

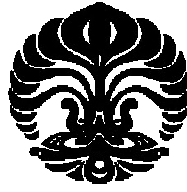
UNIVERSITAS INDONESIA

**TRANSFORMASI GEN *OsERA1* (*Oryza sativa Enhanced Response to ABA1*) KE KALUS PADI cv. TAIPEI 309
MENGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens***

SKRIPSI

**GITA WIDEANI
0706163325**

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



UNIVERSITAS INDONESIA

**TRANSFORMASI GEN *OsERA1* (*Oryza sativa Enhanced Response to ABA1*) KE KALUS PADI cv. TAIPEI 309
MENGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

**GITA WIDEANI
0706163325**

**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 : Gita Wideani

NPM : 0706163325

Tanda Tangan : 

Tanggal : 8 Juli 2011

HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Gita Wideani
NPM : 0706163325
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Judul Skripsi : Transformasi Gen *OsERA1* (*Oryza sativa Enhanced Response to ABA1*) 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 (.....)

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

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 8 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan hanya kepada Allah SWT atas semua nikmat, rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW, sang 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 menuntaskan skripsi ini.
2. Dr. Wibowo Mangunwardoyo dan Dra. Lestari Rahayu K. M.Sc. selaku Penguji I dan II atas segala saran dan perbaikan-perbaikan, dukungan yang diberikan kepada penulis untuk pembuatan dan perbaikan skripsi ini.
3. Dr. Nisyawati selaku Pembimbing Akademis atas segala kasih sayang dan saran-saran, serta semangat yang selalu diberikan selama penulis berada di bangku perkuliahan.
4. Dr. rer. nat. Mufti P. Patria, M.Sc. dan Dra. Nining B. Prihantini, M.Sc selaku Ketua dan Sekretaris Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Titi Soedjiarti, SU selaku Koordinator Pendidikan, dan segenap dosen pengajar atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis selama berada di Biologi. Terima kasih pula kepada seluruh karyawan dan staf Departemen Biologi FMIPA UI, atas segala bantuan yang telah diberikan.
5. Terima kasih kepada Kepala Balai Besar BIOGEN dan Ketua Peneliti Laboratorium Biologi Molekular. Terima kasih kepada Ibu Atmitri S, Ibu Aniversary, Ibu Nur, Pak Heri atas bantuan dalam mendapatkan data, ilmu, dan dukungan yang sangatlah besar untuk penulis.

6. Keluargaku tercinta, Papa (Erlani) dan Mama (W. Nurlistina) terima kasih atas doa yang selalu kalian panjatkan, kasih sayang, dukungan, semangat, dan nasihat yang tak henti untuk penulis. Untuk Ayukku tersayang (Ns. Erra Yudhistina S.Kep) atas keceriaan, semangat dan perhatian serta doa yang selalu menemani penulis. Skripsi ini penulis persembahkan untuk kalian, Papa, Mama dan Ayuk. Terima kasih juga untuk keluarga besar di Palembang dan Ardi S. A, S.Si atas dukungan, doa dan semangat yang selalu diberikan.
7. Sahabat seperjuangan, rekan kerja terbaik yaitu Ade Tri Aryani. Terima kasih atas segala semangat, dukungan, suka dan duka yang selalu membuat penulis menjadi terus kuat.
8. Kepada keluarga besar BB-BIOGEN Lab BM 3, Mba Dewi, Kak Falin, Kak Uthe, Kak Ganty, Fina, Taufan dan Reza atas dukungan, doa, semangat dan canda tawa yang selalu menemani penulis selama menyelesaikan penelitian.
9. Terima kasih untuk sahabat terbaikku (Naba, Tewe, Putsan, Pepep, Memi, Tiara, Bibil, Uti, Ine, Fika, Iik dan Naya). Terima kasih juga pada Eja, Bayu, Karno, Wahyu dan seluruh keluarga Blossom'07 atas persahabatan serta persaudaraan yang indah. Terima kasih kepada asisten genetika, asisten struktum, kak Ina'04, kak Afi'04, Winna'08, Eleya'09 serta seluruh keluarga besar biologi (Felix, Biosentris, Zygomorphic dan Biogenesis).

Akhir kata, penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi 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 : Gita Wideani
NPM : 0706163325
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demikian 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 *OsERA1 (Oryza sativa Enhanced Response to ABA1)* 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, mengalih media/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



Gita Wideani

ABSTRAK

Nama : Gita Wideani
Program Studi : S1 Biologi
Judul : Transformasi Gen *OsERA1* (*Oryza sativa Enhanced Response to ABA1*) ke Kalus Padi cv. Taipei 309 Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk melakukan transformasi gen *OsERA1* ke kalus padi cv. Taipei 309 menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Gen *OsERA1* adalah gen yang berperan dalam meningkatkan sensitifitas dari sel penjaga pada stomata terhadap asam absisat. Transformasi gen *OsERA1* dilakukan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens strain* LBA4404 yang membawa plasmid rekombinan pCAMBIA1301-*OsERA1*. Gen *OsERA1* telah dikloning sebelumnya pada vektor pengklonaan pGEM-T *Easy*. Gen dipotong dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Sall*. Gen diligasikan dengan pCAMBIA 1301 dan ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli* DH5 α dihasilkan vektor rekombinan pCAMBIA-*ERA1*. Plasmid vektor rekombinan pCAMBIA-*ERA1* belum berhasil ditransformasi ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* dengan elektroporasi tetapi berhasil dilakukan dengan *particle bombardment*.

Kata kunci : *Agrobacterium tumefaciens*, cv. Taipei 309, Elektroporasi, Gen *ERA1*, Kalus padi, *Particle bombardment*, Transformasi
xiv + 82 halaman : 23 gambar; 1 tabel
Daftar Referensi : 82 (1975--2011)

ABSTRACT

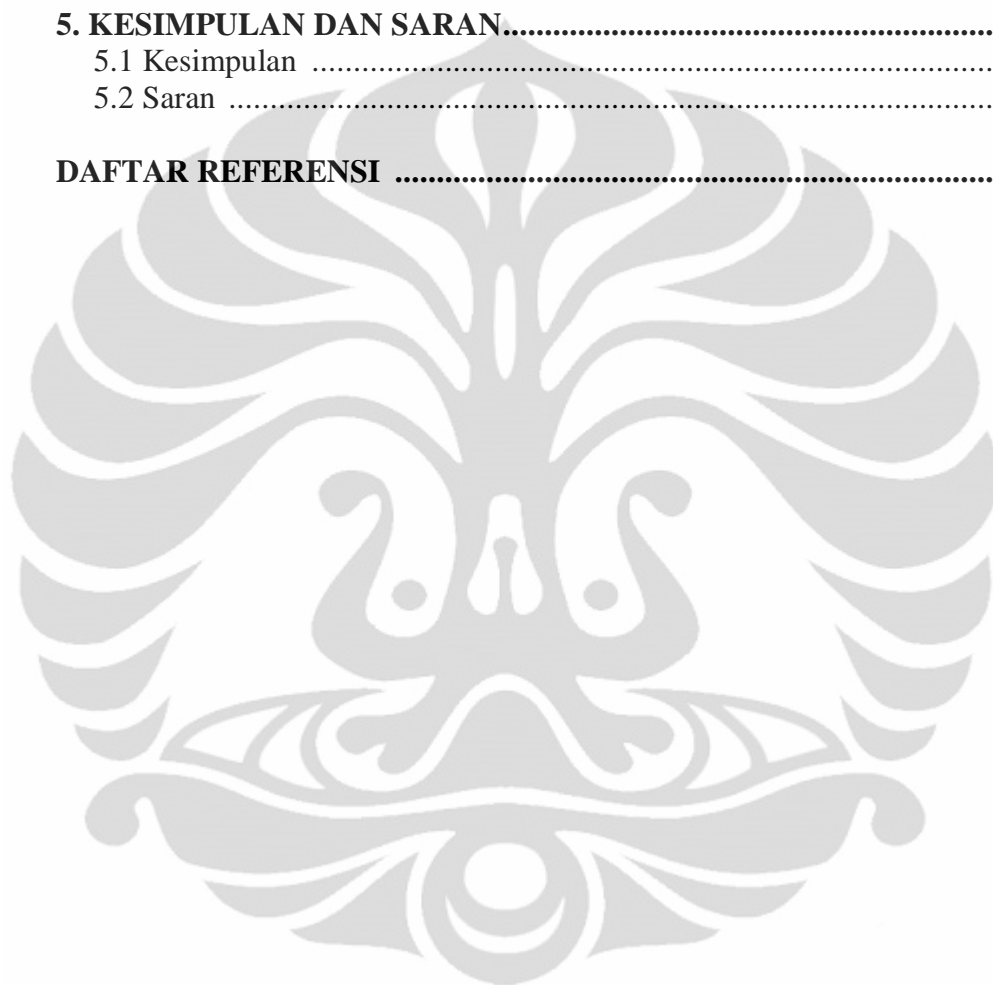
Name : Gita Wideani
Program Study : S1 Biology
Title : Transformation of *OsERA1* (*Oryza sativa Enhanced Response to ABA1*) Gene into cv. Taipei 309 Rice Calli using *Agrobacterium tumefaciens*.

Research about transformation of *OsERA1* gene into rice calli cv. Taipei 309 using *Agrobacterium tumefaciens* had been done. *OsERA1* gene is a gene that has response to enhance sensitivity of guard cell to abscisic acid. Transfer of *OsERA1* gene into calli was carried out using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harboring recombinant plasmid pCAMBIA1301-*OsERA1*. *OsERA1* gene had been cloned previously in the pGEM-T Easy cloning vector and for inserting into pCAMBIA1301, the gene was digested from cloning vector using restriction enzymes *Bam*HI and *Sal*I. Furthermore, the gene was ligated into vector pCAMBIA 1301 and transformed into *Escherichia coli* DH5 α in order to obtain recombinant plasmid pCAMBIA-*OsERA1*. The recombinant plasmid pCAMBIA-*OsERA1* has not successfully transformed with electroporation into *Agrobacterium tumefaciens* yet, but it can be transformed by particle bombardment method.

Keywords : *Agrobacterium tumefaciens*, cv. Taipei 309, Electroporation, *ERA1* gene, Particle bombardment, Rice calli, Transformation.
xiv + 82 pages : 23 pictures; 1 tables
Bibliography : 82 (1975--2011)

3.2.4	Vektor Ekspresi	24
3.2.5	Primer.....	25
3.2.6	Larutan, <i>Buffer</i> dan Medium	25
3.2.7	Bahan Kimia.....	25
3.3	Peralatan.....	25
3.4	Cara Kerja	26
3.4.1	Subkloning Gen <i>ERAI</i> ke pCAMBIA 1301	26
3.4.1.1	Digesti pGEM- <i>ERAI</i> dan pCAMBIA 1301 dengan Enzim Restriksi <i>Bam</i> HI dan <i>Sal</i> I.....	26
3.4.1.2	Ligasi Fragmen Gen <i>ERAI</i> kedalam Vektor BinerpCAMBIA 1301	26
3.4.1.3	Pembuatan Sel Kompeten	27
3.4.1.4	Transformasi Bakteri dengan Kejutuan Panas	27
3.4.1.5	Verifikasi Hasil Transformasi	28
3.4.1.5.1	Verifikasi dengan PCR	28
3.4.1.5.2	Verifikasi dengan Digesti	28
3.4.1.6	Isolasi DNA Plasmid rekombinan	29
3.4.1.7	Verifikasi plasmid Rekombinan.....	30
3.4.1.7.1	Verifikasi dengan PCR	30
3.4.1.7.2	Verifikasi dengan Digesti	31
3.4.2	Transformasi Menggunakan <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
3.4.2.1	Persiapan sel Elektrokompoten	31
3.4.2.2	Elektroporasi	32
3.4.2.3	Verifikasi Hasil Elektroporasi.....	32
3.4.2.3.1	Verifikasi dengan PCR.....	32
3.4.2.3.2	Verifikasi dengan Digesti.....	33
3.4.2.4	Persiapan Bakteri <i>A. tumefaciens</i> dan Ko-kultivasi.....	33
3.4.2.5	Seleksi Kalus pada Media Seleksi.....	34
3.4.3	Verifikasi Transforman	34
3.4.3.1	Uji Histokimia GUS	34
3.4.3.2	Isolasi DNA Hasil Seleksi.....	34
3.4.3.3	Amplifikasi Gen <i>ERAI</i>	35
3.4.4	Transformasi Menggunakan <i>Particle Bombardment</i>	35
3.4.4.1	Persiapan Kalus Embriogenik	35
3.4.4.2	Transformasi dengan <i>Particle Bombardment</i>	36
3.4.4.3	Uji Histokimia GUS	36
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	38
4.1	Digesti Fragmen Gen <i>OsERAI</i> dari pGEM- <i>ERAI</i>	38
4.2	Digesti Vektor Ekspresi pCAMBIA- <i>DREBIA</i> dengan Enzim Restriksi....	40
4.3	Ligasi Gen <i>ERAI</i> dengan Vektor Ekspresi pCAMBIA 1301	42
4.4	Transformasi Plasmid Rekombinan pCAMBIA- <i>ERAI</i>	43
4.5	Verifikasi Transformasi Vektor Rekombinan pCAMBIA- <i>ERAI</i>	46
4.5.1	Verifikasi dengan Teknik PCR.....	46
4.5.2	Verifikasi dengan Digesti.....	49
4.6	Isolasi Plasmid Rekombinan.....	52
4.7	Verifikasi Plasmid Rekombinan.....	53
4.7.1	Verifikasi dengan Teknik PCR.....	53

4.7.2 Verifikasi dengan Teknik Digesti.....	54
4.8 Transformasi ke <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dengan Elektroporasi.....	56
4.9 Isolasi Plasmid dan Verifikasi Hasil Transformasi	63
4.9.1 Isolasi Plasmid	63
4.9.2 Verifikasi Hasil Transformasi dengan Teknik PCR.....	64
4.10 Pengujian Konstruksi Vektor dengan <i>Particle Bombardment</i>	65
4.11 Uji Histokimia GUS	67
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	70
5.1 Kesimpulan	70
5.2 Saran	70
DAFTAR REFERENSI	71



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.2	Perbedaan butir padi <i>Indica</i> dan <i>Japonica</i>	5
Gambar 2.2.	Perbandingan <i>wildtype</i> dan mutan <i>era1-2</i>	8
Gambar 2.3.1.5	Mekanisme transfer gen pada tanaman dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
Gambar 2.3.2.(1)	Peta vektor biner pCAMBIA 1301	16
Gambar 2.3.2.(2)	Struktur T-DNA pada pCAMBIA 1301	16
Gambar 2.6.	Struktur Biokimia X-gluc	22
Gambar 3.1.	Skema kerja penelitian	37
Gambar 4.1.(1)	Hasil elektroforesis vektor rekombinan klonal pGEM- <i>ERA1</i> yang didigesti dengan <i>Bam</i> HI dan <i>Sa</i> II	39
Gambar 4.1.(2)	Konstruksi gen <i>ERA1</i> yang digunakan sebagai DNA sisipan pada subkloning kedalam vektor ekspresi	40
Gambar 4.2.	Hasil elektroforesis vektor rekombinan pCAMBIA- <i>DREB1A</i> yang didigesti dengan <i>Bam</i> HI dan <i>Sa</i> II	42
Gambar 4.4.1	Hasil transformasi <i>E.coli DH5a</i> dengan kontrol positif dan negatif	45
Gambar 4.5.1. (1)	Pelekatan primer <i>ERA1-F</i> dan <i>ERA1-R</i>	46
Gambar 4.5.1.(2)	Hasil elektroforesis produk PCR terhadap koloni transforman	48
Gambar 4.5.2.(1)	Hasil elektroforesis dari verifikasi produk PCR koloni transforman dengan digesti	50
Gambar 4.5.1.(2)	Ilustrasi kemungkinan vektor rekombinan yang akan terbentuk saat proses ligasi dengan sistem kompetisi	51
Gambar 4.7.1	Hasil elektroforesis verifikasi isolasi plasmid dengan PCR	54
Gambar 4.7.2	Hasil elektroforesis verifikasi isolasi plasmid dengan digesti	55
Gambar 4.8.(1).	Hasil transformasi yang tidak berhasil	60
Gambar 4.8.(2)	Hasil transformasi <i>A. tumefaciens</i> dengan elektroporasi	61
Gambar 4.8. (3)	Konstruksi transformasi gen <i>ERA1</i> ke dalam <i>A. tumefaciens</i>	63
Gambar 4.9.2	Visualisasi kandidat koloni transforman dengan PCR	65
Gambar 4.10	Kalus yang digunakan untuk transformasi dengan <i>Particle bombardment</i>	67
Gambar 4.11	Kalus hasil uji histokimiawi GUS	69

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.2.2 Perbedaan Morfologi dan fisiologi tanaman padi subspecies Indica, Japonica dan Javanica	6
---	---

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi dan cara pembuatan larutan dan <i>buffer</i> yang digunakan dalam penelitian	79
Lampiran 2. Komposisi Media Dasar R2 dan Media AB	81
Lampiran 3. Komposisi Media NB	82
Lampiran 4. Komposisi Media MS	83
Lampiran 5. Perhitungan Persentasi Keberhasilan Ligasi	84

BAB 1 PENDAHULUAN

Padi merupakan sumber makanan pokok hampir dari sepertiga penduduk dunia. Padi berperan dalam menyuplai sekitar 35—60% kebutuhan kalori dari pangan penduduk dunia (Khush 1997: 25). Menurut database *Food and Agriculture Organization* (FAO) 2007 dalam *Current World Rice Trends and IRRI's Strategic Goals for 2007-2015, Indonesia-IRRI Workplan Meeting*, Maret 2007, Indonesia sebagai negara produsen padi ketiga di Asia dengan produksi gabah sebesar 53 juta ton Gabah Kering Giling (GKG), Indonesia menduduki peringkat keenam sebagai negara konsumen dengan penggunaan beras sebesar 128 kg/kapita/tahun. Walaupun demikian, dalam bidang ekspor dan impor Indonesia adalah negara peringkat pertama di Asia sebagai negara importir beras sebesar 1.29 juta ton beras (Puslitbang Tanaman Pangan 2007: 3--5).

Usaha dalam meningkatkan produksi padi terus menjadi prioritas yang tinggi dalam pembangunan dan pengembangan ketahanan pangan di Indonesia (Makarim 2009:14). Akan tetapi, masih terdapat beberapa kendala yang ditemukan dalam meningkatkan usaha tersebut, diantaranya adalah cekaman abiotik. Cekaman abiotik yang secara umum dialami oleh tanaman padi adalah cekaman terhadap kekeringan, salinitas dan hama (Rachmawati 2006:36; Pratama 2010: 1). Kondisi cuaca di Indonesia yang tidak menentu akibat pengaruh pemanasan global menyebabkan cekaman kekeringan menjadi masalah terbesar dalam peningkatan hasil produksi pada tanaman padi (Suardi 2002: 100--101; Makarim 2009 : 14). Salah satu usaha untuk meningkatkan hasil produksi tanaman padi dan agar toleran dalam cekaman kekeringan adalah dengan kegiatan memanipulasi secara genetik dari respon tanaman terhadap hormon asam absisat (ABA) (Wang *dkk.* 2005: 413).

Pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan selain diatur oleh kondisi internal juga diatur oleh kondisi lingkungan. Salah satunya adalah respon terhadap hormon asam absisat (ABA). Asam Absisat memiliki peranan penting dalam proses selular diantaranya perkembangan biji, dormansi, germinasi, pertumbuhan vegetatif, penutupan stomata dan respon terhadap cekaman. Asam absisat disintesis di sebagian besar dari sel tanaman, kemudian asam absisat

disebarkan dari akar ke batang dan resirkulasi dari asam absisat dilakukan pada bagian floem dan xylem. Peran asam absisat yang paling penting adalah dalam proses dormansi dan pemasakan biji serta regulasi dari stomata (Qiagen 2003 :1).

Tumbuhan memiliki perkembangan adaptasi yang berbeda-beda dalam respon terhadap kekeringan. Hampir 90% tumbuhan kehilangan air dari proses transpirasi pada permukaan daun (Pei *dkk.* 1998: 287). Asam absisat merupakan fitohormon yang berperan di dalam membuka dan menutupnya stomata untuk mengurangi kehilangan air pada tumbuhan saat terjadi transpirasi. Tumbuhan secara endogenus akan meningkatkan konsentrasi asam absisat ketika berada dalam kondisi cekaman kekeringan, sehingga stomata akan menutup apabila kadar air dalam tumbuhan sudah dalam kondisi optimal maka konsentrasi asam absisat akan menurun. Proses tersebut akan terjadi secara terus-menerus (Wang *dkk.* 2005: 413).

Respon asam absisat pada tumbuhan saat terjadi cekaman kekeringan akan berlangsung secara cepat sehingga dapat menyebabkan terjadinya penutupan stomata. Stomata pada tumbuhan umumnya terletak dibagian epidermis daun. Stomata merupakan pori-pori yang dapat membuka dan menutup diantara sepasang sel khusus yang disebut dengan sel penjaga. Hormon asam absisat akan meningkatkan sinyal *cascade* pada sel penjaga sehingga menghasilkan penutupan stomata dengan menghambat pembukaan stomata (Qiagen 2003: 1). Oleh karena itu, kemampuan tanaman dalam merespon asam absisat merupakan target penting dalam meningkatkan kemampuan tanaman pertanian yang toleran terhadap cekaman kekeringan.

Sejumlah besar gen pada tanaman telah diketahui dapat meningkatkan dan menurunkan respon terhadap fitohormon terutama hormon asam absisat. Salah satunya adalah gen *Enhanced Response to ABA1 (ERA1)* merupakan gen yang berperan dalam meningkatkan sensitifitas dari sel penjaga pada stomata terhadap asam absisat. Gen *ERA1* pertama kali diisolasi dari tanaman model *Arabidopsis thaliana*. Gen *ERA1* mengkode sub unit β dari enzim farnesyltransferase. Farnesyltransferase merupakan enzim yang berperan dalam respon tanaman terhadap hormon asam absisat (Pei *dkk.* 1998: 287; Wang *dkk.* 2005: 414). Mutan *era1* diidentifikasi berdasarkan pada peningkatan dormansi biji dan kadar asam

absisat yang sangat sedikit. Mutan *eral* menunjukkan adanya peningkatan toleransi terhadap cekaman kekeringan melalui pengurangan intensitas pembukaan stomata dan berkurangnya tingkat layu selama terjadi cekaman kekeringan (Ziegeholfer *dkk.* 2000: 7633).

Transformasi merupakan salah satu kegiatan manipulasi genetik dengan melakukan introduksi DNA rekombinan yang sebelumnya telah disisipkan kedalam vektor ke sel inang yang sesuai. Transformasi umumnya digunakan untuk mengetahui ekspresi dari DNA rekombinan tersebut (Wong 2006: 125). Ekspresi dari suatu gen pada tanaman dapat diketahui dengan melakukan berbagai cara diantaranya adalah mengintroduksi gen target ke dalam kalus padi melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* (Ignacimuthu *dkk.* 2000: 186). Kalus padi yang digunakan adalah kalus padi cv. Taipei 309. Kalus tersebut memiliki kemampuan regenerasi dan transformasi yang tinggi sehingga mudah untuk diregenerasikan menjadi tanaman dan dimasuki gen dengan bantuan *A. tumefaciens* (Purnamaningsih 2006: 76).

Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-BIOGEN) sedang mengembangkan padi yang toleran terhadap cekaman abiotik berupa kekeringan dengan melakukan rekayasa genetik terhadap gen *ERAI*. Gen *ERAI* dari tanaman padi (*Oryza sativa-ERAI* yang kemudian disingkat *OsERAI*) sebelumnya telah berhasil diklona ke dalam vektor kloning pGEM-T *easy* oleh Peneliti di Laboratorium Biologi Molekuler BB-BIOGEN. Akan tetapi, belum diketahui ekspresi dari gen *OsERAI* tersebut. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan terhadap gen *OsERAI* dengan melakukan transformasi gen *OsERAI* ke dalam kalus padi cv. Taipei 309 dengan menggunakan bantuan *A. tumefaciens*.

Penelitian bertujuan untuk melakukan transformasi dan mendapatkan transforman gen *OsERAI* yang ditransformasikan ke kalus padi cv. Taipei 309 dengan menggunakan vektor *A. tumefaciens*. Hipotesis penelitian yaitu gen *OsERAI* dapat ditransformasi ke dalam kalus padi subspecies Japonica cv. Taipei 309 dengan bantuan vektor *A. tumefaciens*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Padi (*Oryza sativa* L.)

2.1.1 Klasifikasi dan Karakteristik Tanaman Padi

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 : *Oryza*
Spesies : *Oryza sativa* L.

Menurut Van Steenis (2005: 98) dan PROTA (2006: 1) karakteristik umum dari tanaman padi adalah rumput berumpun kuat, berumur 1 tahun dengan tinggi 1.5—2 m. Helai daun berbentuk garis panjang sebesar 15—80 cm dan kebanyakan dengan tepi daun yang kasar. Panjang bunga malai sekitar 15—40 cm, tumbuh ke atas dengan ujung yang mengantung serta cabang yang mengantung. Anak bulir beraneka ragam, bakal buah beruang satu berbiji satu. Buah dinamakan buah padi (*caryopsis*).

2.1.2 Tanaman Padi Varietas Japonica cv. Taipei 309

Tanaman padi yang ditanam di Asia dikelompokkan menjadi 3 subspecies berdasarkan pada perbedaan morfologi, fisiologi, biokimia dan molekular, yaitu *Oryza sativa* Indica, *Oryza sativa* Japonica dan *Oryza sativa* Javanica. Ketiga jenis subspecies tersebut biasanya memiliki hubungan dari perbedaan pada habitat tumbuhnya dan produk yang dihasilkan (Bourgis *dkk.* 2008: 353). Padi cv. Taipei

309 (T309) adalah salah satu varietas padi yang termasuk dalam subspecies Japonica. Berdasarkan pada karakteristik morfologi dan fisiologinya, padi dari subspecies Japonica memiliki daun yang berwarna hijau pekat dan ukurannya lebih sempit, butir padi pendek dan membulat dibandingkan dengan butir padi Indica yang lebih panjang dan ramping (Gambar 2.1.2.1), pada lemma dan palea memiliki bulu yang panjang dan struktur butir yang padat, serta kadar amilum sekitar 10—20% (Smith & Dilday 2002: 19). Perbedaan morfologi dan fisiologi antara tanaman padi yang berasal dari subspecies Indica, Japonica dan Javanica dapat dilihat pada tabel 2.1.2.2.



Gambar. 2.1.2. Perbedaan butir padi Indica dan Japonica
[Sumber: Rice Diversity 2010: 1.]

Dalam bidang kultur *in vitro*, tanaman padi cv. T309 memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan varietas lain dari subspecies japonica. Menurut Purnamaningsih (2006: 75—78), padi T309 memiliki respon yang lebih mudah dan responsif dalam induksi kalus secara *in vitro*. Padi T309 juga memiliki regenerasi kalus yang lebih cepat, hal tersebut dikarenakan kandungan poliamin pada padi Japonica lebih tinggi daripada Indica. Poliamin tersebut akan berperan dalam proses pembelahan, pemanjangan dan proliferasi sel. Semakin tinggi kandungan poliamin maka semakin responsif apabila ditumbuhkan secara *in vitro*.

Tabel 2.1.2.2. Perbedaan morfologi dan fisiologi tanaman padi subspecies Indica, Japonica, dan Javanica.

Karakteristik	Indica	Japonica	Javanica
Daun	Lebar hingga sempit	sempit	Lebar dan kaku
Warna daun	Hijau muda	Hijau tua	Hijau muda
Butir padi	Panjang hingga pendek, ramping dan sedikit rata	Pendek dan membulat	Panjang, lebar dan tebal
Bentuk lemma dan palea	Tipis dan rambut pendek	Tebal dan rambut yang panjang	Rambut yang panjang
Jaringan	lunak	keras	keras
Kadar amilum	23—31 %	10—20 %	20—25 %

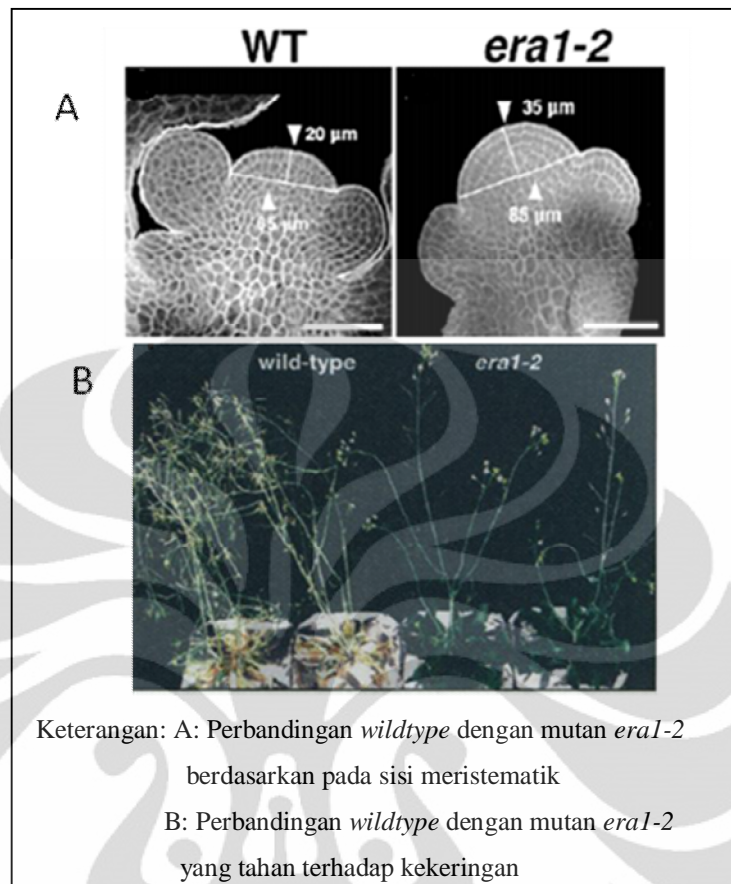
[Sumber: Smith & Dilday 2002: 19.]

2.2 Gen *ERA1* (*Enhanced Response to ABA 1*)

Gen *ERA1* pertama kali diisolasi dari tanaman model *Arabidopsis thaliana* yang berperan dalam meningkatkan sensitifitas dari sel penjaga pada stomata terhadap asam absisat (ABA). Gen *ERA1* mengkodekan dari β -Sub unit dari enzim farnesyltransferase. Farnesyltransferase (FTase) adalah enzim heterodimer pada eukariot yang berperan dalam mengkatalis pelekatan lipid farnesyl dengan daerah C-terminal pada protein target. Protein yang mengalami farnesilasi akan berperan penting dalam pengiriman signal pada khamir dan sel hewan, GTP *binding proteins* dan protein kinase. Farnesyltransferase sudah diidentifikasi secara molekular pada tumbuhan tomat, *pea* dan *Arabidopsis* (Allen *dkk.* 2002: 1649). Farnesyltransferase merupakan enzim yang berperan dalam respon terhadap hormon asam absisat. Berdasarkan pemeriksaan biokimia, ekspresi, aktifitas dan inhibisi dari farnesilasi digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman, termasuk penyebaran nutrisi dan pembelahan sel (Pei *dkk.* 1998: 287; Wang *dkk.* 2005: 414).

Allen (2002:1649) menyebutkan bahwa alel dari mutan *eral1* yang membawa sekitar 7.5 kbp fragmen delesi dari farnesyltransferase (FTase) akan meningkatkan dormansi pada biji terhadap respon asam absisat, tetapi secara endogenus hal tersebut tidak akan mempengaruhi kadar dari asam absisat. Mutasi farnesytransferase pada mutan *era* akan menyebabkan adanya respons hipersensitivitas pada asam absisat dan menutupnya stomata. Oleh karena itu, mutan *eral1* disebut juga sebagai bentuk aplikasi dari inhibitor terhadap farnesyltransferase (FTase) (Pei *dkk.* 1998: 287—288). Akan tetapi, mutasi tersebut juga mampu menyebabkan terjadinya perubahan pada beberapa struktur pertumbuhan dan perkembangan pada tanaman seperti perbungaan yang terhambat, berubahnya struktur apikal dan floral meristem, bertambahnya jumlah organ bunga, dan berkurangnya benih panen meskipun kondisi lingkungan sedang dalam keadaan yang normal (Wang *dkk.* 2005: 414).

Berbagai macam bentuk mutasi dari gen *ERAI* telah banyak diteliti. Cutler *dkk.* (1996: 1239—1241) dan Pei *dkk.* (1998: 287—299) mengemukakan adanya mutan *eral-1*, *eral-2* dan *eral-3* yang menunjukkan pengaruh asam absisat terhadap peningkatan toleransi kekeringan. Pengaruh tersebut berupa peningkatan dormansi biji, peningkatan aktifitas meristem dan berkurangnya intensitas pembukaan stomata sehingga pada saat kekeringan tingkat layu menjadi berkurang (Gambar 2.2). Selain itu, ditemukan pula mutan lain yaitu *eral-4*, *eral-5* dan *eral-6* yang juga menunjukkan adanya peningkatan toleransi tanaman terhadap kekeringan. Mutan-mutan tersebut akan berpengaruh terhadap proses jalur signal dari asam absisat yang meliputi waktu perbungaan, perpanjangan internodus, pembentukan sepal pada bunga (Ziegeholfer *dkk.* 2000: 7633).



Gambar 2.2. Perbandingan *wildtype* dan mutan *era1-2*
[Sumber: Cutler *dkk.* 1996: 1239—1241; Pei *dkk.* 1998: 287—299.]

2.3 Transformasi Gen

Transformasi adalah salah satu teknik dalam bidang biologi molekular untuk mengintroduksi atau menyisipkan fragmen DNA ke sel inang yang sesuai. Fragmen DNA yang telah dikloning disisipkan ke dalam vektor lain, kemudian diintroduksi ke dalam sel inang sehingga terbentuk DNA rekombinan. DNA rekombinan tersebut dapat digunakan untuk perbanyakan dan mempelajari kerja ekspresi dari gen yang terkandung didalam DNA rekombinan (Brown 2006: 56; Wong 1997: 4).

Proses transformasi dapat digunakan dengan berbagai cara tergantung kepada jenis inang dan objek yang akan di transformasi. Transformasi genetik

pada tumbuhan telah banyak dilakukan. Metode transfer gen pada tumbuhan secara garis besar dibagi menjadi dua sistem, yaitu sistem transformasi langsung dan sistem transformasi tidak langsung. Sistem transformasi langsung meliputi kejutan panas (*heat shock*), *particle bombardment*, transfer dengan *polyethylen glycol* (PEG) dan elektroporasi sedangkan sistem transformasi tidak langsung dapat dilakukan dengan menggunakan perantara berupa *A. tumefaciens* (Ignacimuthu *dkk.* 2000: 186; Sharma *dkk.* 2004:104).

2.3.1 Jenis-Jenis Metode Transformasi Gen

2.3.1.1 Kejutan Panas (*heat shock*)

Teknik transformasi kejutan panas (*heat shock*) dilakukan dengan cara pemberian CaCl_2 pada sel bakteri sehingga sel bakteri menjadi kompeten. Sel bakteri yang telah kompeten akan mudah dimasukan DNA rekombinan setelah diberi kejutan panas (Sambrook & Russell 2001:1.25; Wong 2006: 125). Kejutan panas yang diberikan dengan suhu 42°C selama kurang lebih 30 detik dan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu dingin selama kurang lebih 15 menit untuk meningkatkan efisiensi dari transformasi (Singh *dkk.* 2010: 564—566).

2.3.1.2 Elektroporasi

Elektroporasi merupakan salah satu cara melakukan transformasi dengan menggunakan aliran listrik. Elektroporasi berperan untuk meningkatkan efisiensi integrasi DNA pada sel inang. Aliran listrik yang digunakan dalam elektroporasi akan menyebabkan membran sel mengalami kerusakan sementara. Kerusakan pada membran sel karena terbentuknya pori sementara pada lapisan hidrofobik sekitar 2 nm yang membuat struktur membran sel menjadi permeable untuk proses integrasi DNA menuju sitoplasma dalam sel. Aplikasi transformasi dengan elektroporasi dapat dilakukan pada fungi, khamir, sel tumbuhan dan beberapa pada bakteri dan sel hewan (Sambrook & Russell 2001: 1.162; Wong 2006: 126).

2.3.1.3 *Polyethylen glycol* (PEG)

Tenik transfer gen yang termasuk dalam transfer gen secara langsung diantaranya adalah transformasi protoplas. Teknik transformasi protoplas disebut sebagai teknik transfer gen secara langsung karena proses introduksi DNA dilakukan tanpa melalui perantara (O'Neill *dkk.* 1993: 729). Transformasi protoplas umumnya dilakukan pada tanaman monokotil jenis serealia. Teknik tersebut menggunakan perantara berupa senyawa *polyethylen glycol* (PEG). Senyawa *polyethylen glycol* tersebut akan menjadi perantara masuknya DNA kedalam kromosom tanaman. Keberhasilan teknik transformasi dengan PEG masih rendah karena regenerasi protoplas sangat bergantung pada jenis genotipe yang dipakai dan tidak dapat diaplikasikan pada semua tanaman (Loedin 1994: 66).

2.3.1.4 *Particle Bombardment* (*Biolistic*)

Particle bombardment atau disebut juga *biolistic* merupakan metode transfer gen yang digunakan untuk melakukan transformasi terhadap sel secara *in situ*. DNA target akan diletakkan diatas permukaan emas sekitar 0.5—1.5 μm . DNA tersebut kemudian akan dilakukan penembakan dengan alat yang disebut *gene gun*. *Gene gun* akan menembak dengan adanya tekanan yang tinggi. DNA yang sudah terlapisi dengan emas akan masuk kedalam jaringan tumbuhan dan melakukan integrasi kedalam DNA kromosom secara acak. Jaringan tumbuhan tersebut akan diregenerasi dengan kultur jaringan hingga menjadi plantlet (Wong 2006: 126)

2.3.1.5 *Agrobacterium tumefaciens*

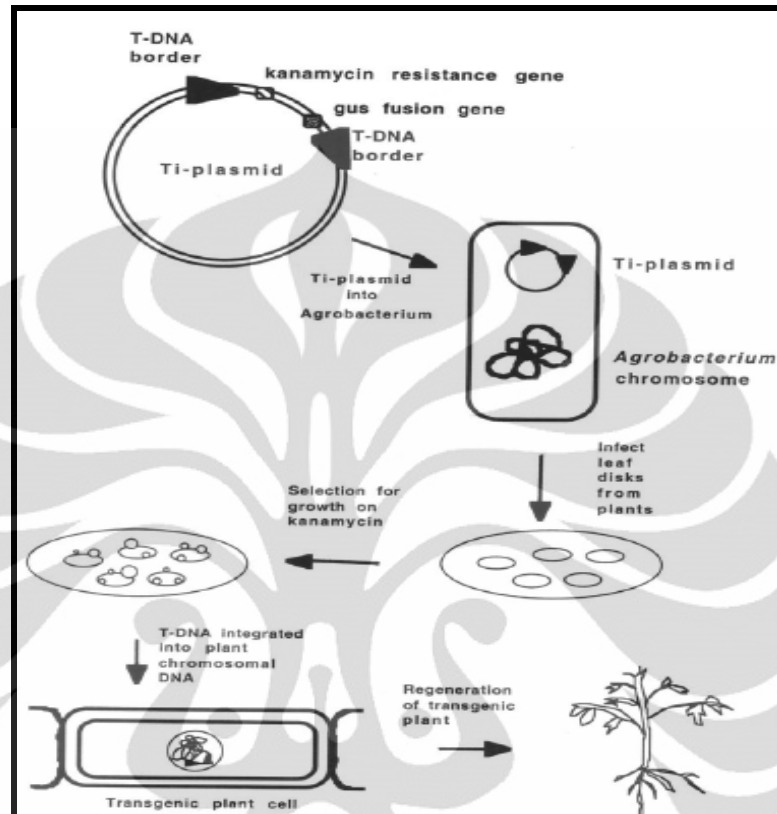
Agrobacterium tumefaciens merupakan bakteri tanah gram positif yang bersifat fitopatogen pada tanaman dikotil. Bakteri tersebut secara alami mempunyai kemampuan untuk mentransfer potongan DNA yang kemudian dikenal dengan T-DNA (transfer DNA) ke dalam genom tanaman dan

menyebabkan terbentuknya tumor (*crown gall*). Tumor tersebut merupakan mesin penghasil makanan atau sebagai sumber karbon bagi *A. tumefaciens* (Rachmawati 2006 : 36; Primrose *dkk.* 2001: 224). Terdapat tiga komponen genetik penting terlibat dalam proses pembentukan tumor. Pertama, gen virulen kromosom (*chromosomal virulence* disingkat *chv*), yang terdapat pada kromosom *A. tumefaciens* dan berfungsi dalam pelekatan bakteri dengan sel tanaman. Kedua, sekelompok gen virulen (*vir*) yang terdapat dalam plasmid Ti yang berukuran besar (~200 kb) yang berperan dalam menginduksi transfer dan integrasi T-DNA. Komponen ketiga adalah daerah T-DNA yang juga terletak pada plasmid Ti. Daerah T-DNA, dibatasi oleh LB (*left border*) dan RB (*right border*), mengandung gen penting bagi *A. tumefaciens* (Sharma *dkk.* 2005: 103; Rachmawati 2006 : 36).

Bakteri melakukan integrasi ke dalam jaringan tanaman melalui luka. Jaringan tanaman dikotil yang terluka menghasilkan senyawa fenolik (asetosiringon) dan monosakarida (glukosa, galaktosa) yang menginduksi transkripsi sejumlah gen *vir* kemudian dilakukan penyisipan gen-gen yang ada pada daerah T-DNA. T-DNA tersebut diinfeksi ke jaringan tanaman berupa eksplan atau organ tanaman lain dan hasilnya diseleksi menggunakan antibiotik. T-DNA yang sudah berintegrasi dalam kromosom tanaman akan membentuk tanaman transgenik (Gambar 2.3.1.5). Kemampuan *A. tumefaciens* tersebut kemudian digunakan untuk menyisipkan gen bermanfaat ke dalam tanaman seperti gen yang berperan dalam perbaikan sifat (de La Riva 1998: 1—2; Rachmawati 2006 : 36).

Transformasi dengan *A. tumefaciens* memiliki beberapa keuntungan, seperti mudah dilakukan, integrasi kedalam genom DNA yang stabil, efisiensi transformasi yang cukup tinggi (Sharma *dkk.* 2004:104; Asaduzaman *dkk.* 2008: 530). Transformasi dengan *A. tumefaciens* juga memiliki efisiensi transformasi dengan salinan gen tunggal yang dihasilkan lebih tinggi. Gen dengan salinan tunggal lebih mudah dianalisa dan biasanya bersegregasi mengikuti pola pewarisan Mendel sehingga tanaman transgenik yang dihasilkan memiliki ekspresi yang stabil. Akan tetapi, keberhasilan transformasi *A. tumefaciens* masih

terbatas pada genotipe tanaman tertentu (Ignacimuthu *dkk.* 2000: 187; Rachmawati 2006: 36)



Gambar 2.3.1.5. Mekanisme transfer gen pada tanaman dengan *A. tumefaciens*.
[Sumber: Karcher 2002: 35.]

2.3.1.5.1 Faktor-Faktor yang mempengaruhi Keberhasilan Transformasi Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*

Faktor yang mempengaruhi keberhasilan dalam proses transformasi gen menggunakan *A. tumefaciens* adalah

1. Genotipe dari jaringan tanaman atau eksplan yang digunakan

Keberhasilan transformasi menggunakan *A. tumefaciens* sangat bergantung kepada genotipe tanaman yang digunakan. Azhakanandam (2000: 430—431) menyebutkan bahwa pada tanaman padi yang berasal dari subspecies Japonica umumnya lebih mudah untuk ditransformasi daripada padi yang berasal dari subspecies Indica. Genotipe yang lebih responsif terhadap induksi dalam kultur

jaringan cenderung akan dapat memberikan respon yang lebih baik dalam transformasi menggunakan *A. tumefaciens*.

2. Strain *A. tumefaciens*

Pemilihan strain *A. tumefaciens* mempengaruhi efisiensi transformasi. Strain *A. tumefaciens* yang tepat akan meningkatkan efisiensi transformasi dengan memperluas daerah infeksi dari tanaman. Hal tersebut berpengaruh pada tingkat virulensi dari strain *A. tumefaciens* yang digunakan. Beberapa strain dari *A. tumefaciens* yang umum digunakan dalam transformasi adalah LBA 4404, EHA 101 dan EHA 105 (Rachmawati 2006: 40).

3. Asetosiringon

Asetosiringon merupakan bahan kimia yang berfungsi dalam induksi gen *vir* pada infeksi *A. tumefaciens* kedalam jaringan tanaman. Penambahan asetosiringon sangat penting untuk transformasi tanaman padi karena tanaman padi tidak menghasilkan asetosiringon. Tanpa penambahan asetosiringon transformasi tidak akan berhasil meskipun menggunakan strain yang super virulen atau vektor super biner (Rachmawati 2006: 40). Opodebe (2006: 17) menyebutkan jika asetosiringon tidak ditambahkan dalam media ko-kultivasi maka akan menyebabkan ekspresi gen sementara dengan uji histokimia GUS menjadi rendah.

4. Antibiotik untuk Mengeliminasi *A. tumefaciens*

Penggunaan antibiotik pada proses transformasi dengan *A. tumefaciens* merupakan proses penting dalam mencapai keberhasilan transformasi. Antibiotik digunakan dalam media ko-kultivasi, media seleksi dan media regenerasi. Penambahan antibiotik pada media tersebut untuk menghindari pertumbuhan yang berlebihan dari *A. tumefaciens*. Beberapa antibiotik yang umum digunakan dalam transformasi adalah karbenisilin dan cefotaxim. Kedua antibiotik tersebut menghambat pembentukan dinding sel dari bakteri. Cefotaxim memiliki efektivitas lebih tinggi dalam menghambat pembentukan dinding sel bakteri daripada karbenisilin. Akan tetapi penggunaan cefotaxim pada media regenerasi

akan menghambat pertumbuhan dan regenerasi kalus sehingga mempengaruhi transformasi (Rachmawati 2006: 41).

5. Ekspresi dan Stabilitas Gen dari Transforman yang Dihasilkan

Gen yang telah terintegrasi di dalam genom tanaman seharusnya bersifat stabil saat diwariskan pada generasi berikutnya. Akan tetapi, kestabilan dari gen tersebut sering tidak terjadi. Rashid *dkk.* (1996: 727—730) menyebutkan bahwa salah satu penyebab dari ketidakstabilan gen yang diwariskan adalah terjadinya pembungkaman gen (*gene silencing*). Pembungkaman gen menyebabkan tidak terjadinya ekspresi dari gen yang telah tersisipi.

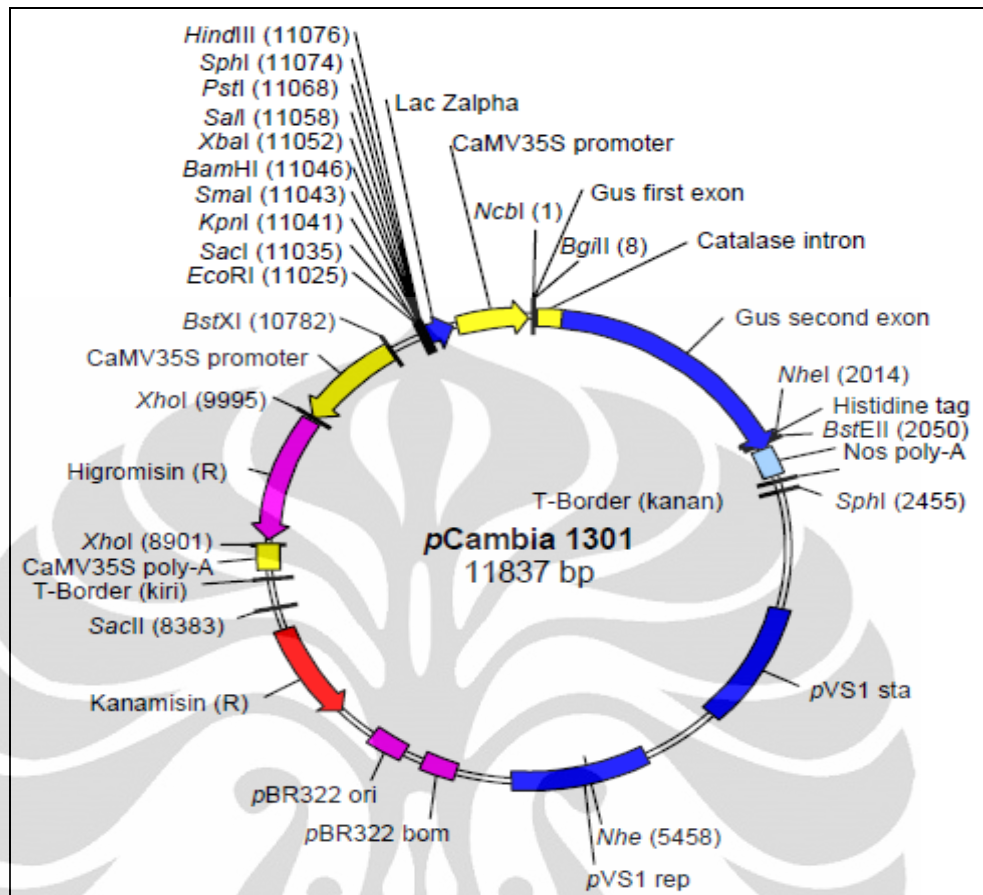
2.3.2 Vektor Pada Transformasi Gen

Vektor merupakan molekul DNA yang berperan dalam membawa gen target ke dalam sel inang dan berintegrasi dalam genom sel inang. Vektor berfungsi sebagai molekul pembawa fragmen DNA yang akan dimasukkan ke dalam sel inang (Nicholl 2002: 57). Vektor memiliki beberapa karakteristik yang khas diantaranya adalah memiliki titik *Origin Of Replication (ORI)*, penanda selektif dan satu atau lebih situs restriksi agar fragmen DNA dapat disisipkan ke dalam vektor. Beberapa jenis vektor yang umum digunakan adalah plasmid, *cosmid* dan *bacteriophage* (Primrose *dkk.* 2001: 43).

Vektor pada proses transformasi dapat digunakan sebagai vektor kloning dan vektor ekspresi. Vektor kloning merupakan vektor yang digunakan untuk memperbanyak dalam pengklonaan gen (Madigan *dkk.* 2009: 334—335). Vektor ekspresi digunakan untuk memastikan proses translasi dan transkripsi berlangsung pada gen asing yang disisipkan ke dalam sel inang. Pada vektor ekspresi terdapat beberapa sekuen tambahan yang dibutuhkan dalam proses translasi dan transkripsi tersebut selain titik *ORI*, penanda selektif dan situs restriksi. Sekuen tersebut adalah promoter, fragmen DNA yang akan di translasi, inisiator dan terminator transkripsi pada prokariot, dan sekuen pengatur transkripsi seperti gen regulator dan operator (Lodge *dkk.* 2007: 40).

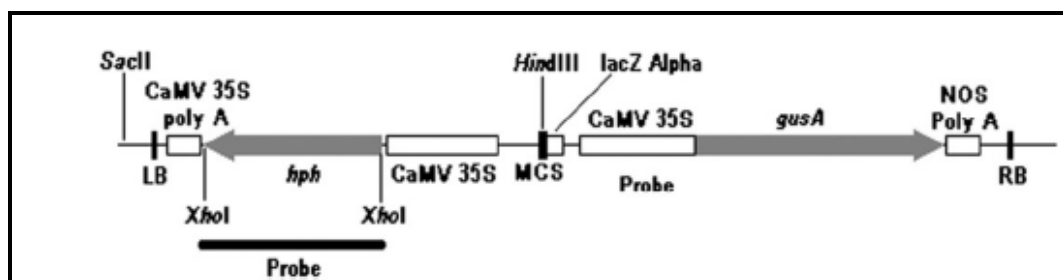
Transformasi tanaman dengan *A. tumefaciens*, memiliki beberapa jenis sistem vektor diantaranya adalah *binary vector* (vektor biner) dan *cointegrate vector*. Dibandingkan dengan sistem *cointegrate*, *binary vector* merupakan sistem yang paling banyak digunakan karena plasmid yang mengandung T-DNA menjadi lebih kecil dan mudah dimanipulasi secara *in vitro* (Rachmawati 2006 : 37). Sistem *binary vector* menggunakan dua jenis vektor, satu vektor yang mengandung gen *vir* (plasmid Ti) disebut *helper* plasmid dan vektor yang lain mengandung T-DNA dengan gen yang disisipkan disebut plasmid donor. Plasmid donor biasanya berasal dari *Escherichia coli* dan *A. tumefaciens* untuk *helper* plasmid. Kedua plasmid tersebut bersifat saling berkomplemen. Plasmid donor harus memiliki titik ORI terhadap *E.coli* dan *A. tumefaciens*, marka seleksi untuk bakteri dan tanaman, sekuen *T-DNA border* dan situs pengenalan untuk menyisipkan gen target (Wong 2006: 108—110). Salah satu contoh dari vektor biner adalah pCAMBIA 1301.

Vektor ekspresi pCAMBIA-1301 (Gambar 3.3.1.2 (1)) merupakan salah satu vektor biner dengan bentuk DNA sirkular. Letak dari pCAMBIA adalah pada lokus AF234297 dan memiliki ukuran 11837 pb. Ekson terletak pada pasangan basa pada range 9—11.844, sedangkan intron terletak pada range pasangan basa 10—199 (NCBI 2008:1). Promoter pada pCAMBIA berupa *Cauliflower Mosaic Virus* 35S atau CaMV35S dan terminator berupa *Nopaline synthase* (NOS). Vektor pCAMBIA 1301 memiliki struktur *T-border right* dan *T-border left* dengan ukuran 5607 pb yang menunjukkan bahwa plasmid tersebut dapat digunakan dalam proses transformasi dengan bantuan bakteri *A. tumefaciens* (Gambar 3.3.1.2 (2)). Marka seleksi pCAMBIA 1301 adalah antibiotik kanamisin untuk seleksi bakteri dan higromisin untuk seleksi tanaman (Cambia Labs 2006: 5).



Gambar 2.3.2.(1). Peta vektor biner pCAMBIA 1301
[Sumber : Listanto *dkk.* 2005: 46.]

pCAMBIA 1301 memiliki situs pelapor berupa *gusA* yang dapat digunakan untuk menganalisis fungsi atau kehadiran gen pada tumbuhan dengan *GUS assay*. *gusA* berasal dari *E.coli gusA* dengan sebuah intron didalamnya yang berisi sekuen pengkode untuk memastikan adanya ekspresi dari aktifitas enzim glucoronidase yang diperoleh dari sel eukariot. Gen pelapor *gusA* diklona ke dalam plasmid agar gen target mudah untuk disisipi, walaupun gen target tersebut sudah mengandung promoter dan terminator sendiri (Cambia Labs 2006: 8).



Gambar 2.3.2.(2). Struktur T-DNA pada pCAMBIA1301
[Sumber:Kumar *dkk.* 2005: 69.]

2.3.3 Tahapan Dalam Proses Transformasi Gen

2.3.3.1 Penyisipan Fragmen DNA ke dalam Vektor

Fragmen DNA target sebelum disisipkan ke dalam vektor dipotong terlebih dahulu menggunakan enzim restriksi. Enzim tersebut memotong DNA pada situs yang spesifik karena enzim restriksi dapat mengenali situs pengenalan yang dimiliki oleh DNA (Gardner & Mertens 1991: 359). Daerah pemotongan tersebut dinamakan situs restriksi. Situs restriksi setiap enzim berbeda-beda dan bersifat spesifik (Fairbanks & Andersen 1999: 256). DNA target dan vektor dipotong dengan enzim restriksi yang sama, sehingga akan menghasilkan ujung pemotongan yang sama agar dapat disatukan.

Jenis pemotongan enzim restriksi terdiri atas dua, yaitu *sticky ends* dan *blunt ends*. *Sticky ends* memotong fragmen DNA tidak tepat pada daerah tengah DNA, sehingga menghasilkan ujung potongan DNA yang tidak rata atau bertangga. *Blunt ends* memotong tepat di daerah tengah fragmen DNA dan membagi sekuens palindrom menjadi dua bagian yang sama, sehingga menghasilkan ujung yang rata (Weaver 1999: 65).

DNA target dan vektor yang telah dipotong kemudian disatukan menggunakan enzim ligase. Enzim ligase merupakan enzim utama dalam replikasi dan perbaikan DNA. Enzim ligase juga digunakan dalam proses rekombinasi DNA, enzim ligase bekerja setelah terjadi penggabungan antara kedua fragmen DNA yang dipotong. Penggabungan fragmen-fragmen DNA dapat dibuat permanen dengan enzim ligase dalam proses rekombinasi DNA, karena enzim tersebut berfungsi mengkatalis pembentukan ikatan kovalen yang menyambung ujung-ujung fragmen DNA yang dipotong (Campbell *dkk.* 2002: 390—391). Hasil dari penyatuan kembali antara DNA target dan vektor membentuk vektor rekombinan.

2.3.3.2 Introduksi Vektor Rekombinan ke dalam Sel Inang

Sel inang merupakan sistem kehidupan yang digunakan sebagai tempat terjadinya pengklonaan gen. Sel inang berfungsi sebagai tempat produksi (kloning) DNA rekombinan ataupun tempat produksi protein rekombinan yang dimaksud. Sel inang yang digunakan dapat berupa sel prokariot atau sel eukariot. Karakteristik sel inang yang dapat digunakan dalam subkloning antara lain pertumbuhannya cepat, bukan patogen, dan mampu diintroduksi oleh bermacam-macam gen (Nicholl 2002: 57).

Proses introduksi dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya adalah teknik kejutan panas dan elektroporasi. Teknik transformasi kejutan panas (*heat shock*) dilakukan dengan cara pemberian CaCl_2 pada sel bakteri sehingga sel bakteri menjadi kompeten. Sel bakteri yang telah kompeten akan mudah dimasukan DNA rekombinan setelah diberi kejutan panas (Sambrook & Russell 2001:1.25; Wong 2006: 126—127). Elektroporasi merupakan salah satu cara melakukan transformasi dengan menggunakan aliran listrik. Aliran listrik yang digunakan dalam elektroporasi akan menyebabkan membran sel mengalami kerusakan sementara sehingga membuat strukturnya menjadi permeable untuk proses integrasi DNA (Wong 2006: 126).

2.3.3.3 Seleksi Klon Pembawa Gen Target

Hasil dari transformasi akan terbentuk koloni sel yang dinamakan klon atau transforman. Klon tersebut ada yang merupakan klon pembawa gen target ada juga yang merupakan klon bukan pembawa gen target. Oleh karena itu, seleksi klon perlu dilakukan untuk mendapatkan klon yang mengandung gen target. Salah satu cara seleksi klon pembawa gen target adalah dengan uji resistensi terhadap antibiotik (Brooker 2005: 493; Nicholl 2002: 133—135).

2.4 Polymerase Chain Reactions (PCR)

Teknik PCR merupakan teknik perbanyakannya suatu fragmen DNA menjadi fragmen-fragmen yang sangat banyak. Penggunaan metode PCR dapat menghasilkan fragmen DNA sebesar 200.000 kali setelah siklus reaksi selama 220 menit (Yuwono 2006: 1). Prinsip dasar dari teknik PCR adalah perbanyakannya segmen DNA spesifik dengan adanya enzim DNA polimerase (Wolfe 1993: 137). Metode PCR berdasar pada amplifikasi atau perbanyakannya fragmen DNA dengan menggunakan enzim DNA polimerase dan primer oligonukleotida yang menghibridisasi ke untai lainnya dari sekuens spesifik yang akan diperbanyak (Klug & Cummings 1994: 402). Komponen-komponen yang diperlukan dalam pelaksanaan PCR adalah DNA template, DNA polimerase, *Deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs), *divalents cations*, pH Buffer, dan primer (Sambrook & Russell 2001: 8.4; Yuwono 2006: 6--7).

Siklus PCR terbagi atas 3 tahap yaitu Denaturasi merupakan suatu proses pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal. Suhu yang digunakan dalam tahap denaturasi berkisar antara 93--95°C. Denaturasi DNA dilakukan dengan selama 1--2 menit. *Annealing* merupakan tahapan penurunan suhu dilakukan setelah denaturasi menjadi 55°C sehingga primer akan menempel pada DNA cetakan yang telah terpisah menjadi rantai tunggal. Primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuens yang komplementer dengan sekuens primer. Proses *annealing* umumnya dilakukan selama 1--2 menit. Polimerasi dengan kembali menaikkan suhu inkubasi menjadi 72°C selama 1,5 menit. DNA polimerase akan melakukan proses polimerasi rantai DNA yang baru berdasarkan informasi yang ada pada DNA cetakan. Rantai DNA yang baru akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan. Rantai DNA yang baru tersebut selanjutnya akan berfungsi sebagai DNA cetakan bagi reaksi polimerasi berikutnya. (Sambrook & Russell 2001: 8.8—8.9; Yuwono 2006: 2—3).

Ketiga tahapan dari proses PCR diulangi sampai 25—30 siklus sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul-molekul DNA rantai ganda yang baru hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan

jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target pada awal reaksi dan efisiensi perpanjangan dan amplifikasi primer (Yuwono 2006: 3).

2.5 Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu proses perpindahan berbagai partikel seperti ion, makro molekul dan unsur protein dengan memanfaatkan respon dari media listrik. Prinsip kerja dari elektroforesis adalah pergerakan partikel-partikel bermuatan negatif (anion), yang bergerak menuju kutub positif (anoda), sedangkan partikel-partikel bermuatan positif (kation) akan bergerak menuju kutub negatif (katoda) (Klug & Cummings 1994: 397). Asam nukleat bersifat asam karena pada bagian gugus fosfat akan berikatan dengan ion H^+ , sehingga DNA atau RNA bermuatan negatif (Martin 1996: 3).

Elektroforesis sangat berkaitan dengan medium gel. Gel yang biasa digunakan dalam elektroforesis adalah agarosa dan poliakrilamid (Wolfe 1993: 126). Agarosa merupakan kompleks polimer yang mengandung gula galaktopiranosida kompleks dengan sulfat dan ester piruvat. Poliakrilamid dibuat dari polimerisasi monomer akrilamid dan bisakrilamid. Gel poliakrilamid dipolimerisasi karena kehadiran dari N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED) sebagai katalisator dan ammonium persulfat (APS) sebagai inisiator. TEMED mengkatalis pembentukan radikal bebas dan APS yang akan menginisiasi polimerisasi (Winfrey *dkk.* 1997: 287—289).

Elektroforesis membutuhkan larutan buffer untuk membuat pH dalam kondisi stabil. Larutan buffer yang umum digunakan dalam elektroforesis adalah *loading buffer* dan *running buffer*. *Loading buffer* merupakan larutan yang akan dicampur dengan fragmen DNA. *Loading buffer* mengandung sukrosa, bromfenol biru dan EDTA. *Running buffer* yang digunakan dalam elektroforesis sebaiknya sama dengan pelarut serbuk agarosa agar kestabilan pH tetap terjaga. TAE (*Tris Base-Acetic acid-EDTA*) dan TBE (*Tris Base-Boric Acid-EDTA*) merupakan larutan buffer yang biasa digunakan sebagai *running buffer* (Birren & Lai 1993: 76—78; Davis *dkk.* 1994: 152—154).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan migrasi molekul dalam gel antara lain ukuran molekul, struktur atau konformasi molekul DNA, densitas muatan, konsentrasi gel, dan kuat medan listrik (voltase) pada matriks gel. Molekul yang berukuran lebih kecil memiliki pergerakan atau migrasi yang lebih cepat, karena matriks gel mengandung jaringan kompleks berupa pori-pori sehingga molekul-molekul tersebut dapat bergerak melalui matriks tersebut. Molekul DNA yang bentuk *supercoiled* lebih cepat bermigrasi dibandingkan dengan molekul DNA berbentuk linear sedangkan molekul DNA yang bentuk *nicked* lebih cepat bermigrasi daripada bentuk linear tetapi lebih lambat dari bentuk *supercoiled*. Molekul DNA yang memiliki densitas tinggi akan melakukan migrasi lebih cepat sedangkan molekul dengan densitas rendah lebih lambat dalam pergerakan migrasi. Gel yang memiliki konsentrasi tinggi dapat melewati molekul DNA yang berukuran kecil sedangkan gel dengan konsentrasi rendah hanya akan melewati DNA yang berukuran lebih besar. Elektroforesis memerlukan arus sebagai media dalam migrasi molekul DNA. Voltase yang lebih tinggi akan mempercepat pergerakan molekul daripada voltase yang rendah (Sambrook & Russell 2001: 5.5—5.6).

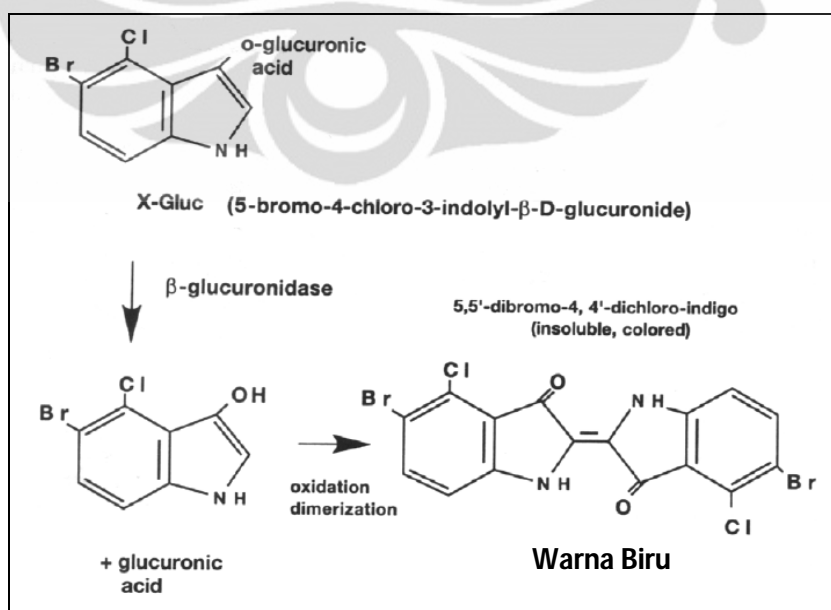
2.6 Gen *gus* Sebagai Gen Pelapor (*reporter*)

Gen *gus* merupakan gen *reporter* pada gen asing setelah dilakukan transformasi pada tanaman. Secara normal, gen *gus* tidak terdapat pada kebanyakan jaringan tumbuhan tinggi. Sensitifitas *assay* pada gen *gus* dapat digunakan dalam proses verifikasi transformasi pada jaringan tumbuhan. *Histochemical assay* dari gen *gus* diketahui dari jaringan tumbuhan dengan ekspresi yang terbentuk akibat adanya aktifitas enzim (OĞRAŞ 1999: 298). Oleh karena itu, gen *gus* digunakan sebagai alat bantu untuk mendeteksi ekspresi gen pada tanaman.

Gen *gusA* merupakan gen yang mengkode β -glucuronidase. Menurut Wilson dkk. (1992:27), gen *gusA* ditemukan pada *E.coli* sebagai bagian dari operon pada bakteri tersebut. Bagian hulu dari gugus gen *gusA* terdapat pula gen *gusB* dan *gusC*. Gen *gusB* merupakan gen yang mengkode glucoronide-permease

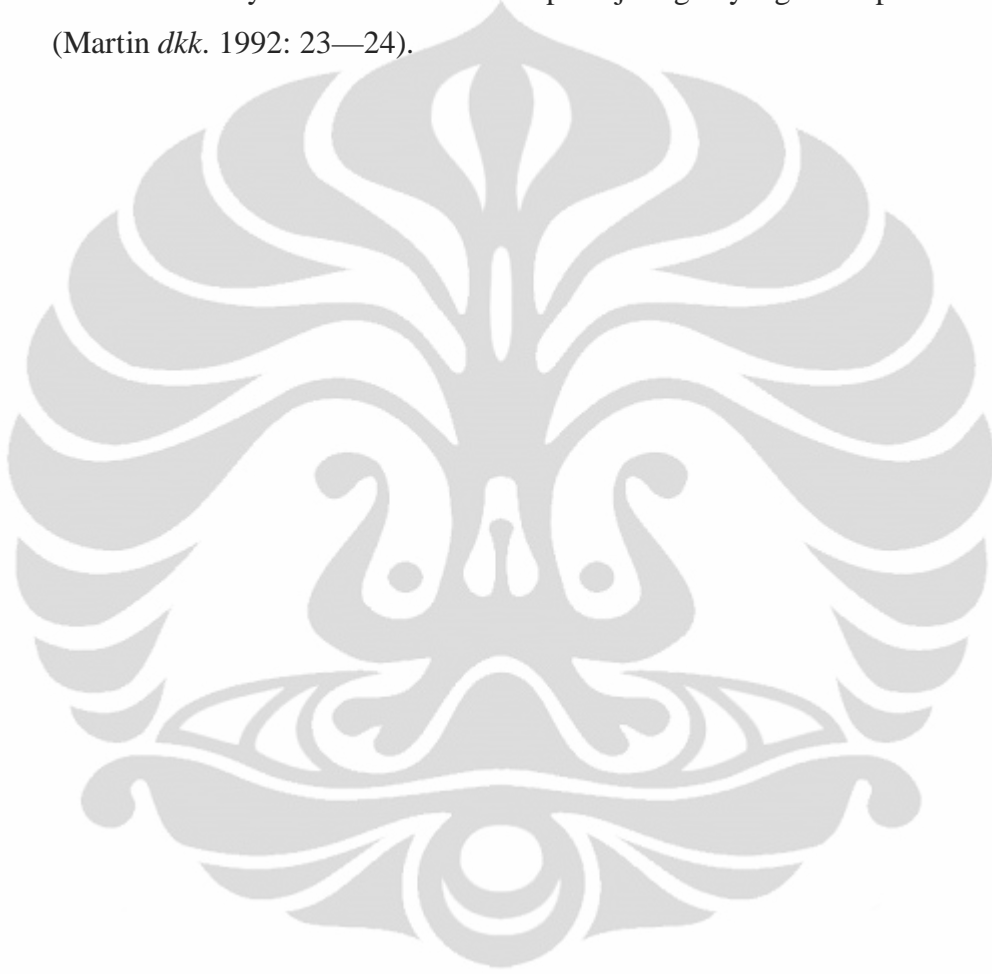
untuk membantu dalam penyerapan substansi *glucoronide* yang spesifik, sedangkan *gusC* masih belum diketahui fungsinya. Bagian hilir dari gugus gen *gusA* terdapat gen *gusR* yang disebut sebagai represor spesifik pada operon *gus*. *gusR* dapat menghambat penempelan dari β -glucoronide pada promoter sehingga *gusA* tidak dapat melakukan transkripsi dan tidak terbentuk β -glucoronidase.

Eksresi dari gen *gus* dapat dideteksi dengan substrat flourogenik dan substrat chromogenik. *Xgluc* (*5-bromo-4-chloro-3-indol- β -glucoronic acid*) adalah substrat chromogenik yang paling efisien. *Xgluc* tersebut digunakan dalam *hictochemical assay* dengan bantuan aktifitas enzim β -glucoronidase. Enzim β -glucoronidase akan mengubah *Xgluc* menjadi *bromo-chloro-indigo* dan asam glukoronik kemudian dengan proses dimerisasi oksidasi akan membentuk produk akhir berupa senyawa *5,5'-dibromo-4,4'-dikloro-indigo* (Gambar 2.6). Struktur tersebut akan menyebabkan adanya presipitasi berwarna biru (Stomp 1992: 103—104). Di sisi lain, *hictochemical assay* dari gen *gus* yang menggunakan substrat flourogenik akan menghasilkan aktifitas gen *gus* secara kuantitatif. Substrat yang digunakan adalah *4-MUG* (*methyl umbelifery- β -D- glucoronic*) yang menghasilkan produk flourogenik yaitu *4-MU* (*4-methyl umbeliferone*). *4-MU* akan berperan dalam meningkatkan daya fluoressen dengan panjang gelombang tertentu (OĞRAŞ 1999: 298).



Gambar 2.6. Struktur biokimia Xgluc [Sumber: Karcher 2002: 34.]

Penggunaan gen *gus* sebagai gen *reporter* memiliki beberapa keuntungan, diantaranya adalah tidak memerlukan waktu yang lama dan tidak bersifat radioaktif. Hasil dari pengujian dengan gen *gus* dapat mengetahui tingkat ekspresi dari gen *gus* terhadap jaringan tanaman dan kepekaan dari jaringan atau organ yang terekspresi. Kekurangan dari uji GUS yaitu bersifat dekstruktif karena toksik dan menyebabkan kematian sel pada jaringan yang terkespresi oleh gen *gus* (Martin *dkk.* 1992: 23—24).



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 Cimanggu, Bogor selama 5 bulan (Januari—Mei 2011).

3.2 Bahan

3.2.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah fragmen cDNA dari gen *ERA1* yang sebelumnya telah diisolasi tanaman padi varietas Nipponbare yang telah disisipkan kedalam vektor kloning pGEM-T *easy*.

3.2.2 Kalus-Kalus Embriogenik

Kalus embriogenik dari tanaman padi yang digunakan untuk transformasi adalah kalus dari padi cv. Taipei 309 yang ditumbuhkan dalam media NB (Lampiran 3). Kalus embriogenik tersebut telah disiapkan oleh peneliti di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.

3.2.3 Kultur bakteri

Kultur bakteri yang digunakan dalam subkloning adalah *Escherichia coli* DH5 α yang ditumbuhkan dalam medium Luria Bertani padat. Strain bakteri *A. tumefaciens* yang digunakan dalam proses transformasi adalah LBA 4404 dalam vektor biner *pCAMBIA 1301-OsERA1*

3.2.4 Vektor ekspresi

Vektor ekspresi yang digunakan untuk transformasi genetik tanaman adalah vektor biner *pCAMBIA 1301*.

3.2.5 Primer

Primer yang digunakan dalam proses PCR adalah :

ERA1- F : 5' GGATCCGCACATGTTTCGCCGCCTTTTCGGT 3'

ERA1- R : 5' GTCGACACTAGCTTGAAAAGAAGACTCATAGG 3'

3.2.6 Larutan, *Buffer*, Medium dan Media

Larutan, *buffer* dan medium beserta komposisi yang digunakan dalam penelitian terdapat pada Lampiran 1 dan komposisi media terdapat pada Lampiran 2, 3 dan 4.

3.2.7 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan yaitu *loading dye*; bubuk agarosa [Amresco]; etidium bromida [Sigma]; sodium dodesil sulfat [Promega]; asam klorida (HCl) [Merck]; Natrium oksida (NaOH) [Merck]; Magnesium Klorida (MgCl₂) [Merck]; asam asetat glacial [Merck]; enzim *Bam*HI dan *Sal* I [Roche Diagnostic GmbH]; *buffer Bam*HI dan *Sal* I [Roche Diagnostic GmbH]; marka 1 kb DNA Ladder Plus 1 µg/µl [Invitrogen]; PCR kit [FastStart Roche], *QIA quick gel extraction kit* [Qiagen]; tisu [Tessa]; aluminium foil [Reynold Wrap]; RNase [Invitrogen]. Larutan-larutan dan *buffer* yang digunakan selama penelitian adalah Tris-Cl 1M; TE pH 8; TAE 50x; TAE 1x; gel agarosa 1% dan 1.2%; solution I; solution II; solution III; larutan kalsium klorida (CaCl₂); serta medium Luria Bertani (LB) padat dan cair.

3.3 PERALATAN

Peralatan yang digunakan yaitu pipet mikro [Pipet Men] ukuran 2 µl –1 ml; voltase elektroforesis [Hoefer]; pipet tips [Axygen]; perangkat dokumentasi [BioRad ChemiDoc]; *laminar air flow cabinet* [Esco]; *microwave* [Sanyo]; Inkubator 37°C [EYELA]; *incubator shaker* [Shaker GFL]; PCR [DNA Engine Tetrad]; sentrifugasi [Beckman]; timbangan digital [Kern 770]; *Aparatus elektroforesis gel agarosa* [BioRad]; sarung tangan [Sensi Gloves]; lemari es

[LG]; Spektrofotometer [BioRad SmartSpec Plus]; elektroporator [BIO RAD MicroPulser System], Software [Quantity one]; vorteks [Genie2]; *water bath* [Barn Stead thermolyne]; mortar; spatula; pinset dan peralatan gelas berbagai ukuran [Duran, Iwaki, Pyrex] yang umum digunakan pada Laboratorium Biologi Molekuler BB BIOGEN.

3.4 CARA KERJA

3.4.1 Subkloning Gen *ERA1* Ke pCAMBIA 1301

3.4.1.1 Digesti pGEM-T-*ERA1* dan pCAMBIA1301 dengan enzim restriksi *BamHI* dan *SaII*

Subkloning gen *ERA1* dari vektor kloning pGEM-T *easy* ke vektor ekspresi pCAMBIA 1301 dilakukan dengan proses digesti pGEM-*ERA1* yang menggunakan dua enzim restriksi yaitu *SaII* dan *BamHI*. Komposisi dari reaksi digesti dengan enzim *SaII* terdiri dari 13 μ l MQ water, 2 μ l *buffer* restriksi, 2 μ l enzim *SaII* dan 3 μ l DNA sampel hasil isolasi plasmid yang dimasukkan dalam tabung polipropilen 0.5 ml. Total campuran digesti adalah 20 μ l, kemudian di inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C 16—18 jam. Setelah selesai diinkubasi, campuran kemudian diinkubasi pada 65°C selama 15 menit untuk in-aktivasi enzim yang pertama. Setelah itu, dilakukan digesti yang kedua dengan menambahkan 2 μ l *buffer* restriksi dan 2 μ l enzim restriksi *BamHI* kemudian diinkubasi kembali pada inkubator dengan suhu 37°C 16—18 jam. Pengecekan hasil digesti dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1 %, pada 80 v selama 45 menit. Hasil sampel yang terdigesti dengan sempurna ditunjukkan dengan terbentuk dua pita yang masing-masing berukuran sekitar 3000 pb dan 1400 pb.

3.4.1.2 Ligasi fragmen *ERA1* kedalam vektor biner pCAMBIA 1301

Hasil digesti yang positif kemudian di ligasi ke dalam vektor ekspresi pCAMBIA1301. Komposisi larutan dalam reaksi ligasi adalah MQ water 4 μ l, 2

µl 10x *buffer* T4 DNA ligase, 3 µl fragmen vektor pCAMBIA1301 hasil digesti *Bam*HI dan *Sal*I, 2 µl T4 ligase dan 9 µl fragmen *ERA*I hasil digesti *Bam*HI dan *Sal*I yang sudah dipurifikasi. Campuran larutan dengan total volume 20 µl dimasukkan ke dalam tabung polipropilen 0.5 ml dan kemudian diinkubasi selama 16—18 jam pada suhu 4°C.

3.4.1.3 Pembuatan sel kompeten

Sel kompeten dibuat berdasarkan prosedur Sambrook *dkk.* (1989: 1.8.1). Sel bakteri yang digunakan sebagai sel kompeten adalah *E.coli* DH5 α . *E.coli* DH5 α sebanyak 20 µl dari stok ditumbuhkan ke dalam 5 ml media LB cair kemudian di inkubasi selama 16—18 jam dalam *incubator shaker* (200 rpm, 37°C). *E.coli* DH5 α yang tumbuh kemudian disubkultur pada 5 ml media LB cair yang baru sebanyak 400 µl dan di inkubasi dalam *incubator shaker* selama 3 jam.

Sebanyak 1 ml hasil subkultur *E.coli* DH5 α dipindahkan ke dalam tabung polipropilene 1.5 ml, kemudian tabung disentrifugasi 5000 rpm selama 1 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang sehingga yang tersisa hanya pelet. Pelet dilarutkan dengan menambahkan 1 ml CaCl₂ 0.1 dingin kemudian diresuspensi dan diamkan di dalam es selama 15 menit. Tabung di sentrifugasi kembali dengan 5000 rpm selama 1 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet diresuspensi dengan menambahkan 200 µl CaCl₂ dingin, kemudian diamkan di dalam es selama 10 menit.

3.4.1.4 Transformasi bakteri dengan kejutan panas (*heat shock*)

Proses transformasi bakteri dilakukan berdasarkan prosedur dalam Sambrook *dkk.* (1989 1.8.1). Sebanyak 10 µl DNA hasil ligasi dicampurkan kedalam tabung yang telah berisi sel kompeten kemudian diamkan dalam es selama 10 menit. Proses kejutan panas (*heat shock*) dilakukan dengan meletakan tabung pada *water bath* bersuhu 42°C selama 90 detik dan tabung langsung dimasukkan kedalam es selama 2 menit. Pemulihan sel dilakukan dengan penambahan 95 µl LB cair ke dalam tabung kemudian di inkubasi dalam

incubater shaker selama 1 jam. Tabung kemudian di sentrifugasi 8000 rpm selama 1 menit, kemudian pelet yang terbentuk di resuspensi dalam 200 µl LB cair dan sebanyak 100 µl dicawakan dalam LB padat dengan metode *spread*. Inkubasi selama 16—18 jam pada suhu 37°C.

3.4.1.5 Verifikasi hasil transformasi

3.4.1.5.1 Verifikasi dengan PCR

Hasil transformasi dengan *heat shock* yang terbentuk yaitu berupa koloni-koloni tunggal bakteri transforman. Koloni tunggal tersebut diisolasi dan dilarutkan dengan Tris-EDTA dalam tabung polipropilen 1.5 ml. Komposisi reaksi PCR yaitu *MQ water* 9.04 µl, 2 µl 10x *buffer* PCR, 1.2 µl MgCl₂, 0.5 µl dNTPs, 1 µl *primer forward ERA1*, 1 µl *primer reverse ERA1*, 0.16 µl *Taq DNA polymerase* dan 5 µl sampel DNA transforman yang sudah dilarutkan dalam larutan Tris-EDTA. Total campuran reaksi adalah 20 µl.

Kondisi PCR yang dilakukan adalah denaturasi awal pada suhu 95° C selama 3 menit. Selanjutnya siklus PCR dilakukan sebanyak 34 kali dimulai dengan denaturasi pada suhu 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55° C selama 1 menit, polimerasi awal pada suhu 72° C selama 90 detik, kemudian siklus PCR dilanjutkan dengan tahap polimerasi akhir pada suhu 72° C selama 5 menit dan penurunan suhu menjadi 15° C. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis 1% (80 v, 45 menit). Hasil PCR positif menunjukkan pita dengan ukuran sekitar 1400 pb.

3.4.1.5.2 Verifikasi dengan Digesti

Verifikasi dilakukan pada hasil transformasi dengan proses digesti yang menggunakan dua enzim restriksi yaitu *SalI* dan *BamHI*. Komposisi dari reaksi digesti meliputi 13 µl *MQ water*, 2 µl *buffer* enzim *SalI*, 2 µl enzim *SalI* dan 3 µl DNA sampel hasil isolasi plasmid yang dimasukkan dalam tabung polipropilen 0.5 ml. Total campuran larutan adalah 20 µl, kemudian diinkubasi dalam

inkubator pada suhu 37°C selama 16—18 jam. Inaktivasi enzim dilakukan setelah inkubasi dengan meletakkan tabung pada *water bath* suhu 65°C selama 10 menit kemudian ditambahkan enzim digesti selanjutnya yaitu *Bam*HI dengan komposisi 2 µl *buffer* enzim *Bam*HI dan 2 µl enzim *Bam*HI, inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 16—18 jam. Pengecekan hasil verifikasi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1 %, 80 v selama 45 menit. Hasil verifikasi positif berupa dua pita yang terbetuk sekitar 12.000 pb dan 1400 pb.

3.4.1.6 Isolasi DNA plasmid rekombinan

Isolasi DNA plasmid dilakukan pada koloni-koloni bakteri yang menunjukkan positif PCR. Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan metode minipreparasi *alkaline lysis solution* menurut Sambrook dan Russell (2001: 1.32—1.34). Sebelum melakukan isolasi plasmid, 5 ml LB cair disiapkan kemudian ditambahkan dengan 5 µl kanamisin (100 mg/ml) serta bakteri yang membawa plasmid rekombinan kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* selama 16—18 jam. Kultur bakteri yang sudah diinkubasi semalaman tersebut dipindahkan ke dalam tabung polipropilen sebanyak 2 ml kemudian di sentrifugasi selama 1 menit 12.000 rpm dalam suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk dibuang dan tabung kembali diisi dengan kultur bakteri yang telah diinkubasi, kemudian disentrifugasi selama 1 menit 12.000 rpm dalam suhu 4°C dan supernatan dibuang. Pelet yang terbentuk ditambahkan 100 µl larutan *solution I* dan diresuspensi. Sebanyak 200 µl *solution II* ditambahkan dan tabung dibolak-balikkan perlahan dan diamkan dalam es selama 5 menit. 150 µl *solution III* dalam keadaan dingin ditambahkan lalu dikocok dan didiamkan dalam es selama 5 menit.

Tabung divorteks selama 10 detik kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk diambil dan dipindahkan kedalam tabung baru, kemudian ditambahkan sebanyak 450 µl campuran fenol:klorofoam (1:1). Tabung kemudian dikocok kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke tabung yang baru. Supernatan yang telah dipindahkan

kemudian ditambahkan 800 µl etanol absolut kemudian inkubasi 5 menit pada suhu ruang. Tabung kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 20°C. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet yang tersisa kemudian ditambahkan 200 µl etanol 70%. Tabung tersebut disentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang kembali sehingga yang tersisa hanya pelet, kemudian tabung dimasukkan ke dalam oven selama 15 menit. Sebanyak 100 µl Tris-EDTA dan 1 µl RNase dimasukkan ke dalam tabung dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 30 menit untuk optimasi kerja RNase. Hasil dari isolasi plasmid dengan elektroforesis gel agarosa 1% 80 v selama 45 menit dengan kontrol positif berupa sampel plasmid pCAMBIA 1301. Hasil positif menunjukkan terbentuknya pita yang sejajar dengan kontrol positif sekitar 1400 pb.

3.4.1.7 Verifikasi Hasil Isolasi Plasmid Rekombinan

3.4.1.7.1 Verifikasi dengan PCR

Komposisi reaksi PCR yang digunakan untuk verifikasi hasil dari isolasi plasmid rekombinan yaitu *MQ water* 9.04 µl, 2 µl *10x buffer* PCR, 1.2 µl $MgCl_2$, 0.5 µl dNTPs, 1 µl *primer forward ERA1*, 1 µl *primer reverse ERA1*, 0.16 µl *Taq DNA polymerase* dan 5 µl sampel DNA transforman yang sudah diencerkan sebanyak 10x. Total campuran reaksi adalah 20 µl. Kondisi PCR yang dilakukan adalah denaturasi awal pada suhu 95° C selama 3 menit. Selanjutnya siklus PCR dilakukan sebanyak 34 kali dimulai dengan denaturasi pada suhu 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55° C selama 1 menit, polimerasi awal pada suhu 72° C selama 90 detik, kemudian siklus PCR dilanjutkan dengan tahap polimerasi akhir pada suhu 72° C selama 5 menit dan penurunan suhu menjadi 15° C. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis 1% (80 v, 45 menit). Hasil PCR positif menunjukkan pita dengan ukuran sekitar 1400 pb.

3.4.1.7.2 Verifikasi dengan menggunakan enzim *SalI* dan *BamHI*

Verifikasi dilakukan pada DNA plasmid hasil isolasi dengan proses digesti yang menggunakan dua enzim restriksi yaitu *SalI* dan *BamHI*. Komposisi dari reaksi digesti meliputi 13 μl MQ water, 2 μl *buffer* enzim *SalI*, 2 μl enzim *SalI* dan 3 μl DNA sampel hasil isolasi plasmid yang dimasukkan dalam tabung polipropilen 0.5 ml. Total campuran larutan adalah 20 μl , kemudian di inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 16—18 jam. Inaktivasi enzim dilakukan setelah inkubasi dengan meletakkan tabung pada *water bath* suhu 65°C selama 10 menit kemudian ditambahkan enzim digesti selanjutnya yaitu *BamHI* dengan komposisi 2 μl *buffer* enzim *BamHI* dan 2 μl enzim *BamHI*, inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 16—18 jam. Pengecekan hasil verifikasi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1 %, 80 v selama 45 menit. Hasil verifikasi positif berupa dua pita yang terbetuk sekitar 12.000 pb dan 1400 pb.

3.4.2 Transformasi dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*

3.4.2.1 Persiapan sel elektrokompeten

Sebanyak 5 ml kultur *A. tumefaciens* strain LBA4404 disiapkan kemudian dibagi kedalam 3 tabung sentrifugasi 1.5 ml masing-masing sebanyak 1 ml, kemudian dilakukan sentrifugasi 5000 rpm selama 10 menit di 4 °C. Supernatan yang terbentuk dibuang sehingga yang tersisa hanya pelet. Pelet kemudian dilarutkan dalam 150 μl gliserol 10 % dingin, tambahkan 1450 μl gliserol 10% dingin hingga volume total 1500 μl . Sentrifugasi kembali dilakukan selama 10 menit (5000 rpm, 4°C), supernatan yang terbentuk dibuang. Pelet kembali dilarutkan dalam 150 μl gliserol 10 % dingin, tambahkan 1450 μl gliserol 10% kembali hingga volume total 1500 μl . Sentrifugasi kembali selama 10 menit (5000 rpm, 4°C). Pelet yang terbentuk kemudian diresuspensi hingga larut dengan 500 μl gliserol 10 % dingin. Suspensi larutan tersebut kemudian disentrifugasi selama 5 menit (5000 rpm, 4°C). Supernatan yang terbentuk

dibuang dan pelet dilarutkan dalam 200 μ l 1M sorbitol dingin. Sel dibekukan dan disimpan pada suhu -80°C .

3.4.2.2 Elektroporasi

Proses elektroporasi dilakukan sesuai dengan prosedur elektroporasi *A. tumefaciens* dari BioRad (2000:15—16). Sampel DNA dipipet (hingga 5 μ l) untuk dielektroporasi dimasukkan ke dalam tabung polipropilen. Tabung kemudian ditempatkan di es. Sebanyak 1 ml LB cair ditambahkan ke tabung polipropilen 1.5 ml pada suhu ruang, lalu kuvet elektroporasi ditempatkan di dalam es. 20 μ l sel elektrokompeten *A. tumefaciens* ditambahkan ke tiap sampel DNA lalu diketuk secara perlahan agar tercampur. Sampel DNA ditransfer ke kuvet elektroporasi setelah alat MicroPulser diset, lalu kuvet diketuk agar suspensi berada pada bagian dasar kuvet. Kuvet kemudian ditempatkan pada *chamber slide*. Proses elektroporasi dilakukan dengan satu kali aliran. Kuvet kemudian dikeluarkan dari *chamber*, LB cair pada tabung polipropilen 1.5 ml langsung digunakan untuk mentransfer sel dari kuvet ke tabung. Sel kemudian diinkubasi di *shaker incubator* (250 rpm, 3 jam, 30°C). Aliquot sel yang dielektroporasi lalu di-*spread* pada medium agar LB yang mengandung antibiotik kanamisin. Cawan petri kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30°C .

3.4.2.3 Verifikasi Hasil Elektroporasi

3.4.2.3.1 Verifikasi dengan PCR

Komposisi reaksi PCR yang digunakan untuk verifikasi hasil dari isolasi plasmid rekombinan yaitu *MQ water* 9.04 μ l, 2 μ l 10x buffer PCR, 1.2 μ l MgCl_2 , 0.5 μ l dNTPs, 1 μ l *primer forward ERA1*, 1 μ l *primer reverse ERA1*, 0.16 μ l *Taq DNA polymerase* dan 5 μ l sampel DNA transforman yang sudah diencerkan sebanyak 10x. Total campuran reaksi adalah 20 μ l. Kondisi PCR yang dilakukan adalah denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit. Selanjutnya siklus PCR dilakukan sebanyak 34 kali dimulai dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 1

menit, *annealing* pada suhu 55° C selama 1 menit, polimerasi awal pada suhu 72° C selama 90 detik, kemudian siklus PCR dilanjutkan dengan tahap polimerasi akhir pada suhu 72° C selama 5 menit dan penurunan suhu menjadi 15° C. Visualisasi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis 1% (80 v, 45 menit). Hasil PCR positif menunjukkan pita dengan ukuran sekitar 1400 pb.

3.4.2.3.2 Verifikasi dengan Digesti

Verifikasi dilakukan pada hasil transformasi dengan proses digesti yang menggunakan dua enzim restriksi yaitu *SalI* dan *BamHI*. Komposisi dari reaksi digesti meliputi 13 µl MQ water, 2 µl *buffer* enzim *SalI*, 2 µl enzim *SalI* dan 3 µl DNA sampel hasil isolasi plasmid yang dimasukkan dalam tabung polipropilen 0.5 ml. Total campuran larutan adalah 20 µl, kemudian di inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 16—18 jam. Inaktivasi enzim dilakukan setelah inkubasi dengan meletakkan tabung pada *water bath* suhu 65°C selama 10 menit kemudian ditambahkan enzim digesti selanjutnya yaitu *BamHI* dengan komposisi 2 µl *buffer* enzim *BamHI* dan 2 µl enzim *BamHI*, inkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 16—18 jam. Pengecekan hasil verifikasi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1 %, 80 v selama 45 menit. Hasil verifikasi positif berupa dua pita yang terbetuk sekitar 12.000 pb dan 1400 pb.

3.4.2.4 Persiapan Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dan ko-kultivasi

Koloni *A. tumefaciens* yang mengandung faktor penanda aktivasi ditumbuhkan pada media LB cair yang mengandung antibiotik 75 mg/L karbenisilin dan 100 mg/L kanamisin selama semalam pada *incubator shaker* dengan suhu 28 C. Selanjutnya 500 µl dari kultur tersebut ditumbuhkan pada media AB padat yang mengandung antibiotik karbenisilin 75 mg/L dan kanamisin 100 mg/L, 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, 10 g/L glukosa, dan 100 µM asetosirgonon, dengan pH 5,2. Suspensi *A. tumefaciens* ditetaskan pada masing-masing kalus

embriogenik. Kalus embriogenik tersebut yang diinfeksi diinkubasi selama 3 hari pada suhu 25°C. dalam kondisi gelap. Setelah ko-kultivasi, kalus embriogenik hasil transformasi dipindahkan ke medium *resting* selama 5 hari.

3.4.2.5 Seleksi Kalus Pada Media Seleksi

Kalus embriogenik yang berada dalam medium *resting* kemudian dipindahkan ke medium seleksi yang mengandung higromisin dan diinkubasi selama 3 minggu. Kalus-kalus tahan dipindahkan ke medium seleksi yang baru diinkubasi selama 10 hari. Kalus-kalus yang tahan dan menunjukkan tanda-tanda embriogenik dipindahkan ke media pre-regenerasi dan diinkubasi selama 10 hari.

3.4.3 Verifikasi Transforman Dengan Uji Histokimia GUS dan PCR

3.4.3.1 Uji histokimia GUS (*histochemical GUS assay*)

Sebagian kecil kalus hasil transformasi direndam dalam larutan *X-gluc* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucoronide) selama 4 jam sampai satu malam pada suhu 37 °C. Kalus padi dipindahkan ke cawan petri. Uji histokimia GUS positif ditunjukkan dengan adanya *spot* berwarna biru.

3.4.3.2 Isolasi DNA hasil seleksi

Kalus transforman diambil kemudian diletakkan dalam tabung 1,5 ml dan digerus hingga halus. Setelah itu, ditambahkan 400 μ l *buffer* lalu divorteks hingga homogen, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5--10 menit pada suhu ruang. Supernatan sebanyak 300 μ l dipindahkan ke tabung 1,5 ml steril, lalu ditambahkan fenol: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 lapisan fenol:kloroform. Lapisan atas

diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml steril. Presipitasi DNA dilakukan dengan menambahkan isopropanol dingin sebanyak 250 μ l ke dalam 150—200 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 dengan 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.

3.4.3.3 Amplifikasi gen *ERA1* pada kalus transforman dengan PCR

Reaksi amplifikasi dilakukan menggunakan PCR *kit Fastart* dengan total volume reaksi sebanyak 20 μ l. Komposisi reaksi amplifikasi PCR adalah 9,04 μ l *MQ water*, 2 μ l 10x PCR *buffer*, 1,2 μ l $MgCl_2$, 0,5 μ l dNTPs, 1 μ l untuk masing-masing primer *ERA1-F* dan *ERA1-R*, 0,16 μ l *Taq DNA polymerase*, dan 5 μ l *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. Hasil reaksi PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1,2% (80V, 45 menit).

3.4.4 Transformasi dengan *Particle Bombardment*

3.4.4.1 Persiapan Kalus Embriogenik

Kalus-Kalus embriogenik yang telah disubkultur diletakkan dalam media osmotikum. Media osmotikum yang digunakan adalah manitol-sorbitol. Pada bagian luar petri dibuat cetakan berupa lingkaran dengan diameter 2 cm. Kalus-

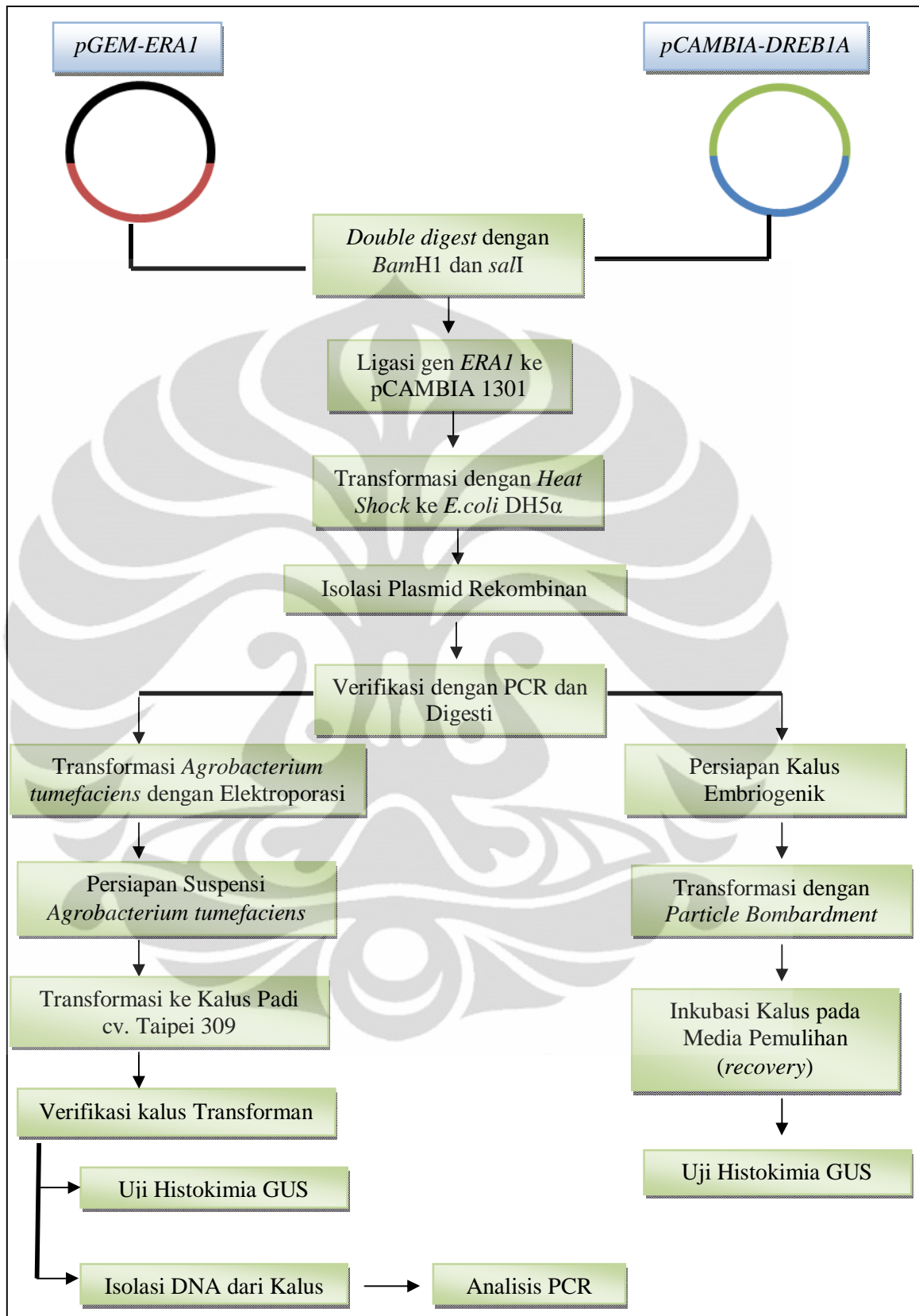
kalus embriogenik kemudian disusun dalam cetakan lingkaran tersebut hingga penuh. Inkubasi selama 4 jam sebelum penembakkan.

3.4.4.2 Transformasi Kalus dengan *Particle Bombardment*

Kalus embriogenik padi ditempatkan di tengah cawan petri berisi medium D20 pada daerah lingkaran kecil yg berdiameter kira-kira 4 cm hingga menutupi bagian tersebut kemudian dilakukan penembakan menggunakan *gene gun* (biolistic PDS 1000/He) dari Bio-Rad Laboratories. Perlakuan transformasi menggunakan tekanan gas helium 1.100 psi, jarak tembak ke jaringan target adalah 6 cm dengan sekali tembakan. Selama pengoperasian alat biolistik, udara di dalam ruang utama (*main chamber*) diatur oleh pompa vakum (*vacuum pump*) dengan mengarahkan jarum di dalam pengukur vakum (*vacuum gauge*) pada 697,5 mm. Hal tersebut dilakukan untuk mengurangi gesekan udara pada partikel penembakan (*microcarrier*) dan meredam suara yg dihasilkan dari pecahan *rupture disk*. Selanjutnya, kalus hasil penembakan disimpan dalam media pemulihan MS selama 3 hari. Komposisi media MS dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.4.4.3 Uji Histokimia GUS

Sebagian kecil kalus hasil transformasi direndam dalam larutan *X-gluc* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucoronide) selama 4 jam sampai satu malam pada suhu 37 °C. Kalus padi dipindahkan ke cawan petri. Uji histokimia GUS positif ditunjukkan dengan adanya *spot* berwarna biru. Alur kerja penelitian secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Skema kerja penelitian

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

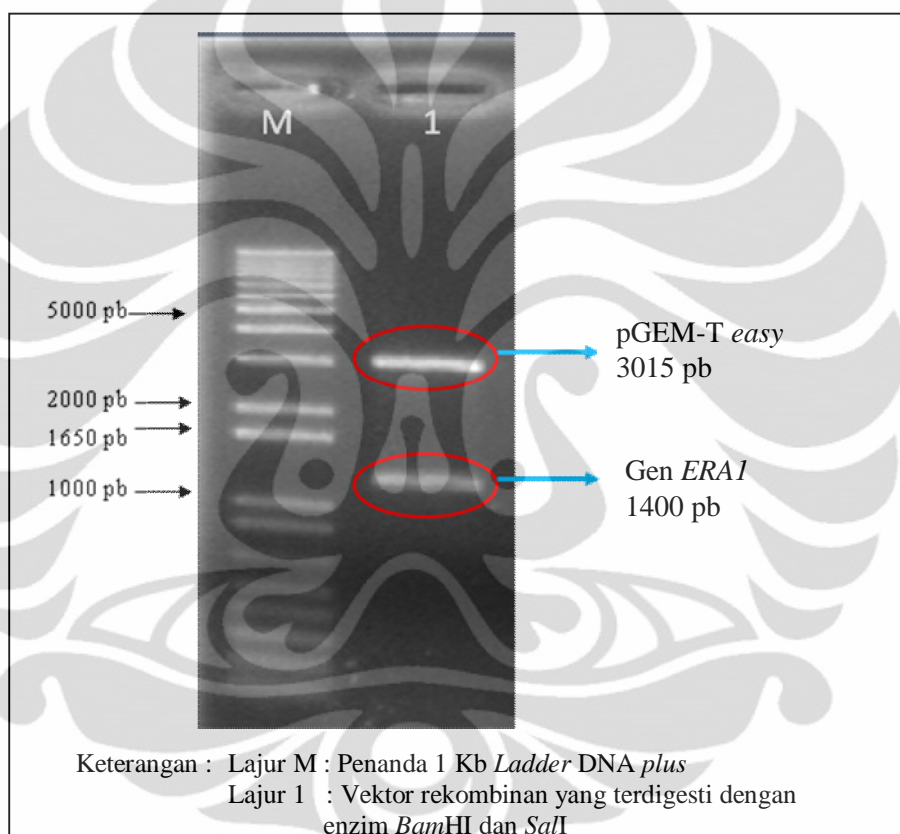
4.1 Digesti Fragmen Gen *OsERA1* dari pGEM-*ERA1*

Gen *ERA1* sebelumnya telah berhasil diklonasi ke dalam vektor kloning pGEM-T *easy* oleh peneliti Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-BIOGEN). Digesti fragmen gen *ERA1* dari pGEM-T *easy* dilakukan untuk mendapatkan fragmen gen *ERA1* dengan menggunakan dua enzim restriksi yaitu *Bam*HI dan *Sal*I. Enzim *Bam*HI merupakan enzim restriksi yang diperoleh dari bakteri *Bacillus amyloliquefaciens* H. Enzim tersebut mempunyai situs pengenalan 5'G ↓ GATTC 3'. Enzim *Bam*HI akan memotong DNA sirkular menjadi DNA linear dan menghasilkan potongan *sticky end* diantara basa G (Roche 2008: 1—2). Enzim *Sal*I diperoleh dari bakteri *Streptomyces albus* G. Enzim *Sal*I mempunyai situs pengenalan 5'G ↓ TCGAC 3', pada plasmid pGEM-T *easy* yang digunakan sebagai vektor kloning enzim *Sal*I memiliki situs pengenalan pasangan basa pada *range* 88—90 (Roche 2004: 1—2).

Digesti menggunakan kedua enzim tersebut dilakukan karena primer yang digunakan untuk amplifikasi fragmen gen *ERA1* telah disisipi oleh situs pemotongan untuk kedua enzim tersebut. Primer *forward* memiliki sekuen dengan situs pemotongan dari enzim *Bam*HI sedangkan primer *reverse* memiliki sekuen dengan situs pemotongan dari enzim *Sal*I. Hal tersebut dilakukan agar memudahkan proses digesti sehingga fragmen gen *ERA1* dapat diisolasi dari vektor tanpa merusak fragmen dari gen *ERA1* tersebut. Adanya situs restriksi yang disisipkan pada primer akan menyebabkan gen yang telah diamplifikasi menghasilkan situs pemotongan yang sama dengan vektor sehingga mempermudah dalam melakukan subkloning (Arfia 2010: 38).

Visualisasi hasil digesti DNA dari gen *ERA1* pada plasmid rekombinan pGEM-*ERA1* dilakukan dengan elektroforesis menggunakan agar agarosa 1% (80 v, 45 menit). Menurut Ausubel *dkk.* (2002: 2.14), gel agarosa 1% dapat digunakan untuk menganalisis fragmen DNA sebesar 500 pb—10.000 pb. Hasil

visualisasi gel agarosa 1% menunjukkan bahwa terbentuk 2 pita pada gel agarosa, yaitu pita berukuran sekitar 1400 pb yang merupakan fragmen gen *ERAI* (Data belum dipublikasi) dan pita berukuran 3015 pb yang berasal dari vektor pGEM-T *easy* (Gambar 4.1.(1)). Menurut Promega (2008: 2), vektor pGEM-T *easy* memiliki ukuran 3015 pb. Hal tersebut menunjukkan bahwa vektor pGEM-*ERAI* berhasil didigesti. Hasil dari digesti kemudian akan menjadi DNA sisipan dalam proses subkloning.

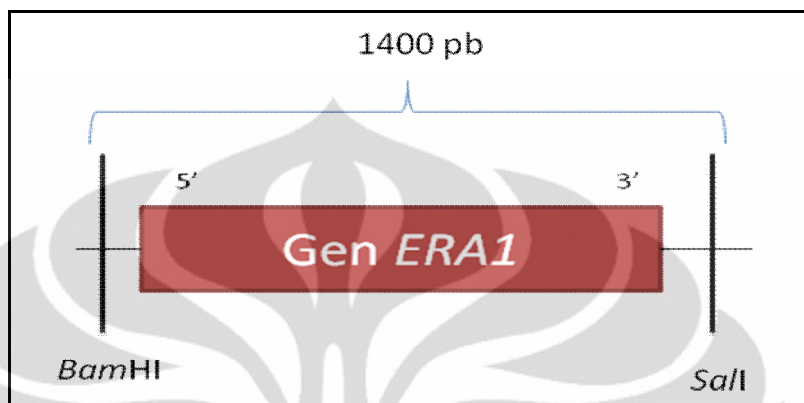


Gambar 4.1.(1). Hasil elektroforesis vektor rekombinan klonas pGEM-*ERAI* yang didigesti enzim *Bam*HI dan *Sal*I.

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

Ukuran total dari gen *ERAI* yang akan ditransformasikan ke dalam kalus padi cv. Taipei 309 dengan *A. tumefaciens* adalah sekitar 1400 pb. Tambahan berupa situs pengenalan dari enzim restriksi *Bam*HI (G ↓ GATTC) yang menghasilkan potongan kohesif terdapat pada fragmen gen *ERAI* pada ujung 5' sedangkan pada ujung 3' juga ditambahkan situs restriksi berupa *Sal*I (G ↓ TCGAC) yang menghasilkan ujung potongan kohesif (Gambar 4.1.(2)). Hasil

potongan yang kohesif akan meningkatkan efisiensi dari ligasi karena ikatan hidrogen akan membentuk ikatan yang lebih kuat sehingga membentuk struktur yang stabil dibandingkan dengan potongan dengan ujung rata (Brown 1987: 55).



Gambar 4.1.(2). Konstruksi gen *ERA1* yang digunakan sebagai DNA sisipan pada subkloning ke dalam vektor ekspresi.

4.2 Digesti Vektor Ekspresi pCAMBIA-*DREB1A* dengan Enzim Restriksi

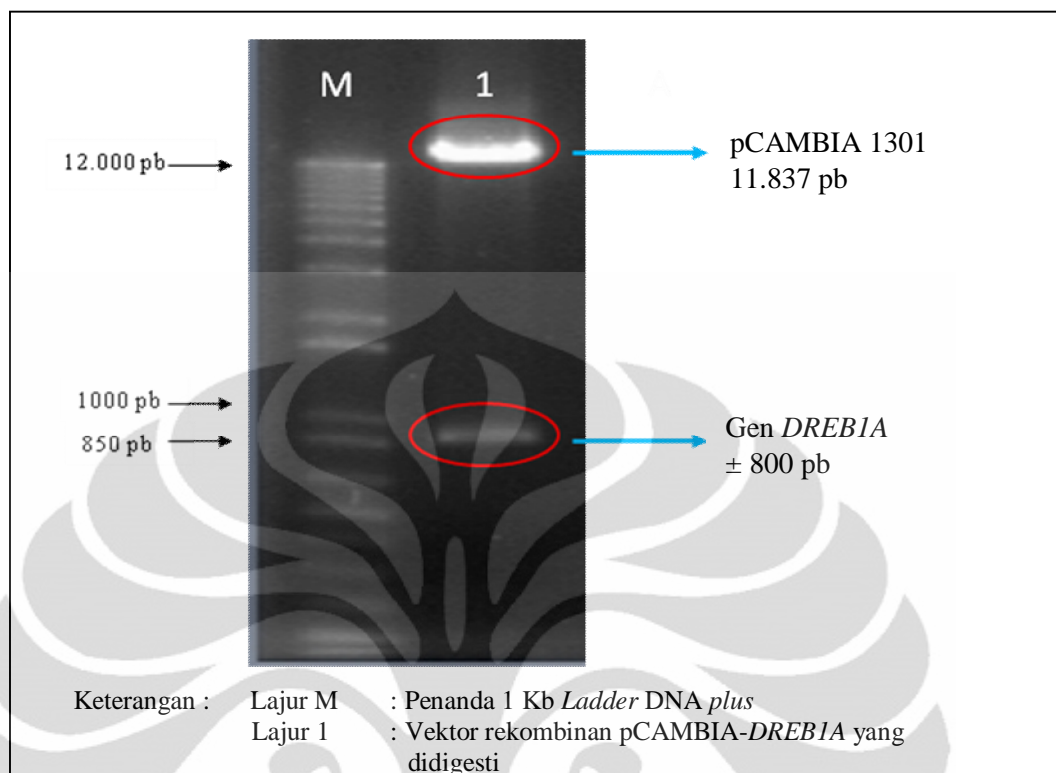
Vektor ekspresi yang digunakan dalam proses subkloning adalah pCAMBIA 1301. Vektor ekspresi tersebut berasal dari vektor rekombinan pCAMBIA-*DREB1A* yang sebelumnya telah berhasil dikonstruksi oleh Tim Peneliti Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-BIOGEN). Vektor rekombinan pCAMBIA-*DREB1A* didigesti dengan menggunakan dua enzim yang sama dengan digesti fragmen gen *ERA1* yaitu *Bam*HI dan *Sal*I. Hal tersebut bertujuan agar fragmen DNA sisipan (gen *ERA1*) dengan vektor (pCAMBIA 1301) akan dapat diligasikan apabila dipotong dengan menggunakan enzim yang sama.

Digesti pertama menggunakan enzim *Bam*HI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16—18 jam. Menurut Roche (2004: 1; 2008:1) inkubasi pada suhu 37°C merupakan suhu yang optimal untuk kerja enzim. Hasil inkubasi kemudian diinaktivasi pada *waterbath* dengan suhu 65°C selama 10 menit untuk menekan kerja dari enzim *Bam*HI kemudian dilanjutkan dengan menambahkan enzim kedua yaitu *Sal*I dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16—18 jam. Konsentrasi

kedua enzim restriksi yang digunakan dalam penelitian sebesar 10 U/ μ l. Hal tersebut sesuai dengan (Roche 2004: 1; Roche 2008: 1) yang menyebutkan bahwa proses inaktivasi pada enzim *Bam*HI dan *Sal*I dengan konsentrasi 10 U/ μ l sebaiknya digunakan suhu 65°C selama 10--15 menit. Konsentrasi yang lebih tinggi memerlukan suhu yang lebih tinggi pula dalam melakukan proses inaktivasi.

Hasil digesti divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Menurut Sambrook & Russell (2001: 5.6) penggunaan konsentrasi agar agarosa 1% umum digunakan untuk mengetahui pita DNA yang berukuran sekitar 500bp—15 kbp. Hasil visualisasi dengan gel agarosa 1% menunjukkan terbentuknya dua pita, yaitu satu pita berukuran 11.837 pb dan satu pita berukuran sekitar 800 pb. Pita yang berukuran 11.837 pb merupakan fragmen dari vektor pCAMBIA 1301. Hal tersebut sesuai dengan Cambia Labs (2006: 5) yang menyatakan bahwa pCAMBIA 1301 memiliki ukuran 11.837 pb. Pita yang berukuran sekitar 800 pb merupakan ukuran dari fragmen gen *DREBIA* (Data belum dipublikasi) (Gambar 4.2.1). Berdasarkan hasil elektroforesis maka vektor pCAMBIA-*DREBIA* berhasil didigesti.

Vektor ekspresi pCAMBIA 1301 didigesti dengan enzim yang sama dengan enzim yang digunakan untuk digesti gen *ERAI*, yaitu enzim *Bam*HI dan *Sal*I. Hal tersebut bertujuan agar ujung-ujung yang terbentuk pada vektor dan gen sisipan dapat bersesuaian, sehingga dapat dilekatkan kembali saat proses ligasi (Weaver & Hedrick 1997: 417). Digesti dengan menggunakan enzim *Bam*HI dan *Sal*I menghasilkan ujung kohesif (*sticky-end*) sehingga memudahkan proses ligasi dan meningkatkan efisiensi ligasi (Brown 1987: 55). Vektor pCAMBIA 1301 yang telah didigesti selanjutnya diligasi dengan gen *ERAI*.



Gambar 4.2. Hasil elektroforesis vektor rekombinan pCAMBIA-*DREBIA* yang didigesti dengan enzim *Bam*HI dan *Sal*I.

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

4.3 Ligasi Gen *ERA1* dengan Vektor Ekspresi pCAMBIA 1301

Proses ligasi fragmen gen *ERA1* menggunakan plasmid pCAMBIA 1301 sebagai vektor. Enzim ligase yang digunakan yaitu T4 DNA ligase yang berfungsi sebagai katalisator dalam proses penyatuan DNA yang berasal dari dua sumber. Enzim tersebut akan menyatukan kedua fragmen melalui ikatan kovalen fosfodiester (Russell 1994: 335). Enzim T4 ligase dalam reaksi ligasi berperan dalam proses rekombinasi DNA dengan plasmid membentuk plasmid rekombinan. Perbandingan fragmen DNA sisipan dan vektor linear yang umumnya digunakan dalam reaksi ligasi adalah 1 : 3. Hal tersebut bertujuan untuk meningkatkan efektivitas dari proses ligasi. Reaksi ligasi kemudian diinkubasi pada suhu 10° C selama 16—18 jam untuk mengoptimalkan kerja dari enzim T4 DNA ligase (Sambrook & Russell 2001: 1.157).

Gen *ERA1* berperan sebagai DNA sisipan yang berukuran sekitar 1400 pb disisipkan pada vektor ekspresi pCAMBIA 1301 yang berukuran 11.837 pb, sehingga akan menghasilkan vektor rekombinan sebesar 13.237 pb. Hasil dari reaksi ligasi tidak divisualisasi dalam gel agarosa karena setelah diinkubasi selama 16—18 jam langsung digunakan dalam proses transformasi ke dalam sel *E. coli* DH5 α .

4.4 Transformasi Plasmid Rekombinan pCAMBIA-*ERA1*

Tahapan awal dari proses transformasi plasmid rekombinan adalah pembuatan sel kompeten *E. coli* DH5 α . Tidak semua sel memiliki kemampuan mengintegrasikan DNA asing ke dalam tubuhnya. *Escherichia coli* merupakan salah satu mikroorganisme yang memiliki kemampuan rendah dalam integrasi DNA. Oleh karena itu, untuk meningkatkan kemampuan sel dalam menyerap DNA perlu dilakukan beberapa perlakuan fisik atau kimia yang dapat membuat sel tersebut menjadi kompeten (Sambrook & Russell 2001:1.96).

Sel kompeten sebelumnya dibuat terlebih dahulu dengan menumbuhkan *E. coli* DH5 α sebanyak 20 μ l dari stok awal ke dalam 5 ml LB cair kemudian diinkubasi selama 16—18 jam dalam *incubator shaker* (200 rpm, 37°C). Inkubasi dalam *incubator shaker* berfungsi agar kontak yang terjadi antara sel dengan medium lebih besar sehingga pemanfaatan nutrisi yang terkandung dalam medium LB akan optimal. Pertumbuhan optimal dari *E. coli* adalah selama 16—20 jam dalam suhu 37°C (Sezonov *dkk.* 2007: 8746).

Pembuatan sel kompeten *E. coli* DH5 α dan transformasi menggunakan metode CaCl $_2$ dengan kejutan panas (*heat shock*). Kejutan panas menyebabkan pori pada dinding sel *E. coli* terbentuk dan DNA plasmid yang sudah menempel di permukaan dinding sel akan masuk ke dalam sitoplasma sel *E. coli* (Brown 2006: 91). Kejutan panas dengan suhu 42°C dilakukan selama 90 detik kemudian dilanjutkan dengan inkubasi di dalam es selama 2 menit. Menurut Singh *dkk.* (2010: 564--566) suhu 42°C merupakan suhu optimal dalam melakukan transformasi dengan kejutan panas dan dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu dingin untuk meningkatkan efisiensi transformasi. CaCl $_2$ merupakan larutan yang

memiliki kation bivalen berupa Ca^{2+} . Kation bivalen yang bersifat positif akan dapat berikatan dengan membran fosfolipid sehingga molekul DNA yang bermuatan negatif dapat menempel dan mempermudah integrasi DNA ke dalam sel. Kejutkan panas dengan suhu 42°C dilakukan selama 90 detik kemudian dilanjutkan dengan inkubasi didalam es selama 2 menit.

Hasil ligasi yang telah diinkubasi selama 16—18 jam langsung ditransformasi ke dalam sel kompeten *E. coli* DH5 α . Hasil dari transformasi dicawakan pada medium Luria Bertani (LB) agar yang telah mengandung kanamisin dengan konsentrasi akhir 100 $\mu\text{g/ml}$. Sambrook & Russell (2001: 1.145) menyatakan bahwa konsentrasi yang dapat digunakan untuk antibiotik adalah 50—100 $\mu\text{g/ml}$. Antibiotik kanamisin digunakan karena merupakan salah satu marka seleksi antibiotik yang dimiliki oleh vektor pCAMBIA 1301 (Cambia Labs 2006: 1). Antibiotik kanamisin ditambahkan ke dalam LB bertujuan untuk seleksi bakteri *E.coli* DH5 α yang telah ditransformasi, sehingga koloni bakteri yang tumbuh hanya merupakan koloni dari *E.coli* rekombinan yang mengandung gen target yaitu gen *ERA1*.

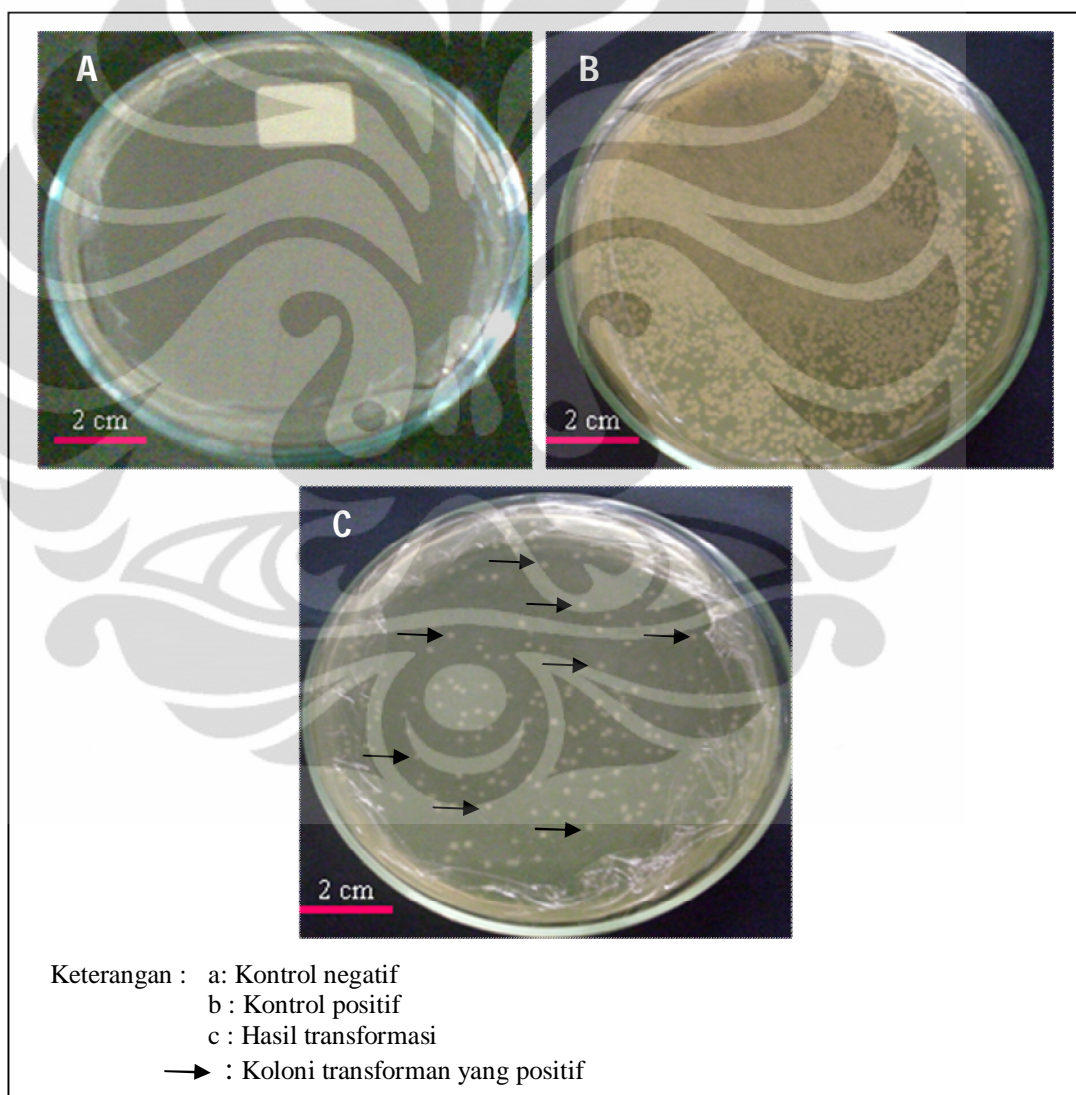
Medium Luria Bertani (LB) merupakan salah satu medium yang umum digunakan dalam studi genetik dan molekular karena kandungan nutrisi dan komposisi yang sederhana sehingga mudah untuk disiapkan. Medium LB biasanya digunakan untuk proses ko-kultivasi dan menjaga pertumbuhan dari kultur bakteri seperti *E.coli* dan derivatnya termasuk DH5 α . Kandungan dari medium LB per liter adalah 10 g/L tripton, 5 g/L *yeast extract*, dan 10 g/L sodium klorida. Tripton dan *yeast extract* akan membantu *E.coli* agar dapat tumbuh secara cepat dan memanfaatkan nutrisi dalam medium dengan optimal tanpa harus melakukan sintesis terlebih dahulu. Sodium klorida berfungsi untuk menjaga tekanan osmotik sel (Sezonov *dkk.* 2007: 8746).

Proses transformasi menggunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif dari sel kompeten *E.coli* DH5 α tumbuh sedangkan kontrol negatif tidak tumbuh pada medium LB agar yang sudah diberikan antibiotik kanamisin. Penggunaan kontrol positif dan negatif tersebut bertujuan untuk mengetahui apakah proses transformasi berjalan dengan baik tanpa adanya kontaminasi serta untuk memastikan kualitas sel kompeten yang telah dibuat sebelumnya

(Sambrook & Russell 2001: 1.111—1.112). Kontrol positif dapat dilihat pada Gambar 4.5.1.A, kontrol negatif pada Gambar 4.5.1.B dan hasil transformasi pada Gambar 4.5.1.C. Dengan demikian, sel kompeten yang digunakan memiliki kualitas yang baik dan proses transformasi juga berjalan dengan baik.

Berdasarkan hasil pengamatan pada medium LB padat hasil transformasi, terdapat sekitar 80 koloni yang tumbuh, akan tetapi hanya delapan koloni yang diambil.

Delapan koloni tersebut merupakan koloni tunggal yang diharapkan merupakan koloni positif rekombinan



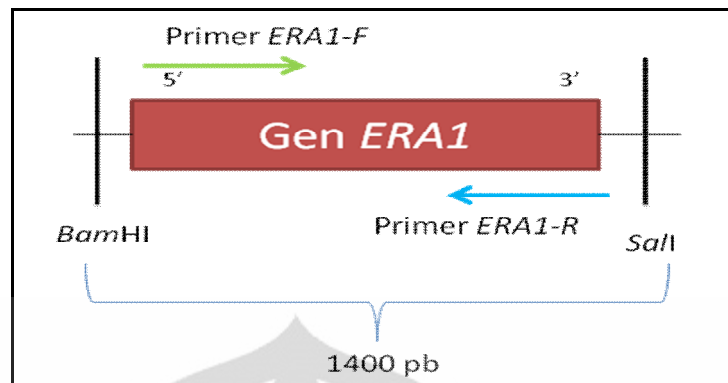
Gambar 4.4.1. Hasil transformasi *E. coli* DH5 α dengan kontrol positif dan negatif.
 [Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-BIOGEN, 2011.]

4.5 Verifikasi Transforman Vektor Rekombinan pCAMBIA-*ERAI*.

Koloni transforman hasil ligasi yang tumbuh pada medium LB agar dengan seleksi kanamisin kemungkinan tidak semuanya merupakan koloni yang mengandung vektor rekombinan. Hal tersebut dapat terjadi karena terdapat kemungkinan koloni yang mengandung pCAMBIA 1301 mengalami religasi (*self ligation*), sehingga perlu dilakukan proses verifikasi (Sambrook & Russell 2001: 1.25—1.26). Proses verifikasi dapat dilakukan dengan teknik PCR dan digesti dengan enzim restriksi.

4.5.1 Verifikasi Transforman dengan Teknik PCR

Koloni tunggal bakteri yang tumbuh pada medium LB agar dilakukan verifikasi dengan menggunakan teknik PCR. Primer yang digunakan dalam amplifikasi PCR adalah *OsERAI-F* dan *OsERAI-R*. Primer *OsERAI-F* dan *OsERAI-R* telah didesain sebelumnya oleh Tim Peneliti Laboratorium Biologi Molekular, BB-BIOGEN. Kedua primer tersebut adalah primer yang spesifik terhadap gen *ERAI* sehingga hanya vektor rekombinan yang telah tersisipi gen target yang dapat teramplifikasi. Primer *OsERAI-F* menempel pada ujung 3', sedangkan primer *OsERAI-R* menempel pada ujung 5' (Gambar 4.5.1.(1)). Bagian dari vektor pCAMBIA-*ERAI* yang tidak mengandung gen *ERAI* tidak akan teramplifikasi karena tidak adanya sekuen spesifik terhadap primer yang digunakan. Hasil amplifikasi dengan kedua primer tersebut menghasilkan fragmen DNA sebesar sekitar 1400 pb yang merupakan fragmen DNA tersebut merupakan gen *ERAI*.



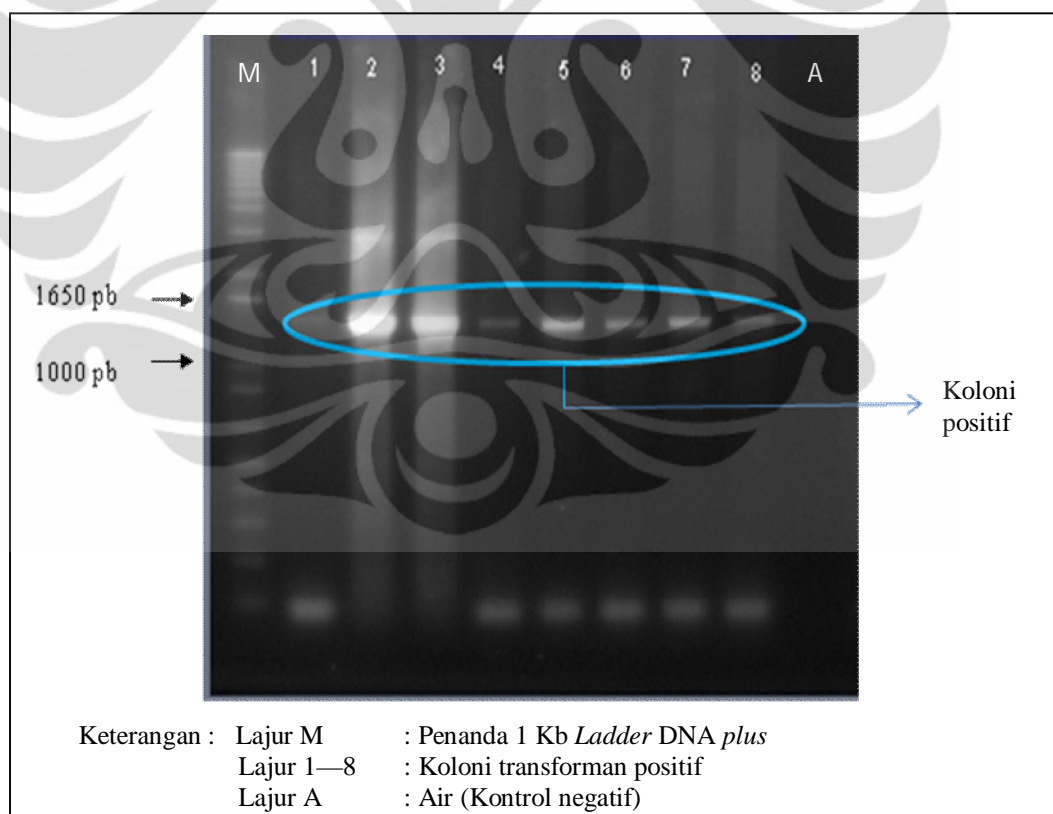
Gambar 4.5.1.(1). Pelekatan primer *ERA1-F* dan *ERA1-R*.

Hasil PCR divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% menunjukkan adanya produk PCR berupa pita DNA tunggal yang berukuran sekitar 1400 pb (Gambar 4.5.1.(2)). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat delapan koloni positif yang mengandung gen *ERA1* karena ukuran dari pita DNA tersebut sesuai dengan ukuran hasil verifikasi dengan digesti vektor rekombinan pGEM-*ERA1*. Akuades digunakan sebagai kontrol negatif untuk membuktikan proses PCR berjalan baik dan tidak terjadi kontaminasi saat PCR. Hasil dari produk PCR juga masih memperlihatkan terbentuknya dimer primer. Terbentuknya dimer primer dapat disebabkan karena spesifitas primer yang kurang sehingga antara primer *forward* dan primer *reverse* masih saling berkomplemen (Yuwono 2006: 18).

Jumlah basa pada primer *OsERA1-F* adalah 23 basa ditambah dengan 6 basa sebagai sekuen dari enzim restriksi menjadi 29 basa dan *OsERA1-R* berjumlah 24 basa ditambah dengan 6 basa enzim restriksi menjadi 30 basa. Komposisi G+C dari primer *OsERA1-F* dan primer *OsERA1-R* adalah 60% dan 43%. Hal tersebut sesuai dengan Sambrook & Russell (2001: 8.8) bahwa penentuan kualitas primer dapat ditentukan dari beberapa faktor diantaranya Komposisi basa, primer harus memiliki komposisi G+C sebanyak 40–60% dengan distribusi keempat basa disepanjang primer dan panjang primer harus terdiri dari 18–28 nukleotida.

Suhu denaturasi dan *annealing* yang digunakan dalam proses PCR dipengaruhi oleh kandungan basa C+G dan *temperature melting* (T_m) dalam primer yang digunakan. Suhu denaturasi yang digunakan dalam penelitian adalah

95°C. Menurut Sambrook & Russell (2001: 8.8), suhu denaturasi berkisar 95—96°C dapat digunakan pada primer dengan komposisi G+C kurang dari 55%. Komposisi G+C yang besar memerlukan suhu denaturasi yang lebih tinggi untuk merusak ikatan hidrogen antar basa. Suhu *annealing* yang digunakan dalam penelitian adalah 55°C. Primer *OsERA1-F* dan primer *OsERA1-R* memiliki T_m sebesar 74°C dan 62°C. Suhu *annealing* umumnya berkisar antara 3°—5 °C lebih rendah dari nilai T_m primer. Nilai T_m yang tinggi akan memerlukan suhu *annealing* yang tinggi pula. Akan tetapi, suhu *annealing* yang terlalu tinggi dapat mengakibatkan penempelan primer tidak maksimal pada DNA target, sedangkan bila suhu terlalu rendah mengakibatkan berkurangnya spesifisitas primer saat menempel dengan sekuen DNA target yang akan di amplifikasi. Oleh karena itu, penting dilakukan optimasi untuk mendapatkan amplicon dari gen target yang tepat (Sambrook & Russell 2001: 8.8; Yuwono 2006: 18).



Gambar 4.5.1.(2). Hasil elektroforesis produk PCR terhadap koloni transforman.

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

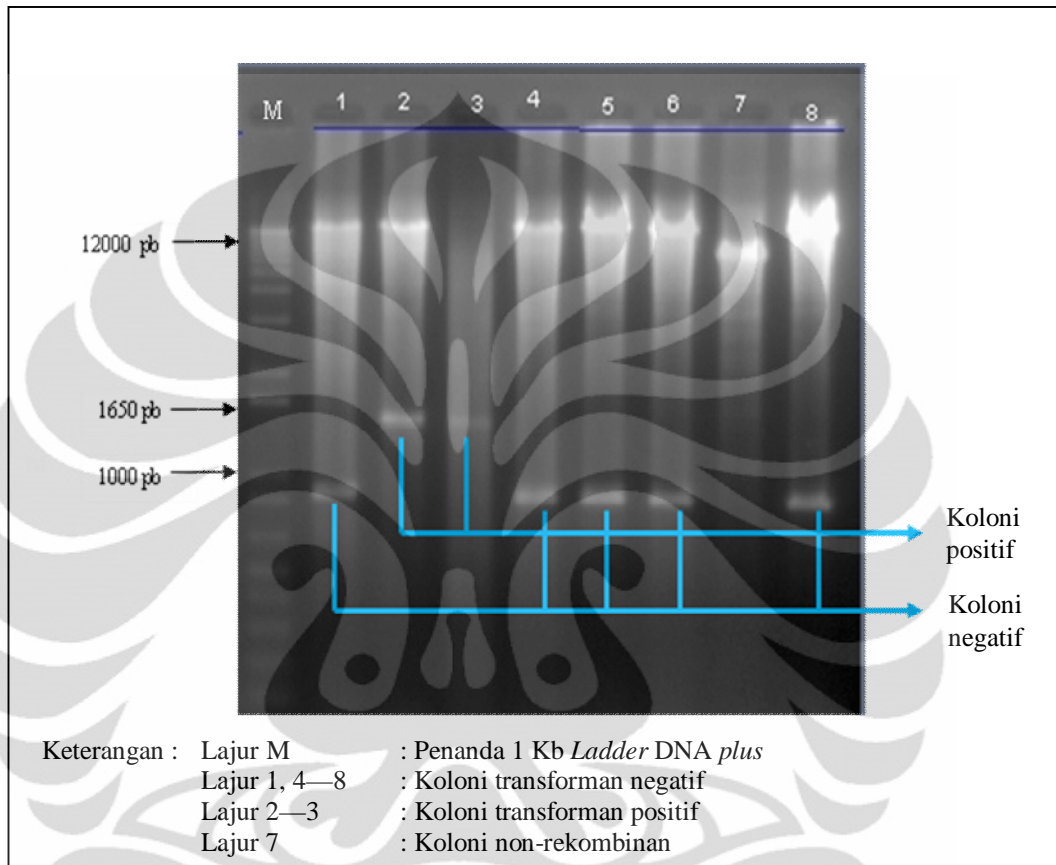
Jumlah siklus dari PCR juga menentukan kualitas produk PCR yang dihasilkan. Jumlah siklus yang digunakan dalam amplifikasi *OsERA1* adalah 34 siklus agar dihasilkan produk PCR yang baik. jumlah siklus yang optimal untuk proses PCR adalah 25—45 siklus (Fairbanks & Andersen 1999: 276). Siklus yang terlalu banyak akan meningkatkan konsentrasi produk yang tidak spesifik, sedangkan siklus yang terlalu sedikit akan mengurangi kuantitas produk yang diharapkan (Yuwono 2006: 20).

4.5.2 Verifikasi Transforman Dengan Digesti

Verifikasi terhadap hasil transformasi selain dilakukan dengan menggunakan teknik PCR juga dapat dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi (Klug & Cummings 1994: 397). Tujuan dari pemotongan dengan enzim restriksi adalah untuk mengetahui apakah plasmid rekombinan yang telah diisolasi sebelumnya benar-benar mengandung DNA sisipan yang diinginkan. Enzim yang digunakan adalah *Bam*HI dan *Sal*I.

Hasil visualisasi dengan gel agarosa 1%, dari delapan koloni transforman yang didigesti hanya dua koloni positif yang terdigesti dengan benar yaitu lajur 2 dan lajur 3 (Gambar 4.5.2.(1)). Hal tersebut ditunjukkan dengan terbentuk dua pita yaitu satu pita berukuran 11.837 pb yang merupakan ukuran dari vektor pCAMBIA 1301 (Cambia Labs 2006: 8). Pita berukuran sekitar 1400 pb yang merupakan ukuran dari fragmen gen *ERA1*. Koloni transforman lain (lajur 1, 4, 5, 6 dan 8) juga berhasil didigesti akan tetapi ukuran fragmen gen yang terpotong tidak sesuai karena pita yang terdigesti berukuran sekitar 800 pb. Ukuran tersebut merupakan ukuran dari fragmen gen *DREB1A* bukan fragmen gen *ERA1*. Adanya koloni transforman yang terpotong bukan pada ukuran 1400 pb dikarenakan saat melakukan proses ligasi terjadi proses kompetisi antara vektor rekombinan pCAMBIA-*DREB1A* dengan vektor rekombinan pGEM-*ERA1*. Hasil yang didapatkan memiliki beberapa kemungkinan koloni transforman yang akan terbentuk diantaranya adalah pCAMBIA-*ERA1* yang merupakan vektor rekombinan target atau pGEM-*ERA1* yang merupakan vektor rekombinan yang tidak diinginkan. Selain itu dapat pula terbentuk kembali vektor rekombinan awal

yaitu pGEM-*ERA1* dan pCAMBIA-*DREB1A* (Gambar 4.5.2(2)). Oleh karena itu, hasil dari transformasi memerlukan proses verifikasi dengan teknik PCR dan digesti.



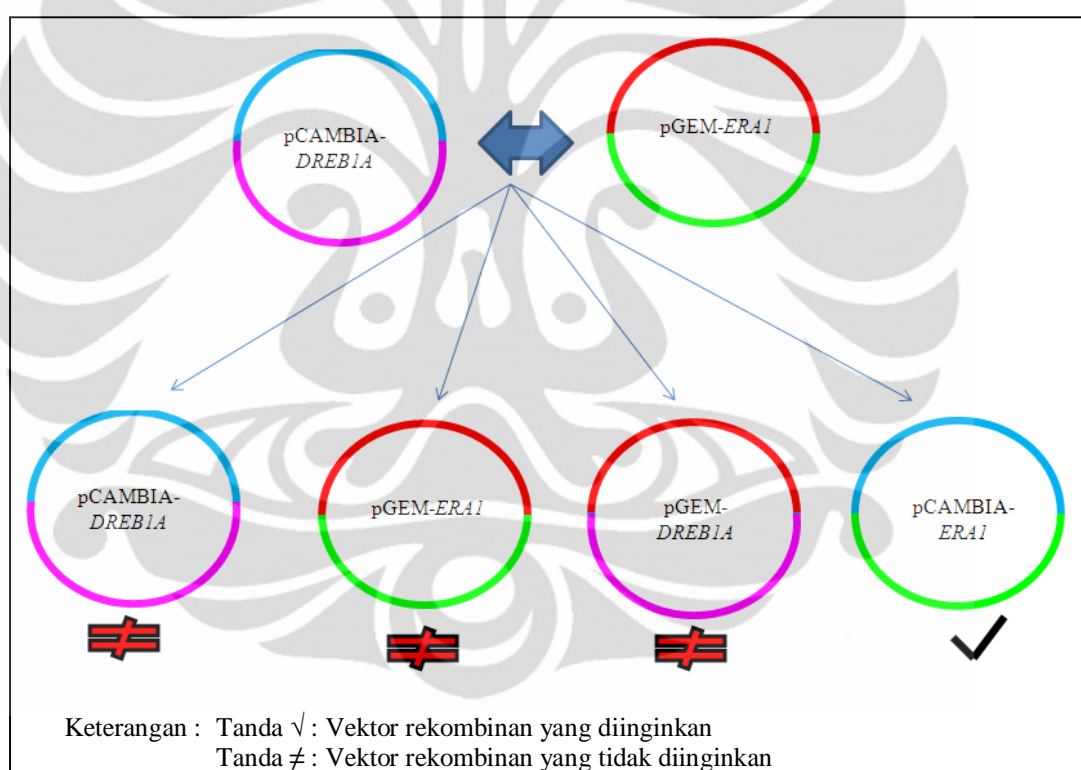
Gambar 4.5.2.(1). Hasil elektroforesis dari verifikasi produk PCR koloni transforman dengan digesti.

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

Lajur no 7 kemungkinan merupakan plasmid yang tidak memiliki sisipan dari DNA asing, baik gen *DREB1A* atau gen *ERA1*. Hasil visualisasi gel agarosa pada koloni lajur 7 hanya terbentuk satu pita dan ukuran dari fragmen pita tersebut juga lebih rendah daripada sampel lain yang merupakan vektor rekombinan. Hal tersebut menunjukkan adanya peristiwa religasi atau *self ligation*. Menurut Sambrook & Russell (2001:1.93), DNA T4 ligase yang ditambahkan saat proses ligasi akan mengkatalisis terbentuknya ikatan fosfodiester terhadap nukleotida yang letaknya berdekatan. Hal tersebut dapat terjadi apabila terdapat satu nukleotida yang membawa ujung 5' fosfat dan satu nukleotida lain membawa

gugus hidroksil pada ujung 3'. Religasi (*self ligation*) yang terjadi pada vektor pCAMBIA 1301 akan membuat vektor kembali ke bentuk sirkular sehingga DNA target (gen *ERAI*) tidak akan dapat tersisipi ke dalam vektor yang menyebabkan tidak terbentuk vektor rekombinan.

Proses digesti yang tidak sempurna juga dapat terjadi karena beberapa hal diantaranya adalah adanya kontaminasi. Kontaminasi dapat menyebabkan kemurnian DNA menjadi rendah sehingga mengganggu proses digesti. Efisiensi reaksi pemotongan sangat bergantung kepada kemurnian DNA. Kontaminan seperti protein, fenol, kloroform, EDTA, SDS dan kadar garam yang tinggi dapat menghambat kerja dari enzim restriksi (Ausubel *dkk.* 2002: 3.1.7).



Gambar 4.5.2.(2). Ilustrasi kemungkinan vektor rekombinan yang akan terbentuk saat proses ligasi dengan sistem kompetisi.

Persentase keberhasilan ligasi dihitung berdasarkan pada perbandingan antara dua koloni yang positif rekombinan dari hasil verifikasi dengan delapan koloni transforman yang diambil dari hasil transformasi. Perhitungan dari persentase keberhasilan ligasi terdapat pada Lampiran 5. Persentase yang didapatkan yaitu sebesar 25 %. Persentase keberhasilan yang kecil disebabkan

karena proses ligasi dengan kompetisi yang dilakukan pada penelitian sehingga menyebabkan gen *ERAI* sulit untuk tersisipi dengan vektor pCAMBIA 1301. Hal tersebut berdasarkan pada hasil digesti dengan jumlah koloni non rekombinan (pCAMBIA-*DREBIA*) yang dihasilkan lebih banyak yaitu 5 koloni dibandingkan dengan koloni positif rekombinan (pCAMBIA-*ERAI*) yaitu hanya 2 koloni.

Persentase keberhasilan yang kecil juga disebabkan karena ukuran fragmen dari gen *ERAI* yang besar yaitu 1400 pb. Ukuran fragmen gen *ERAI* yang akan disisipi lebih besar dibandingkan dengan gen *DREBIA* yang berukuran sekitar 800 pb sehingga lebih mudah untuk disisipi ke dalam vektor pCAMBIA 1301. Hal tersebut dibuktikan dengan penelitian Aryani (2011) yang juga melakukan proses ligasi dengan kompetisi pada gen *Osdep1-Tc* yang berukuran 800 pb. Gen tersebut juga disisipi ke dalam vektor pCAMBIA-*DREBIA* yang sebelumnya telah didigesti. Hasil dari persentase keberhasilan ligasi yang didapatkan dari penelitian tersebut adalah 88.9 % (Data belum dipublikasi). Dengan demikian, ukuran fragmen gen target yang akan disisipi ke dalam vektor dengan menggunakan sistem kompetisi berpengaruh terhadap hasil dari persentase keberhasilan ligasi.

4.6 Isolasi Plasmid Rekombinan

Koloni transforman yang positif kemudian ditumbuhkan dalam LB cair kemudian diinkubasi dalam *incubator shaker* (200 rpm, 37°C) selama 16—18 jam. Hasil kultur yang telah diinkubasi akan dilakukan isolasi plasmid rekombinan. Isolasi plasmid rekombinan tersebut dilakukan dengan metode lisis alkali (Sambrook & Russell 2001: 1.31—1.34). Prinsip kerja dari metode lisis alkali adalah melisiskan dinding sel *E. coli* dan memisahkan DNA plasmid dari DNA kromosom sel *E. coli*. Metode lisis alkali terdiri atas tiga tahapan besar yaitu persiapan sel, proses lisis sel dan pemulihan DNA plasmid. Persiapan sel dilakukan dengan sentrifugasi kultur plasmid hingga mendapatkan pelet. Proses lisis sel dalam metode lisis alkali menggunakan beberapa larutan yang spesifik yaitu *alkaline lysis solution I*, *alkaline lysis solution II* dan *alkaline lysis solution III*. *Alkaline lysis solution I* yang berfungsi dalam pemaparan DNA. *Alkaline*

lysis solution I merupakan campuran yang terdiri dari 50 mM glukosa, 25 mM Tris-Cl, dan 10 mM EDTA. Larutan glukosa berfungsi untuk menambah tingkat pH, sedangkan Tris-Cl berfungsi sebagai larutan buffer (penjaga) agar pH yang terbentuk tetap stabil, dan EDTA untuk melindungi DNA dari aktivitas DNase sehingga DNA tidak terdegradasi (Clark & Switzer 1964: 135; Boyer 1993: 459).

Alkaline lysis solution II berfungsi membuat DNA terpresipitasi dan lisisnya isi sel dan DNA kromosomal. Larutan tersebut terdiri dari 0.2 M NaOH dan 1 % SDS (Sodium Disulfat). Larutan SDS berperan dalam proses denaturasi protein. Denaturasi merupakan peristiwa pemisahan DNA dengan unsur protein. Proses tersebut diwujudkan dengan melisiskan membran sel yang sebagian besar terdiri dari protein. Larutan NaOH merupakan larutan yang membantu terciptanya kondisi basa sehingga proses denaturasi berjalan dengan baik. Larutan *alkaline lysis solution* III terdiri dari 5 M CH₃COOK (Kalium Asetat), CH₃COOH (asam asetat) pekat, dan akuades. Larutan kalium asetat akan bereaksi dengan asam asetat sehingga terbentuk larutan buffer. Larutan tersebut akan bereaksi dengan SDS sehingga DNA plasmid akan bersih dari kotoran zat-zat yang tidak diperlukan (Davis *dkk.* 1994: 250--251). Pemulihan DNA dilakukan dengan menambahkan etanol absolut untuk membantu presipitasi dari DNA dan etanol 70% untuk menghilangkan kotoran yang masih terdapat pada DNA (Sambrook & Russell 2001: 1.32—1.34). Hasil dari isolasi plasmid rekombinan kemudian dilakukan verifikasi untuk memastikan apakah plasmid dari pCAMBIA-*ERA1* sudah berhasil diisolasi.

4.7 Verifikasi Plasmid Rekombinan

4.7.1 Verifikasi Dengan Teknik PCR

Verifikasi plasmid rekombinan dilakukan dengan menggunakan teknik PCR. Primer yang digunakan sama dengan primer pada verifikasi koloni transforman, yaitu primer *ERA1-forward* dan primer *ERA1-reverse*. Kedua primer tersebut digunakan karena bersifat spesifik terhadap gen *ERA1*, sehingga sekuen yang bukan merupakan gen *ERA1* tidak akan teramplifikasi. Hasil verifikasi

dengan menggunakan teknik PCR dikatakan positif apabila terdapat satu pita yang berukuran 1400 pb yang merupakan ukuran dari fragmen gen *ERAI*.

Hasil visualisasi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa 1% menunjukkan adanya fragmen DNA spesifik yang berukuran sekitar 1400 pb. Ukuran fragmen DNA tersebut sesuai dengan ukuran fragmen gen *ERAI* yaitu sekitar 1400pb sama dengan pita yang terbentuk pada hasil digesti dari vektor rekombinan pGEM-*ERAI*. Hal tersebut menunjukkan bahwa plasmid rekombinan pCAMBIA-*ERAI* berhasil diisolasi.



Gambar 4.7.1. Hasil elektroforesis verifikasi isolasi plasmid dengan PCR
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekular BB-BIOGEN, 2011.]

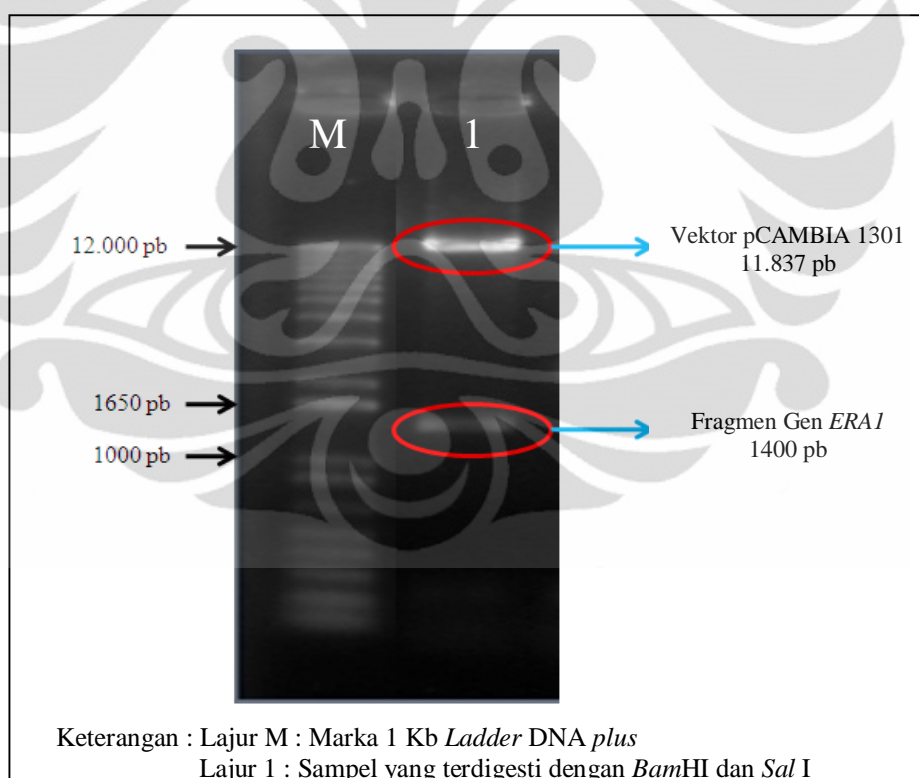
4.7.2 Verifikasi dengan Teknik Digesti

Plasmid rekombinan yang telah diisolasi, kemudian kembali dilakukan verifikasi. Verifikasi selain dilakukan dengan menggunakan teknik PCR dapat pula dengan enzim restriksi yang bertujuan untuk mengetahui apakah plasmid rekombinan yang telah diisolasi sebelumnya benar-benar mengandung DNA sisipan yang diinginkan (Klug & Cummings 1994: 397). Enzim yang digunakan adalah enzim yang sama saat melakukan digesti vektor rekombinan dan verifikasi koloni transforman yaitu *Bam*HI dan *Sal*I.

Enzim *Bam*HI dan *Sal*I merupakan jenis enzim restriksi endonuklease tipe II yaitu enzim yang tepat memotong pada fragmen DNA target (Weaver 1999:

65). Jenis potongan yang dihasilkan oleh kedua enzim adalah potongan kohesif (*Sticky end*). Menurut Brown (1987: 55), hasil digesti dengan ujung potongan kohesif memiliki efisiensi ligasi yang lebih tinggi daripada ujung potongan rata (*Blunt end*). Hal tersebut disebabkan karena ujung kohesif akan secara tepat berikatan melalui ikatan hidrogen dan menghasilkan rekombinasi yang stabil.

Hasil visualisasi dari proses digesti enzim restriksi dengan gel agarosa 1% memperlihatkan adanya dua pita yang masing-masing berukuran 11.837 pb dan 1400 pb (Gambar 4.7.2). Ukuran kedua fragmen tersebut sesuai dengan ukuran fragmen dari koloni transforman yang juga diverifikasi dengan digesti enzim restriksi. Pita yang berukuran 11.837 pb merupakan fragmen dari vektor ekspresi pCAMBIA-1301 sedangkan fragmen DNA yang berukuran 1400 pb merupakan fragmen dari gen *ERA1*. Hal tersebut menunjukkan bahwa hasil isolasi plasmid berhasil didigesti dan ukuran pita yang dihasilkan tepat.



Gambar 4.7.2. Hasil elektroforesis verifikasi produk isolasi plasmid dengan digesti.

[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekular BB-BIOGEN, 2011.]

4.8 Transformasi ke *Agrobacterium tumefaciens* dengan Elektroporasi

Vektor rekombinan pCAMBIA-*ERA1* ditransformasikan kedalam *A. tumefaciens* dengan menggunakan elektroporasi. Teknik tersebut digunakan karena tidak merusak dinding sel inang. Elektroporasi berperan untuk meningkatkan efisiensi integrasi DNA pada sel inang. Aliran listrik yang digunakan dalam elektroporasi akan menyebabkan membran sel mengalami kerusakan sementara sehingga membuat strukturnya menjadi permeable untuk proses integrasi DNA. Kejut listrik mengakibatkan pembentukan pori sementara pada membran sel, sehingga molekul DNA dapat masuk kemudian pori membran sel akan menutup kembali (Wong 2006: 126).

Metode elektroporasi digunakan untuk transformasi ke *A. tumefaciens* karena elektroporasi memiliki beberapa keuntungan, yaitu tekniknya yang cukup sederhana, dapat diaplikasikan untuk transfer makromolekul dan dapat digunakan untuk sel eukariot dan sel prokariot (Mahmood *dkk.* 2008:3). Elektroporasi memerlukan sel kompeten yang membantu integrasi plasmid ke dalam sel inang. Sel kompeten tersebut biasanya disebut sebagai sel elektrokompeten.

Pembuatan sel elektrokompeten dilakukan sesuai dengan prosedur dari BioRad (2000: 1--31). Sel elektrokompeten dibuat dengan penambahan gliserol 10% dingin dan sorbitol 1M dingin. Penambahan sorbitol berfungsi untuk mempertahankan tekanan osmotik sel, sehingga sel tidak mudah rusak pada kondisi lingkungan yang tidak sesuai (Walker & Rapley 2002: 527). Gliserol yang ditambahkan dalam sel akan bertindak sebagai krioprotektan dalam penyimpanan kultur sel (BioRad 2000: 7). Krioprotektan intraselular berperan dalam menghambat pembentukan kristal intraselular yang akan mengakibatkan terjadinya kerusakan pada organel-organel di dalam sel sehingga menyebabkan kematian sel (Katha 1985: 33; Simione 1998: 1).

Tegangan listrik yang digunakan dalam transformasi berbeda-beda tergantung pada sel inang yang digunakan. Transformasi *A. tumefaciens* dengan elektroporasi pada penelitian menggunakan tegangan listrik sebesar 2.2 kV. Hal tersebut sesuai dengan BioRad (2000: 9) bahwa untuk transformasi menggunakan metode elektroporasi dengan *A. tumefaciens* tegangan aliran listrik yang optimal

adalah sebesar 2.2 kV dengan satu kali aliran dalam kuvet 0.1 cm. Aliran listrik yang tidak tepat juga akan mempengaruhi efisiensi transformasi dengan elektroporasi (Mahmood *dkk.* 2008: 3).

Pembuatan sel kompeten dengan metode fisik melalui tegangan listrik seperti sel elektrokomen memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan sel kompeten yang dibuat dengan metode kimiawi menggunakan CaCl_2 . Sel elektrokomen akan meningkatkan efisiensi transformasi hingga mencapai 10^{10} transforman/ μg DNA dan dapat digunakan untuk plasmid yang berukuran kurang dari 15 Kpb (Sambrook & Russell 2001: 1.122). Ukuran vektor pCAMBIA 1301 yang digunakan dalam penelitian yaitu 11.837 pb sehingga dapat menggunakan sel elektrokomen untuk proses transformasi.

DNA plasmid yang sudah dielektroporasi kemudian ditambahkan LB cair untuk pemulihan sel dan diinkubasi selama 3 jam pada *incubator shaker* (30°C 200 rpm). Proses inkubasi selama 3 jam bertujuan untuk meningkatkan ekspresi dari *A. tumefaciens* setelah dilakukan elektroporasi (Lin 1994: 13). Hasil inkubasi kemudian di-*spread* di medium LB padat dengan penambahan antibiotik rifampisin dan kanamisin untuk seleksi. Medium LB padat tersebut kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 48 jam. Newbury (2003 :89) menyatakan bahwa suhu 28--30°C merupakan suhu yang optimal untuk pertumbuhan *A. tumefaciens*. Pertumbuhan optimal dari *A. tumefaciens* adalah 48 jam (Opodebe 2006: 16).

Koloni yang dihasilkan pada LB padat hasil transformasi sangat banyak hingga menutupi keseluruhan bagian pada medium. Proses elektroporasi kembali diulang agar menghasilkan koloni yang dapat diduga sebagai koloni rekombinan. Pengulangan yang telah dilakukan adalah sebanyak sembilan (9) kali pengulangan. Akan tetapi, hasil yang didapatkan dari pengulangan tersebut tetap sama dan bahkan pada beberapa pengulangan elektroporasi hasil yang didapatkan adalah tidak ada koloni yang tumbuh pada medium. Dengan demikian, koloni yang diduga merupakan koloni rekombinan dari pCAMBIA-*ERA1* belum berhasil didapatkan.

Proses transformasi yang tidak berhasil tersebut dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya adalah ketidakstabilan plasmid rekombinan, fisiologis

dari sel inang dan kemurnian DNA plasmid yang masih rendah. Ketidakstabilan dari plasmid rekombinan dapat disebabkan karena proses ligasi yang kurang efisien umumnya disebabkan karena perbandingan konsentrasi antara vektor dan gen sisipan yang tidak tepat sehingga mempengaruhi efisiensi proses ligasi (Sambrook & Russell 2001: 1.157). Akan tetapi, ketidakstabilan plasmid rekombinan pCAMBIA-*ERA1* pada penelitian lebih disebabkan karena sistem kompetisi yang dilakukan saat ligasi vektor dan gen *ERA1*. Hasil digesti vektor ekspresi pCAMBIA 1301 yang sebelumnya telah disisipi oleh gen *DREB1A* akan diligasi dengan gen *ERA1*. Gen *ERA1* berukuran 1400 pb lebih besar daripada gen *DREB1A* yang hanya berukuran sekitar 800 pb. Perbedaan ukuran yang besar dari fragmen gen *ERA1* tersebut dapat menyebabkan proses ligasi tidak berjalan dengan optimal.

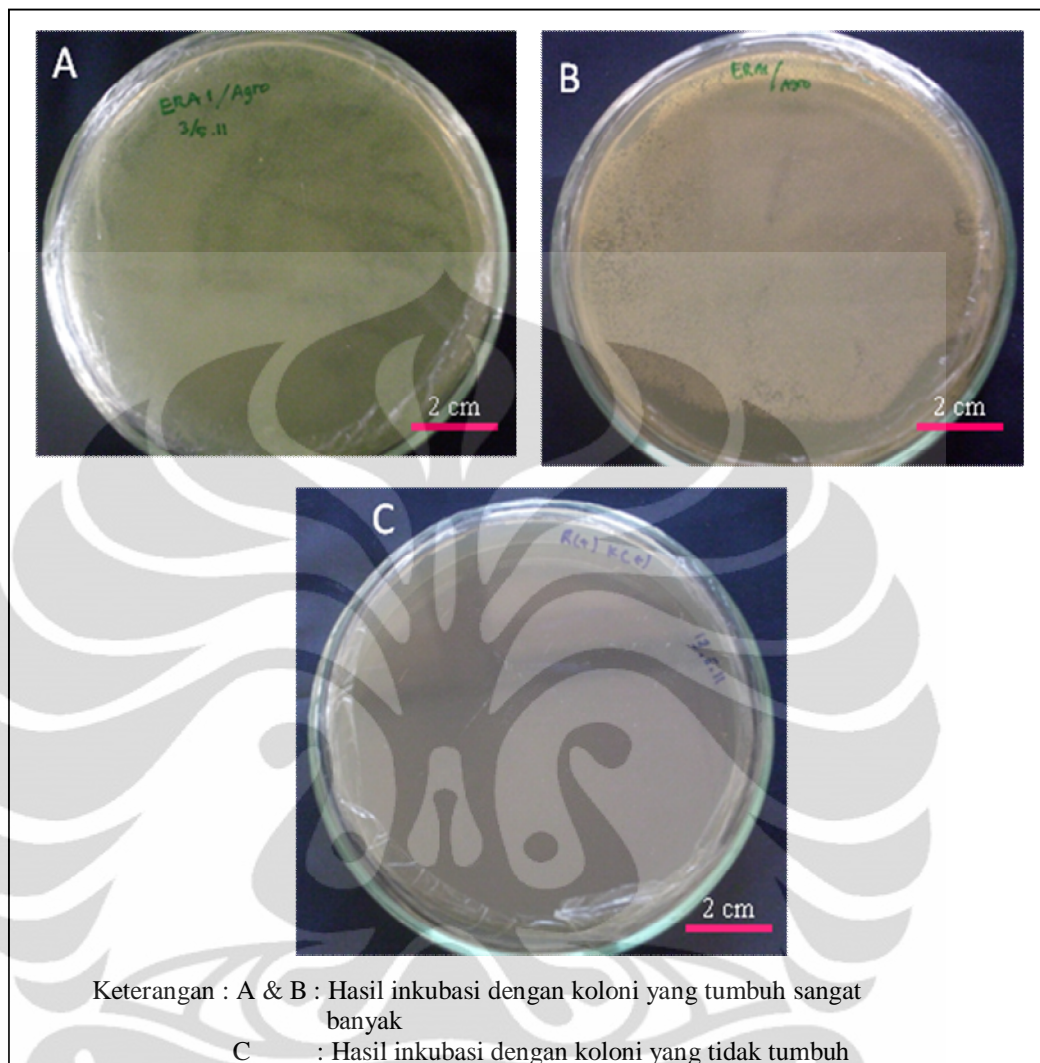
Kondisi fisiologis dari sel inang yang tidak baik juga dapat menyebabkan efisiensi transformasi menjadi menurun. Sel inang yang digunakan dalam penelitian adalah *A. tumefaciens* strain LBA 4404. Pemilihan strain *A. tumefaciens* sangat memengaruhi proses transformasi pada tanaman. Salah satu kelemahan transformasi dengan *A. tumefaciens* adalah terbatasnya tanaman inang yang dapat diinfeksi (Rachmawati 2006: 40). Strain LBA 4404 yang merupakan strain yang umum digunakan untuk transformasi pada tanaman. Azhakanandam dkk (2000: 430—431) menyebutkan bahwa terdapat beberapa strain *A. tumefaciens* yang dapat digunakan untuk transformasi tanaman padi Japonica, Indica dan Javanica dengan efisiensi yang cukup tinggi yaitu strain LBA 4404, EHA 105, dan EHA 101.

Kemurnian DNA plasmid yang rendah juga merupakan salah satu penyebab ketidakberhasilan transformasi dalam penelitian. Hal tersebut dapat terjadi karena masih adanya pengotor. Kontaminan seperti sodium dedosil sulfat (SDS), fenol, kloroform, EDTA dan garam yang tinggi dapat mengganggu proses transformasi (Ausubel dkk. 2002: 3.17). Kontaminasi tersebut umumnya dapat terjadi saat melakukan isolasi plasmid rekombinan.

Ketidakterhasilan proses transformasi pada penelitian kemungkinan disebabkan karena adanya kontaminasi dari EDTA yang ditambahkan saat melakukan isolasi plasmid. *Ethylene Diamine Tetra Acetic acid* (EDTA)

merupakan kation bivalen yang digunakan untuk menghambat kerja DNase sehingga DNA tidak mudah terdegradasi saat penyimpanan. Akan tetapi menurut Wise *dkk.* (2006: 44—46), menyatakan bahwa pada saat DNA akan disisipi ke dalam sel *A. tumefaciens*, adanya kation bivalen dapat mengganggu struktur dari dinding sel. Struktur dinding sel yang terganggu tersebut akan mengakibatkan dinding sel tidak dapat kembali menutup setelah terbentuk pori sementara akibat adanya aliran listrik. Dinding sel yang tidak kembali ke dalam keadaan yang awal akan memungkinkan DNA plasmid tidak akan masuk ke dalam sel bakteri *A. tumefaciens* dan hanya sel elektrokompeten saja yang dapat masuk ke dalam sel *A. tumefaciens*. Kasus tersebut dibuktikan dengan hasil koloni yang tumbuh pada LB padat setelah diinkubasi selama 48 jam sangat banyak menutupi hampir seluruh bagian dari medium sehingga tampak seperti kontrol positif (Gambar 4.8.(1). A & B). Selain itu, terganggunya struktur dinding sel juga dapat mengakibatkan DNA plasmid tidak dapat berintegrasi dengan *A. tumefaciens* sehingga saat ditumbuhkan dalam medium LB padat tidak ada koloni transforman yang tumbuh (Gambar 4.8.(1). C).

Penggunaan EDTA yang dicampurkan dalam RNase untuk melarutkan pelet DNA plasmid saat melakukan isolasi dapat digantikan dengan menggunakan akuades steril (dH₂O). Penggunaan akuades tersebut akan menurunkan kemungkinan kontaminasi yang berasal dari EDTA karena akuades hanya berperan sebagai pelarut bukan garam. Akan tetapi, akuades tidak dapat menghambat kerja dari DNase, sehingga apabila DNA plasmid tersebut disimpan dalam jangka waktu yang lama akan lebih mudah terdegradasi. Penggunaan akuades sebagai pengganti tris-EDTA sebaiknya digunakan jika DNA plasmid hasil isolasi langsung digunakan untuk proses transformasi sehingga tidak membutuhkan penyimpanan yang lama.

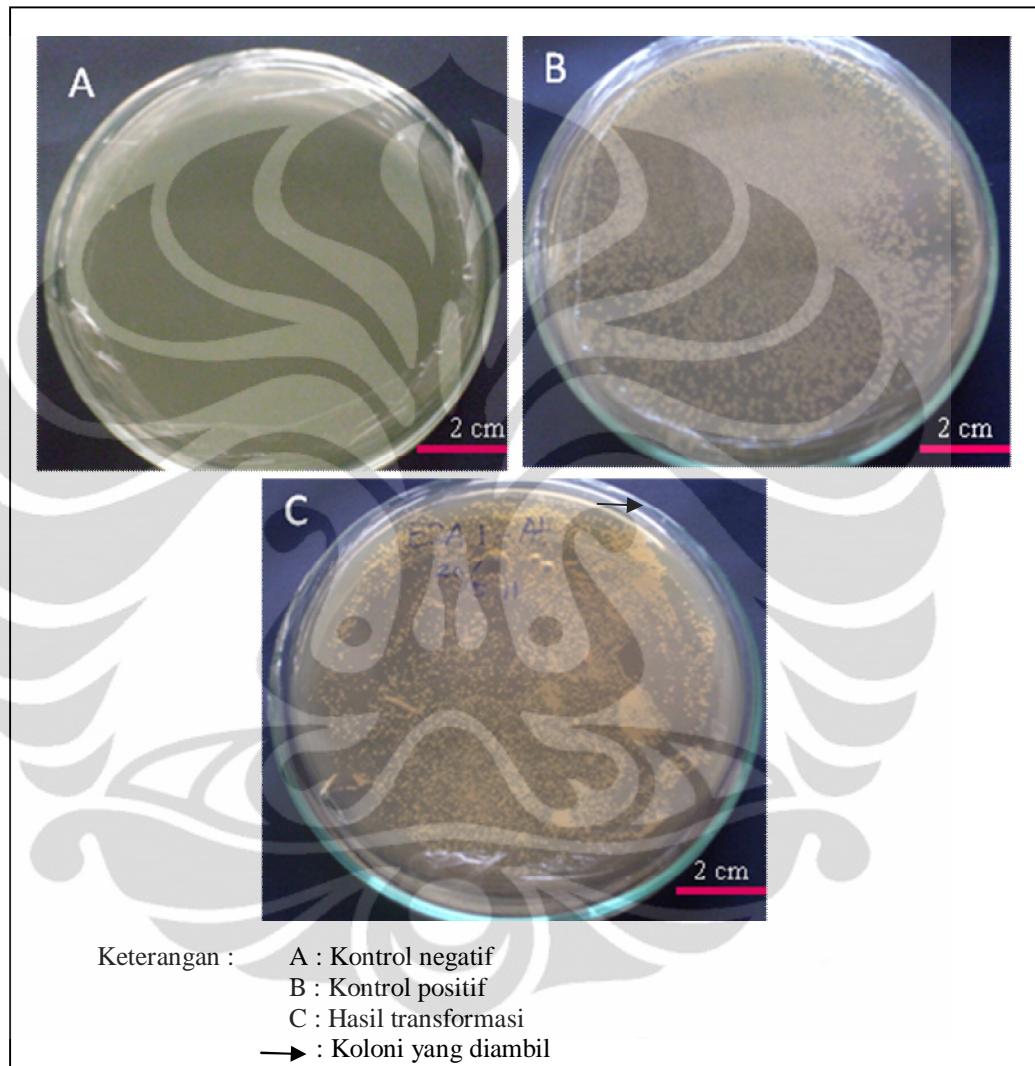


Gambar 4.8.(1). Hasil transformasi yang tidak berhasil
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekular BB-BIOGEN, 2011.]

Kontrol positif dan kontrol negatif juga disertakan dalam proses transformasi *A. tumefaciens* dengan elektroporasi. Kontrol negatif sel kompeten (Gambar 4.8.(2) A) menunjukkan tidak terbentuknya koloni pada medium. Hal tersebut menunjukkan bahwa sel kompeten yang digunakan berkualitas baik. Hasil pengamatan menunjukkan kontrol positif sel kompeten dan transformasi tumbuh dengan baik hampir diseluruh medium (Gambar 4.8.(2) B). Dengan demikian, ketidakberhasilan proses elektroporasi bukan berasal dari kontaminasi dari lingkungan.

Pengujian terhadap koloni yang tumbuh tetap dilakukan pada pengulangan ke-6 untuk mengetahui koloni yang tumbuh adalah koloni transforman maka

diisolasi satu kandidat koloni transforman. Pada pengulangan tersebut koloni yang tumbuh tidak terlalu banyak seperti pada pengulangan sebelumnya. Kandidat koloni memiliki ukuran yang lebih besar daripada koloni lain (Gambar 4.8.(2) C).



Gambar 4.8.(2). Hasil Transformasi *A. tumefaciens* dengan elektroporasi
 [Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekular BB-BIOGEN, 2011.]

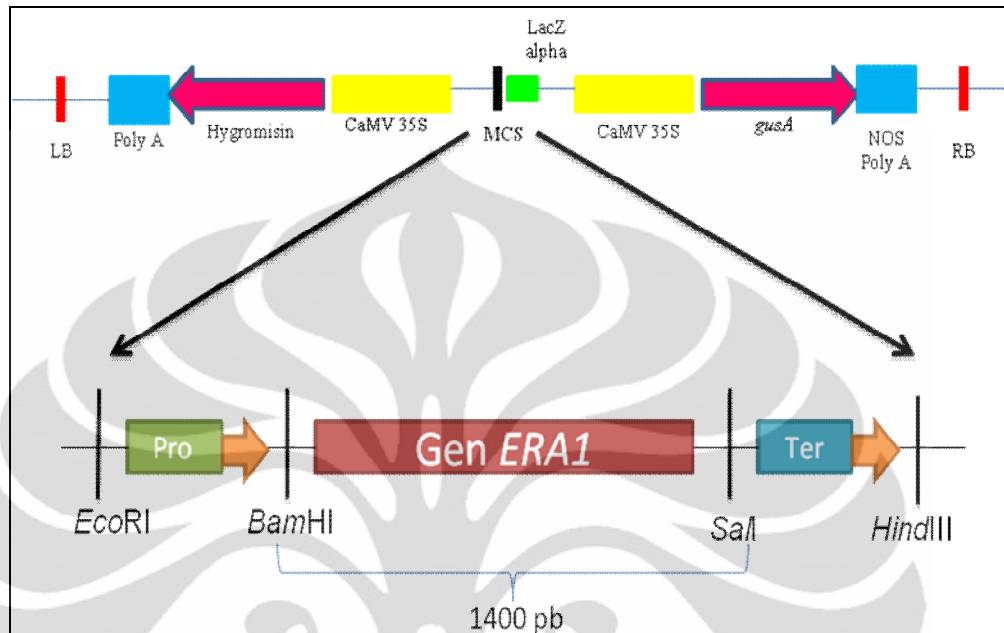
Koloni yang diduga merupakan koloni transforman tersebut kemudian diisolasi dan diinkubasi pada LB cair dengan penambahan antibiotik rifampisin dengan konsentrasi akhir 50 µg/ml dan kanamisin dengan konsentrasi akhir 100 µg/ml. Proses inkubasi dilakukan selama dua hari dalam *incubator shaker* pada suhu 30°C. Newburry (2003 :89) menyatakan bahwa suhu 28--30°C merupakan suhu yang optimal untuk pertumbuhan *A. tumefaciens*. Hasil inkubasi kemudian

digunakan untuk isolasi plasmid rekombinan dan dilakukan verifikasi untuk memastikan kandidat koloni tersebut benar merupakan transforman positif atau bukan.

Beberapa metode yang dapat digunakan untuk melakukan transformasi menggunakan *A. tumefaciens* selain elektroporasi adalah metode kejutan panas (*Heat shock*) atau metode *freeze/thaw*, dan metode *triparental mating*. Metode *freeze/thaw* memiliki frekuensi transformasi yang relatif kecil hanya 10^2 sampai 10^3 transforman per μg DNA akan tetapi keunggulan dari metode tersebut adalah persiapannya yang mudah dilakukan. Metode *triparental mating* membutuhkan tiga jenis mikroorganisme, yaitu *E.coli* yang berperan dalam proses pemindahan ke *A. tumefaciens*, *E.coli* yang mengandung Ti plasmid serta *Agrobacterium* sebagai sel inang. Penggunaan ketiga mikroorganisme tersebut membuat metode *triparental mating* sangat kompleks dan sulit dilakukan (Lin 1994: 12; Wise dkk. 2006: 45).

Proses transformasi vektor rekombinan pCAMBIA-*ERA1* ke dalam *A. tumefaciens* memerlukan suatu konstruksi yang lengkap agar transformasi dapat berlangsung. Konstruksi tersebut meliputi penyisipan fragmen gen *ERA1* ke dalam situs MCS pada pCAMBIA 1301. Fragmen gen *ERA1* yang telah tersisipi dalam vektor ekspresi pCAMBIA 1301 memiliki promoter dan terminator. Kedua faktor transkripsi tersebut mengandung situs pemotongan dengan enzim restriksi yaitu *EcoRI* yang terletak pada ujung 5' dari promoter dan *HindIII* yang terletak pada ujung 3' dari terminator. Fragmen gen *ERA1* beserta promoter dan terminator berada pada situs *Multiple Cloning Site* (MCS) pada pCAMBIA 1301. Proses transformasi gen *ERA1* ke dalam *A. tumefaciens* juga membutuhkan suatu konstruksi gen yang dikedua ujungnya terdapat situs T-DNA *right border* dan T-DNA *left border* untuk membantu gen *ERA1* berintegrasi dengan kromosom pada sel bakteri *A. tumefaciens*. Diantara kedua situs tersebut terdapat beberapa bagian penting seperti CaMV 35S dan NOS poly A yang masing-masing merupakan promoter dan terminator dari proses transformasi *A. tumefaciens*, higromisin digunakan sebagai seleksi antibiotik untuk jaringan tanaman yang telah diinfeksi dengan *A. tumefaciens* yang telah tersisipi gen *ERA1*, serta gen *gusA*

sebagai gen pelapor yang berperan dalam ekspresi gen sementara terhadap jaringan tanaman (Gambar 4.8.(3)).



Gambar 4.8.(3). Konstruksi transformasi gen *ERA1* ke dalam *A. tumefaciens*.

4.9 Isolasi Plasmid Hasil Transformasi dan Verifikasi Transforman

4.9.1 Isolasi Plasmid Hasil Transformasi

Kultur *A. tumefaciens* yang telah ditransformasi menggunakan teknik elektroporasi kemudian diisolasi dan diinkubasi dalam LB cair yang mengandung antibiotik kanamisin dan rifampisin, inkubasi selama satu malam dalam *shaker incubator* (200 rpm, 25°C). Vektor ekspresi pCAMBIA 1301 memiliki sifat resisten terhadap antibiotik kanamisin, sehingga penambahan kanamisin berperan dalam seleksi bakteri (Cambia Labs 2006: 5). Antibiotik rifampisin berfungsi untuk mengeliminasi *A. tumefaciens* agar tidak tumbuh terus menerus (*over growth*). *A. tumefaciens* yang tumbuh terus menerus akan mengganggu proses transformasi tanaman dan menghambat pertumbuhan dari jaringan tanaman yang ditransformasikan (Opabode 2006:16). Le *dck.* (2001: 2089) menyebutkan penambahan kanamisin dan rifampisin yang tepat akan berperan dalam

meningkatkan efisiensi transformasi serta membantu dalam meningkatkan sensitivitas jaringan tanaman yang akan ditransformasi.

Isolasi kultur *A. tumefaciens* menggunakan metode alkali lisis dengan modifikasi pemberian lisozim berdasarkan Sambrook & Russel (2001 : 1.28). Prosedur pelaksanaan isolasi plasmid sama dengan isolasi plasmid alkali lisis *minipreparation*. Proses isolasi plasmid menggunakan larutan yang spesifik berupa *alkaline solution I*, *alkaline solution II*, *alkaline solution III*. Modifikasi yang dilakukan pada isolasi plasmid tersebut terletak pada adanya penambahan lisozim pada *alkaline solution I*. Lisozim merupakan enzim yang dapat merusak ikatan β -1,4-glikosidik antara N-acetylglucosamin dan asam N-asetilmuramic pada struktur peptidoglican yang terdapat pada dinding sel bakteri sehingga penambahan lisozim berguna untuk membantu proses lisisnya dinding sel bakteri *A. tumefaciens* yang termasuk kedalam kelompok bakteri gram positif (Sambrook & Russell 2001 : 1.153; Madigan *dkk.* 2009: 4.8).

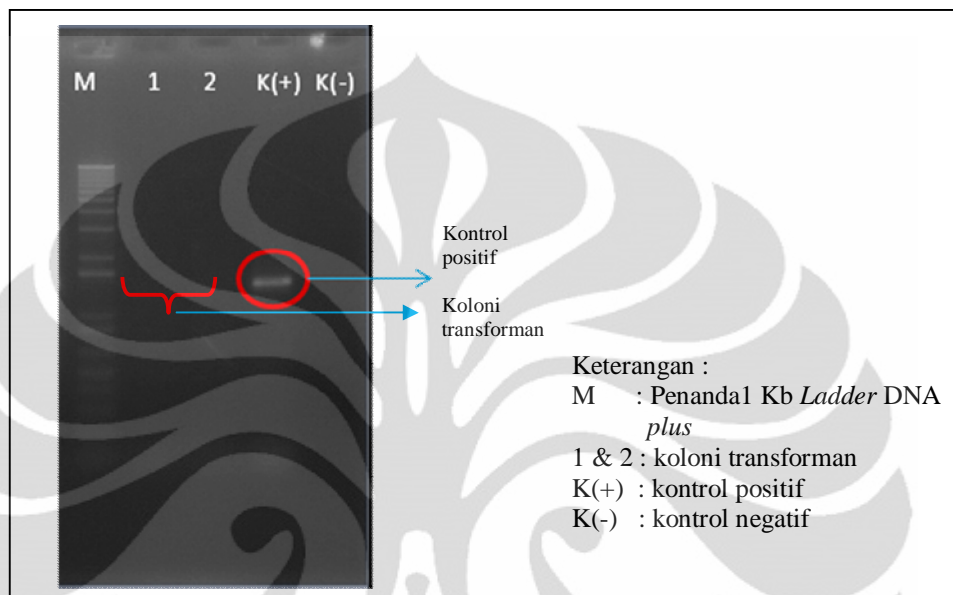
4.9.2 Verifikasi hasil transformasi *A. tumefaciens* dengan Teknik PCR

Proses verifikasi hasil transformasi *A. tumefaciens* dilakukan dengan teknik PCR. *Template* DNA yang digunakan berupa DNA plasmid yang sebelumnya telah diisolasi. Primer yang digunakan dalam amplifikasi PCR adalah *OsERA1-F* dan *OsERA1-R*. Kedua primer tersebut adalah primer yang spesifik terhadap gen *ERA1* sehingga hanya vektor rekombinan yang telah tersisipi gen target yang dapat teramplifikasi.

Hasil PCR divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% (80 v, 45 menit). Menurut Ausubel *dkk.* (2002: 2.14), gel agarosa 1% dapat digunakan untuk menganalisis fragmen DNA sebesar 500 pb--10.000 pb. Kontrol positif dan kontrol negatif juga disertakan dalam proses PCR. Kontrol positif merupakan plasmid pCAMBIA-*ERA1* dan kontrol negatif berupa air. Hasil visualisasi menunjukkan bahwa proses PCR berjalan dengan baik tanpa adanya kontaminasi.

Berdasarkan hasil visualisasi dengan gel agarosa 1%, kandidat koloni yang telah di PCR tidak menunjukkan adanya pita. Hal tersebut menunjukkan bahwa

kandidat koloni yang diisolasi bukan merupakan koloni transforman (Gambar 4.9.2). Dengan demikian, vektor rekombinan pCAMBIA-*ERA1* belum berhasil di transformasi kedalam *A. tumefaciens* sehingga data dari tahapan kerja selanjutnya mengenai transformasi ke kalus padi cv. Taipei 309 belum dapat dilaporkan.



Gambar 4.9.2. Visualisasi kandidat koloni transforman dengan PCR.
 [Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekuler BB-BIOGEN, 2011.]

4.10 Pengujian Konstruksi Vektor dengan *Particle Bombardment*

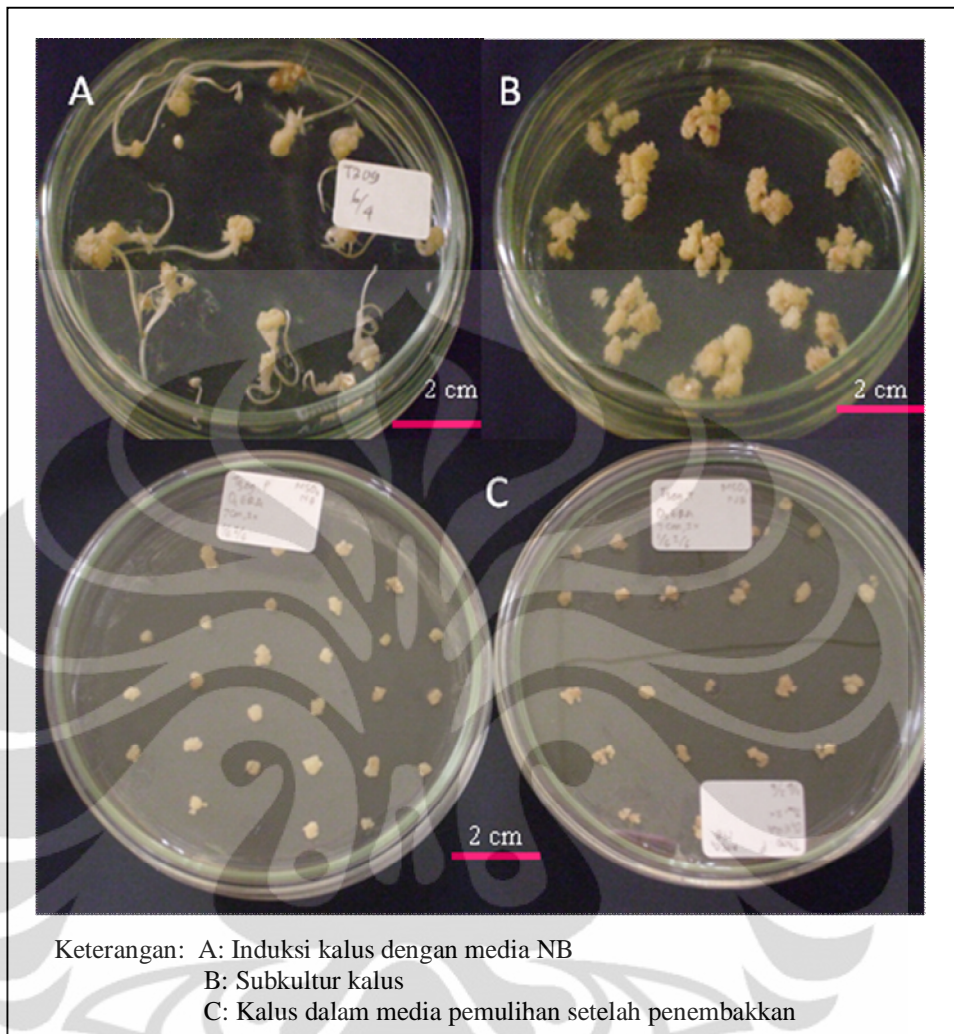
Vektor rekombinan pCAMBIA-*ERA1* yang belum dapat ditransformasikan kedalam *A. tumefaciens* perlu dilakukan pengujian untuk memastikan konstruksi dari vektor rekombinan pCAMBIA-*ERA1* apakah berperan dalam ketidakberhasilan proses transformasi tersebut atau tidak. Metode transformasi yang dapat digunakan adalah *Particle bombardment*. *Particle bombardment* merupakan sebuah metode transformasi yang dilakukan dengan menggunakan partikel mikroskopik emas atau tungsten yang sebelumnya telah dilapisi oleh vektor rekombinan target (pCAMBIA-*ERA1*) ditembakkan agar DNA dapat masuk kedalam sel atau jaringan tanaman.

Sel atau jaringan tanaman yang akan ditembakkan berupa kalus embriogenik. Kalus embriogenik tersebut berasal dari embrio matang padi cv. Taipei 309 dan diinduksi dalam media NB (Gambar 4.10.A) dan dilakukan

subkultur dalam media yang sama setiap 2 minggu (Gambar 4.10.B). Proses induksi dan subkultur kalus dilakukan oleh Tim Peneliti di Laboratorium Biologi Molekuler BB-BIOGEN. Komposisi media NB dapat dilihat pada Lampiran 3. Keuntungan penggunaan kalus embrio matang pada transformasi adalah materi dari embrio matang padi mudah didapatkan dan prosedur transformasi yang lebih singkat daripada penggunaan kalus yang berasal dari embrio yang belum matang (Guo *dkk.* 2011: 3). Kalus embriogenik yang akan ditransformasikan memiliki struktur khas yaitu remah, berbentuk granular, berwarna kuning terang dan permukaan yang kering. Kalus embriogenik memiliki tingkat diferensiasi yang tinggi sehingga memudahkan proses transformasi (Hei & Komari 2008: 824).

Kalus-kalus embriogenik sebelum ditembakkan terlebih dahulu diinkubasi selama 4 jam pada media osmotikum. Media osmotikum yang digunakan dalam penelitian adalah manitol-sorbitol. Santoso *dkk.* (2004: 43—44) menyatakan bahwa penggunaan media osmotikum manitol sorbitol dapat meningkatkan ekspresi transien GUS. Perlakuan osmotikum pada sel atau jaringan yang ditembakkan juga diharapkan dapat menurunkan presentase kematian eksplan akibat proses penembakkan. Akan tetapi, perlakuan osmotikum yang berlebihan juga dapat menyebabkan kematian eksplan akibat terjadinya plasmolisis pada jaringan yang ditembakkan.

Proses penembakkan dilakukan dengan tekanan gas helium sebesar 1.100 psi, vakum 27 in Hg, jarak tembak 6 cm dan jumlah tembakan satu kali. Kalus yang telah mengalami penembakkan kemudian ditumbuhkan dalam media pemulihan (Gambar 4.10.C). Kultur kalus yang ditanam dalam media pemulihan bertujuan untuk mengembalikan keadaan fisiologis kalus setelah mengalami penembakkan. Kalus dapat kembali tumbuh dengan memanfaatkan nutrisi yang terkandung dalam media pemulihan secara optimal. Media pemulihan yang digunakan dalam penelitian adalah media MS. Komposisi media MS dapat dilihat pada Lampiran 4.



Gambar 4.10. Kalus yang digunakan untuk transformasi dengan *Particle Bombardment*.

[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekular BB-BIOGEN, 2011.]

4.11 Uji Ekspresi Transien Gen *gus* Secara Histokimia

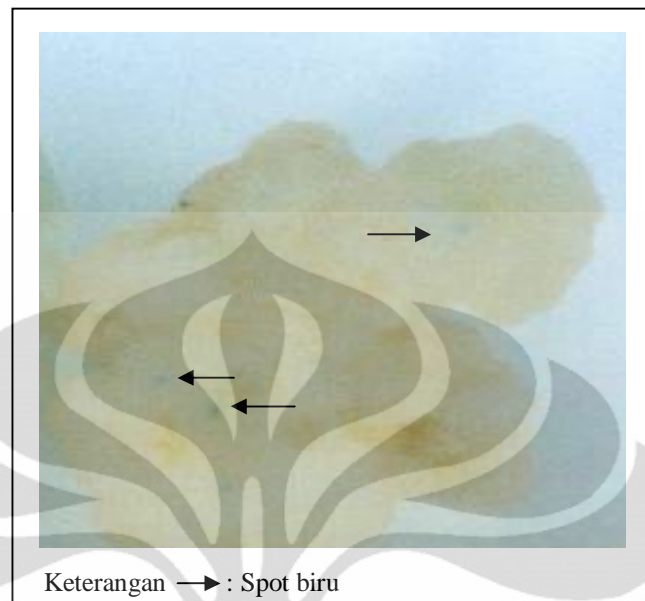
Vektor transformasi yang digunakan dalam penelitian adalah pCAMBIA 1301. Konstruksi dari vektor tersebut memiliki gen *gus* sebagai gen pelapor. Oleh karena itu, pengecekan ekspresi gen transien dapat dilakukan dengan uji histokimia GUS menggunakan larutan X-*gluc*. Reaksi awal saat X-*gluc* (5-bromo,4-chloro,3-indolyl- β -D-glucoronide) diinfeksi ke jaringan embrionik pada kalus padi maka produk yang dihasilkan berupa 5-bromo,4-chloro,3-indolyl yang tidak berwarna dan bersifat larut. Produk awal tersebut kemudian akan mengalami proses dimerisasi oksidasi menjadi 5,5'-dibromo-4,4'-

dikloro-indigo yang berwarna dan tidak larut. Warna yang dihasilkan adalah kebiruan yang berasal dari struktur indigo (Stomp 1992: 103--104).

Spot biru yang dihasilkan dari uji histokimia merupakan bentuk aktivitas enzim pada sel yang ditransformasikan. Ekspresi menggunakan gen *gus* dapat digunakan untuk mengetahui tingkat dari efisiensi transformasi yang telah dilakukan. Semakin tinggi efisiensi dari transformasi maka semakin banyak jumlah spot biru yang dihasilkan oleh eksplan atau organ yang ditransformasikan.

Berdasarkan hasil pengamatan, gen *gus* dapat terekspresikan pada kalus embriogenik padi cv Taipei 309. Akan tetapi, spot biru yang dihasilkan sangat sedikit dan cenderung terlihat tidak tampak. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi tingkat efisiensi transformasi diantaranya adalah kurangnya difusi oksigen pada kalus. Jefferson (1987: 398) menyatakan bahwa, produk yang dihasilkan oleh aktifitas dari enzim β -glucuronidase pada larutan *X-gluc* tidak menghasilkan warna. Struktur indigo yang merupakan derivat dari enzim β -glucuronidase memerlukan difusi oksigen untuk melakukan proses dimerisasi oksidatif. Proses tersebut yang menghasilkan spot berwarna biru. Hal tersebut kemungkinan karena pada saat penelitian sampel kalus hanya direndam dalam larutan *X-gluc* pada tabung polipropilen.

Spot biru yang dihasilkan pada kalus yang telah mengalami transformasi mengindikasikan bahwa kalus tersebut mampu menghasilkan enzim dengan aktifitas yang sama dengan enzim yang ada pada gen *gus*. Gen *gus* berperan sebagai gen pelapor untuk pengujian hasil transformasi. Gen *gus* tersebut berada pada konstruksi plasmid vektor rekombinan pCAMBIA-*ERA1*, sehingga apabila gen *gus* terekspresi pada sel/jaringan tanaman yang di transformasi maka diharapkan plasmid rekombinan telah berintegrasi pada sel/jaringan tanaman yang ditransformasi. Dengan demikian, kalus yang menghasilkan spot biru tersebut mengindikasikan keberhasilan transformasi dengan menggunakan metode *particle bombardment*.



Gambar 4.11. Kalus hasil uji histokimia GUS
[Sumber: Dokumentasi Laboratorium Biologi Molekular BB-BIOGEN, 2011.]

Keberhasilan transformasi ke kalus padi cv Taipei 309 menggunakan metode transformasi dengan *particle bombardment* dapat dijadikan sebagai metode alternatif untuk melakukan transformasi pada kalus tanaman padi selain menggunakan *A. tumefaciens*. Dai *dkk.* (2001: 25—26), menyebutkan bahwa *particle bombardment* memiliki beberapa keuntungan yaitu dapat diaplikasikan pada molekul yang berukuran besar, memiliki tingkat efisiensi transformasi yang tinggi sehingga tingkat ekspresi pada tanaman juga tinggi. Akan tetapi kestabilan ekspresi pada tanaman hasil transformasi sangat kecil dan memungkinkan terjadinya *multigenes transformation* pada sel atau jaringan tanaman yang akan ditransformasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap kestabilan ekspresi genetik pada kalus yang telah berhasil ditransformasi dengan metode *particle bombardment*.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Gen *OsERA1* belum berhasil ditransformasikan ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* dengan metode elektroporasi. Gen *OsERA1* berhasil ditransformasikan ke dalam kalus padi cv. Taipei 309 dengan *particle bombardment* dan menghasilkan uji histokimia GUS yang positif.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan optimasi metode transformasi selain dengan elektroporasi agar vektor rekombinan pCAMBIA-*ERA1* dapat ditransformasi ke dalam *Agrobacterium tumefaciens*.
2. *Particle bombardment* dapat dijadikan metode alternatif untuk melakukan transformasi gen *OsERA1* ke kalus padi cv. Taipei 309.

DAFTAR REFERENSI

- Allen, G.J., Y. Murata., S.P. Chu., M. Nafiei & J.I. Schroeder. 2002. Hypersensitivity of abscisic acid-induced cytosolic calcium increases in the *Arabidopsis* farnesyltransferase mutant *era1-2*. *The Plant Cell*. **14**: 1649—1662.
- Arfia, P. I. 2010. Subkloning Gen Sintetik *CSF3syn* (*Colony Stimulating Factor-3*) pada vektor ekspresi pGAPZ α dan transformasi vektor rekombinan ke dalam *Pichia pastoris*. Skripsi S1. Departemen Biologi, FMIPA. Universitas Indonesia: xiv + 88 hlm.
- Assaduzzaman, M., M.A. Bari., M. Rahman., M. Minami., K. Matsushima & K. Nemoto. 2008. GUS gene transformation in rice (*Oryza sativa* L.) Variety BRRI Dhan-30 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Biotechnology*. **7**(3): 530—536.
- 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*. Volume I. John Wiley & Sons, Inc., New York: xxxviii + 12.10 + A1.29 + 17 hlm.
- Azhakanandam, K., M.S. McCabe., J.B. Power., K.C. Lowe., E.C. Cocking & M.R. Davey. 2000. T-DNA transfer, integration, expression, and inheritance in rice: Effects of plant genotype and *Agrobacterium* super-virulence. *Journal Plant Physiology*. **157**: 429—439.
- Birren, B & E. Lai. 1993. *Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide*. Academic Press.Inc Harcourt Brace Javanovich Publisher, San Diego: xvii + 245 hlm.
- BioRad. 2000. *MicropulserTM electroporation apparatus operating instructions and application guide*. BioRad Laboratories, United States: 1—31 hlm.
- Bourgis, F., R. Guyot., H. Gherbi., E. Tailliez., I. Amabile., J. Salse. M., Lorieux. M., Delseny & A. Ghesquière. 2008. Characterization of the major fragrance gene from an aromatic japonica rice and analysis of its diversity in Asian cultivated rice. *Theory Application Genetics*. **117**: 353—368.
- Brooker, R.J. 2005. *Genetics: Analysis and principles*. 2nd ed. McGraw-Hill Companies, Inc., Boston: xxii + 842 hlm.

- Brown, T.A. 1987. *Gene cloning an introduction*. Van Nostrand Reinhold, Co.Ltd., Wokingham: vi + 233 hlm.
- Brown, T.A. 2006. *Gene cloning and DNA analysis: An introduction*. 5th ed. Blackwell Publishing, Oxford: xx + 386 hlm.
- Cambia Labs. 2006. *pCAMBIA vectors*. 2006. 12 hlm.
<http://www.cambia.org/daisy/cambia/585.html>. 15 Februari 2011.
 pk.20.32.
- Campbell, N.A., J.B. Reece & L.G. Mitchell. 2002. *Biologi*. Terj dari *Biology* oleh Lestari, R., E.I.M. Adil, N. Anita, Andri, W.F. Wibowo & W. Manalu. Erlangga, Jakarta: xxi + 438 hlm.
- Cutler, S., M. Ghaseemian., D. Bonetta., S. Cooney & P. McCourt. 1996. A protein farnesyltransferase involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis*. *Science*. **273**: 1239—1241.
- Dai, S., P. Zheng., P. M., S. Zhang., W. Tian., S. Chen., R. N. Beachy & C. Fauquet. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*. **7**: 25—33.
- Davis, L., M. Kuehl & J. Battery. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Paramount Publishing Bussines & Professional Group, Connecticut: xxi + 525 hlm.
- De La Riva, G.A., J. Onzáles-Cabebra., R. Vázquez-Pádrón & C. Arya-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*. **1**(3): 1—16.
- Fairbanks, D.J & W.R. Andersen. 1999. *Genetics: The continuity of life*. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, London: xix + 820 hlm.
- Gardner, E. J & T. R. Mertens. 1991. *Genetics: Laboratory investigations*. 6th ed. Burgess Publishing Company, Minneapolis: vi + 180 hlm.
- Guo, G., J. Yu & D. Zhao. 2011. Rapid acquirement of transgenic rice plant derived from callus mature embryos transformed by *Agrobacterium* mediation. *Plant Molecular Breeding*. **2**(2):1—6.

- Hei, Y & T. Komari. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Natural Protocol*. **3**(5): 824—834.
- Iganacimuthu, S., S. Arockiasamy & R. Terada. 2000. Genetic transformation of rice: Current status and future prospect. *Current Science*. **79**(2): 186—192.
- Jefferson, R. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Breeding*. **5**(4): 387—405.
- Karcher, S.J. 2002. Blue plants: Transgenic plants with the GUS reporter gene. *Association for Biology Laboratory Education*. **23**: 29—42.
- Kartha, K.K. 1985. *Cryopreservation of plant cells and organs*. CRC Press, Cleveland: 276 hlm.
- 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.
- Kumar, K.K., S. Maruthasalam., M. Loganathan., D. Sudhakar & P. Balasubramanian. 2005. An improved *Agrobacterium*-Mediated transformation protocol for recalcitrant elite Indica Rice cultivar. *Plant Molecular Biology Reporter*. **23**: 67—73.
- Le, V. Q., J. Belles-Isles., M. Dusabenyagusani & F. M. Tremblay. 2001. Improved procedure for production of white pruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal Experience Botani*. **52**: 2089—2095.
- Lin, J.-J. 1994. Optimatization of transformation efficiency of *Agrobacterium tumefaciens* cells using electroporation. *Plant Science*. **101**:11—15.
- 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. Michin. 2007. *Gene cloning*. Taylor and Francis Group, Birmingham: 453 hlm.
- Loedin, I. H.S. 1994. Transformasi genetik pada tanaman: Beberapa teknik dan aspek penting. *Hayati*. **1**(2): 66—67.

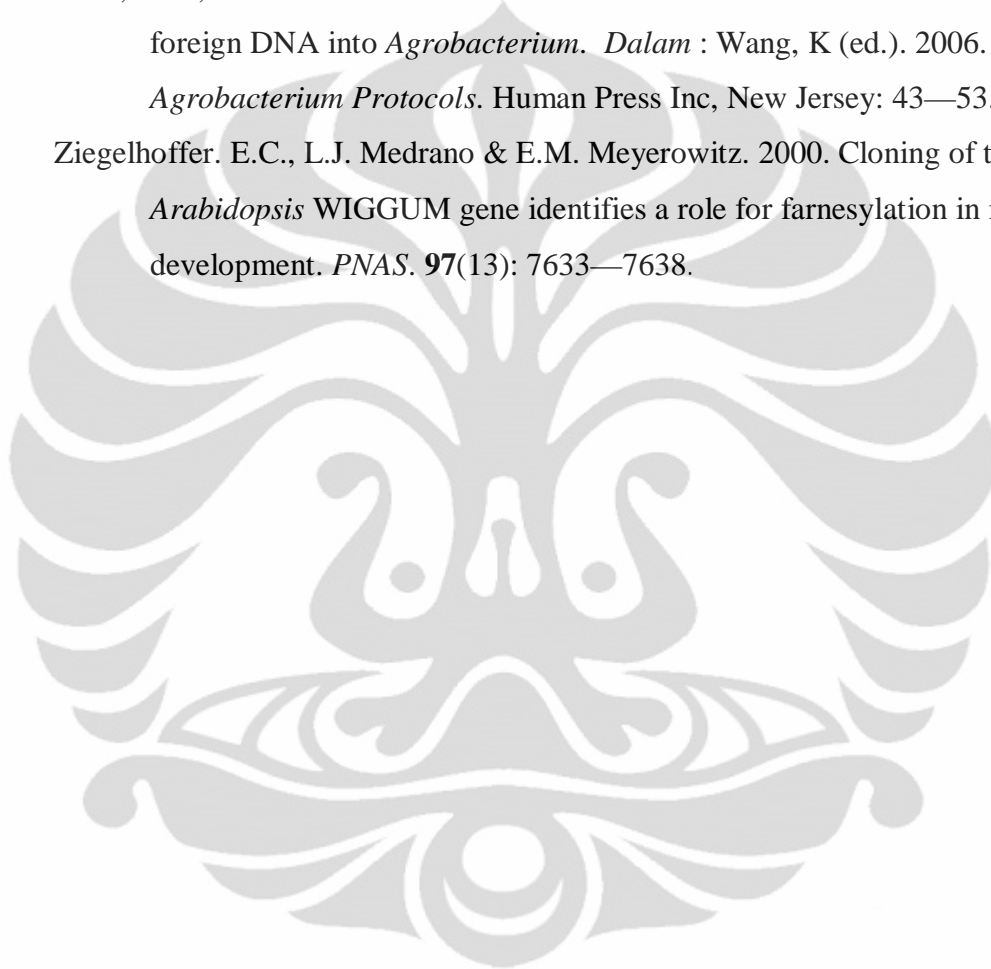
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, P.V. Dunlap & D.P. Clark. 2009. *Brock: Biology of microorganisms*. 12th ed. Pearson Education, San Francisco xxviii + 1061 + A-12 + G-17 + P-1 + I-36 hlm.
- Makarim. A.K. 2009. Aplikasi ekofisiologi dalam system produksi padi berkelanjutan. *Pengembangan Inovasi Pertanian*. **2**(1): 14—34.
- Martin, R. 1996. *Gel electrophoresis: Nucleic acid*. Bios Scientific Publisher, Ltd., Oxford: xiii + 175 hlm.
- Martin, T., R.V. Wohner, S. Hummel, L. Willmitzer & W.B. Frommer. 1992. The gus reporter system as a tool to study plant gene expression. *Dalam: Gallagher, S.R. (ed.). 1992. GUS Protocol: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Academic Press Inc, California: 23—43.
- NCBI (=National Center for Biotechnology Information). 2008. *Binary vector pCAMBIA-1301, complete sequence*. 29 April 2008. 6 hlm. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/7638068>. 20 Februari 2011, pk 20.54.
- Newbury, H. M. 2003. *Plant molecular breeding*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford: xi + 255 hlm.
- Nicholl, D.S.T. 2002. *An introduction to genetic engineering*. 2nd ed. Cambridge University Press, New York: xi + 292 hlm.
- O'Neill, C., G. V. Horváth., É. Horváth., P. J. Dix & P. Medgyesy. 1993. Chloroplast transformation in plant: Polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplast is an alternative to biolistic delivery system. *The Plant Journal*. **3**(5): 729—738.
- OĞRAŞ. T. T & N. Gözürkirmizi. 1999. Expression and inheritance of GUS gene in transgenic Tobacco plant. *Tropical Journal Botany*. **23**: 297—323.
- Opabode, J. T. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plant: Emerging factor that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. **1**(1): 12—20.
- Pei. Z., M. Ghassemian., C.M. Kwak., P. McCourt & J.I. Schroeder. 1998. Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion chanells and plant water loss. *Science*. **282**: 287—290.

- 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. 10.00 WIB.
- Pratama, G. S. 2010. Analisis Respon Toleransi Padi Nipponbari Transgenik Terhadap Salinitas Tinggi. Skripsi S1. Departemen Biokimia, FMIPA. Institut Pertanian Bogor: 34 hlm.
- Primrose, S. B., R. M. Twyman & R.W. Old. 2001. *Principles of Gene Manipulation*. 6th ed. Blackwell Publishing Company, Oxford: Vii + 377 hlm.
- Promega. 2008. *pGEM-T and pGEM-T easy vector system: Technical manual*. Promega Corporation, Madison: 30 hlm.
- PROTA (= Plant Resources of Tropical Africa). 2006. Prota 1: Cereals and pulses. 2006. http://database.prota.org/PROTAhtml/Oryza%20sativa_En.htm. 25 Maret 2011. Pk.13.06.
- Purnamaningsih, R. 2002. Regenerasi tanaman melalui embriogenesis somatik dan beberapa gen yang mengendalinya. *Buletin Agrobiogen*. **5**(2): 51—58.
- Purnamaningsih, R. 2006. Induksi Kalus dan Optimasi Regenerasi Empat Varietas Padi Melalui Kultur In Vitro. *Jurnal Agrobiogen*. **2**(2): 74—80.
- Puslitbang Tanaman Pangan. 2007. *Data penting padi dunia dan beberapa negara Asia*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor: iii + 90 hlm.
- Qiagen. 2003. *GeneGlobe Pathways: Absicid acid*. 2003.
<http://www.qiagen.com/pathways.aspx>. 17 Februari 2011. Pk 10.14.
- Rachmawati, S. 2006. Studi Perkembangan Perbaikan Sifat Genetik Padi Menggunakan Transformasi *Agrobacterium*. *Jurnal AgroBiogen*. **2**(1): 36—44.
- Rashid, H., S. Yokoi., K. Toriyama & K. Hinata. 1996. Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Report*. **15**: 727—730.

- Rice Diversity. 2010. Populations of rice. 2010.
<http://www.ricediversity.org/thebasics/populationsofrice.cfm>. 25 Maret 2011. pk 11.29.
- Roche. 2004. *Restriction endonuklease SalI*. Roche Applied Science, Jerman: 2 hlm.
- Roche. 2008. *Restriction endonuklease BamHI*. Roche Applied Science, Jerman: 2 hlm.
- Russell, P.J. 1994. *Fundamentals of genetics*. Harper Collins College Publishers, New York: xvi + 528 hlm.
- Sambrook, J & D.W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol 2. 3rd ed. Coldspring Harbor Laboratory Press, New York: xxvii + 8.1—14.53 + I.44.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch., & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: xxviii + 7.87 hlm + I.47.
- Santoso, T.J., Sudarsono., H. Aswidinnoor & I. H. Soemantri. 2004. Daya regenerasi transforman padi Indica cv. Bengawan Solo hasil penembakkan mikroproyektil setelah perlakuan osmotikum. *Jurnal Bioteknologi Pertanian*. **9**(2): 41—48.
- Sezonov, G., D. Joseleau-Petit & R. D'Ari. 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria Bertani Broth. *Journal of Bacteriology*. **189**(23): 8746—8749.
- Sharma, K.K., P.B. Mathur & T.A. Thrope. 2005. Genetic transformation technology: Status and problems. *In Vitro Cell Development Biology-Plant*. **41**: 102—112.
- Simione, F. P. 1998. *Cryopreservation manual*. Nalge Nunc International Corp, Los Angeles : 8 hlm.
- Singh, M., A. Yadav., X. Ma & E. Amoah. 2010. Plasmid DNA transformation in *Escherichia Coli*: Effect of heat shock temperature, duration, and cold incubation of CaCl₂ treated cells. *International Journal of Biotechnolgy and Biochemistry*. **6**(4): 561—568.
- Smith, C. W & R.H. Dilday. 2002. *Rice: Origin, history, technology and production*. Willey & Sons Inc, New Jersey: ix + 627 hlm.

- Stomp, A.M. 1992. Histochemical localization of β -glucuronidase. *Dalam:* Gallagher, S.R. (ed.). 1992. *GUS Protocol: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Academic Press Inc, California: 103—113.
- Suardi, D. 2002. Perakaran padi dalam hubungannya dengan toleransi tanaman terhadap kekeringan dan hasil. *Jurnal Litbang Pertanian*. **21**(3): 100—108.
- Tu, Z., G. He., K. X. Li., M. J. Chen., J. Chang., L. Chen., Q. Yao., D. P. Liu., H. Ye, J. Dhi & X. Wu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*. **8**(1): 113—120.
- Van Steenis, C.G.G.J. 2005. *Flora*. Terj. dari *Flora*. Oleh: M. Surjowinoto. PT Pradya Paramita, Jakarta: xii + 485 hlm.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan aplikasi: polymerase chain reaction*. Andi Offset, Yogyakarta, Yogyakarta: v + 237 hlm.
- Walker, J.M. & R. Rapley. *Molecular biology and biotechnology*. 4th ed. Atheneum Press, Cambridge: xxiv + 563 hlm.
- Wang, Y., J. Ying., M. Kuzma., M. Chalifoux., A. Sample., C. McArthur., T. Uchaz., C. Sarvas., J. Wan., D.T. Dennis., P. McCourt., & Y. Huang. 2005. Molecular Tailoring of Farnesylation for plant drought tolerance and yield protection. *The Plant Journal*. **43**: 413—424.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski & M. Zoller. 1992. *Recombinant DNA*. 2nd ed. W.H. Freeman and Company, New York: xiv + 626 hlm.
- Weaver, R.T. 1999. *Molecular biology*. McGraw Hill Company, Boston: xxii + 788 hlm.
- Weaver, R.F & P.W. Hedrick. 1997. *Genetics*. 3rd ed. Wm.C.Brown Publishers, Dubuque: xvii + 638 hlm.
- Winfrey, M.R., M.A Rott & A.T. Wortman. 1997: *Unreveling DNA: molecular biology for the laboratory*. Prentice Hall, Inc, New Jersey: xxviii + 369 hlm.
- Wong, D.W.S. 2006. *The ABC of gene cloning*. International Thomson Publishing, New York: xiv + 213 hlm.

- Wilson, K.J., S.G. Hughes & R.A. Jefferson. 1992. The *Escherichia coli* gus Operon: Induction and expression of the gus operon in *E.coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. *Dalam*: Gallagher, S.R. (ed.). 1992. *GUS Protocol: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. Academic Press Inc, California: 7—22.
- Wise, A.A., Z. Liu & A.N. Binns. 2006. Three method for introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Dalam* : Wang, K (ed.). 2006. *Agrobacterium Protocols*. Human Press Inc, New Jersey: 43—53.
- Ziegelhoffer. E.C., L.J. Medrano & E.M. Meyerowitz. 2000. Cloning of the *Arabidopsis* WIGGUM gene identifies a role for farnesylation in meristem development. *PNAS*. **97**(13): 7633—7638.



Lampiran 1

Komposisi dan cara pembuatan larutan dan *buffer* yang digunakan dalam penelitian

Larutan/buffer	Cara pembuatan
TAE (TrisHCl-Asetic Acid-EDTA) 1x	Sebanyak 40 ml larutan TAE 50x dilarutkan dengan aquades hingga volume akhir 2L
Marka 1 kb Ladder plus	50 μ l <i>stock</i> 1 kb Ladder plus ditambah 950 μ l Tris-EDTA untuk menjadikan konsentrasi akhir 50 μ g/ μ l
<i>Loading dye</i> 6x	Bromofenol biru 0,03%, 10mM Tris-HCL (pH 7,6), gliserol 60%, 60mM EDTA, dan <i>xylencyanol</i> FF dilarutkan dalam aquades.
Solution I	Sebanyak 5 ml glukosa 1M dicampur dengan Tris-Cl pH 8 1M dan EDTA pH 8 0.05M kemudian ditambahkan aquades hingga volume mencapai 100 ml, disimpan pada suhu 4°C
Solution II	Sebanyak 1760 μ l aquades dicampur dengan 40 μ l NaOH 10N dan 200 μ L SDS 10% sehingga volume akhirnya 2 ml, simpan pada suhu ruang. Larutan II dipersiapkan dalam keadaan fresh/baru
Solution III	Sebanyak 60 ml potassium asetat 5M dicampur dengan 11.5 ml asam asetat glacial kemudian ditambah 28.5 ml aquades hingga volume akhir 100 ml, simpan pada suhu 4°C
Medium Luria-Bertani (LB)	Sebanyak 10 g triptone, 5 g <i>yeast extract</i> dan 5 g NaCl ditambahkan aquades hingga volume mencapai 1 L, lalu disterilisasi dalam autoklaf (121°C, 2atm, 20 menit). Untuk media LB padat ditambahkan 15 gram bacto-agar lalu ditambahkan aquades hingga volume 1 L disterilisasi dalam autoklaf (121°C, 2atm, 20 menit)

Larutan CaCl ₂	Sebanyak 2.94gram CaCl ₂ dicampur dengan 1.01 MgCl ₂ dan 0.15 gram Tris-HCl kemudian ditambahkan akuades hingga volume mencapai 200ml, lalu disterilisasi dalam autoklaf (121°C, 2atm, 20 menit)
Gel agarosa 1%	Sebanyak 0.25 gram bubuk agarosa dilarutkan dengan 25 ml TAE 1x kemudian dipanaskan dalam <i>microwave</i> hingga mendidih dan aduk hingga homogen.
0,5 µl/ml etidium bromida	Sebanyak 10 µl etidium bromida (10 mg/ml) dilarutkan dalam 200 ml akuades.
Antibiotik ampisilin 50 µg/ml	Sebanyak 0.25 gram bubuk ampisilin ditambahkan dengan akuades steril hingga volume mencapai 5 ml, kemudian di filter dan disimpan dalam suhu -20°C
Antibiotik karbenisilin 75 µg/ml	Sebanyak 0.125 gram bubuk ampisilin ditambahkan dengan akuades steril hingga volume mencapai 5 ml, kemudian di filter dan disimpan dalam suhu -20°C
Antibiotik kanamisin 100 µg/ml	Sebanyak 0.125 gram bubuk ampisilin ditambahkan dengan akuades steril hingga volume mencapai 5 ml, kemudian di filter dan disimpan dalam suhu -20°C

[Sumber : Ausubel *dkk.* 2002: A1.12--A1.18; Sambrook *dkk.* 1989. A1-B22.]

Lampiran 2

Komposisi Media ko-kultivasi cair, Media Dasar R2

Komposisi Media Dasar R2

Larutan	Ukuran	Bahan	Ukuran
Makro I	100 ml/L	KNO ₃	40 g/L
		(NH ₄) ₂ SO ₄	3.30 g/L
		NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	3.14 g/L
		MgSO ₄ .7H ₂ O	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	160 mg/100 ml
		H ₃ BO ₃	283 mg/100 ml
		ZnSO ₄ .7H ₂ O	220 mg/100 ml
		CuSO ₄ .5H ₂ O	19.5 mg/100 ml
		Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	12.5 mg/100 ml
FeNaEDTA	10 ml/L	FeSO ₄ .7H ₂ O	1.25 g/L
		Na ₂ EDTA.2H ₂ O	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			

Komposisi Media AB

	Komposisi	Jumlah
AB Buffer stock 20x (1L)	K ₂ HPO ₄	60 g/L
	NaH ₂ PO ₄	20 g/L
AB Salt Stock 20x (1L)	NH ₄ Cl	20 g/L
	MgSO ₄	5 g/L
	KCl	3 g/L
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.2 g/L
	FeSO ₄ .7H ₂ O	50 mg/L
	Glukosa	6 g
	<i>Bacto Agar</i>	6 g

Lampiran 3

Komposisi Media NB

	Komposisi	Jumlah
Makro I	KNO ₃ (NH ₄) ₂ SO ₄ H ₂ PO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O	28.3 g/L 4.63 g/L 4 g/L 1.85 g/L
Makro II	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.66 g/L
Vitamin B5	Myoinositol Thiamin-Hcl Nicotinic acid Pyridoxin Hcl	10 g/L 1 g/L 0.1 g/L 0.1 g/L
Mikro B5	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
	akuades	Ditambahkan hingga vol 1 L
pH	5.8—5.82	

Lampiran 4
Komposisi Media MS

	Komposisi	Jumlah
Makro	KNO ₃	28.3 g/L
	(NH ₄) ₂ SO ₄	4.63 g/L
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1.85 g/L
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1.66 g/L
	KH ₂ PO ₄	1.7 g/L
Mikro	MnSO ₄ .H ₂ O	1000 mg/100 ml
	KI	75 mg/100 ml
	H ₃ BO ₃	300 mg/100 ml
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	200 mg/100 ml
	CuSO ₄	2.5 mg/100 ml
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg/100 ml
	CaCl ₂ .6H ₂ O	2.5 mg/100 ml
	Fe-EDTA	10 ml/L
	Myoinositol	5 ml/L
	Glycin	2 ml/L
	Pyrodoxin	0,5 ml/L
	Thiamin	0,1 ml/L
	Sukrosa	30 g/L
	Akuades	Ditambahkan hingga vol 1 L
	Phytigel	3 g/L
pH 5.8		

Lampiran 5
Perhitungan Persentasi Keberhasilan Ligasi

$$\text{Persentasi keberhasilan Ligasi} = \frac{\text{Jumlah koloni transforman positif}}{\text{Jumlah koloni transforman yang diambil}} \times 100\%$$

$$= \frac{2 \text{ Koloni}}{8 \text{ Koloni}} \times 100\%$$

$$= 25 \%$$

