/ml) dan dihomogenkan. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit.

3.4.6 Verifikasi DNA Plasmid dengan Digesti Menggunakan Enzim Restriksi

Verifikasi DNA plasmid dilakukan dengan proses digesti menggunakan berbagai enzim *Bam*HI dan *Sal*I. Komposisi reaksi digesti dengan adalah 13 µl MQ water, 3 µl DNA plasmid rekombinan, 2 µl *buffer* enzim *Bam*HI, dan 2 µl enzim restriksi *Bam*HI. Total volume reaksi adalah 20 µl. Tabung berisi campuran tersebut diinkubasi selama satu malam pada suhu 37 °C.

Proses inaktivasi enzim dilakukan dengan menginkubasi tabung pada suhu 65 °C selama 10 menit. *Buffer* enzim *Sal*I sebanyak 2 µl dan enzim restriksi *Sal*I sebanyak 2 µl ditambahkan ke dalam tabung tersebut. Tabung kemudian diinkubasi selama satu malam pada suhu 37 °C. Hasil digesti dapat dilihat menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa 1,2% (b/v), 80 V, selama 45 menit.

3.4.7 Persiapan Sel Elektrokompeten

Sebanyak 5 ml kultur sel *A. tumefaciens* disiapkan kemudian dimasukkan ke dalam 3 tabung 1,5 ml masing-masing sebanyak 1 ml. Sel kemudian disentrifugasi (5000 rpm, 4 °C, 10 menit). Supernatan kemudian dibuang, dan tabung ditempatkan di es. Sebanyak 150 µl gliserol 10% steril dingin kemudian ditambahkan, dan sel divorteks. Selanjutnya gliserol 10% steril dingin ditambahkan hingga volume mencapai 1,5 ml dan tabung disentrifugasi (5000 rpm, 4 °C, 10 menit). Supernatan kemudian dibuang kembali, dan tabung ditempatkan di es. Sebanyak 150 µl gliserol 10% steril dingin kemudian ditambahkan, dan sel divorteks. Selanjutnya gliserol 10% steril dingin ditambahkan hingga volume mencapai 1,5 ml dan tabung disentrifugasi (5000 rpm, 4 °C, 10 menit). Pelet yang terbentuk kemudian diresuspensi dengan 500 µl

gliserol 10% steril dingin lalu tabung disentrifugasi (5000 rpm, 4 °C, 5 menit), lalu supernatan dibuang. Pelet sel kemudian diresuspensi dengan 200 µl sorbitol 1 M steril dingin. Sel kemudian disimpan pada suhu -80 °C. Sel tersebut dapat stabil hingga 6 bulan di bawah kondisi di atas.

3.4.8 Elektroporasi

Sampel DNA dipipet (hingga 5 µl) untuk dielektroporasi ke tabung mikrofus. Tabung kemudian ditempatkan di es. Sebanyak 1 ml medium LB cair ditambahkan ke tabung 17 x 100 mm pada suhu ruang, lalu kuvet elektroporasi 0,1 cm ditempatkan di es. Sel elektrokompoten *A. tumefaciens* yang berada di es dicairkan, dan 20 µl sel elektrokompoten ditambahkan ke tiap sampel DNA lalu diketuk secara perlahan agar tercampur. Campuran tersebut ditransfer ke kuvet elektroporasi, lalu suspensi diketuk agar berada di bagian bawah kuvet. Kuvet kemudian ditempatkan pada *chamber slide*. Alat MicroPulser kemudian diset, dan proses elektroporasi dilakukan. Kuvet kemudian dikeluarkan dari *chamber*, medium LB cair langsung digunakan untuk mentransfer sel dari kuvet ke tabung. Sel kemudian diinkubasi di *shaker incubator* (250 rpm, 30 °C, 3 jam). Aliquot sel yang dielektroporasi lalu digores pada medium LB padat yang mengandung antibiotik kanamisin. Cawan petri kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C.

3.4.9 Persiapan Bakteri *A. tumefaciens* dan Ko-kultivasi

Koloni *A. tumefaciens* yang mengandung faktor penanda aktivasi ditumbuhkan pada medium LB cair yang mengandung antibiotik 75 µg/ml karbenisilin dan 100 µg/ml kanamisin selama satu malam pada *shaker incubator* dengan suhu 28 °C. Selanjutnya 500 µl dari kultur tersebut ditumbuhkan pada media AB padat yang mengandung antibiotik karbenisilin 75 µg/ml dan kanamisin 100 µg/ml, selama 3 hari pada suhu 28° C. Kultur *A. tumefaciens* kemudian dilarutkan pada media ko-kultivasi cair, yaitu media dasar R2 dengan

penambahan 2,5 mg/L 2,4-D, dan 100 μ M asetosiringon, dengan pH akhir 5,2. Kalus embriogenik yang berada di cawan petri kemudian direndam dengan 25 ml suspensi *A. tumefaciens* tersebut. Perendaman dilakukan selama 15 menit. Suspensi *A. tumefaciens* kemudian dibuang menggunakan pipet mikro, dan kalus ditiriskan dan dikeringkan di kertas saring hingga benar-benar kering. Kalus yang telah kering kemudian ditumbuhkan di media R2 padat. Kalus embriogenik yang diinfeksi diinkubasi selama 3 hari pada suhu 25 °C dalam kondisi gelap. Setelah ko-kultivasi, kalus embriogenik kemudian dipindahkan ke media seleksi R2 padat yang mengandung higromisin dan diinkubasi selama 2 minggu.

3.4.10 Uji Histokimia GUS (*histochemical GUS assay*)

Uji histokimia GUS dilakukan berdasarkan metode Jefferson *et. al.* (1987). Sebagian kecil kalus hasil transformasi direndam dalam 150 μ l larutan *X-gluc* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucoronide) selama satu malam pada suhu 37 °C. Kalus padi kemudian dipindahkan ke cawan petri dan diamati di bawah mikroskop binokuler. Uji histokimia GUS positif ditunjukkan dengan adanya bercak (*spot*) berwarna biru.

3.4.11 Isolasi DNA Transforman

Isolasi DNA transforman dilakukan menggunakan metode Doyle & Doyle (1990) yang telah dioptimasi oleh para peneliti Laboratorium Biologi Molekuler, BB-Biogen. Kalus embriogenik diambil, kemudian diletakkan dalam tabung 1,5 ml dan ditambahkan *buffer cetyltrimethylammoniumbromide* (CTAB)-*mercaptoetanol* sebanyak 1 ml dan digerus hingga halus. Setelah itu, tabung disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5--10 menit pada suhu ruang. Supernatan sebanyak 450 μ l dipindahkan ke tabung 1,5 ml steril, lalu ditambahkan kloroform (1:1) sebanyak 1 kali volume untuk pemurnian DNA hasil ekstraksi. Tabung tersebut disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5--10 menit. Sentrifugasi menghasilkan tiga lapisan, yaitu lapisan atas adalah DNA plasmid, lapisan tengah adalah protein terdenaturasi, dan lapisan bawah adalah

Universitas Indonesia

lapisan kloroform. Lapisan atas diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml steril. Presipitasi DNA dilakukan dengan menambahkan isopropanol dingin sebanyak 700 μ l ke dalam 350 μ l larutan DNA kemudian digoyang secara perlahan, dan diinkubasi selama 15--30 menit pada suhu ruang. Tabung kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5--10 menit. Pelet yang terbentuk kemudian dicuci dengan etanol 70% dan dikeringkan dalam oven selama 5 menit. DNA kemudian dilarutkan dalam 100 μ l TE yang mengandung RNase (20 μ g/ml) dan dihomogenkan. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit, dan disimpan dalam *freezer* suhu -20 °C.

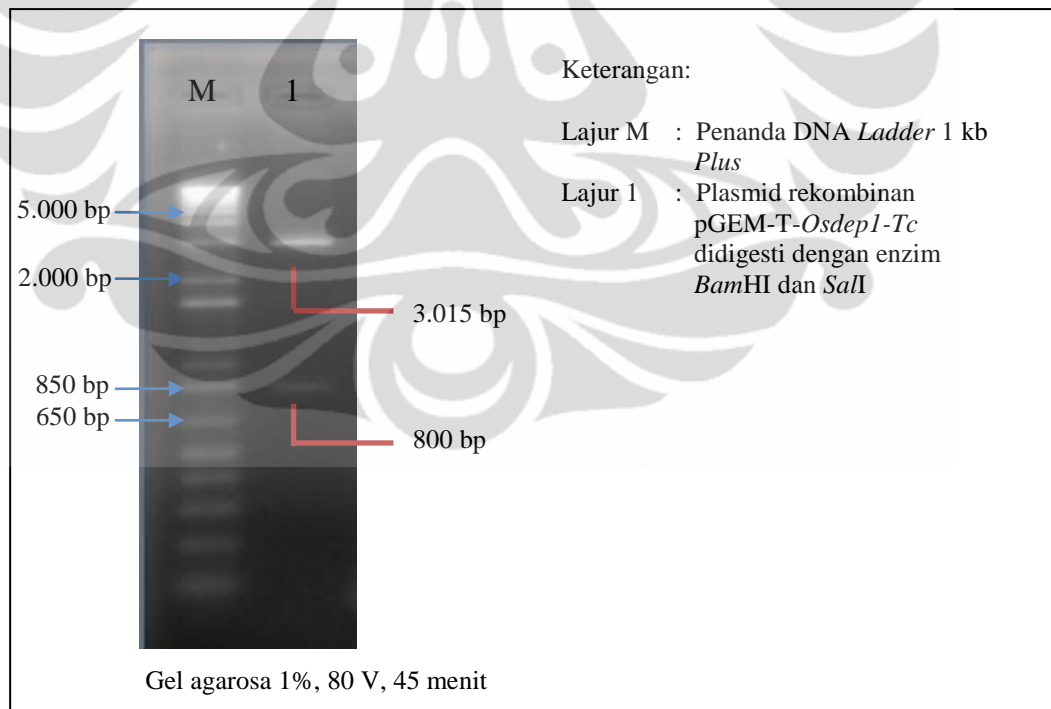
3.4.12 Verifikasi Hasil Isolasi DNA Transforman dengan PCR

Verifikasi hasil isolasi DNA transforman dilakukan menggunakan PCR *kit FastStart* dengan total volume reaksi sebanyak 20 μ l. Komposisi reaksi amplifikasi PCR adalah 12,04 μ l MQ water, 2 μ l 10x PCR *buffer*, 1,2 μ l MgCl₂, 0,5 μ l dNTPs, 1 μ l untuk masing-masing primer *forward* hpt dan *reverse* hpt, 0,16 μ l *Taq DNA polymerase*, dan 2 μ l *template* DNA (50 ng/ μ l). Kondisi PCR diprogram, diawali dengan denaturasi pada suhu 94 °C selama 2 menit. Siklus PCR sebanyak 34 siklus dimulai dengan denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55 °C selama 1 menit, dan polimerisasi awal pada suhu 72 °C selama 1 menit 30 detik. Siklus PCR diakhiri dengan polimerisasi akhir suhu 72 °C selama 5 menit dan penurunan suhu inkubasi menjadi 15 °C. Hasil reaksi PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,2% (80V, 45 menit).

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Digesti Klona pGEM-T-*Osdep1-Tc* dengan Enzim Restriksi

Gen *Osdep1-Tc* yang digunakan dalam penelitian berasal dari klona pGEM-T-*Osdep1-Tc*. Gen *Osdep1-Tc* dipotong dari vektor pengklonaan pGEM-T *Easy* dengan menggunakan enzim restriksi *Bam*HI-*Sal*I. Hasil digesti kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Menurut Sambrook & Russell (2001: 5.6), gel agarosa 1% dapat digunakan untuk menganalisis fragmen DNA berukuran 250 bp--15.000 bp. Hasil visualisasi gel agarosa 1% menunjukkan terbentuknya 2 pita pada gel agarosa, yaitu pita berukuran 800 bp yang merupakan fragmen gen *Osdep1-Tc* dan pita berukuran 3.015 bp yang merupakan vektor pengklonaan pGEM-T *Easy* (Gambar 4.1 lajur 1).



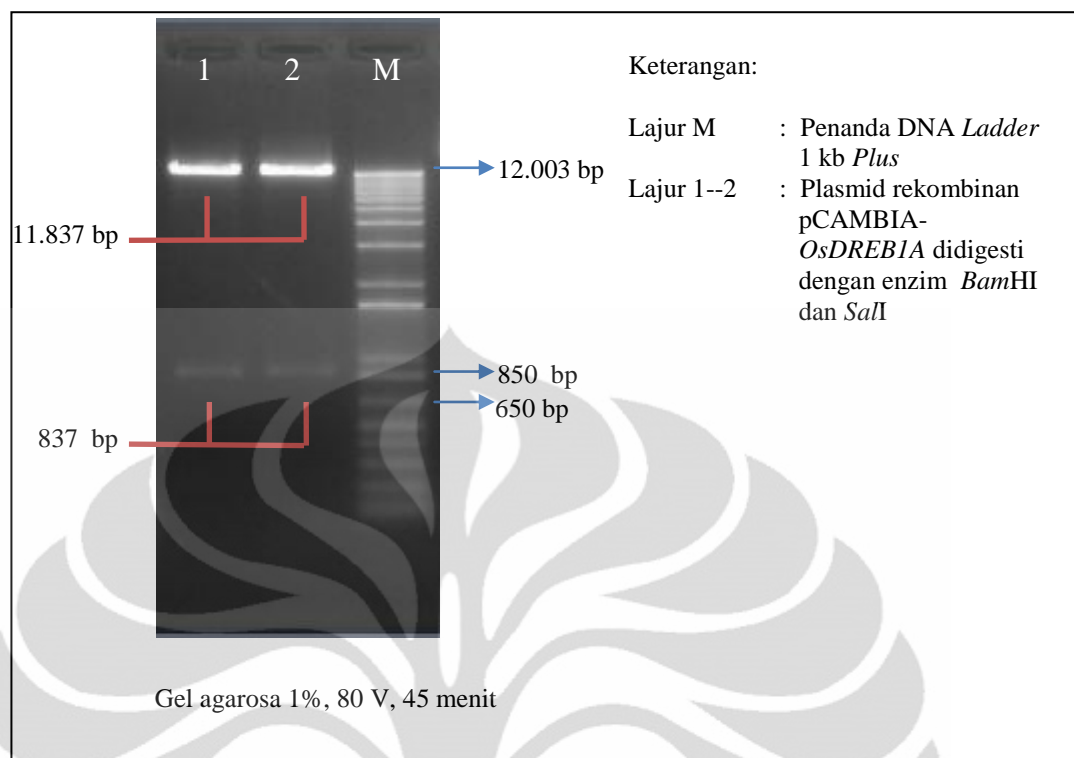
Gambar 4.1 Hasil elektroforesis gel agarosa hasil digesti plasmid rekombinan pGEM-T-*Osdep1-Tc*
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

Vektor kloning pGEM-T *Easy* menjadi linier setelah didigesti dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Sal*I. Enzim restriksi *Bam*HI memiliki situs pengenalan 5'-G↓GATCC-3', sedangkan enzim restriksi *Sal*I memiliki situs pengenalan 5'-G↓TCGAC-3'. Kedua enzim restriksi tersebut menghasilkan ujung potongan fragmen yang kohesif (*sticky end*). Menurut Singh (2009: 17), enzim restriksi memiliki sifat yang spesifik, yaitu dapat mengenali sekuen nukleotida pendek dalam molekul DNA dan memotong pada titik tertentu di dalam sekuen nukleotida tersebut. Fragmen DNA yang berukuran 800 bp pada Gambar 4.1 merupakan fragmen yang menggambarkan ukuran DNA sisipan, yang selanjutnya akan diligasi dengan vektor ekspresi pCAMBIA 1301.

4.2 Digesti Klon pCAMBIA-*OsDREB1A* dengan Enzim Restriksi

Vektor ekspresi yang digunakan dalam penelitian adalah pCAMBIA 1301 [Cambia]. Vektor ekspresi tersebut diperoleh dari digesti klon pCAMBIA-*OsDREB1A* menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Sal*I. Klon plasmid rekombinan tersebut telah berhasil dikonstruksi oleh Tim Peneliti Laboratorium Biologi Molekuler, BB-Biogen. Vektor ekspresi pCAMBIA 1301 memiliki situs pemotongan *Bam*HI dan *Sal*I pada *multiple cloning site*, sehingga ligasi antara vektor ekspresi tersebut dengan DNA sisipan yang berasal dari gen *Osdep1-Tc* dapat dilakukan.

Hasil digesti kemudian divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1% (Gambar 4.2 lajur 1 dan 2). Hasil visualisasi gel agarosa 1% menunjukkan terbentuk 2 pita pada gel agarosa, yaitu pita berukuran 837 bp yang merupakan fragmen gen *OsDREB1A* dan pita berukuran 11.837 bp yang merupakan vektor ekspresi pCAMBIA 1301 yang selanjutnya akan digunakan sebagai vektor bagi DNA sisipan.



Gambar 4.2 Hasil elektroforesis gel agarosa hasil digesti plasmid rekombinan pCAMBIA-*OsDREB1A*
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

4.3 Ligasi Vektor pCAMBIA dengan Fragmen Gen *Osdep1-Tc*

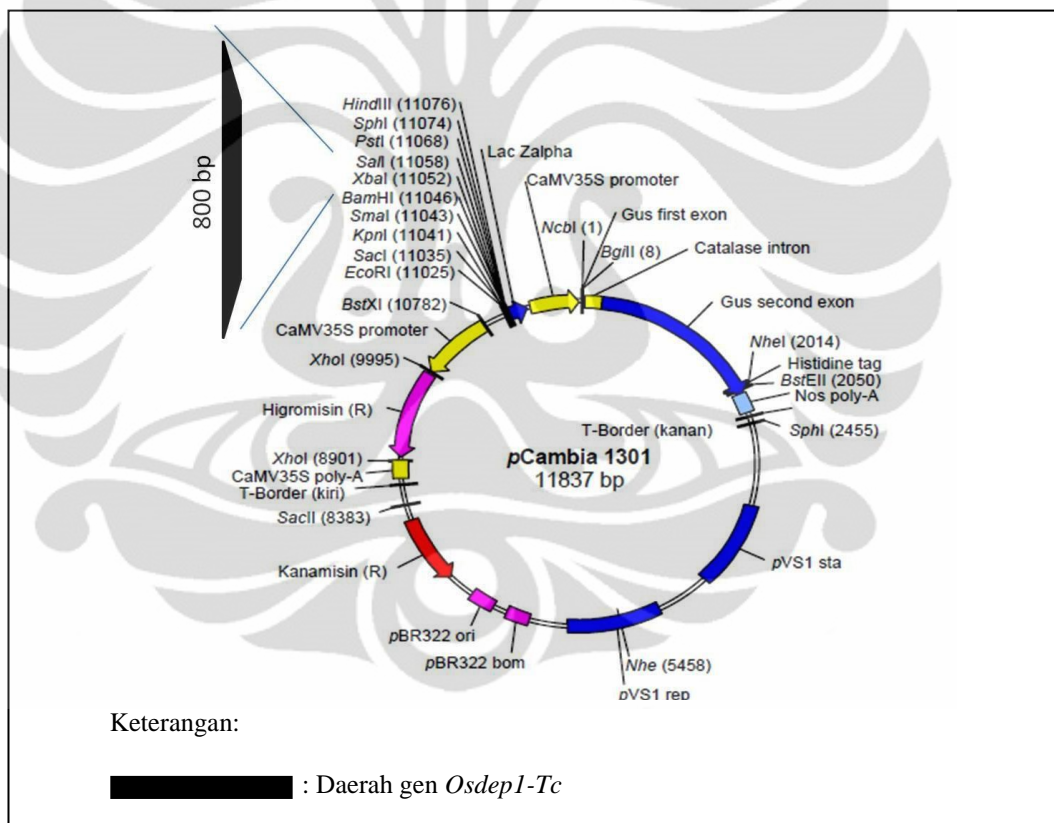
Vektor yang digunakan dalam proses ligasi adalah pCAMBIA 1301 [Cambia]. Fragmen gen *Osdep1-Tc* berlekatan dengan ujung-ujung vektor pCAMBIA yang berkomplemen. Gen *Osdep1-Tc* sebagai DNA sisipan berukuran 800 bp disisipkan pada vektor ekspresi pCAMBIA 1301 berukuran 11.837 bp, sehingga menghasilkan plasmid rekombinan berukuran sekitar 12.637 bp. Posisi daerah gen *Osdep1-Tc* hasil ligasi dengan T4 DNA ligase di dalam vektor ekspresi pCAMBIA 1301 dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Reaksi ligasi yang dilakukan menggunakan rasio molar vektor dan fragmen 1:3. Rasio molar vektor dan fragmen merupakan faktor penting dalam reaksi ligasi untuk mengoptimalkan pembentukan plasmid rekombinan. Menurut Knoche & Kephart (1993) (*lihat* Prayuni 2008: 46), jumlah molekul DNA sisipan

yang lebih banyak dibandingkan vektor dalam proses ligasi akan meningkatkan frekuensi terbentuknya vektor rekombinan hingga 95%. Reaksi ligasi kemudian diinkubasi pada suhu 10 °C selama satu malam. Hasil ligasi tidak dianalisis menggunakan teknik elektroforesis gel, tetapi langsung ditransformasi.

Pembentukan ikatan fosfodiester dikatalisis pada proses ligasi.

Pembentukan ikatan fosfodiester tersebut terjadi antara ujung 3' -OH dan ujung 5' -P pada DNA untai ganda (Agrawal 2008: 274). Pembentukan ikatan fosfodiester tersebut dapat dikatalisis secara *in vitro* menggunakan dua DNA ligase yang berbeda, yaitu DNA ligase *E. coli* dan DNA ligase bakteriofaga T4 (Sambrook & Russell 2001: 1.63).



Gambar 4.3 Posisi daerah gen *Osdepl1-Tc* dalam vektor ekspresi pCAMBIA 1301

4.4 Transformasi Hasil Ligasi

Plasmid rekombinan yang terbentuk dari hasil ligasi antara pCAMBIA 1301 dengan fragmen gen *Osdep1-Tc* ditransformasi ke dalam sel inang. Sel inang yang digunakan dalam penelitian adalah *E. coli* DH5 α . *E. coli* merupakan bakteri yang tidak dilengkapi dengan protein-protein permukaan pada lapisan luar sel yang berfungsi mengikat molekul DNA asing dari lingkungan sekitar untuk diintroduksi ke dalam sel, sehingga bakteri tersebut harus dibuat kompeten terlebih dahulu agar dapat digunakan untuk proses transformasi dengan cara mensuspensikan bakteri tersebut ke dalam larutan kalsium klorida (CaCl₂) dingin (Sarkar *dkk.* 2002: 1376). Bakteri *E. coli* DH5 α yang telah dibuat kompeten kemudian digunakan untuk transformasi plasmid rekombinan dengan metode kejutan panas (*heat shock*) pada suhu 42 °C selama 90 detik. Kejutan panas tersebut memungkinkan molekul DNA asing yang menempel pada dinding sel kompeten terintroduksi ke dalam sitoplasma (Brown 2006: 90--91).

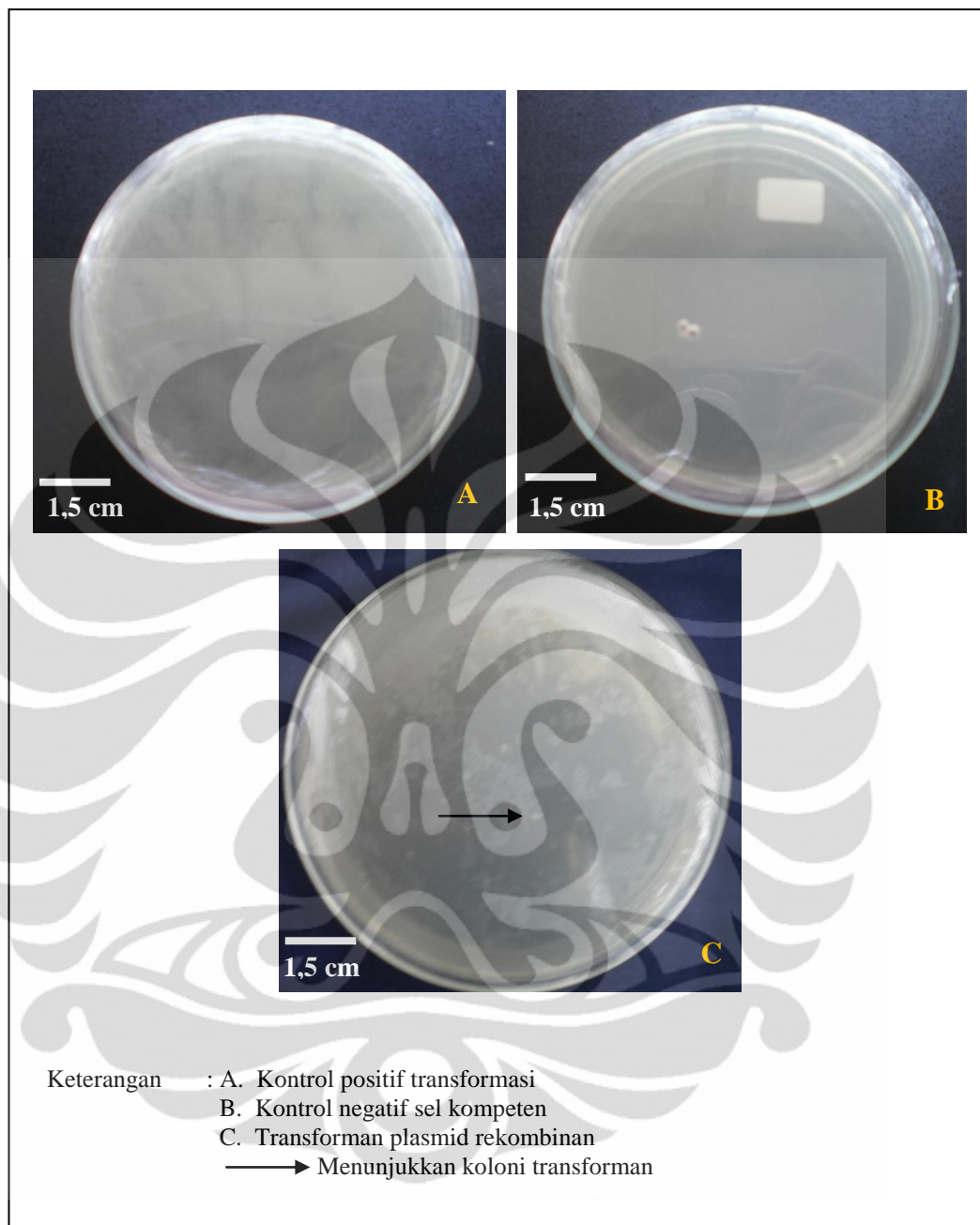
E. coli DH5 α termasuk jenis *strain* yang sering digunakan dalam proses pengklonaan. Hal tersebut terkait dengan mutasi *endA1* pada *strain* tersebut, yang menyebabkan aktivitas endonuklease tipe I yang non-spesifik ditiadakan, sehingga dapat meningkatkan hasil dan kualitas plasmid yang diisolasi. Selain itu, mutasi *recA* pada *strain* tersebut meningkatkan stabilitas DNA asing yang diinsersikan (Casali & Preston 2008: 33).

Sebanyak 100 μ l kultur hasil ligasi kemudian ditumbuhkan dengan metode *spread* pada medium Luria Bertani (LB) padat yang mengandung antibiotik kanamisin, dan diinkubasi selama satu malam pada suhu 37 °C. Medium LB padat yang mengandung antibiotik kanamisin berperan sebagai medium seleksi. Menurut Brown (2006: 93), penggunaan medium seleksi disesuaikan berdasarkan aktivitas penanda genetik yang dimiliki oleh plasmid rekombinan. Plasmid rekombinan pCAMBIA-*Osdep1-Tc* menggunakan penanda seleksi antibiotik kanamisin sebagai penanda seleksi antibiotik bakteri, sehingga hanya sel *E. coli* yang mengandung vektor pCAMBIA 1301 baik ada maupun tanpa adanya DNA sisipan yang dapat tumbuh pada medium seleksi (CambiaLabs 2006: 1). Konstruksi pCAMBIA 1301 mengandung gen *neomycin phosphotransferase*

(*nptII*) yang memberi resistensi terhadap antibiotik kanamisin sebagai penanda seleksi bakteri di bawah kontrol promotor CaMV35S dan terminator *nopaline synthase* (NOS) (Paramesh *et. al.* 2010: 87). Hal tersebut memberi kemudahan pada proses seleksi subklona yang positif membawa plasmid rekombinan.

Hasil transformasi sel *E. coli* dengan plasmid rekombinan pCAMBIA-*Osdep1-Tc* menunjukkan terdapat 9 koloni tunggal yang tumbuh pada medium seleksi (Gambar 4.4 C). Masing-masing koloni tunggal tersebut kemudian dilarutkan ke dalam 50 µl akuades steril. Campuran tersebut digunakan sebagai cetakan DNA dalam proses verifikasi dengan teknik PCR. Menurut Sambrook & Russell (2001: 8.18), cetakan DNA yang digunakan dalam proses PCR dapat berupa fragmen DNA, bagian dari DNA genomik, plasmid rekombinan, atau sampel lain yang mengandung DNA.

Kontrol positif transformasi dan kontrol negatif sel kompeten juga disertakan (Gambar 4.4 A dan B). Kontrol positif transformasi menunjukkan bahwa sel kompeten *E. coli* dapat ditransformasi dengan baik menggunakan vektor pCAMBIA 1301 tanpa DNA sisipan (Gambar 4.4 A). Kontrol negatif sel kompeten menunjukkan bahwa sel kompeten tidak tumbuh pada medium dengan antibiotik (Gambar 4.4 B). Hal tersebut menunjukkan bahwa sel kompeten yang digunakan berkualitas baik.



Gambar 4.4 Transformasi plasmid rekombinan pCAMBIA-*Osdep1-Tc* pada sel kompeten *E. coli* DH5 α
 [Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

4.5 Verifikasi Hasil Transformasi Menggunakan Metode PCR

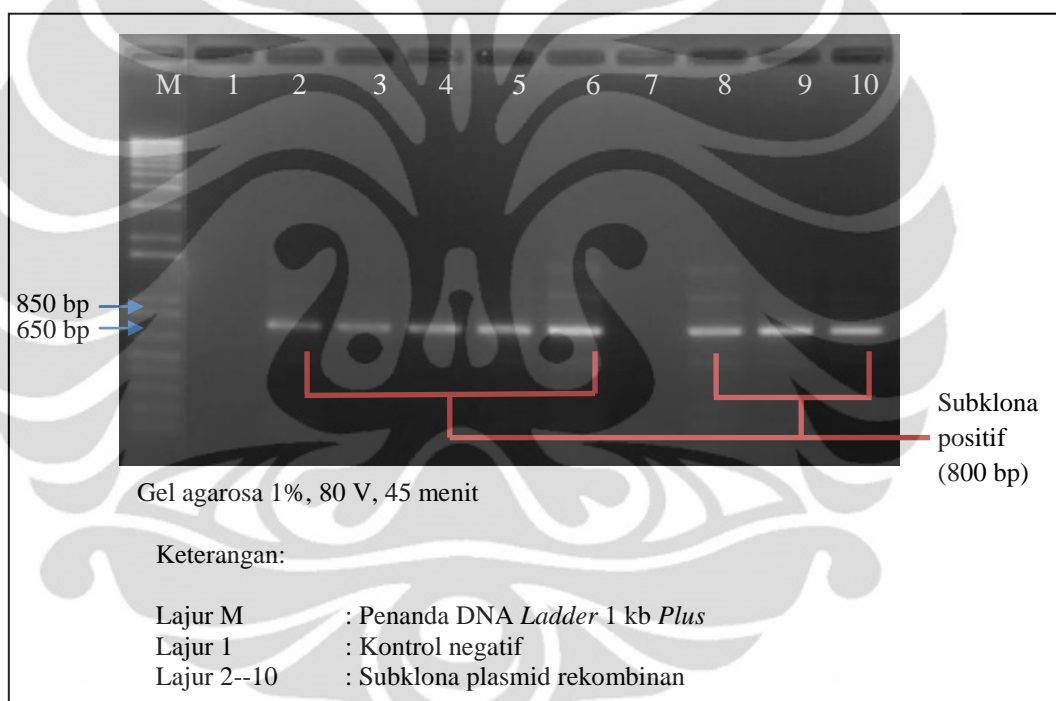
Verifikasi hasil transformasi dilakukan menggunakan metode PCR untuk menentukan adanya DNA sisipan dalam plasmid rekombinan. Proses PCR dilakukan terhadap 9 subklona *E. coli* hasil transformasi. Keberadaan DNA sisipan di dalam vektor dapat diketahui menggunakan primer OsDep-S-F dan OsDep-Tc-R. Primer tersebut telah didesain oleh Tim Peneliti Laboratorium Biologi Molekuler, BB-Biogen. Primer OsDep-S-F dan OsDep-Tc-R merupakan primer spesifik gen *Osdep1-Tc*, sehingga hanya plasmid rekombinan yang mengandung gen *Osdep1-Tc* yang akan mengalami amplifikasi. Hasil verifikasi positif ditunjukkan dengan adanya pita berukuran 800 bp yang menggambarkan ukuran fragmen gen *Osdep1-Tc*. Vektor pCAMBIA 1301 yang tidak mengandung gen *Osdep1-Tc* tidak akan teramplifikasi, sehingga tidak menunjukkan adanya pita DNA. Hal tersebut disebabkan oleh tidak adanya sekuen yang spesifik dengan primer yang digunakan. Posisi penempelan primer OsDep-S-F dan OsDep-Tc-R pada gen *Osdep1-Tc* dapat dilihat pada Gambar 4.5.1.



Gambar 4.5.1 Posisi penempelan primer OsDep-S-F dan OsDep-Tc-R pada gen *Osdep1-Tc*

Produk PCR divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v). Hasil visualisasi elektroforesis menunjukkan adanya pita DNA yang terbentuk berukuran 800 bp pada penanda DNA *Ladder 1 kb Plus* (Gambar 4.5.2 lajur 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat 8

subklona plasmid rekombinan yang telah tersisipi oleh gen *Osdep1-Tc*. Kontrol negatif PCR (Gambar 4.5.2 lajur 1) disertakan, yaitu reaksi PCR tanpa DNA cetakan, hanya MQ water. Kontrol negatif tersebut menunjukkan tidak terbentuknya pita DNA sehingga dapat disimpulkan bahwa pita DNA berukuran 800 bp berasal dari DNA cetakan (bukan kontaminan). Hasil verifikasi negatif dapat dilihat pada sampel no. 6 (Gambar 4.5.2 lajur 7). Lajur 7 (Gambar 4.5.2), tidak menunjukkan adanya pita DNA yang terbentuk. Sampel tersebut diduga merupakan vektor pCAMBIA 1301 yang tidak mengandung gen *Osdep1-Tc*, karena tidak terdapat sekuen yang spesifik dengan primer yang digunakan.



Gambar 4.5.2 Hasil elektroforesis gel agarosa produk PCR menggunakan pasangan primer *OsDep-S-F* dan *OsDep-Tc-R* terhadap hasil transformasi plasmid rekombinan
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

Perhitungan persentase keberhasilan ligasi dilakukan berdasarkan hasil produk PCR tersebut. Hasil perhitungan menunjukkan bahwa persentase keberhasilan ligasi tinggi, yaitu 88,9% (Lampiran 5). Perbandingan persentase keberhasilan ligasi tersebut kemudian dibandingkan dengan persentase

keberhasilan ligasi penelitian yang dilakukan Wideani (2011), yang menunjukkan persentase sebesar 25% (Data belum dipublikasi). Persentase keberhasilan ligasi yang tinggi tersebut disebabkan oleh ukuran fragmen gen *Osdep1-Tc* (800 bp) yang digunakan pada penelitian lebih pendek dibandingkan fragmen gen *OsERA1* (1.400 bp) yang digunakan pada penelitian yang dilakukan Wideani (2011), sehingga kemungkinan terjadinya ligasi antara fragmen *Osdep1-Tc* dengan vektor pCAMBIA 1301 cukup besar (Data belum dipublikasi).

Salah satu faktor keberhasilan dalam proses PCR adalah primer *forward* dan *reverse* yang digunakan dalam reaksi PCR. Menurut Sambrook & Russell (2001: 8.81), primer yang baik memiliki panjang 20--30 basa, dan memiliki kandungan basa GC sebesar 45--55%. Kedua primer yang digunakan masing-masing memiliki panjang 24 dan 33 basa, hal tersebut disebabkan primer dirancang untuk membawa sekuen pengenalan enzim restriksi. Primer OsDep-S-F mengandung 6 basa pengenalan enzim restriksi *Bam*HI pada ujung 5', sedangkan primer OsDep-Tc-R mengandung 6 basa pengenalan enzim restriksi *Sal*I pada ujung 5'. Menurut van Pelt-Verkuil *et.al.* (2008: 68), situs restriksi dapat ditambahkan pada ujung 5' primer yang digunakan dalam proses PCR. Hal tersebut bertujuan untuk memudahkan pengenalan situs restriksi pada proses digesti DNA hasil amplifikasi dan menghasilkan potongan yang sesuai dengan vektor.

Konsentrasi primer juga mempengaruhi hasil amplifikasi. Konsentrasi primer yang digunakan pada penelitian adalah 0,01 mM. Konsentrasi primer dalam proses PCR umumnya berkisar antara 0,01--0,5 mM. Konsentrasi primer yang terlalu rendah akan menyebabkan reaksi amplifikasi berjalan kurang spesifik (Agrawal 2008: 68). Selain itu, faktor lain yang mempengaruhi keberhasilan PCR adalah konsentrasi dNTPs. Konsentrasi dNTPs yang digunakan dalam penelitian adalah 0,2 mM. Hal tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa konsentrasi dNTPs yang optimal berkisar antara 0,1--0,5 mM (Roche 2008: 5). Menurut Agrawal (2008: 68), konsentrasi dNTPs yang optimal dapat meminimalisasi kesalahan penempelan primer pada situs non-target, sehingga akan didapatkan hasil PCR yang spesifik.

Faktor lainnya adalah konsentrasi $MgCl_2$ pada reaksi PCR. Konsentrasi $MgCl_2$ yang digunakan dalam penelitian adalah 1,5 mM. Hal tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa konsentrasi $MgCl_2$ yang optimal berkisar antara 1,5--4 mM (Roche 2008: 5). Menurut Agrawal (2008: 68), konsentrasi $MgCl_2$ yang terlalu rendah dapat menyebabkan tidak terdapat produk PCR yang dihasilkan, sedangkan konsentrasi $MgCl_2$ yang terlalu tinggi dapat menyebabkan munculnya berbagai produk PCR yang tidak diinginkan.

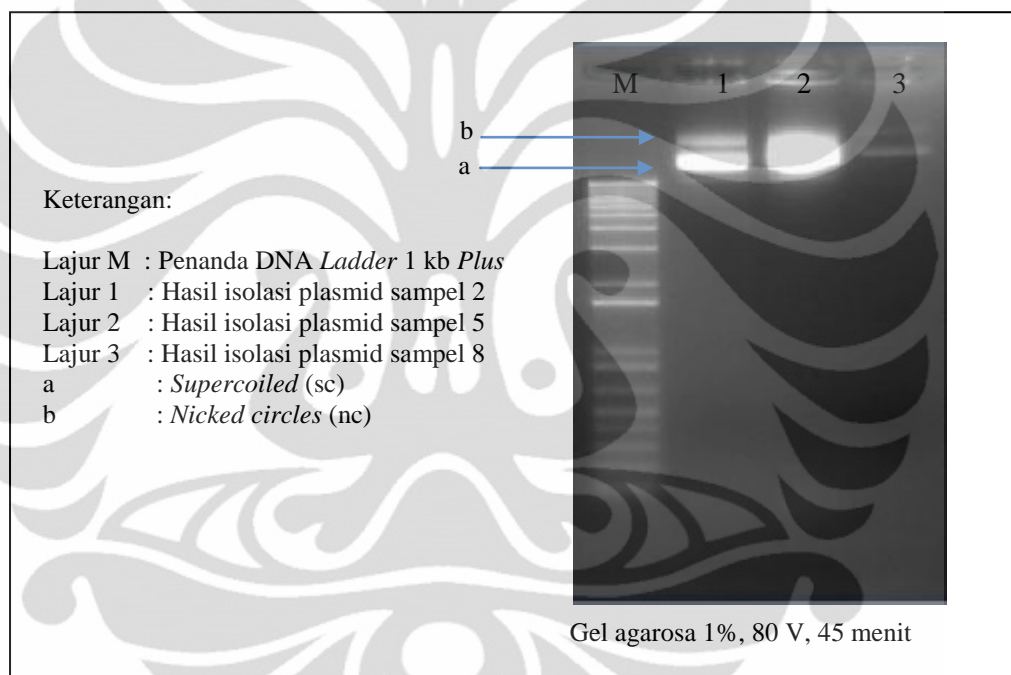
4.6 Isolasi DNA Plasmid

Proses isolasi plasmid dilakukan terhadap 3 transforman positif verifikasi, yaitu sampel no. 2, 5, dan 8. Hasil transformasi sebanyak 30 μ l ditumbuhkan ke dalam 5 ml medium Luria Bertani (LB) cair yang mengandung 5 μ l antibiotik kanamisin. Kultur tersebut akan menyebabkan koloni hasil transformasi dapat tumbuh hingga fase log akhir, sehingga *aliquot* dari kultur tersebut dapat digunakan untuk isolasi DNA plasmid (Sambrook & Russell 2001: 1.16). Koloni yang berhasil tumbuh pada medium tersebut hanya sel bakteri yang berhasil mentransformasi plasmid pCAMBIA 1301, karena plasmid tersebut membawa sifat resistensi kanamisin bagi sel. Kultur kemudian diinkubasi di *shaker incubator* selama 16 jam pada suhu 37 °C.

Plasmid kemudian diisolasi dari kultur bakteri menggunakan metode minipreparasi lisis alkali berdasarkan Sambrook & Russell (2001: 1.32--1.34). Hasil isolasi plasmid pada Gambar 4.6 (lajur 1) memperlihatkan hasil visualisasi dengan dua konformasi plasmid, yaitu *supercoiled* (sc) dan *nicked circles* (nc). DNA sc memiliki laju migrasi yang paling cepat dibanding konformasi DNA plasmid lainnya. Hal tersebut ditunjukkan dengan pita plasmid sc (Gambar 4.6 lajur 1) berada paling bawah. Selain itu, pita tersebut terlihat lebih tebal dibandingkan yang lain. Hal tersebut sesuai dengan EDVOTEK (2001: 6) yang menyatakan bahwa DNA bentuk sc bermigrasi lebih cepat dibandingkan bentuk lainnya dan jumlahnya lebih banyak pada plasmid yang dipurifikasi. Konformasi yang kedua adalah nc, ditunjukkan pada Gambar 4.6.1 (lajur 1). Pita konformasi

nc berada paling atas, hal tersebut sesuai dengan EDVOTEK (2001: 6) yang menyatakan bahwa konformasi nc bermigrasi paling lambat.

Visualisasi elektroforesis DNA plasmid pada gel agarosa 1% menunjukkan bahwa plasmid rekombinan pada ketiga sampel berhasil diisolasi (Gambar 4.6 lajur 1, 2, 3). Namun, hanya plasmid rekombinan sampel no. 2 (Gambar 4.6 lajur 1) yang memperlihatkan pola konformasi plasmid yang jelas. Hasil isolasi plasmid ketiga sampel tersebut selanjutnya diverifikasi menggunakan teknik PCR dan digesti menggunakan enzim restriksi.



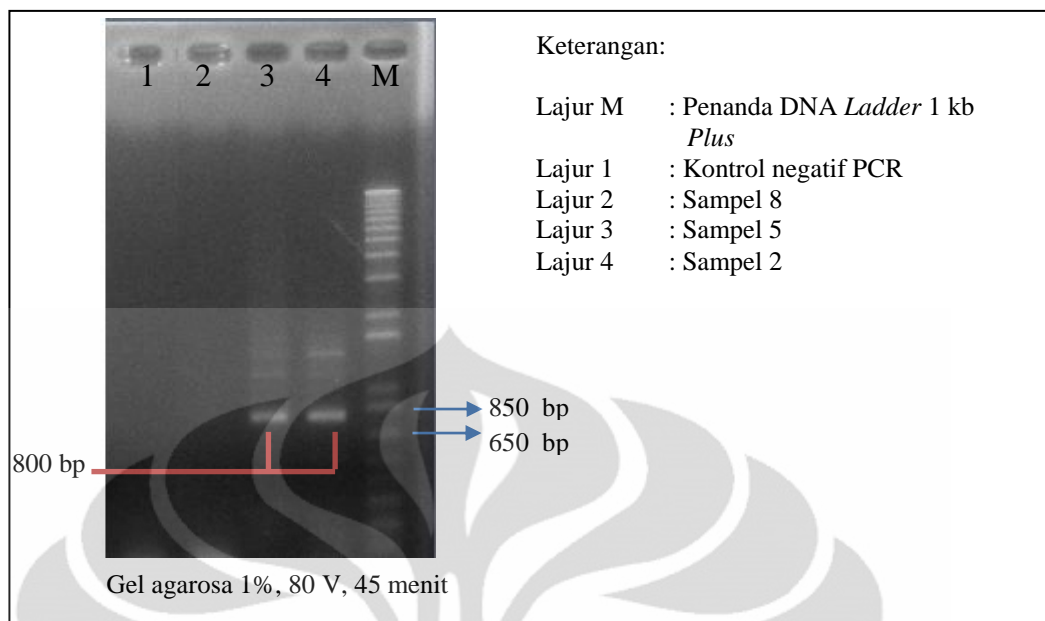
Gambar 4.6 Hasil elektroforesis gel plasmid rekombinan pCAMBIA-*Osdep1-Tc* hasil isolasi
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

4.7 Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan PCR dan Proses Digesti Menggunakan Enzim Restriksi

4.7.1 Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan PCR

Verifikasi plasmid rekombinan dilakukan menggunakan teknik PCR. Hal tersebut dilakukan untuk memastikan adanya DNA sisipan di dalam plasmid hasil isolasi. Metode, primer, dan siklus reaksi yang digunakan sama dengan ketika verifikasi subklona hasil transformasi plasmid rekombinan. Hasil visualisasi produk PCR menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% memperlihatkan adanya fragmen DNA berukuran 800 bp pada dua plasmid rekombinan hasil isolasi (Gambar 4.7.1 lajur 3 dan 4). Berdasarkan hasil tersebut hampir dapat dipastikan bahwa plasmid rekombinan mengandung gen *Osdep1-Tc*. Namun pada plasmid hasil isolasi sampel no. 8, tidak terlihat adanya fragmen gen seperti yang diharapkan (Gambar 4.7.1 lajur 2). Hal tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor, seperti konsentrasi plasmid yang terlalu rendah sehingga tidak dapat digunakan sebagai cetakan DNA pada proses PCR. Konsentrasi DNA plasmid yang rendah dapat disebabkan karena proses isolasi plasmid kurang baik sehingga masih terdapat pengotor seperti protein dan sisa fenol pada DNA plasmid (Sambrook & Russell 2001: A8.20). Kontrol negatif PCR (Gambar 4.7.1 lajur 1) memperlihatkan tidak adanya pita DNA sehingga dapat disimpulkan bahwa pita DNA berukuran 800 bp tersebut berasal dari cetakan DNA (bukan kontaminan).

Melalui verifikasi dengan teknik PCR, dapat disimpulkan bahwa terdapat 2 sampel yang memiliki daerah gen *Osdep1-Tc* pada plasmid rekombinan, yaitu sampel no. 2 dan no. 5. Namun, perlu dilakukan verifikasi dengan digesti menggunakan enzim restriksi untuk lebih memastikan bahwa pada sampel tersebut terdapat daerah gen *Osdep1-Tc* yang telah tersisip di dalam vektor ekspresi pCAMBIA 1301.

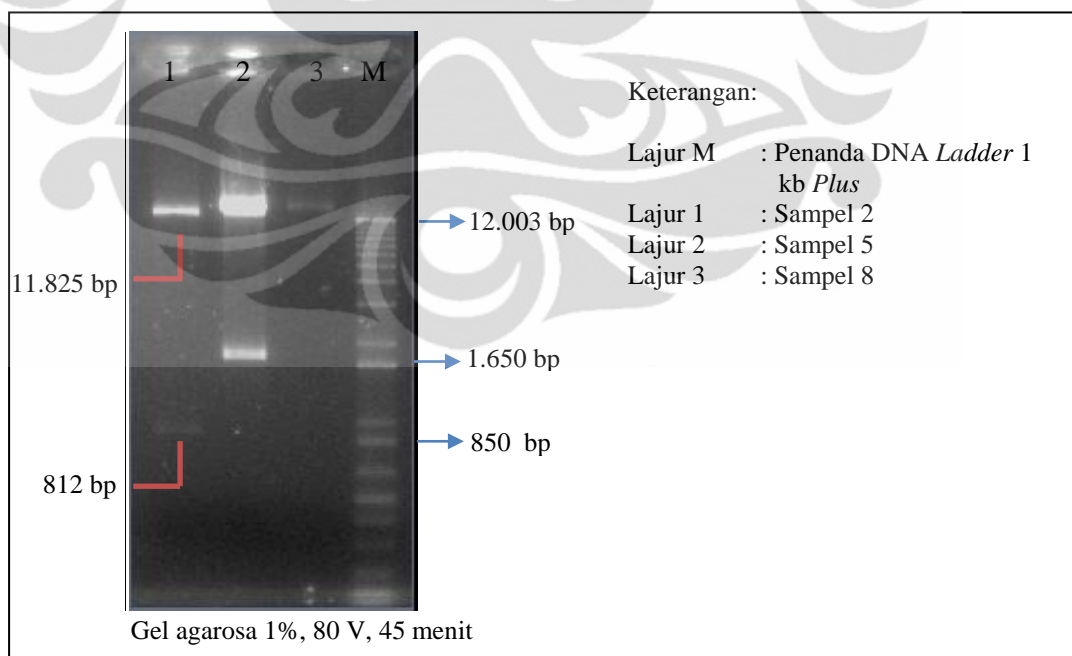


Gambar 4.7.1 Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan PCR
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

4.7.2 Verifikasi Plasmid Rekombinan dengan Digesti Menggunakan Enzim Restriksi

Verifikasi plasmid rekombinan kemudian dilakukan dengan proses digesti menggunakan enzim *Bam*HI dan *Sal*I. Enzim restriksi *Bam*HI memotong vektor ekspresi pCAMBIA 1301 pada basa ke 11.046 dan enzim restriksi *Sal*I memotong pada basa ke 11.058. Digesti plasmid rekombinan dengan kedua enzim restriksi tersebut menghasilkan pita DNA sebesar 812 bp dan 11.825 bp. Hasil elektroforesis gel agarosa 1% (b/v) memperlihatkan adanya satu sampel yang memiliki dua pita fragmen potongan berukuran 11.825 bp dan 812 bp. Pita potongan berukuran 812 bp merupakan pita fragmen gen *Osdep1-Tc* berukuran 800 bp ditambah dengan 12 bp DNA vektor ekspresi pCAMBIA 1301, sedangkan pita potongan berukuran 11.825 bp merupakan pita fragmen pCAMBIA 1301. Berdasarkan hasil elektroforesis, dapat diketahui bahwa hanya satu sampel yang berhasil terdigesti dengan baik, yaitu sampel no. 2 (Gambar 4.7.2 lajur 1). Sampel tersebut untuk selanjutnya akan digunakan sebagai sampel plasmid rekombinan yang dielektroporasi ke bakteri *A. tumefaciens*.

Hasil digesti yang tidak sempurna ditunjukkan pada lajur 2 dan 3 (Gambar 4.7.2). Hal tersebut terlihat dengan hasil potongan fragmen yang tidak sesuai (Gambar 4.7.2, lajur 2) dan hanya terbentuk satu fragmen saja (Gambar 4.7.2, lajur 3). Kemurnian DNA plasmid yang rendah dapat menyebabkan proses digesti berjalan 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 berupa fenol, kloroform, protein, etanol, EDTA, dan kadar garam yang tinggi diduga menjadi sumber kontaminasi pada DNA plasmid, dan dapat menghambat kerja enzim restriksi. Selain itu, potongan yang tidak sempurna dapat menunjukkan bahwa terjadi mutasi pada salah satu situs restriksi pada plasmid rekombinan, sehingga tidak dapat dikenali kembali oleh enzim *Bam*HI ataupun *Sal*I. Mutasi tersebut dapat terjadi akibat aktivitas enzim eksonuklease. Menurut Micklos & Freyer (1990: 44), enzim eksonuklease dapat memotong bagian ujung vektor ekspresi, dalam hal ini adalah vektor pCAMBIA 1301.



Gambar 4.7.2 Verifikasi plasmid rekombinan dengan digesti menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Sal*I
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

4.8 Elektroporasi DNA Plasmid ke Sel Elektrokompeten *Agrobacterium tumefaciens*

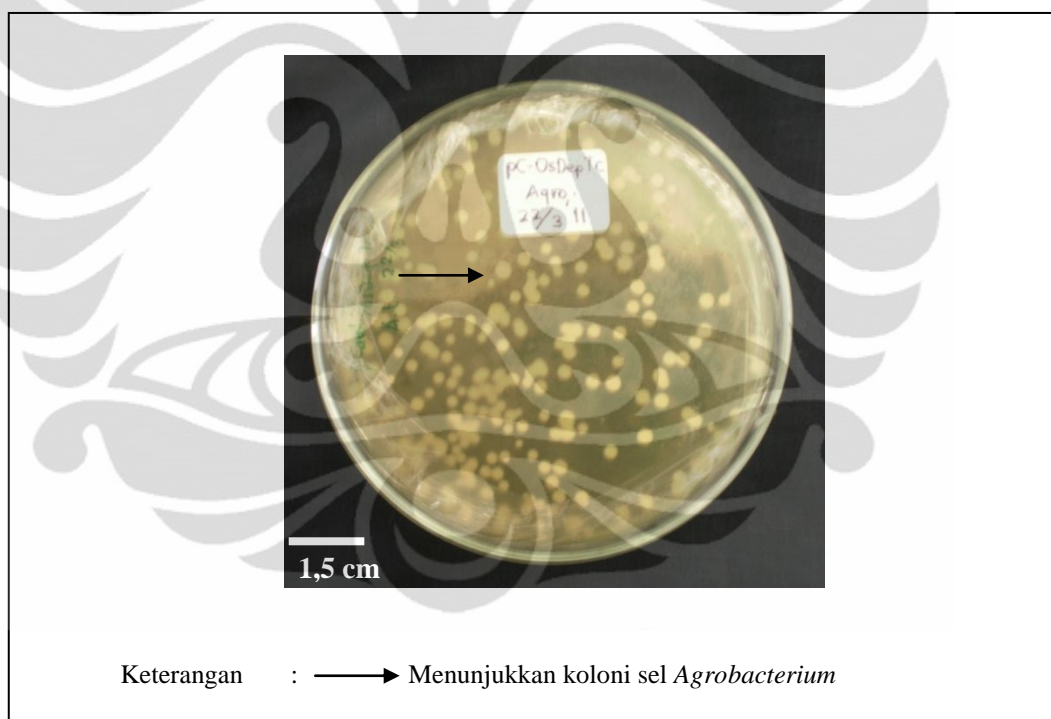
Strain bakteri *A. tumefaciens* yang digunakan pada penelitian adalah LBA4404. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Komari *et. al.* (2006: 31), kemampuan vektor biner yang paling baik adalah saat dikombinasikan dengan *A. tumefaciens strain* LBA4404. Pembuatan sel elektrokompeten dilakukan berdasarkan protokol BioRad (2002: 7--11). Kultur sel *A. tumefaciens* diberi perlakuan menggunakan gliserol 10% dingin dan sorbitol 1 M. Pencucian berulang dengan gliserol 10% dingin digunakan untuk menghilangkan seluruh garam-garam dan elektrolit, sehingga dihasilkan larutan dengan kadar ionik rendah dan bebas-garam (Wise *et. al.* 2006: 44, 50). Menurut Sambrook & Russell (2002: 13.90), kultur bakteri dapat bertahan pada suhu -70 °C tanpa kehilangan viabilitasnya dengan penambahan gliserol, sehingga sel tersebut dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama. Pengawetan sel pada suhu -70 °C juga memperkecil kemungkinan terjadinya perubahan genetik pada *strain* bakteri tersebut (Wise *et. al.* 2006: 4).

Elektroporasi dilakukan pada plasmid rekombinan yang positif membawa gen *Osdep1-Tc*. Elektroporasi merupakan metode yang paling efisien untuk menempatkan DNA asing ke bakteri *A. tumefaciens*. Elektroporasi bergantung pada penggunaan kejutan listrik sehingga terbentuk pori pada membran lipid bakteri. Pori tersebut memungkinkan molekul DNA untuk masuk ke sel bakteri. Parameter keberhasilan metode elektroporasi adalah kuat tegangan listrik yang digunakan serta durasi kejutan. Tegangan listrik yang digunakan pada penelitian adalah sebesar 2,2 kV dengan waktu konstan sekitar 0,5 milidetik. Hal tersebut sesuai dengan protokol BioRad (2000: 9) bahwa untuk elektroporasi *Agrobacterium*, tegangan listrik optimal adalah sebesar 2,2 kV.

Sel *A. tumefaciens* yang telah dielektroporasi kemudian dimasukkan ke dalam medium LB cair, karena *A. tumefaciens* dapat dengan mudah tumbuh pada medium tersebut. Menurut Brown (2006: 30), Luria Bertani merupakan media kompleks yang tidak memerlukan penambahan senyawa lainnya, dan dapat mendukung pertumbuhan beberapa spesies bakteri. Kandungan tripton pada

media tersebut dapat menyuplai asam amino dan peptida, sedangkan kandungan ekstrak khamir menyediakan suplai nitrogen, gula, serta nutrisi organik dan anorganik.

Sel kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C. Menurut Wise *et. al.* (2006: 7), suhu pertumbuhan yang baik bagi *Agrobacterium* berkisar antara 25--30 °C selama 3 jam. Suhu yang terlalu tinggi, misalnya 37 °C, dapat merusak gen *vir* pada bakteri tersebut. Kultur sel kemudian ditumbuhkan kembali pada medium LB padat yang mengandung antibiotik kanamisin dengan metode *spread*. Koloni yang tumbuh merupakan koloni sel *A. tumefaciens* yang mengandung plasmid rekombinan pCAMBIA-*Osdep1-Tc*, karena plasmid tersebut membawa gen resisten terhadap antibiotik kanamisin (Gambar 4.8) (CambiaLabs 2006: 1).

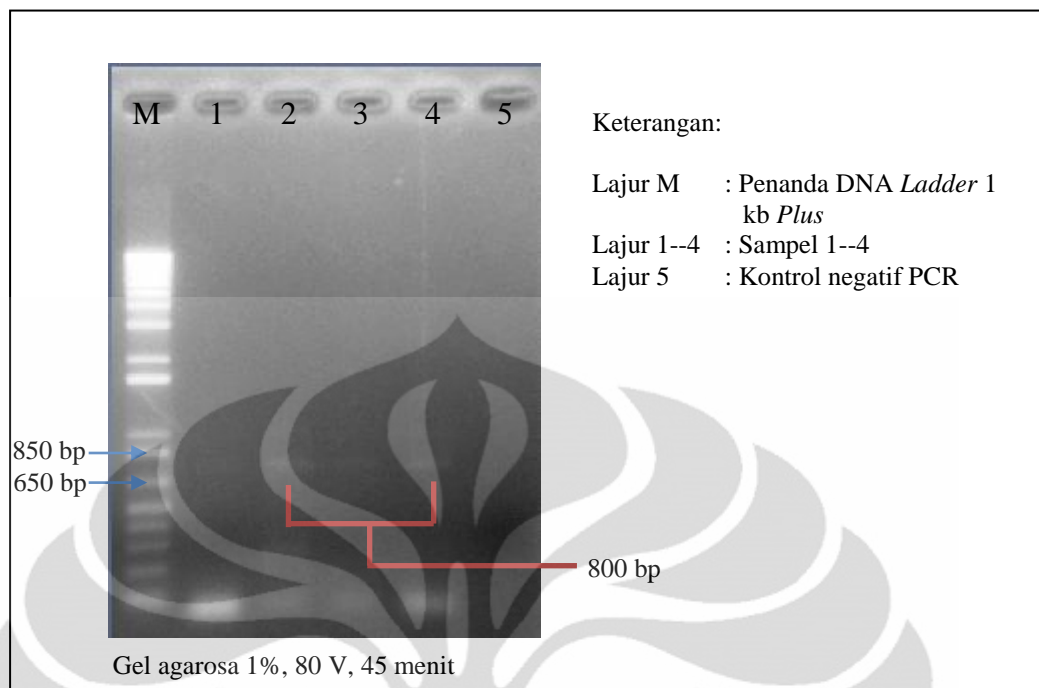


Gambar 4.8 Koloni sel *A. tumefaciens* yang mengandung plasmid rekombinan pCAMBIA-*Osdep1-Tc* pada medium seleksi
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

4.9 Isolasi DNA Plasmid Hasil Elektroporasi dan Verifikasi dengan Teknik PCR

Isolasi DNA plasmid dilakukan untuk mengetahui apakah DNA plasmid benar telah tersisipi ke dalam bakteri *A. tumefaciens*. Isolasi DNA plasmid dilakukan terhadap koloni *A. tumefaciens* yang tumbuh pada medium LB padat yang mengandung antibiotik kanamisin. Koloni tersebut ditumbuhkan kembali di medium LB cair selama 2 hari pada suhu 27 °C. Isolasi plasmid dilakukan menggunakan metode minipreparasi lisis alkali berdasarkan Sambrook & Russell (2001: 1.32--1.34) dengan penambahan lisozim. Menurut Sambrook & Russell (2001: 1.134), lisozim digunakan untuk melisiskan dinding sel bakteri *A. tumefaciens*, karena bakteri tersebut termasuk bakteri Gram-positif yang memiliki dinding sel berupa peptidoglikan yang sangat tebal (Alberts *dkk.* 2008: 1490).

Verifikasi plasmid dilakukan dengan teknik PCR, menggunakan pasangan primer OsDep-S-F dan OsDep-Tc-R. Hasil visualisasi dengan elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa terbentuk pita pada ukuran 800 bp pada sampel 2, 3 dan 4 (Gambar 4.9 lajur 2--4), yang menandakan bahwa plasmid rekombinan yang mengandung gen *Osdep1-Tc* telah berhasil dielektroporasi ke bakteri *A. tumefaciens*. Sampel no.2 kemudian dipilih untuk selanjutnya digunakan sebagai kultur *A. tumefaciens* penginfeksi kalus embriogenik.



Gambar 4.9 Visualisasi gel agarosa verifikasi DNA plasmid hasil elektroporasi ke bakteri *A. tumefaciens*
 [Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

4.9 Persiapan Bakteri *A. tumefaciens* dan Ko-kultivasi

Media *autoinducer bioassay* (AB) padat digunakan sebagai media tumbuh kultur bagi sel *A. tumefaciens* yang positif mengandung plasmid rekombinan. Media AB merupakan media penginduksi gen *vir*. Penambahan glukosa pada media AB bertujuan sebagai sumber karbon untuk meningkatkan ekspresi gen *vir* bakteri *A. tumefaciens* (Wise *et. al.* 2006: 10). Komposisi media AB dapat dilihat pada Lampiran 4 (4.1).

Kultur *A. tumefaciens* yang tumbuh pada media AB kemudian dilarutkan pada media ko-kultivasi cair. Media ko-kultivasi cair yang digunakan adalah media dasar R2 dengan penambahan 2,5 mg/L 2,4-D dan 100 μ M asetosiringon. Asetosiringon merupakan senyawa fenolik yang dapat menginduksi gen *vir*, sehingga menambah efektifitas transformasi (Rao & Rao 2007: 507). Menurut Azhakanandam *et. al.* (2000) (lihat Rao & Rao 2007: 507), 100 μ M merupakan

konsentrasi asetosiringon yang optimum dalam media ko-kultivasi pada proses transformasi kalus padi.

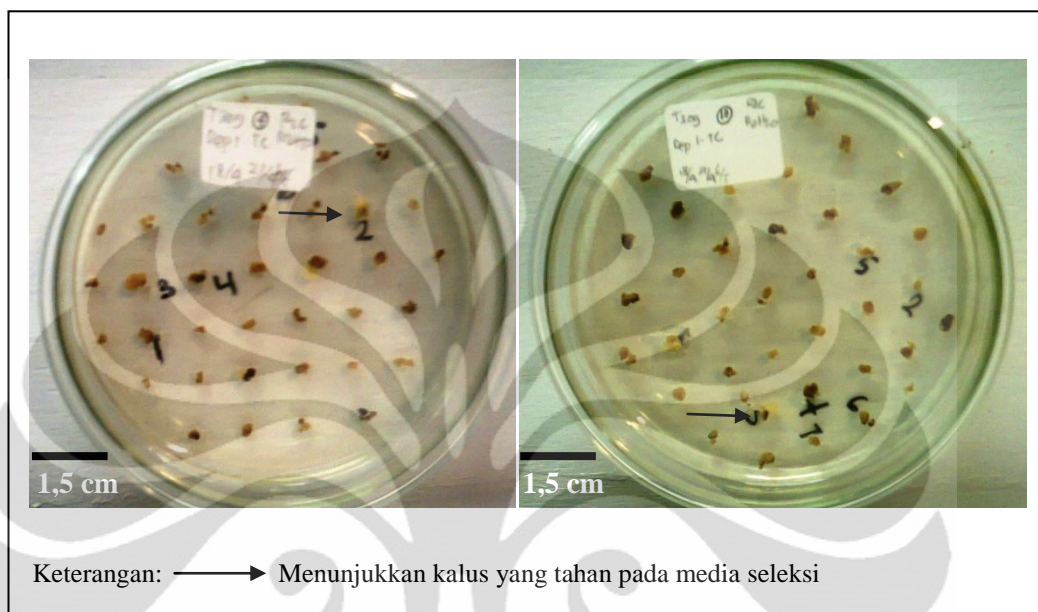
Kalus embriogenik yang berada di cawan petri direndam selama 15 menit dengan suspensi *A. tumefaciens* yang berasal dari kultur *A. tumefaciens* yang dilarutkan pada media ko-kultivasi cair. Setelah dikeringkan, kalus embriogenik kemudian ditumbuhkan pada media ko-kultivasi R2 padat yang mengandung antibiotik cefotaxim (200 µg/ml) dan vancomisin (100 µg/ml). Tahap ko-kultivasi merupakan tahap penginfeksi kalus oleh sel *A. tumefaciens*.

Setelah 3 hari masa ko-kultivasi, kalus yang diinfeksi dengan *A. tumefaciens* dicuci dengan air steril yang mengandung antibiotik cefotaxim (200 µg/ml)-vancomisin (100 µg/ml) untuk membunuh bakteri *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens strain* LBA4404 tidak mengekspresikan aktivitas β-laktamase dengan baik, sehingga dapat dengan mudah dibunuh dengan antibiotik seperti cefotaxim (Lee & Gelvin 2008: 329).

Kalus yang telah dicuci kemudian dipindahkan ke medium seleksi R2 yang mengandung antibiotik cefotaxim-vancomisin. Menurut Paramesh *et. al.* (2010: 87), antibiotik tersebut digunakan untuk mengatasi kemungkinan terjadinya kontaminasi oleh *A. tumefaciens* pada media seleksi. Antibiotik higromisin (50 mg/L) juga ditambahkan pada media seleksi kalus, sebagai penanda seleksi antibiotik untuk tanaman. Konstruksi vektor pCAMBIA 1301 memiliki gen *hygromycin phosphotransferase (hptI)* pada daerah T-DNA serta CaMV35S polyA terminator yang memberi resistensi terhadap antibiotik higromisin sebagai penanda seleksi tanaman (Paramesh *et. al.* 2010: 87).

Dua minggu setelah kalus dipindahkan ke medium seleksi, terlihat bahwa terdapat kalus-kalus yang berhasil tumbuh pada media seleksi dan kalus-kalus yang tidak berhasil tumbuh pada media seleksi. Kalus-kalus yang berhasil tumbuh pada medium seleksi diduga kuat membawa gen *hpt* yang memberi resistensi terhadap antibiotik higromisin sebagai penanda seleksi tanaman, sementara kalus-kalus yang tidak berhasil tumbuh pada medium seleksi diduga tidak memiliki resistensi terhadap antibiotik higromisin yang dikode oleh gen *hpt* (Paramesh *et. al.* 2010: 87).

Kalus-kalus yang berhasil tumbuh pada media seleksi dapat dilihat pada Gambar 4.10. Sebanyak lima kalus kemudian diambil untuk dilakukan isolasi DNA terhadap kalus tersebut.



Gambar 4.10 Kalus-kalus tahan pada media seleksi higromisin
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

4.11 Uji Histokimiawi GUS

Uji histokimiawi GUS dilakukan pada kalus berdasarkan metode Jefferson *et. al.* (1987) tiga hari setelah ko-kultivasi. Kalus dicuci dengan air steril dan antibiotik cefotaxim-vancomisin, kemudian dimasukkan ke dalam tabung 1,5 ml steril yang berisi 150 µl larutan *X-gluc* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucoronide). Uji positif ditandai dengan adanya bercak biru (*blue spot*) pada kalus, yang terjadi akibat reaksi histokimiawi antara kalus dengan substrat *X-Gluc* yang bersifat indigogenik (Jefferson *et. al* 1987: 3907).

Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop setelah dilakukan inkubasi selama satu malam pada suhu 37 °C. Hasil pengamatan menunjukkan terdapat bercak biru pada 6 kalus hasil transformasi, yang menandakan bahwa uji GUS tersebut positif. Namun, berdasarkan perhitungan persentase uji histokimiawi

GUS yang dilakukan, didapatkan persentase yang cukup rendah, yaitu 30% (Lampiran 5). Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh oksidasi yang kurang terjadi di dalam tabung 1,5 ml. Menurut Jefferson (1987: 398), dimerisasi oksidatif diperlukan untuk membentuk warna biru pada kalus, karena hasil aktivitas glukuronidase tanpa oksidasi adalah senyawa yang tidak berwarna. Dimerisasi oksidatif tersebut dapat dipicu oleh oksigen di atmosfer maupun katalis oksidasi.

Gen reporter *gus* pada pCAMBIA 1301 memiliki daerah intron pada sekuens pengkodennya. Hal tersebut memberi keuntungan karena gen tersebut tidak terekspresi pada *A. tumefaciens*, sehingga bercak biru menunjukkan ekspresi dari sel tanaman, bukan berasal dari sel *A. tumefaciens* (Cambialabs 2006: 1).



Gambar 4.11 Hasil uji GUS positif pada kalus transforman
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

4.12 Isolasi DNA Kalus Transforman

Isolasi DNA transforman dilakukan pada kalus embriogenik yang tahan pada media seleksi. Sebanyak lima kalus dengan panjang ± 3 mm diambil dari media seleksi dan digerus pada tabung 2 ml menggunakan *buffer* CTAB-

merchптоetanol. Proses isolasi DNA membutuhkan suatu tahapan dimana asam nukleat dipisahkan dari pengotornya dan dilakukan presipitasi terhadap DNA yang didapatkan. Penambahan kloroform bertujuan untuk memisahkan asam nukleat dari pengotor berupa protein, lipid dan karbohidrat (van Pelt-Verkuil *et. al.* 2008: 36). Presipitasi DNA dilakukan menggunakan etanol 70% (Sambrook & Russell 2001: A8.12). DNA yang telah dipresipitasi dengan etanol dapat dilarutkan kembali menggunakan *buffer* yang memiliki kekuatan ionik rendah, seperti TE (pH 8). Penambahan RNase ke dalam TE mempermudah degradasi RNA sehingga akan didapatkan DNA dengan kemurnian yang tinggi.

Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi dari kalus transforman kemudian dihitung menggunakan teknik spektrofotometri. Konsentrasi DNA dihitung pada panjang gelombang 260 nm (Sambrook & Russell 2001: A8.20). Perhitungan konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Perhitungan konsentrasi dan kemurnian DNA hasil isolasi kalus transforman

Sampel	Absorbansi		Kemurnian DNA	Konsentrasi DNA (ng/ μ l)
	λ 260	λ 280		
Blanko	0,000	0,000	-	-
Kalus 2	0,201	0,121	1,66	2.009,75
Kalus 4.2	0,116	0,080	1,45	1.160,79
Kalus 7.2	0,340	0,200	1,69	3.396,49
Kalus 10.3	0,131	0,088	1,49	1.313,52
Kalus 11.2	0,117	0,087	1,34	1.168,03

[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

Data pengamatan menunjukkan bahwa kemurnian DNA tidak cukup baik pada keseluruhan sampel. Nilai kemurnian DNA yang baik berkisar antara 1,8--2,0 (Sambrook & Russell 2001: A8.20). Nilai kemurnian DNA masing-masing sampel kalus transforman berada di bawah 1,8. Menurut Santella (2006: 1586), nilai kemurnian DNA yang berada di bawah 1,8 mengindikasikan adanya

kontaminasi berupa protein. Kontaminasi tersebut kemungkinan disebabkan karena kurangnya pemisahan antara asam nukleat dengan protein saat penambahan kloroform:isoamil (van Pelt-Verkuil *et. al.* 2008: 36). Namun, walaupun nilai kemurnian DNA yang didapat dari hasil isolasi tersebut tidak terlalu baik, DNA hasil isolasi kalus transforman tersebut tetap dapat digunakan sebagai cetakan DNA untuk proses PCR yang akan dilakukan selanjutnya.

4.13 Verifikasi Hasil Isolasi DNA Transforman dengan PCR

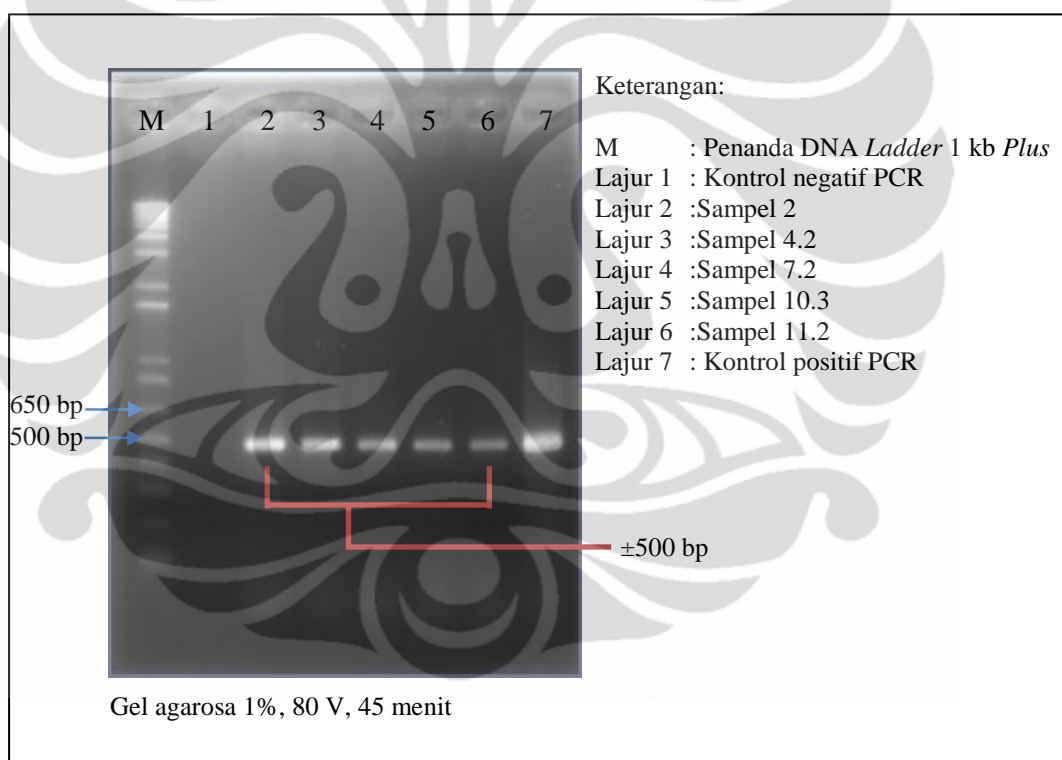
Verifikasi hasil isolasi DNA transforman dilakukan menggunakan PCR *kit FastStart* dengan total volume reaksi sebanyak 20 μ l. Verifikasi dilakukan untuk mengkonfirmasi kestabilan integrasi dari gen *hpt* pada genom kalus transforman. Primer yang digunakan dalam proses PCR adalah primer *forward* *hpt* dan primer *reverse* *hpt*. Cetakan DNA yang digunakan dalam reaksi PCR adalah DNA masing-masing kalus transforman dengan konsentrasi sebesar 50 ng/ μ l.

Hasil elektroforesis gel agarosa menunjukkan bahwa terbentuk pita DNA berukuran \pm 500 bp pada masing-masing kalus transforman (Gambar 4.13 lajur 2--6). Kontrol positif PCR juga disertakan, yaitu reaksi PCR dengan plasmid rekombinan pCAMBIA-*Osdep1-Tc* sebagai cetakan DNA. Kontrol positif menunjukkan pita DNA yang berukuran sama dengan kalus transforman, yaitu \pm 500 bp (Gambar 4.13 lajur 7). Hal tersebut menunjukkan bahwa gen *hygromycin phosphotransferase (hpt)* terintegrasi dengan stabil ke masing-masing kalus transforman yang diuji, sehingga dapat disimpulkan bahwa kalus embriogenik berhasil ditransformasi menggunakan *A. tumefaciens*. Kontrol negatif PCR yang disertakan pada verifikasi tidak memperlihatkan pita fragmen DNA, yang berarti reaksi PCR berjalan dengan baik dan pita DNA pada kalus transforman berasal dari gen *hpt* (bukan kontaminan) (Gambar 4.13 lajur 1).

Gen *hpt* yang telah terintegrasi dengan baik pada kalus transforman mengindikasikan bahwa gen *Osdep1-Tc* berhasil disubkloning ke vektor pCAMBIA 1301 dan berhasil diintroduksi ke kalus uji. Hal tersebut dikarenakan konstruksi pCAMBIA 1301 membawa gen *hptI*, sehingga hanya kalus positif

mengandung gen *hpt* yang berhasil dideteksi oleh primer *forward* dan *reverse* *hpt* (Rao & Rao 2007: 509).

Hasil verifikasi PCR yang positif terhadap kelima kalus uji menandakan bahwa frekuensi transformasi tergolong tinggi. Hal tersebut dikarenakan insersi intron pada gen *hpt* dalam konstruksi pCAMBIA 1301. Menurut Opabode (2006: 17), daerah intron pada *hpt* tidak hanya meningkatkan frekuensi transformasi pada tanaman padi, namun juga mereduksi jumlah salinan gen penanda. Selain itu, insersi intron ke gen penanda memungkinkan kontrol pertumbuhan *A. tumefaciens* selama proses transformasi lebih baik dibandingkan gen penanda tanpa daerah intron.



Gambar 4.13 Visualisasi gel agarosa verifikasi PCR kalus transforman
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen, 2011.]

Hasil tersebut menunjukkan bahwa gen *Osdep1-Tc* telah berhasil diintroduksi ke kalus padi cv. Taipei 309. Akan tetapi, perlu dilakukan penelitian menggunakan eksplan berupa kalus embriogenik yang berasal dari embrio belum matang (*immature embryo*) padi, untuk melihat apakah hasil positif uji GUS dan

analisis molekuler juga terjadi pada eksplan tersebut. Selain itu, kestabilan gen tersebut pada tanaman transgenik belum dapat diketahui, demikian pula untuk ketahanan tanaman transgenik terhadap cekaman biotik seperti serangan hama wereng, dan cekaman abiotik seperti cekaman kekeringan terhadap tanaman padi belum diketahui. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji lapang pada tanaman transgenik dewasa agar kelebihan serta kekurangan tanaman transgenik tersebut dapat dipelajari lebih lanjut.



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Transformasi gen *Osdep1-Tc* ke kalus padi cv. Taipei 309 berhasil dilakukan dengan indikasi hasil positif uji GUS dan analisis PCR.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan eksplan berupa kalus embriogenik yang berasal dari embrio belum matang (*immature embryo*) tanaman padi sebagai target introduksi gen.
2. Perlu dilakukan uji lapang pada tanaman transgenik dewasa terkait ketahanan tanaman terhadap cekaman biotik seperti serangan hama wereng dan cekaman abiotik seperti cekaman kekeringan, jika tanaman transgenik dewasa berhasil didapatkan.

DAFTAR REFERENSI

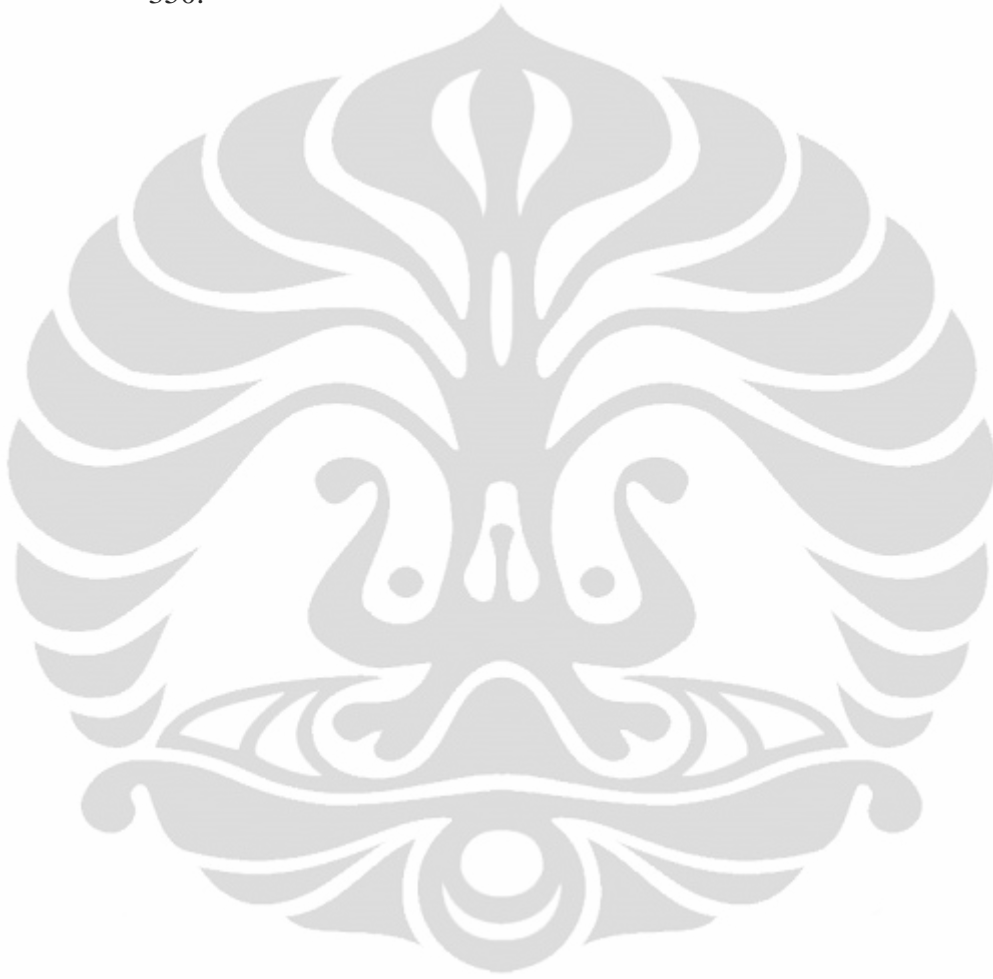
- Agrawal, S. 2008. *Techniques in molecular biology*. International Book Distributing, Co., Lucknow: 329 hlm.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter. 2008. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. Garland Science, Abingdon: xxxiii + 1601 + G.40 + I.39 + T.1.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl. 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York: xxxviii + 12.10 + AL.29 + 17 hlm.
- Bhatti, K.H. & C. He. 2009. *Agrobacterium* mediated tobacco transformation with rice fae gene and segregation analysis of T1 generation. 2009. *Pak. J. Bot* **41** (1): 403--412.
- BioRad. 2002. *MicroPulser electroporation apparatus operating instructions and applications guide*. Catalog Number 165-2100. 26 hlm.
- Brooker, R.J. 2005. *Genetics: Analysis and principles*. McGraw Hill Companies, Inc., Boston: xxii + 842 hlm.
- Brown, T.A. 2006. *Gene cloning & DNA analysis: An introduction*. 5 th ed. Blackwell Publishing, Manchester: xx + 386 hlm.
- CambiaLabs. 2006. pCAMBIA vectors. (?): 5 hlm.
<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html>, 1 Februari 2011, pk. 13.35 WIB.
- Casali, N. & A. Preston. 2008. *E. coli plasmid vectors*. Humana Press, Inc., Totowa: 304 hlm.
- EBI (=European Bioinformatics Institute). 2011. (?): 1 hlm.
www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR008914, 3 Februari 2011, pk. 15.40 WIB.
- EDVOTEK. 2001. Mini-prep isolation of plasmid DNA. (?): 25 hlm. <http://www.edvotek.com/pdf/202.pdf>, 26 April 2011, pk 16.00 WIB.
- Fisk, H.J. & A.M. Dandekar. 2004. Electroporation: Introduction and expression of transgenes in plant protoplasts. *Methods in Molecular Biology* **286**: 79--90.

- Harisha, 2007. *Biotechnology procedures and experiments handbook*. Infinity Science Press LLC, New Delhi: xv + 694 hlm.
- Guo, Y. & D. Hong. 2010. Novel pleiotropic loci controlling panicle architecture across environments in japonica rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics and genomics* **37**: 533–544.
- Heinrichs, E.A. 2009. Management of Rice Insect Pests. (?): 1 hlm.
<http://ipmworld.umn.edu/chapters/heinrich.htm>, 11 Oktober 2010, pk. 11.50 WIB.
- Huang, X., Q. Qian, Z. Liu, H. Sun, S. He, D. Luo, G. Xia, C. Chu, J. Li & X. Fu. 2009. Natural variation at the DEP1 locus enhances grain yield in rice. *Nature Genetics* **41** (4): 494--497.
- Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* **5** (4): 387--405.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh & M.W. Bevan. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* **6** (13): 3901--3907.
- Karcher, S.J. & S.B. Gelvin. 2000. Blue plants: Transgenic plants with the GUS reporter gene for the undergraduate biology curriculum. (?): 1 hlm.
<http://www.bio.purdue.edu/research/blue2000/blue.html>, 5 April 2011, pk. 14.33 WIB.
- Khush, G.S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology* **35**: 25--34.
- Klug, W.S. & M.R. Cummings. 1994. *Concepts of genetics*. 4th ed. Prentice-Hall Englewood, New Jersey: xvi + 773 hlm.
- Komari, T., Y. Takakura, J. Ueki, N. Kato, Y. Ishida & Y. Hiei. 2006. Binary vectors and super-binary vectors. *Agrobacterium Protocols* **1**: 15--41.
- Lee, K.W., G.J. Choi, K.Y. Kim, S.H. Yoon, H.C. Ji, H.S. Park, C.Y. Lim & S.H. Lee. 2010. Genotypic variation of *Agrobacterium*-mediated transformation of Italian ryegrass. *Electronic Journal of Biotechnology* **13** (3): 1--10.
- Lee, L.Y. & S.B. Gelvin. 2008. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology* **146**: 325--332.

- Listanto, E., Sutrisno, S.J. Pardal & M. Herman. 2005. Penyisipan gen inhibitor α -amilase pada plasmid biner pCambia 1301. *Jurnal AgroBiogen* **1** (2): 45--52.
- Lodge, J., P. Lund & S. Minchin. 2007. *Gene cloning : Principles and applications*. Taylor & Francis Group, Birmingham: ix + 462 hlm.
- Micklos, D.A. & G.A. Freyer. 1990. *DNA science: A first course in recombinant DNA technology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xiv + 477 hlm.
- Nicholl, D.S.T. 2002. *An introduction to genetic engineering*. 2nd ed. Cambridge University Press, New York: xii + 292 hlm.
- Omoto, C.K. & P.F. Lurquin. 2004. *Genes and DNA: A beginner's guide to genetics and its applications*. Columbia University Press, New York: xviii + 217 hlm.
- Opabode, J.T. 2006. Agrobacterium-mediated transformation of plants: Emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review* **1** (1): 12--20.
- Paramesh, H., B. Fakhrudin & M.S. Kuruvinschetti. 2010. Genetic transformation of a local variety of tomato using *gus* gene: An efficient genetic transformation protocol for tomato. *Journal of Agricultural Technology* **6** (1): 87--97.
- Piao, R., W. Jiang, T.H. Ham, M.S. Choi, Y. Qiao, S.H. Chu, J.H. Park, M.O. Woo, Z. Jin, G. An, J. Lee & H. J. Koh. 2009. Map based cloning of the ERECT PANICLE 3 gene in rice. *TAG Theoretical and Applied Genetics*. **119** (8): 1497--1506.
- Plants Database. 2006. Classification for kingdom Plantae down to genus *Oryza* L. Mei 2011: 1 hlm.
<http://www.plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=ORYZA&display=31>, 24 Mei 2011, pk. 10.57 WIB.
- Prayuni, K. 2008. Isolasi dan pengklonaan promoter gen *lea3* yang terinduksi kekeringan dari tanaman padi (*Oryza sativa* L.) local Indonesia kultivar rojolele dan batutegei. Skripsi S1-Biologi FMIPA UI. Depok: xi + 104 hlm.

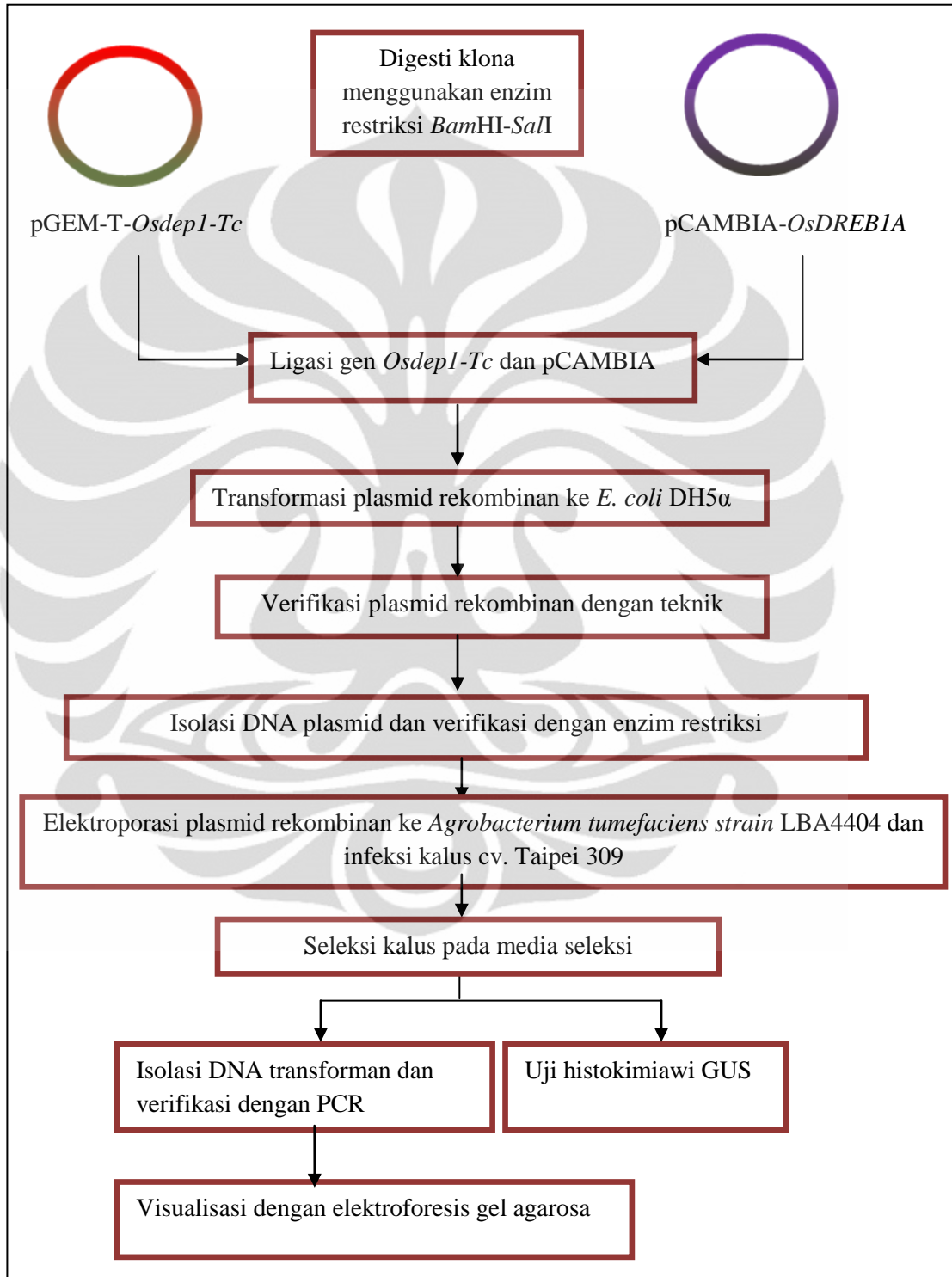
- Purnamaningsih, R. 2006. Induksi kalus dan optimasi regenerasi empat varietas padi melalui kultur in vitro. *Jurnal AgroBiogen* **2** (2): 74--80.
- Rao, M.V.R. & G.J.N. Rao. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice under acetosyringone-free conditions. *Plant Biotechnology* **24**: 507--511.
- Roche. 2008. *FastStart Taq DNA polymerase, 5 U/ μ l*. Roche Applied Science, Manheim: 22 hlm.
- Saharan, V., R.C. Yadav, N.R. Yadav & K. Ram. 2004. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology* **3** (11): 572--575.
- Sambrook, J. & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Volume 1--3. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 18.136 + A.14.1 + R.22 + I.44 hlm.
- Santella, R.M. 2006. Approaches to DNA/RNA extraction and whole genome amplification. *Cancer Epidemiology Biomarkers* **15** (9): 1585--1587.
- Sarkar, S., S. Chaudhuri & T. Basu. 2002. Mechanism of artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA-clues from the influence ethanol. *Current Science* **83** (11): 1736--1380.
- Singh, B.D. 2009. *Biotechnology: Expanding horizons*. 2nd ed. Kalyani Publishers, New Delhi: xxxix + 919 hlm.
- Spencer, S.C. 1991. Electroporation technique of DNA transfection. *Methods in Molecular Biology* **7**: 45--52.
- Van Steenis, C.G.G.J. 2005. *Flora*. PT Pradnya Paramita, Jakarta: xii + 485 hlm.
- Van Pelt-Verkuil, E., A. van Belkum & J.P. Hays. 2008. *Principles and technical aspects of PCR amplification*. Springer Science, Neth: xii + 323 hlm.
- Weaver, R.F. 2005. *Molecular biology*. 3rd ed. McGraw Hill Higher Education, Inc., Boston: xvii + 894 hlm.
- Wise, A.A., Z. Liu & A.N.Binns. 2006. Culture and maintenance of *Agrobacterium* strains. *Agrobacterium Protocols* **1**: 3--13.
- Wise, A.A., Z. Liu & A.N.Binns. 2006. Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Agrobacterium Protocols* **1**: 43--53.

- Wong, D.W.S. 1997. *The ABCs of gene cloning*. International Thomson Publishing, New York: xiv + 213 hlm.
- Zhu, K., D. Tang, C. Yan, Z. Chi, H. Yu, J. Chen, J. Liang, M. Gu & Z. Cheng. 2009. ERECT PANICLE2 Encodes a Novel Protein That Regulates Panicle Erectness in Indica Rice. *Genetics Society of America* **184**: 343—350.



Lampiran 1

Skema kerja penelitian secara umum



Lampiran 2

Genotipe sel *Escherichia coli* DH5 α

Genotip	Fungsi
<i>deoR</i>	Untuk replikasi plasmid berukuran besar
<i>endA1</i>	Meningkatkan hasil dan kualitas DNA plasmid hasil isolasi
<i>gyrA96</i>	Memberi resistensi terhadap asam nalidixic
<i>hsdR17</i>	Inaktivasi aktivitas endonuklease <i>Eco</i>
$\Delta(lac)$	Delesi gen <i>lac</i>
<i>recA1</i>	Meningkatkan stabilitas DNA yang diinsersikan ke plasmid
<i>relA1</i>	Memungkinkan sintesis RNA saat tidak terjadi sintesis protein
<i>supE44</i>	Supresor mutasi kodon UAG dan UAA
<i>thi-1</i>	Thiamin dibutuhkan pada pertumbuhan di medium

[Sumber: Casali & Preston 2008: 33.]

Lampiran 3

Komposisi larutan/*buffer*/medium yang digunakan

Larutan/ <i>Buffer</i> /Medium	Cara Pembuatan
<i>Tris-acetate</i> (TAE) 50x dan 1x	Sebanyak 242 g <i>tris base</i> ; 57,1 ml asam asetat glasial; dan 37,29 g Na ₂ EDTA dilarutkan dalam akuades hingga volumenya tepat 1 L untuk menghasilkan larutan <i>stock buffer</i> TAE 50x. Sebanyak 40 ml larutan TAE 50x dilarutkan dengan akuades hingga volume akhir 2 L.
<i>Buffer</i> TE (pH 8)	10 mM Tris-Cl (pH 8) dicampurkan dengan 1 mM EDTA (pH 8).
Marka DNA 1 kb <i>Ladder plus</i>	50 µl <i>stock</i> marka DNA 1 kb ditambah 950 µl Tris-EDTA.
<i>Loading dye</i> 6x	Bromofenol biru 0,25% (w/v) dan sukrosa 40% (w/v) dilarutkan dalam akuades.
<i>Lysis solution</i> I	Sebanyak 5 ml glukosa dicampur dengan Tris-Cl 1 M pH 8 dan EDTA 0.05 M pH 8 kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 100 ml, disimpan pada suhu 4 °C.
<i>Lysis solution</i> II	Sebanyak 40 µl NaOH 10 M dicampur dengan 200 µl SDS 10% kemudian ditambah akuades hingga volume 2 ml, disimpan pada suhu ruang.
<i>Lysis solution</i> III	Sebanyak 60 ml potassium asetat 5 M dicampurkan dengan 11,5 ml asam asetat glasial kemudian ditambah 28,5 H ₂ O, disimpan pada suhu 4 °C.
Medium Luria Bertani (LB)	Sebanyak 10 g tripton, 5 g ekstrak khamir, dan 5 g sodium klorida (NaCl) ditambahkan akuades hingga volume mencapai 1 L (pH 7), lalu disterilisasi dalam autoklaf (121°C, 2 atm, 20 menit). Untuk medium LB

	padat ditambahkan 15 g bacto-agar kemudian ditambahkan akuades hingga volume 1 L, disterilisasi dalam autoklaf (121°C, 2 atm, 20 menit).
--	--

[Sumber: Ausubel *dkk.* 2002: A1.12--A1.18; Sambrook & Russell 2001: A1.1--A2.12.]



Lampiran 4

Komposisi media

4.1 Komposisi media AB

	Bahan	Ukuran
Stok <i>buffer</i> AB 20x (1 L)	K ₂ HPO ₄	60 g/L
	NaH ₂ PO ₄	20 g/L
Stok <i>buffer</i> AB 20x (1 L)	NH ₄ Cl	20 g/L
	MgSO ₄	4 g/L
	KCl	3 g/L
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.2 g/L
	FeSO ₄ .7H ₂ O	50 mg/L
	Glukosa	5 g
	Bacto Agar	15 g
	Akuades steril	900 mL

4.2 Komposisi media NB

Larutan	Ukuran	Bahan	Ukuran
Makro I	100 ml/L	KNO ₃	28.3 g/L
		(NH ₄) ₂ SO ₄	4.63 g/L
		H ₂ PO ₄	4 g/L
		MgSO ₄ .7H ₂ O	1.85 g/L
Makro II	100 ml/L	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.66 g/L
Vitamin B5	25 ml/L	Myoinositol	10 g/L
		Thiamin-Hcl	1 g/L
		Nicotinic acid	0.1 g/L
		Pyridoxin Hcl	0.1 g/L

Mikro B	1 ml/L	MnSO ₄ .H ₂ O KI H ₃ BO ₃ ZnBO ₄ .7H ₂ O CuSO ₄ Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O CaCl ₂ .6H ₂ O	1000 mg/100 ml 75 mg/100 ml 300 mg/100 ml 200 mg/100 ml 2.5 mg/100 ml 25 mg/100 ml 2.5 mg/100 ml
Sukrosa	30 gr/L	-	-
Phytigel	3 gr/L	-	-
Ditambahkan akuades steril hingga volume mencapai 1 L, pH 5.8--5.82			

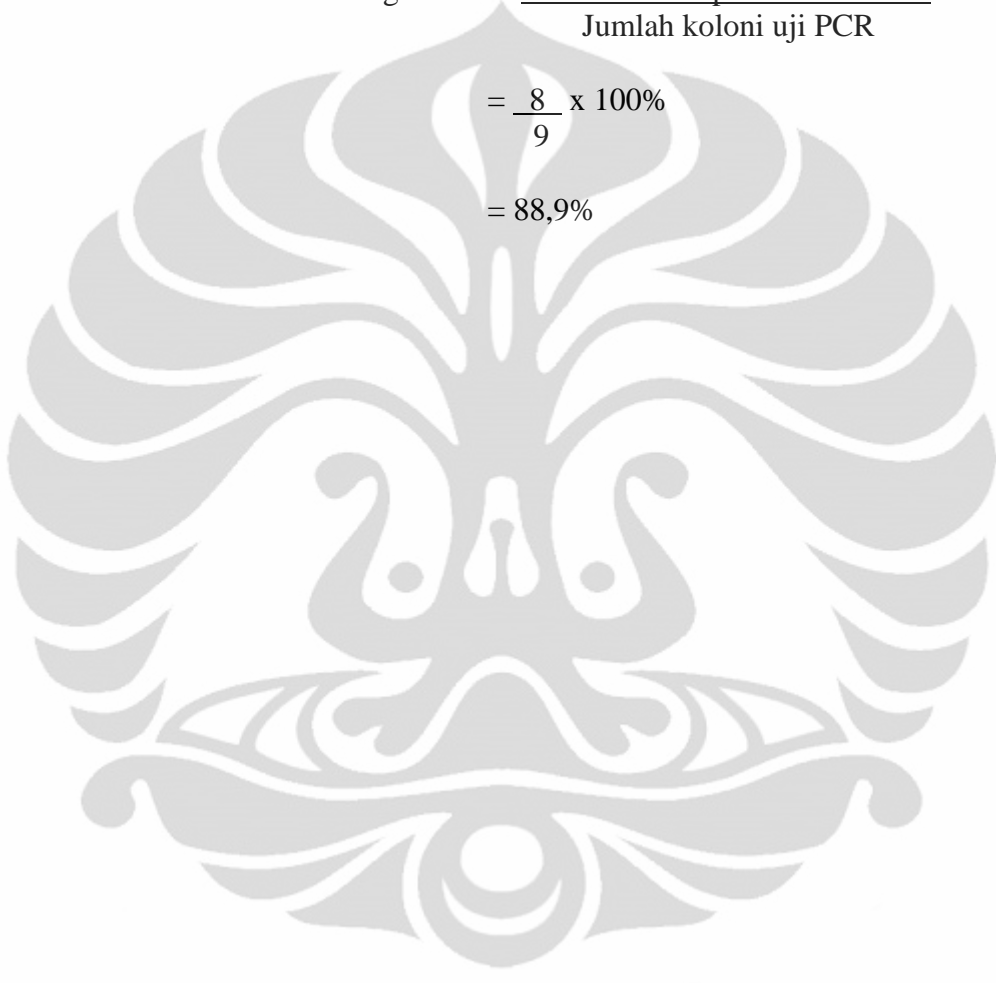
4.3 Komposisi media R2

Larutan	Ukuran	Bahan	Ukuran
Makro I	100 ml/L	KNO ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄ NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O MgSO ₄ .7H ₂ O	40 g/L 3.30 g/L 3.14 g/L 2.46 g/L
Makro II	100 ml/L	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.46 g/L
Mikro	1 ml/L	MnSO ₄ .H ₂ O H ₃ BO ₃ ZnSO ₄ .7H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	160 mg/100 ml 283 mg/100 ml 220 mg/100 ml 19.5 mg/100 ml 12.5 mg/100 ml
FeNaEDTA	10 ml/L	FeSO ₄ .7H ₂ O Na ₂ EDTA.2H ₂ O	1.25 g/L 0.177 g/L
Vitamin	25 ml/L	-	-
Sukrosa	30 g/L	-	-
Agarosa	7 g/L	-	-
Ditambahkan akuades steril hingga volume mencapai 1 L, pH 6.0			

Lampiran 5

Perhitungan persentase keberhasilan ligasi

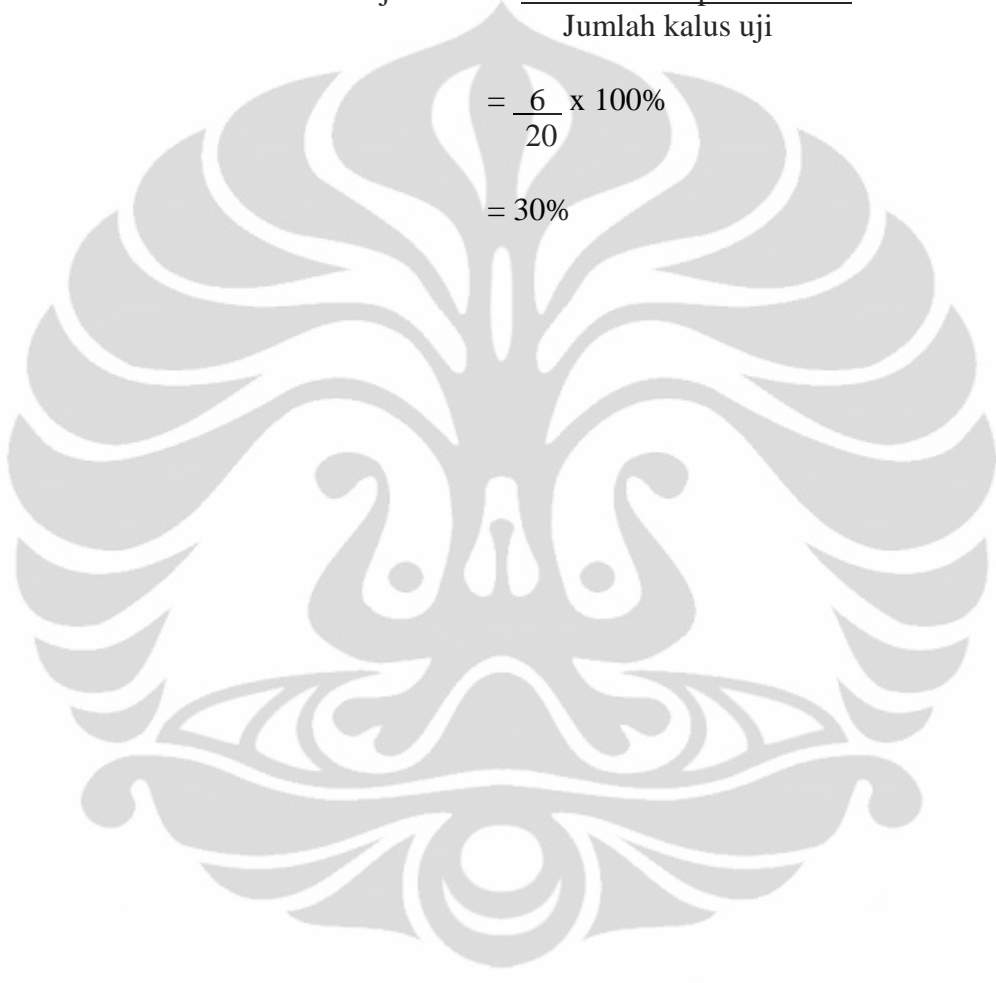
$$\begin{aligned}\text{Persentase keberhasilan ligasi} &= \frac{\text{Jumlah koloni positif hasil PCR}}{\text{Jumlah koloni uji PCR}} \times 100\% \\ &= \frac{8}{9} \times 100\% \\ &= 88,9\%\end{aligned}$$



Lampiran 6

Perhitungan persentase uji histokimiawi GUS

$$\begin{aligned}\text{Persentase keberhasilan uji GUS} &= \frac{\text{Jumlah kalus positif GUS}}{\text{Jumlah kalus uji}} \times 100\% \\ &= \frac{6}{20} \times 100\% \\ &= 30\%\end{aligned}$$



Lampiran 7

Perhitungan nilai kemurnian DNA hasil isolasi kalus transforman

Sampel	Absorbansi		Kemurnian DNA $\lambda 260 : \lambda 280$
	$\lambda 260$	$\lambda 280$	
Kalus 2	0,201	0,121	$0,201 : 0,121 = 1,66$
Kalus 4.2	0,116	0,080	$0,116 : 0,080 = 1,45$
Kalus 7.2	0,340	0,200	$0,340 : 0,200 = 1,69$
Kalus 10.3	0,131	0,088	$0,131 : 0,088 = 1,49$
Kalus 11.2	0,117	0,087	$0,117 : 0,087 = 1,34$