

**KONSTRUKSI GEN *GREEN FLOURESCENT PROTEIN* (GFP)  
DAN GEN *REP* (C1) KEDALAM PLASMID BINER pBI121**

**OLEH**

**EKO DARMA HUSADA  
0910211023**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2013**

**KONSTRUKSI GEN *GREEN FLOURESCENT PROTEIN* (GFP)  
DAN GEN *REP* (C1) KEDALAM PLASMID BINER pBI121**

**OLEH**

**EKO DARMA HUSADA  
0910211023**

**SKRIPSI**

**SEBAGAI SALAH SATU SYARAT  
UNTUK MEMPEROLEH GELAR  
SARJANA PERTANIAN**

**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS ANDALAS**

**PADANG**

**2013**

**KONSTRUKSI GEN *GREEN FLOURESCENT PROTEIN* (GFP)  
DAN GEN *REP* (C1) KEDALAM PLASMID BINER pBI121**

**OLEH**

**EKO DARMA HUSADA  
0910211023**

**MENYETUJUI:**

**Dosen Pembimbing I**

**Dosen Pembimbing II**

**Prof. Dr. Ir. Aswaldi Anwar, MS.  
NIP : 196202091989031002**

**Dini Hervani, SP, MSi.  
NIP : 198006102002122002**

**Dekan Fakultas Pertanian  
Universitas Andalas,**

**Ketua Program Studi Agroekoteknologi  
Fakultas Pertanian  
Universitas Andalas,**

**Prof. Dr. Ir. H. Ardi, MSc  
NIP: 195312161980031004**

**Dr. Jumsu Trisno, SP, MSi.  
NIP : 196911211995121001**

Skripsi ini telah diuji dan dipertahankan didepan sidang pada Ujian Sarjana Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang, pada tanggal 30 Juli 2013.

<b>No</b>	<b>Nama</b>	<b>Tanda Tangan</b>	<b>Jabatan</b>
<b>1</b>	<b>Prof. Dr.sc.agr. Ir. Jamsari, MP</b>		<b>Ketua</b>
<b>2</b>	<b>Dr. Ir. Benni Satria, MP</b>		<b>Sekretaris</b>
<b>3</b>	<b>Dr. Yusniwati, SP, MP</b>		<b>Anggota</b>
<b>4</b>	<b>Prof. Dr. Ir. Aswaldi Anwar, MS</b>		<b>Anggota</b>
<b>5</b>	<b>Dini Hervani, SP, MSi</b>		<b>Anggota</b>

--	--	--	--

*Semua berawal dari SAYA, saya yang memilih jalan ini dan saya yang menjalaninya dengan langkah yang percaya diri.*

*Untuk semua usaha dan doa yang telah dicurahkan hingga saat ini,  
Untuk semua semangat dan kerja keras hingga semua ini terjadi,  
Untuk cinta dan kasih sayang yang menemani letihnya perjalanan ini,*

*Sebuah Karya Kecil Dari SAYA untuk masa depan.*

*Dengan Segenap Hati,*

*Rasa Syukur tak hentinya diucapkan kepada Allah SWT atas anugerah-Nya  
Beribu Sayang untuk kedua orang tua, Ibunda Darneli dan Ayahanda  
Supriadi. S, (Terspesial untuk Ayah dan Amak/Nenek yang jauh di Surga,  
Alm Drs. ECM Abil dan Almh Darnis), Serta saudara saya Adek Ulil Amri  
dan Uni Melissa Fitri atas semua supportnya.*

*Terima Kasih Buat teman-teman Keluarga Besar AgET 09, para Breeder  
hebat keluarga besar PGSBP 09, Keluarga Besar Lab Biotek UNAND.  
Spesial bagi teman-teman seperjuangan para PETUALANG GEN (Waedi  
Yarman, Hafid Harnas, Sulastri, Melly Syandi, Sari Ramadhani, Kak Mery  
Septiani, Kak Kamelia) dan para mentor hebat kak Ester Kristin Natali,  
Kak Siti Nur Aisyah, Kak Dila Febria, Kak Elly Syafriani, dan Bang Ade  
Noferta yang dengan senang hati berbagi ilmu dan pengalaman.*

*Kepada Para pembimbing serta Dosen dan staf di Fakultas Pertanian yang telah mengajarkan tentang segalanya (akademik dan nilai kehidupan) terima kasih untuk semua hal yang tak terhingga ini.*

## **BIODATA**

Penulis dilahirkan di Muara Bungo, Kecamatan Rimbo Tengah, Kabupaten Bungo, Jambi pada tanggal 17 Maret 1992 sebagai anak pertama, dari pasangan Drs. ECM Abil (Alm) dan Darneli. Pendidikan Sekolah Dasar (SD) ditempuh di SDN 104 Muara Bungo hingga kelas empat serta menamatkan SD di SDIT Dinniyah Muara Bungo (1997-2003). Sekolah Menengah Pertama ditempuh di SMP Prof. Dr. HAMKA Kecamatan Batang Anai, Kabupaten Padang Pariaman, Sumatera barat (2003-2006). Sekolah Menengah Atas ditempuh di SMA Baiturrahmah Padang (2006-2009). Pada tahun 2009 penulis diterima di Fakultas Pertanian Universitas Andalas Program Studi Agroekoteknologi.

Padang, Juli 2013

Eko Darma Husada

# **KONSTRUKSI GEN *GREEN FLUORESCENT PROTEIN* (GFP) DAN GEN *REP* (C1) KEDALAM PLASMID BINER pBI121**

## **ABSTRAK**

Gen *Rep* (C1) pada Geminivirus memiliki peran penting dalam partikel virus. Gen ini sering dipakai dalam pendekatan PDR (*Pathogen Derived Resistance*) untuk mengembangkan tanaman transgenik. GFP merupakan gen dari ubur-ubur yang banyak dimanfaatkan sebagai gen reporter dalam transformasi genetik. Vektor biner plasmid pBI121 merupakan vektor yang umum digunakan dalam transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium tumifaciens*. T-DNA yang dimiliki pBI121 berperan dalam proses pentransferan DNA asing kedalam tanaman. Modifikasi T-DNA dilakukan dengan penyisipan gen pembawa ketahanan serta gen reporter. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengembangkan vektor plasmid biner pBI121 rekombinan gen *Rep* serta mengganti reporter gen GUS pada pBI121 dengan gen GFP. Dalam penelitian ini gen GFP didapat dengan merestriki plasmid pET15b-S65T-GFP menggunakan kombinasi enzim *Xba*I dan *Eco*RI kemudian dikloning kedalam pBI121 untuk mendapatkan plasmid pBI121 rekombinan gen GFP. Namun akibat keterbatasan stok gen GFP, proses pengkloning gen GFP tertunda. Kloning gen *Rep* dilakukan untuk mendapatkan plasmid pBI121 rekombinan gen *Rep*, gen *Rep* didapat dengan merestriksi plasmid pGEM-*Rep* dengan *Eco*RI, dan dilakukan transformasi kedalam *A.tumifaciens* menggunakan metode “*electrophoration*”. Pendeteksian keberhasilan transformasi dilanjutkan dengan metode PCR koloni serta isolasi dan PCR plasmid rekombinan menggunakan primer spesifik C1-TD21-*Sma*I/*Bam*HINT. Dua koloni bakteri transforman yang mengandung gen *Rep* (C1) berhasil didapatkan.

Kata Kunci : *kloning, GFP, Rep, pBI121, transformasi genetik, PDR.*

# **CONSTRUCTION OF GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) GENE AND REP GENE (C1) INTO pBI121 BINARY VECTOR**

## **ABSTRACT**

Rep (C1) gene in Geminivirus has an important role in virus particle. This gene is commonly used in Pathogen Derived Resistance (PDR) system for developing transgenic plants. GFP is a gene from jellyfish that had been developed as a reporter gene for genetic transformation. Binary vector plasmid pBI121 is a vector that usually be used in *Agrobacterium-mediated* method. T-DNA in pBI121 has a role in transferring gene of interest into plants. T-DNA had to be modified via insertion gene of interest and reporter gene. The objective of this study was to develop a binary vector plasmid pBI121 that harboring an interest gene Rep and to replace GUS gene with GFP gene as a reporter. In this study GFP gene was digested from plasmid pET15b-S65T-GFP with *Xba*I and *Eco*RI and then cloned into pBI121 to result a recombinant plasmid pBI121 that harboring GFP gene (pBI121-GFP). However due to unavailability of GFP gene, the cloning process was skipped. Rep gene was cloned into pBI121 to get a recombinant plasmid pBI121 that harboring Rep gene (pBI121-Rep), Rep gene was digested from pGEM-Rep with restriction enzyme *Eco*RI, and transformed into *A.tumifaciens* using electrophoration method. Successful transformation was detected using PCR colony method, isolation and PCR recombinant plasmid method with specific primer C1-TD21-*Sma*I/*Bam*HINT. Two recombinants of *A.tumifaciens* that harboring Rep (C1) gene were successfully obtained.

Keyword: *cloning, GFP, Rep, pBI121, genetic transformation, PDR.*

# I. PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Pada saat ini sistem perakitan tanaman tahan telah bergerak maju melalui pendekatan secara rekayasa genetik. Salah satu pendekatan yang digunakan adalah dengan memanfaatkan sumber gen ketahanan dari penyebab penyakit itu sendiri atau dikenal dengan pendekatan PDR (*Pathogen Derived Resistance*). Salah satu gen yang dapat digunakan untuk menghasilkan resistensi berbasis PDR adalah penggunaan gen-gen yang mengkode protein untuk replikasi (gen replikasi) (Palukaitis dan Zaitin, 1997 dalam Jamsari *et al.*, 2009). Salah satu contoh pada geminivirus, gen yang berperan sebagai gen replikasinya adalah C1 (Meliansyah, 2010 dalam Syafriani, 2012).

Tahapan awal dari serangkaian proses panjang perakitan tanaman tahan adalah tersedianya sumber gen yang membawa karakter ketahanan itu sendiri. Dalam hal ini gen *Rep* (C1) memainkan peran kunci dalam transkripsi dan replikasi DNA geminivirus (Laufs *et al.*, 1995 dalam Mujaddad, 2004). Pemanfaatan gen C1 (*Rep*) di dalam PDR telah dilakukan oleh Golemboski *et al.* (1990) dalam Syafriani (2012) pada tanaman tembakau untuk merakit kultivar tembakau yang tahan terhadap *Tobacco Mosaic Virus* (TMV). Tahapan berikutnya dari pembentukan tanaman transgenik merupakan kloning gen C1 kedalam vektor plasmid biner yang akan membawa gen tersebut untuk selanjutnya ditransformasikan kedalam tanaman target.

Sistem transformasi genetik yang paling umum digunakan pada tanaman adalah dengan menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* sebagai pembawa gen asing ke tanaman target. Bakteri ini secara alami menginfeksi tanaman dikotil yang menyebabkan penyakit tumor akar (*crown gall*). Kemampuan untuk mengakibatkan penyakit tumor akar ini berkaitan dengan keberadaan plasmid yang dikenal sebagai *Tumor Induced* (Ti) yang berukuran 200 kb pada sel bakteri. Ketika *A.tumefaciens* menginfeksi tanaman, bagian dari molekulnya yang disebut T-DNA terintegrasi pada DNA kromosom tanaman. Sifat unik ini memungkinkan plasmid Ti

menjadi alat transportasi dari gen lain dengan menyisipkan gen asing tersebut pada T-DNA (Loedin, 1994).

Dalam pembuktian keberhasilan transformasi genetik maka dimanfaatkan sistem reporter gen yang terdapat pada plasmid vektor biner, dimana reporter gen yang biasa dimanfaatkan adalah gen GUS yang terdapat di plasmid pBI121. Gen penanda GUS menyandikan  $\beta$ -glukuronidase yang berfungsi dalam menguji keberhasilan transformasi dari gen yang diinginkan, namun hasil positif GUS yaitu timbulnya warna biru setelah uji histokimia, sering kali merupakan hasil semu. Warna biru yang tampak sering kali terjadi karna masih adanya sisa bakteri yang mengandung gen GUS pada jaringan yang diinfeksi, meskipun telah dilakukan perlakuan antibiotik (Loedin, 1994). Meskipun telah banyak upaya dilakukan untuk meminimalisir hasil semu yang sering terjadi pada gen GUS, namun masih saja cara tersebut dirasa kurang efisien.

Saat ini telah dikembangkan plasmid berbasis *E. coli* yang dikenal sebagai plasmid PET-15b yang mengandung gen penanda GFP (*Green Fluorescent Protein*). Gen GFP diisolasi dari ubur-ubur dan diintegrasikan pada plasmid PET-15b-S65T-GFP. Sesuai dengan namanya, GFP (*Green Fluorescent Protein*) bersifat *luminescence* dengan pendaran warna hijau. Pemurnian dan karakterisasi GFP dari ubur-ubur (*Aequorea victoria*) dilakukan pertama kali oleh ilmuwan Jepang Osamu Shimomura pada tahun 1960-an (Shimomura *et. al.*, 1960). Namun kegunaannya sebagai alat deteksi biologi molekuler masih belum jelas sampai pada awal tahun 1992.

Douglas Prasher melaporkan keberhasilannya dalam mengkloning dan mendapatkan sekuen nukleotida GFP (Prasher *et. al.*, 1992). Keberhasilan kloning tersebut dilanjutkan dengan aplikasi GFP pada dua sistem organisme prokaryotik (bersel tunggal) dan eukaryotik (multi sel/organisme tingkat tinggi). Organisme prokaryotik yang digunakan adalah *Escherichia coli*, sedangkan organisme eukaryotiknya adalah cacing dari *filum nematoda* (cacing gelang) yaitu *Caenorhabditis elegans*, hasilnya sangat memuaskan, ekspresi GFP cukup stabil pada kedua sistem tersebut (Chalfie *et. al.*, 1994).

GFP juga bisa digunakan sebagai reporter ekspresi gen sebagaimana GUS dan LUC. Tidak seperti GUS dan LUC, GFP *fusion system* memiliki keunggulan tersendiri yaitu tidak memerlukan suatu substrat sehingga deteksinya cukup menggunakan mikroskop. Selain itu GFP juga tidak bersifat toksik sehingga pengambilan Gambar bisa menggunakan sel hidup (*in vivo imaging*) (Berita IPTEK, 2011).

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan kloning gen *Rep* (C1) dan gen GFP kedalam plasmid vektor pBI121 sebagai bahan sumber gen dalam perakitan tanaman transgenik tahan geminivirus serta pengkreasian gen reporter yang dapat memberikan efisiensi lebih baik secara waktu maupun tenaga. Dengan dasar tersebut disusunlah penelitian dengan judul “**KONSTRUKSI GEN *GREEN FLUORESCENT PROTEIN* (GFP) DAN GEN *REP* (C1) KEDALAM PLASMID BINAER pBI121**” sebagai salah satu upaya dalam tahapan pembentukan tanaman transgenik.

## **1.2 Tujuan penelitian**

Adapun tujuan dari penelitian adalah untuk mendapatkan plasmid pBI121 yang telah mengandung gen *Rep* sebagai bahan transformasi genetik dan gen GFP sebagai marka molekuler yang efisien.

## **1.3. Manfaat Penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah didapatkannya plasmid rekombinan pBI121 yang mengandung gen *Rep* (C1) dan gen penanda GFP yang dapat digunakan dalam proses transformasi genetik ke tanaman yang diinginkan dalam upaya pembentukan tanaman transgenik.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Transformasi Genetik

Transformasi genetik adalah suatu teknik yang digunakan untuk mendapatkan tanaman transgenik dimana menyisipkan gen tertentu dari makhluk hidup ke tanaman yang diinginkan dengan menggunakan metode-metode tertentu. Terdapat beberapa metode dalam transformasi genetik antara lain metode elektroporasi (Arencibia *et. al.*, 1995), metode *polyethylene glycol* (Rathore *et. al.*, 1993), metode penggunaan silicon carbide (Kaeppler *et. al.*, 1990), metode penembakan partikel DNA (Gordon-Kamm *et al.* 1990; Maqbool *et. al.* 1998) dan dengan metode menggunakan perantara *Agrobacterium tumefaciens* (Ishida *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998; Negrotto *et al.*, 2000; Frame *et al.*, 2002).

Transformasi menggunakan *A.tumefaciens* lebih disenangi dibanding metode lainnya dikarenakan penggunaan *A.tumefaciens* menghasilkan proporsi yang lebih besar transgen tereksresi dengan jumlah lokus yang lebih rendah (Ishida *et. al.*, 1996; Zhao *et. al.*, 1998 dalam Utomo, 2004). *A.tumefaciens* adalah bakteri tanah yang dapat menyebabkan penyakit tumor akar (*crown gall*) pada bagian tanaman terinfeksi. Hal ini disebabkan karena bakteri ini mampu mentransfer T-DNA yang terdapat pada Ti-plasmid ataupun Ri-plasmid ke dalam tanaman (Zambryski *et. al.*, 1989 dalam Yusniwati, 2008). *A.tumefaciens* yang bersifat patogen bagi jaringan tanaman dikotil yang mengalami pelukaan ada dua spesies, yaitu *A.tumefaciens* yang menginduksi pembentukan tumor pada leher batang/ tumor akar (*crown gall*) dan *Agrobacterium rhizogenes* yang menginduksi pembentukan akar berambut (*hairy root*) (Zambryski *et. al.*, 1989 dalam Yusniwati, 2008).

Transformasi genetik merupakan salah satu metode yang dapat dimanfaatkan untuk mempelajari regulasi gen, identifikasi fungsi gen, pengujian metabolisme, mempelajari fisiologi serta perkembangan tanaman. Keberhasilan proses transformasi gen melalui *A.tumefaciens* sangat ditentukan oleh berbagai hal antara lain kesesuaian antara strain *A.tumefaciens* dengan jenis tanaman dan vektor plasmid yang dipergunakan, kerapatan sel *A.tumefaciens* yang digunakan pada saat proses

transformasi genetik, lama waktu ko-kultivasi, tingkat kemasaman media, kondisi kultur *in vitro* dan sebagainya. Disamping itu pemanfaatan *A.tumefaciens* pada proses transformasi genetik jenis tanaman monokotil masih memerlukan berbagai penyesuaian dalam upaya meningkatkan efisiensi transformasi. Hal ini disebabkan secara alami bakteri patogen tanah tersebut hanya menginfeksi tanaman dikotil dengan cara mengintroduksi T-DNA dari Ti-plasmid bakteri ke dalam inti sel tanaman (Smith dan Hood, 1995 dalam Maftuchah, 2005).

Efisiensi transformasi menggunakan *A.tumefaciens* dipengaruhi oleh strain *A.tumefaciens*. Perbedaan antar-strain *A.tumefaciens* ditentukan oleh tipe kromosom dan tipe Ti-plasmid, seperti yang terlihat pada Tabel 1. Tipe kromosom dalam sel bakteri *A.tumefaciens* antara lain terdiri dari *octopine*, *nopaline*, dan *chrysopine*; sedangkan tipe Ti-plasmid antara lain *octopine*, *nopaline*, *chrysopine*, dan *succinamopine* (Utomo, 2004).

**Tabel 1.** Tipe Ti-plasmid dan tipe kromosom tiga strain *A.tumefaciens* (Utomo, 2004)

Strain	Tipe Ti plasmid	Tipe kromosom
C58C1	pMP90 ( <i>nopaline</i> )	C58 ( <i>nopaline</i> )
LBA4404	pAL4404 ( <i>octopine</i> )	Ach5 ( <i>octopine</i> )
NTL4-Cry5	pKPSF2 ( <i>chrysopine</i> )	NTL ( <i>nopaline</i> )

T-DNA merupakan bagian dari megaplasmid pada *A.tumefaciens*, yaitu Ti(*tumor inducing*)-plasmid pada *A. tumefaciens* dan Ri(*root inducing*)-plasmid pada *A. rhizogenes* (Winans 1992). Ti-plasmid yang terdapat pada semua isolat virulen *A. tumefaciens* akan stabil selama *A.tumefaciens* tumbuh pada temperatur dibawah 30°C. Ti-plasmid menghasilkan suatu senyawa opine dengan tipe nopaline atau oktopine, sedangkan Ri-plasmid menghasilkan tipe manopine atau agropine (Armitage *et. al.*, 1987) yang merupakan suatu senyawa yang menjadi sumber C dan N bagi *A.tumefaciens* yang tidak dihasilkan oleh tanaman normal (Yusniwati, 2008).

Teknik penyisipan gen (transformasi genetik) akan menghasilkan tanaman transgenik yang kemudian dapat dimanfaatkan sebagai sumber plasma nutfah atau langsung diseleksi menjadi galur harapan. Transformasi gen secara *in vitro* dengan menggunakan vektor *A.tumefaciens* akan berhasil dan bermanfaat apabila sudah

diperoleh protokol regenerasi tanaman yang efisien dan stabil. Kompetensi untuk beregenerasi yaitu kemampuan membentuk tanaman lengkap (mempunyai tunas dan akar) dan kompetensi untuk ditransformasi merupakan dua kunci penting penentu keberhasilan program transformasi genetika (Yusniwati, 2008).

Pada tanaman dikotil, transfer gen sering menggunakan *A.tumefaciens* strain liar (galur alami) yang memiliki plasmid Ti. Pada plasmid Ti terdapat T-DNA yang digunakan sebagai vektor untuk transformasi tanaman yang telah dihilangkan virulensinya (*disarmed*), sehingga sel tanaman yang ditransformasi mampu beregenerasi menjadi tanaman sehat hasil rekayasa genetika. Gen yang diinginkan dimasukkan ke dalam sel tanaman dengan cara menitipkannya (menyisipkan) pada T-DNA. Plasmid Ti terlibat sebagai parasitisme secara genetika, infeksi menyebabkan pengambilalihan sumber metabolit tanaman (opin) yang hanya dapat dimetabolisasi oleh produk bakteri yang dikode oleh plasmid Ti. Perkembangan tanaman yang terinfeksi akan semakin meningkatkan jumlah opin yang tersedia (Gelvin, 1990).

Tumor dan akar rambut dapat tumbuh terus walaupun *A.tumefaciens* telah mati. Selain itu, jaringan tersebut dapat tumbuh secara *in vitro* dalam medium tanpa zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang biasanya diperlukan untuk memacu pertumbuhan jaringan tanaman. Induksi tumor dan akar ini disebabkan oleh ditransferkannya sebagai DNA (T-DNA) dari *A.tumefaciens* ke dalam inti sel tanaman (Yusniwati, 2008).

Aspek penting lain dalam transformasi dengan *A.tumefaciens* adalah perihal pembuktian terintegrasinya gen asing yang kita sisipkan. Analisis yang tercepat untuk menunjukkan gen terintegrasi secara stabil pada tanaman ialah dengan analisis histokimia enzim gen penanda  $\beta$ -glukuronidase serta dapat dilakukan juga teknik PCR (Loedin, 1994).

## **2.2 Gen *Rep* (C1) Sebagai Sumber Gen Resistensi**

Strategi berbasis PDR dapat dibagi ke dalam beberapa kelompok tergantung kepada bagian genom virus yang digunakan. Salah satu gen yang dapat digunakan untuk menghasilkan resistensi berbasis PDR adalah penggunaan gen-gen yang

mengkode protein untuk replikasi (gen replikasi) (Palukaitis dan Zaitlin, 1997 dalam Syafriani, 2012).

Pada Geminivirus, gen yang berperan adalah gen C1, Seperti yang telah dikembangkan untuk beberapa jenis virus lainnya seperti *Pea Early Browning Virus*, PVY, dan CMV. Konsep penggunaan gen dari gen *Rep* yang telah digunakan untuk pembentukan ketahanan pada tanaman, dapat terdiri dari penggunaan sekuens gen sepenuhnya dan adanya pemotongan atau mutasi pada gen tersebut. Kebanyakan dari sifat ketahanan yang telah diperoleh pada hasil percobaan, tidak membutuhkan sintesis protein dan menjadi perantara pada level RNA. Jenis ketahanan ini memiliki keterbatasan hanya untuk spektrum serangan virus yang sempit. Spektrumnya lebih sempit daripada *Coat Protein Mediated Resistance* (CPMR). Untuk membuat spektrum ketahanannya menjadi luas merupakan hal yang sangat penting dilakukan. Hal ini dilakukan untuk memperbanyak gen *Rep* tersebut dari beberapa sumber virus yang berbeda ke dalam genom tanaman yang dicobakan. Walau spektrum gen *Rep* sempit, tetapi sifat ketahanan yang dihasilkannya sangat kuat. Serangan virus dengan tingkat agresivitas yang sangat tinggi, tidak akan memberi pengaruh terhadap tanaman transgenik yang memiliki ketahanan dari gen *Rep* (Dasgupta *et al.*, 2003 dalam Syafriani 2012).

Gen C1 (*Rep*) merupakan gen pengkode protein replikasi yang multifungsional yaitu: 1) Gen C1 (*Rep*) terlokalisasi dengan nukleus, 2) Gen C1 (*Rep*) memiliki sisi pengenalan DNA spesifik, 3) Gen C1 (*Rep*) memiliki sisi endonuklease spesifik dan aktivitas ligasi untuk pita positif (+) viral DNA, 4) Memiliki aktivitas ATP/GTPase, 5) Mengaktifkan promotor untuk gen *mRNA* selubung protein, 6) Dapat menekan promotornya sendiri, 7) Dapat menstimulasi ekspresi perkembangan antigen inti sel, serta 8) Berinteraksi dengan protein retinoblastoma (Hull, 2002).

### **2.3 Plasmid pBI121 dan Pembentukan Plasmid Rekombinan**

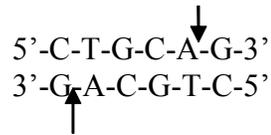
Plasmid merupakan molekul DNA sirkular yang terdapat bebas di dalam sitoplasma sel bakteri yang kebanyakan terdapat pada sel prokariot. Struktur plasmid merupakan DNA sirkular tertutup, berpita ganda dengan panjang antara 1 kb hingga

200 kb. Plasmid secara umum bukan merupakan komponen esensial dari inangnya. Sebagai komponen ekstragenomik, plasmid memiliki gen yang mengendalikan kemampuan plasmid untuk memperbanyak diri atau replikasi secara autonom, sehingga perbanyakan molekul plasmid tersebut dapat tergantung kepada kendali perbanyakan sel inangnya. replikasi DNA plasmid dikendalikan oleh seperangkat enzim yang sama dengan yang dipakai untuk duplikasi kromosom bakteri. Jika replikasi DNA plasmid bergabung dengan DNA kromosom inangnya, maka disebut replikasi plasmid tersebut berada dalam kondisi kontrol ketat. Pada kondisi ini, di dalam setiap sel bakteri hanya ada satu atau beberapa kopi saja dalam sel bakteri. Sebaliknya apabila replikasi berlangsung dalam kondisi kontrol longgar, maka jumlah kopi plasmid dapat mencapai 10-200 kopi pada setiap sel bakteri. Bahkan jumlah tersebut mencapai beberapa ribu, apabila sintesis protein bakteri inangnya dihentikan misalnya dengan antibiotik khlorampenikal (Jamsari 2007). Plasmid pBI121 merupakan vektor plasmid yang sering digunakan dalam proses transformasi genetik dimana plasmid ini mengandung reporter gen GUS penyandi  $\beta$ -glukuronidase yang akan menunjukkan titik biru pada kalus tanaman yang berhasil mengekspresikan gen tersebut didalamnya.

Teknik kloning yang biasanya digunakan menggunakan plasmid sebagai vektor yang sesuai dipilih untuk menjadi penerima sisipan gen yang diinginkan sebagai DNA donor. DNA donor dan vektor dipotong dengan enzim restriksi yang sama, kemudian diinkubasi bersama dengan ligasi untuk menyambungkan fragmen-fragmen DNA donor dengan plasmid. Hasilnya adalah plasmid rekombinan yang mengandung fragmen DNA yang diinginkan. Plasmid rekombinan tersebut kemudian digunakan untuk mentransformasi sebuah sel inang bakteri, sehingga dihasilkan sebuah galur genetik baru dari bakteri tersebut yang dapat menjaga plasmid rekombinan sengan stabil (Stansfield *et. al.*, 2006 dalam Nasution, 2010).

Vektor plasmid dimana cDNA akan disisipkan adalah plasmid *E.coli* yang lazim digunakan. Plasmid ini merupakan molekul DNA beruntai-ganda sirkular. Karena plasmid memiliki tempat pembelahan tunggal untuk endonuklease pembatasan, maka pembelahan oleh enzim menghasilkan suatu molekul DNA

berantai-ganda linear. Endonuklease mengenali rangkaian palindromik berikut dan melakukan pembelahan pada tempat yang spesifik (Nathan and Smith, 1975), seperti yang terlihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Contoh titik pemotongan (*Cutting Site*)

Plasmid rekombinan adalah plasmid yang telah mengandung gen baru yang alaminya tidak terdapat didalam plasmid tersebut. Pembentukan plasmid rekombinan dilakukan dengan me-ligase gen asing yang ingin disisipi tersebut kedalam plasmid yang ingin kita ubah, dengan memanfaatkan sifat pada plasmid yang memiliki titik pemotongan (*cutting site*) dan titik pengenalan (*recognition site*). Dengan memanfaatkan enzim restriksi dapat dilakukan pemotongan pada titik plasmid yang diinginkan, selanjutnya dapat dilakukan penyambungan bagian gen asing yang ingin disisipi dengan memanfaatkan enzim ligase.

#### **2.4 *Green Fluorescent Protein (GFP) sebagai Gen Reporter***

Pengevaluasian dan untuk mengetahui apakah gen target yang telah ditransformasikan dapat berekspresi atau tidak maka dapat digunakan marker seperti *reporter gen*. Gen reporter berfungsi sebagai penanda apakah gen target yang telah ditransformasikan sudah berekspresi atau belum. Menurut Chalfie (1994), salah satu gen reporter ini adalah gen GFP (*Green Fluorescent Protein*) yang dapat memendarkan warna hijau diekstrak dari protein GFP ubur-ubur (*Aequorea victoria*).

Dalam sel dan biologi molekuler, gen GFP sering digunakan sebagai pengeksresi. Dalam bentuk dimodifikasi, itu telah digunakan untuk membuat biosensor, dan banyak hewan telah diciptakan yang mengekspresikan GFP sebagai bukti konsep dimana gen dapat dinyatakan melalui organisme yang diberikan. Gen GFP dapat diperkenalkan ke dalam organisme dan dipelihara dalam genom mereka melalui pembiakan, injeksi dengan vektor virus, atau transformasi sel. Untuk saat ini,

gen GFP telah diperkenalkan dan disajikan dalam banyak bakteri, ragi dan jamur lainnya, ikan, tanaman, lalat, dan sel mamalia, termasuk manusia. Martin Chalfie, Osamu Shimomura, dan Roger Y. Tsien dianugerahi Hadiah Nobel Kimia untuk penemuan mereka dan pengembangan protein fluoresen hijau (Helianti, 2007).

*Green Fluorescent Protein* (GFP) adalah protein yang terdiri dari 238 residu asam amino memiliki berat molekul 26.9 kDa yang dapat menunjukkan fluoresensi hijau bila terkena sinar biru (Helianti, 2007). GFP memiliki sifat yang mampu memancarkan warna hijau. Pemurnian dan karakterisasi GFP dari ubur-ubur *Aequorea victoria* pertama kali dilakukan oleh ilmuwan Jepang Osamu Shimomura pada tahun 1960-an. Namun kegunaannya sebagai alat deteksi biologi molekuler masih belum jelas sampai pada awal tahun 1992 (Chalfie, 1994).

Menurut Helianti (2007), GFP dari *Aequorea victoria* memiliki puncak eksitasi utama pada panjang gelombang 395 nm dan yang kecil pada 475 nm. Puncak emisi adalah pada 509 nm, pada bagian hijau yang lebih rendah dari spektrum yang dapat terlihat. GFP dari *sea pansy* (*Renilla reniformis*) memiliki puncak eksitasi tunggal utama pada 498 nm. Di dalam GFP terdapat gugus yang disebut *chromophore* yang berperan sangat penting dalam proses perpendaran hijau. *Chromophore* terdiri dari tiga residu asam amino di posisi 65 (Serin), 66 (Tirosin), dan 67 (Glisin). Ketika dikenai energi cahaya biru atau UV maka pada gugus ini akan terjadi reaksi oksidasi. Energi yang diserap membuat elektron-elektron di dalam gugus ini tereksitasi dan menghasilkan energi yang lebih rendah yaitu energi cahaya hijau.

Douglas Prasher melaporkan keberhasilannya dalam mengkloning dan mendapatkan sekuen nukleotida GFP. Keberhasilan kloning tersebut dilanjutkan dengan aplikasi GFP pada dua sistem organisme prokaryotik (bersel tunggal) dan eukaryotik (multi sel/organisme tingkat tinggi). Organisme prokaryotik yang digunakan adalah *Escherichia coli*, sedangkan organisme eukaryotiknya adalah cacing dari *filum nematoda* (cacing gelang) yaitu *Caenorhabditis elegans*. Hasilnya sangat memuaskan. Ekspresi GFP cukup stabil pada kedua sistem tersebut (Chalfie, 1994).

*Green Fluorescent Protein* (GFP) digunakan sebagai reporter ekspresi gen sebagaimana GUS ( $\beta$ -glukuronidase) yang mengkode kemampuan menghasilkan warna pada *E. coli.*, sedangkan kemampuan berpendar pada kunang-kunang dikode oleh LUC (*luciferase*). Tidak seperti GUS dan LUC, GFP *fusion system* memiliki keunggulan tersendiri yaitu tidak memerlukan suatu substrat sehingga deteksinya cukup menggunakan mikroskop. Selain itu GFP juga tidak bersifat toksik sehingga pengambilan Gambar bisa menggunakan sel hidup (*in vivo imaging*) (Berita IPTEK, 2011).

Beberapa penelitian telah memanfaatkan gen GFP sebagai marker pada pelaksanaan transformasi. Bahkan beberapa hewan telah berhasil disisipi dengan gen GFP ini sehingga dapat memendarkan warna hijau contohnya kera, ikan, dan tikus. Sedangkan dibidang kedokteran gen GFP telah dimanfaatkan untuk mendeteksi penderita penyakit Alzheimer. Menurut Rahmawati (2003) gen GFP dapat dijadikan sebagai penyeleksi alternatif untuk transformasi tanaman. Sedangkan Widayati (2008), melaporkan bahwa dengan menggunakan gen GFP dapat mendeteksi keberadaan bakteri diazotrof endofit dalam jaringan tebu. GFP juga telah digunakan untuk menyelidiki proses infeksi dalam kultivar padi komersial dan diekspresikan pada berbagai organisme seperti bakteri, cendawan, tumbuhan, serangga dan sel mamalia.

Beberapa kelebihan penggunaan gen GFP menurut Ehrenberg (2008) dalam Ratnasari (2011) sehingga banyak digunakan sebagai penanda molekuler antara lain adalah ekspresinya dapat diamati secara langsung tanpa merusak jaringan yang akan ditransformasikan. Keberadaan gen di dalam sel itu sendiri tidak membutuhkan perlakuan khusus pada jaringan, tidak membutuhkan penambahan substrat untuk visualisasinya dan ekspresi gen GFP dapat dideteksi sampai pada tingkat sel tunggal. Oleh karena itu, gen GFP cocok digunakan sebagai marker atau penanda.

### **III. BAHAN DAN METODE**

### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Januari hingga Juni 2013 bertempat di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang. (Jadwal kegiatan terlampir pada Lampiran 1)

### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *A.tumefaciens* LBA4404 + plasmid pBI121, YM (*Yeast Medium*) cair dan YM Padat (Komposisi media terlampir pada Lampiran 2), Kanamysin (100mg/ml), Streptomysin (50mg/ml), CaCl<sub>2</sub> + 15% Glyserol, LB cair dan LB padat (Komposisi media terlampir pada Lampiran 2), alkohol 70%, isopropanol, etanol absolute, 1xTE, bakteri *E.coli* BL21 + Plasmid pGEM-Rep, bakteri *E.coli* BL21 + Plasmid pET-15b-S65T-GFP, kloramphenicol (CAM) 100mg/ml, Ampicilin (100mg/ml), Primer spesifik (terlampir pada Tabel 2), *E.coli* BL21, Enzim Restriksi *Xba*I, *Buffer Tango*, 1 kb ladder (Promega), λ DNA (50ng/μl), Enzim Restriksi *Eco*RI, *Isolation Kits Miniprep* (Thermoscientific), 10x *Buffer Eco*RI, 0,5x TBE, *Kits Purification SV Cleans Up* (Promega), Ethidium Bromide, 10xBPB (Bromophenol Blue), T4 DNA ligasi, tabung eppendorf (2 mL, 1,5 ml, 0,5 mL, 0,2 mL), 2x *Rapid Ligase Buffer*, dNTPs 2,5μM, *Taq Polymerase*, *Taq Buffer+KCl+MgCl<sub>2</sub>*, pGEM T-easy vector, ddH<sub>2</sub>O PCR, H<sub>2</sub>O UV, tip (1000μl, 200μl, dan 10μl), dan *Soresen-Posphat Buffer*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sarung tangan, microwave, petridish, shaker, kulkas -4°, kulkas -20°, sentrifugasi dingin, tabung eppendorf 1,5 mL, *water bath*, *spreader*, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), tabung reaksi, erlemeyer, tusuk gigi, botol scott, bunsen, *aluminium foil*, plastik *wrap*, kertas label, pipet mikro, timbangan analitik, autoklaf, alat sentrifugasi, alat gel dokumentasi, alat elektroforesis, *gel tray*, oven, *Vortex*, pisau *scapel* untuk potong agar hasil restriksi, tabung *minicolumn*, marker, mesin PCR (Promega), mikroskop *fluorescent*.

**Tabel 2.** Daftar Primer Spesifik untuk Amplifikasi

No	Nama Primer	Sekuens
1	P1 Forward	5'-GTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACC-3'

2	P2 on Sequence	5'-GTGGGAACAAACGGCGGATTGACCG-3'
3	P3 Reverse	5'-GTTATTGCTCAGCGGTGGCAGCAGC-3'
4	35SP Forward	5'-CTATCCTTCGCAAGACCCTTC-3'
5	GUS3 Reverse	5'-TGGCGGAAGCAACGCGTAAAC-3'
6	NPTII 1 Forward	5'-TGAATGAACTGCAGGACGAG-3'
7	NPTII 2 Reverse	5'-AGCCAACGCTATGTCCTGAT-3'
8	C1-TD21- <i>Sma</i> INT F	5'-CTAATCCCGGGTACGTCTCCTGCGA-3'
9	C1-TD21- <i>Bam</i> HINT R	5'-CATGGGGATCCATGCCTCCACCACGT-3'

### 3.3 Metode Penelitian

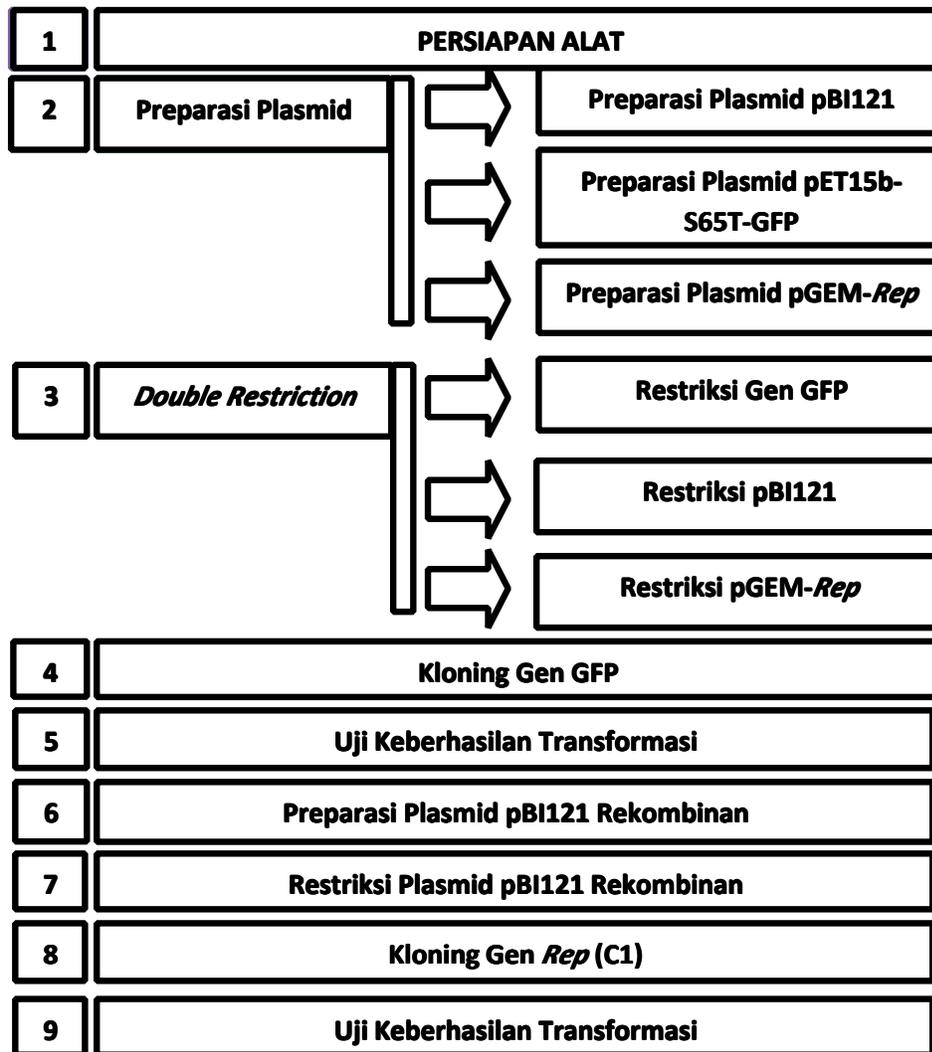
Metode penelitian yang digunakan adalah metode deskriptif. Penelitian dilakukan dengan tahapan preparasi plasmid dengan mengisolasinya dari sel bakteri. Restriksi dobel dilakukan dengan *Xba*I dan *Eco*RI untuk membebaskan gen GFP dan membuang gen GUS, lalu ligasi dilakukan untuk menggabungkan gen GFP kedalam plasmid pBI121 untuk menghasilkan plasmid pBI121-GFP, kemudian dilakukan transformasi ke *A.tumefaciens* dan ditumbuhkan pada media selektif untuk seleksi bakteri transforman serta uji PCR koloni, dan uji mikroskop *fluorescent* untuk melihat ekspresi gen GFP. Kemudian gen *Rep* dipotong dengan enzim *Eco*RI dan dilakukan ligasi ke plasmid pBI121-GFP, lalu transformasi dilakukan untuk mendapatkan bakteri transforman yang mengandung pBI121-GFP-*Rep*. Verifikasi dilakukan dengan uji PCR koloni menggunakan primer spesifik dan uji mikroskop *fluorescent* untuk melihat ekspresi gen GFP. Ilustrasi plasmid rekombinan dengan T-DNA yang mengandung insersi gen *Rep* dan GFP dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Ilustrasi T-DNA pBI121 setelah dilakukan kloning gen GFP dan gen *Rep* menjadi plasmid biner pBI121-GFP-*Rep*.

### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

Kegiatan penelitian ini dilakukan dengan alur penelitian seperti yang terlihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Alur kerja penelitian

### 3.4.1 Persiapan Alat

Langkah awal pelaksanaan penelitian ini adalah mempersiapkan ketersediaan bahan dan alat yang diperlukan sesuai kebutuhan penelitian dan melakukan sterilisasi pada alat yang perlu disterilisasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Sterilisasi alat dan bahan yang dibutuhkan menggunakan autoklaf sebanyak dua kali yakni autoklaf kotor untuk membersihkan sampah biologis dan autoklaf bersih untuk membersihkan alat sebelum digunakan.

### **3.4.2 Preparasi Plasmid**

#### **3.4.2.1 Isolasi plasmid pBI121**

Langkah awal pembuatan kultur starter dengan memasukkan YM cair sebanyak 10 mL pada masing-masing tabung reaksi, kemudian tambahkan antibiotik Kanamycin dan Streptomycin pada setiap tabung reaksi sebanyak 10 µL, bakteri diambil dengan tusuk gigi yang steril dengan didekatkan ke api bunsen. Tusuk gigi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah disediakan, lalu ditutup tabung dengan *aluminium foil* dan direkatkan menggunakan plastik *wrap*, diulangi untuk setiap tabung reaksi. Selanjutnya diinkubasi di *dishaker incubator* pada suhu 30°C dengan kecepatan 225 rpm selama 3 hari ( $\pm 72$  jam).

Isolasi plasmid dilakukan untuk mendapatkan plasmid dari dalam sel bakteri. Proses isolasi dilakukan dengan menggunakan *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermoscientific). Bakteri yang telah ditumbuhkan pada kultur starter yang selesai diinkubasi dipanen dengan cara diendapkan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 2 menit. Kegiatan ini diulangi hingga kultur starter habis. Kemudian ditambahkan 250 µL *resuspension solution* + RNAse, dan di-*tapping* hingga homogen. Kemudian ditambahkan 250 µL *lysis solution* dan di-*tapping* hingga homogen, lalu ditambahkan 350 µL *neutralization solution* dan dihomogenkan. Kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Supernatan ditransfer ke *GeneJET spin column* dengan hati-hati untuk mencegah agar *pellet* tidak ikut terbawa. Kemudian kembali disentrifugasi selama 1 menit. Larutan dibawah *column* dibuang. Sebanyak 500 µL *wash solution* dimasukkan kedalam *column* dan disentrifugasi selama 30-60 detik. Kegiatan diulangi hingga 2 kali dan larutan dibawah *column* dibuang. Jika diperlukan sampel kembali disentrifugasi selama 1 menit untuk membuang sisa ethanol pada plasmid hasil isolasi. *GeneJET spin column* dipindahkan ke tabung *ependorf* 1,5 mL yang baru dan *elution buffer* sebanyak 50 µL dimasukkan ke dalam *column* untuk melulusi plasmid hasil isolasi, lalu diinkubasi selama 2 menit pada suhu ruang dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 2 menit. *Column* dibuang dan DNA plasmid dapat disimpan pada suhu -20°C.

Verifikasi keberadaan plasmid pBI121 dari hasil isolasi dilakukan uji PCR menggunakan primer spesifik 35SPGUS3. Adapun komposisi *cocktail* PCR yang digunakan adalah :

dNTPs	: 2,5 $\mu$ l
Taq Polymerase	: 1 $\mu$ l
Taq Buffer	: 2,5 $\mu$ l
Primer 35SPGUS3	: 3 $\mu$ l
DNA Plasmid	: 3 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O PCR	: 11 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>: 25 <math>\mu</math>l</b>

*Cocktail* dibuat didalam *ependorff* 0,2 ml, kemudian di-*running* pada mesin PCR (Biometra-Jerman) dengan program PCR sebagai berikut :

<i>Initial Denaturation</i>	: 94°C selama 5'	} 30 siklus
<i>Denaturation</i>	: 94°C selama 1'	
<i>Annealing</i>	: 64°C selama 1'	
<i>Extension</i>	: 72°C selama 1,5'	
<i>Final extension</i>	: 72°C selama 5'	
<i>Pause</i>	: 8°C ~	

Hasil amplifikasi ditambah 10x BPB sebanyak 2,5  $\mu$ l pada masing-masing tabung *ependorff* dan dielektroforesis pada agarose 1,5% selama 30 menit dengan tegangan 100 volt. Estimasi produk plasmid positif yang diharapkan adalah  $\pm$  1400 bp. Visualisasi dapat dilihat dengan gel dokumentasi.

### 3.4.2.2 Isolasi plasmid pET15b-S65T-GFP

Langkah awal pembuatan kultur starter, LB cair dimasukkan sebanyak 5 mL pada masing-masing erlenmeyer, ditambahkan antibiotik kloramphenicol (CAM) dan ampisilin pada setiap tabung reaksi sebanyak 5  $\mu$ L. Bakteri diambil dengan tusuk gigi yang steril dengan didekatan ke api bunsen. Kemudian tusuk gigi tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah disediakan, lalu tabung ditutup dengan *aluminium foil* dan direkatkan menggunakan plastik *wrap*. Selanjutnya diinkubasi di *shaker incubator* dengan kecepatan 150 rpm dan suhu 37°C *overnight*.

Isolasi plasmid dilakukan untuk mendapatkan plasmid dari sel bakteri. Proses isolasi dilakukan dengan menggunakan *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermoscientific). Cara kerja sebagaimana yang telah dijelaskan pada Sub Bab 3.4.2.1 mengenai isolasi plasmid pBI121.

Verifikasi keberadaan plasmid pET15b-S65T-GFP diuji menggunakan teknik PCR menggunakan primer spesifik P1, P2, dan P3. Adapun komposisi *cocktail* PCR yang digunakan adalah :

dNTPs	: 2,5 µl
Taq Polymerase	: 1 µl
Taq Buffer	: 2,5 µl
Primer P1	: 1,5 µl
Primer P2	: 1,5 µl
Primer P3	: 1,5 µl
DNA Plasmid	: 3 µl
ddH <sub>2</sub> O PCR	: 11,5 µl
<b>Total</b>	<b>: 25 µl</b>

*Cocktail* dibuat didalam *ependorf* 0,2 ml, kemudian di-*running* pada mesin PCR (Biometra-Jerman) dengan program PCR sebagai berikut :

<i>Initial Denaturation</i>	: 94°C selama 4'	} 32 siklus
<i>Denaturation</i>	: 94°C selama 30''	
<i>Annealing</i>	: 66°C selama 40''	
<i>Extension</i>	: 72°C selama 45''	
<i>Final extension</i>	: 72°C selama 2'	
<i>Pause</i>	: 8°C ~	

Hasil amplifikasi ditambahkan dengan 10x BPB sebanyak 2,5 µl pada masing-masing tabung *ependorf* dan dielektroforesis pada agarose 1,5% selama 30 menit dengan tegangan 100 volt, dengan marker 1Kb Ladder sebagai pembanding, estimasi produk plasmid positif yang diharapkan adalah ± 1000 bp. Visualisasi dilihat dengan gel dokumentasi.

### 3.4.2.3 Isolasi plasmid pGEM-Rep

Langkah awal pembuatan kultur starter, isolasi plasmid dilakukan untuk mendapatkan plasmid dari sel bakteri. Proses isolasi dilakukan dengan menggunakan *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermoscientific). Cara kerja sebagaimana yang telah dijelaskan pada Sub Bab 3.4.2.2 mengenai isolasi plasmid pET15b-S65T-GFP.

Verifikasi keberadaan plasmid pGEM-*Rep* dari hasil isolasi dilakukan uji PCR menggunakan primer spesifik C1-TD21-*SmaI/BamH*INT untuk verifikasi gen *Rep*. Adapun komposisi *cocktail* PCR yang digunakan adalah :

dNTPs	: 2,5 µl
Taq Polymerase	: 1 µl
Taq Buffer	: 2,5 µl
Primer C1	: 3 µl
DNA Plasmid	: 3 µl
ddH <sub>2</sub> O PCR	: 13 µl
<b>Total</b>	<b>: 25 µl</b>

*Cocktail* dibuat didalam *ependorf* 0,2 ml, kemudian di-*running* didalam mesin PCR (Biometra-Jerman) dengan program PCR sebagai berikut :

<i>Initial Denaturation</i>	: 94°C selama 2'	} 30 siklus
<i>Denaturation</i>	: 94°C selama 1'	
<i>Annealing</i>	: 60°C selama 2'	
<i>Extension</i>	: 72°C selama 1,5'	
<i>Final extension</i>	: 72°C selama 5'	
<i>Pause</i>	: 8°C ~	

Hasil amplifikasi ditambahkan dengan 10x BPB sebanyak 2,5 µl pada masing-masing tabung *ependorf* dan di elektroforesis pada agarose 1,5% selama 30 menit dengan tegangan 100 volt. Estimasi produk plasmid positif yang diharapkan adalah ± 1100 bp. Visualisasi dilihat dengan gel dokumentasi.

### 3.4.3 *Double Restriction*

#### **3.4.3.1 Restriksi gen GFP**

Restriksi dilakukan untuk memotong gen GFP dari plasmid pET-15b-S65T-GFP. Langkah pertama *cocktail* dipersiapkan dengan komposisi: *nuclease free water* (Promega) sebanyak 11  $\mu\text{L}$ , buffer Tango 1  $\mu\text{L}$ , plasmid pET-15b 5  $\mu\text{L}$ , Enzim Restriksi *XbaI* sebanyak 1  $\mu\text{L}$  dan Enzim Restriksi *EcoRI* 1  $\mu\text{L}$  dan 10x Buffer *EcoRI* sebanyak 1  $\mu\text{L}$  dimana total volume *cocktail* yang dibuat adalah 20  $\mu\text{L}$ . *Cocktail* dimasukkan ke dalam eppendorf 0,5 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam di *water bath*. Setelah selesai diinkubasi, sampel dielektroforesis bersama *1 kb ladder* 5  $\mu\text{L}$  dan 2  $\mu\text{L}$   $\lambda$  DNA selama 30 menit dengan voltase 100 volt dan diamati hasil visualisasi keberhasilan proses restriksi pada gel dokumentasi.

Purifikasi dilakukan untuk mengambil gen GFP yang berhasil dipotong pada proses restriksi sebelumnya. Proses ini dilakukan dengan *Kit Purification SV Clean Up* (Promega). Tahapan pertama agar hasil restriksi yang di-*running* elektroporesis dipotong menggunakan pisau *scapel* diatas sinar UV pada alat *UV transmilator*, kemudian dimasukkan kedalam eppendorf 2 mL. Lalu ditambahkan *membran binding solution* 200  $\mu\text{L}$ . di-*tapping* dan di-*Vortex* hingga homogen. Sampel diinkubasi pada suhu 65°C dalam *waterbath* selama 10 menit. Kemudian hasil inkubasi ditransfer ke dalam *minicolumn*, lalu disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm dan kemudian air dibawah tabung *minicolumn* dibuang. *Membran wash solution* ditambahkan sebanyak 700  $\mu\text{L}$  kedalam *minicolumn* dan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm lalu air dibawah tabung dibuang, kegiatan diulangi sebanyak dua kali. *Minicolumn* dipindahkan ke tabung eppendorf 1,5 mL dan ditambahkan 50  $\mu\text{L}$  *nuclease free water*. Diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit lalu disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 14.000 rpm, *minicolumn* dibuang dan DNA plasmid dapat disimpan pada suhu -20°C. Hasil purifikasi dianalisis kualitas dan kuantitasnya menggunakan elektroforesis, sebagai pembanding ditempatkan *size marker 1 kb ladder* dan  $\lambda$  DNA (50  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ ) sebanyak 2  $\mu\text{L}$ . Visualisasi dilihat dengan menggunakan gel dokumentasi.

#### **3.4.3.2 Restriksi plasmid pBI121**

Restriksi dilakukan untuk memotong gen GUS dari plasmid pBI121. Langkah pertama disiapkan *cocktail* dengan komposisi: *water nuclease free* (Promega) sebanyak 11  $\mu\text{L}$ , 10x *Fast Digest Green Buffer* 1  $\mu\text{L}$ , DNA plasmid pBI121 sebanyak 5  $\mu\text{L}$ , *Fast Digest* Enzim Restriksi *Bam*HI sebanyak 1  $\mu\text{L}$  dan Enzim *Eco*RI 1  $\mu\text{L}$  dan Buffer *Eco*RI sebanyak 1  $\mu\text{L}$  dimana total volume *cocktail* yang dibuat 20  $\mu\text{L}$ . *Cocktail* dimasukkan ke dalam eppendorf 0,5 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam di oven. Setelah selesai diinkubasi, sampel dielektroforesis bersama 1 kb ladder 5  $\mu\text{L}$  dan 2  $\mu\text{L}$   $\lambda$  DNA selama 30 menit dengan voltase 100 volt dan hasil visualisasi keberhasilan proses restriksi dapat diamati pada gel dokumentasi.

Purifikasi dilakukan untuk mengambil plasmid pBI121 yang telah berhasil dipotong dan dibuang gen GUS yang dikandungnya pada proses restriksi sebelumnya. Proses ini dilakukan dengan *Kit Purification SV Clean Up* (Promega). Cara kerja sebagaimana yang telah dijelaskan pada Sub Bab 3.4.3.1 mengenai restriksi gen GFP.

#### **3.4.3.3 Restriksi gen *Rep* (C1)**

Restriksi dilakukan untuk memotong gen *Rep* (C1) dari plasmid pGEM-*Rep*. Langkah pertama *cocktail* dipersiapkan dengan komposisi: *nuclease free water* (Promega) sebanyak 13  $\mu\text{L}$ , plasmid pGEM-*Rep* 5  $\mu\text{L}$ , Enzim Restriksi *Eco*RI 1  $\mu\text{L}$  dan 10x Buffer *Eco*RI sebanyak 1  $\mu\text{L}$  dimana total volume *cocktail* yang dibuat adalah 20  $\mu\text{L}$ . *Cocktail* dimasukkan ke dalam eppendorf 0,5 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam di *water bath*. Setelah selesai diinkubasi, sampel dielektroforesis bersama 1 kb ladder 5  $\mu\text{L}$  dan 2  $\mu\text{L}$   $\lambda$  DNA selama 30 menit dengan voltase 100 volt dan diamati hasil visualisasi keberhasilan proses restriksi pada gel dokumentasi.

Purifikasi dilakukan untuk mengambil gen *Rep* (C1) yang berhasil dipotong pada proses restriksi sebelumnya. Proses ini dilakukan dengan *Kit Purification SV Clean Up* (Promega). Cara kerja sebagaimana yang telah dijelaskan pada Sub Bab 3.4.3.1 (A) mengenai restriksi gen GFP.

#### **3.4.4 Kloning Gen GFP**

##### **3.4.4.1 Ligasi gen GFP ke plasmid pBI121**

Tahapan selanjutnya dilakukan ligasi dari gen GFP yang telah direstriksi ke dalam plasmid pBI121. Langkah awal dibuat *cocktail* dengan komposisi seperti dibawah ini dan diinkubasi 4°C *overnight*.

plasmid pBI121 hasil restriksi	: 5 µL
T4 DNA ligasi	: 1 µL
2x Rapid Ligasi Buffer	: 5 µL
gen GFP hasil restriksi	: 10 µL
H <sub>2</sub> O UV	: 4 µL
<hr/>	
Total	: 25 µL

#### **3.4.4.2 Transformasi plasmid rekombinan pBI121-GFP ke *A. tumefaciens***

##### **a. Pembuatan sel kompeten *A. tumefaciens***

Koloni tunggal *A. tumefaciens* pada petridish yang telah tersedia dibuat menjadi kultur Starter pada medium Luria-Bertani (LB) cair dan ditambahkan antibiotik Kanamysin dan streptomisin 10 µL untuk 10 mL medium LB cair, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam di-*shaker*. Kemudian ambil 1 mL dari kultur Starter yang telah selesai dibuat dan dimasukkan ke dalam 20 mL LB cair baru diinkubasi kembali di shaker pada suhu 37°C selama 4 jam. Setelah selesai diinkubasi, diambil pellet *A. tumefaciens* pada kultur Starter yang telah dibuat dengan cara mensentrifugasi dingin pada suhu 4°C selama 3 menit dengan kecepatan 10.000 rpm selanjutnya buang supernatan yang terpisah setelah disentrifugasi, ulangi hingga kultur Starter habis (seperlunya). Tambahkan CaCl<sub>2</sub> 500 µL dan inkubasi di es selama 30 menit lalu kembali disentrifugasi dingin 4°C selama 3 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Buang supernatan dan tambahkan CaCl<sub>2</sub> 200 µL, inkubasi di es 30 menit. Sel kompeten siap digunakan atau dapat disimpan pada suhu -80°C hingga -20°C.

##### **b. Transformasi pBI121-GFP dengan metode elektroporasi**

Transformasi dilakukan untuk memasukkan plasmid pBI121 rekombinan hasil ligasi ke dalam *A. tumefaciens*. Langkah awal dibuat *cocktail* transformasi dengan komposisi : 5 µL DNA plasmid rekombinan pBI121 yang telah disisipi gen GFP hasil ligasi dan 50 µL sel kompeten bakteri *A. tumefaciens*. *Cocktail* transformasi

dimasukkan kedalam kuvet elektroporasi yang sebelumnya kuvet dicuci dengan alkohol, kemudian dikeringkan. Campuran transformasi dimasukkan kedalam celah kuvet elektroporasi dan dilakukan elektroporasi pada elektroporator dengan tegangan 1800 volt (1 kali kejutan listrik). Kemudian ditambahkan 1 ml YM cair baru kedalam kuvet dan diaduk dengan menggunakan pipet mikro. Semua campuran yang terdapat di dalam kuvet diambil dan dipindahkan kedalam eppendorf baru. Inkubasi dilakukan pada *shaker incubator* selama 3 jam dengan kecepatan 225 rpm dan suhu 30°C.

c. Plating hasil transformasi

Hasil transformasi setelah diinkubasi selama tiga jam, di-*plating*. Langkah awal semua alat dan bahan disiapkan; YM Padat + antibiotic (Kanamysin dan Streptomysin) dalam petridish, *spreader*, bunsen, marker label, alkohol, dan kertas *wrap*. Kemudian semua alat dan bahan yang diperlukan dimasukkan kedalam LAFC yang sebelumnya telah disterilkan dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Hasil transformasi dimasukkan sebanyak 100 µL dan aduk secara perlahan dan merata dengan *spreader*. Ditunggalkan dan direkatkan dengan kertas *wrap*, kemudian diinkubasi di oven dengan suhu 30°C untuk *A.tumefaciens* selama ± 3 hari (± 72 jam).

### 3.4.5 Uji Keberhasilan Transformasi

#### 3.4.5.1 Uji PCR koloni

PCR Koloni dilakukan untuk pengecekan keberhasilan transformasi plasmid pBI121 ke dalam *A.tumefaciens* dengan menggunakan primer spesifik NPTII 1.2.

*Cocktail* dipersiapkan dengan komposisi sebagai berikut :

dNTPs	: 2,5 µl
Taq Polymerase	: 1 µl
Taq Buffer	: 2,5 µl
Primer NPTII 1.2	: 5 µl
ddH <sub>2</sub> O PCR	: 14 µl
<b>Total</b>	<b>: 25 µl</b>

*Cocktail* dibuat didalam *eppendorf* 0,2 ml, kemudian di-*running* didalam mesin PCR (Biometra-Jerman) dengan program PCR sebagai berikut :

<i>Initial Denaturation</i>	: 94°C selama 5'	} 30 siklus
<i>Denaturation</i>	: 95°C selama 1'	
<i>Annealing</i>	: 60°C selama 1'	
<i>Extension</i>	: 72°C selama 1,5'	
<i>Final extension</i>	: 72°C selama 5'	
<i>Pause</i>	: 8°C ~	

Hasil amplifikasi ditambah dengan 10x BPB sebanyak 2,5 µl pada masing-masing tabung *ependorf* dan dielektroforesis pada agarose 1,5% selama 30 menit dengan tegangan 100 volt. Estimasi produk plasmid positif yang diharapkan adalah ±500 bp. Visualisasi dilihat dengan gel dokumentasi.

### 3.4.5.2 Uji ekspresi gen GFP

Uji dengan menggunakan mikroskop *fluorescence* dilakukan untuk melihat ekspresi gen GFP yang disisipkan pada pBI121 yang ditransformasikan kedalam *A. tumefaciens* secara in-vivo (secara hidup). Langkah pertama alat dan bahan yang diperlukan dipersiapkan, yakni : koloni hasil transformasi yang telah tumbuh, *object glass*, *cover glass*, Sorensen-Posphat Buffer, tip 10 µl, pipet mikro, bunsen, dan tusuk gigi. Semua alat dan bahan yang diperlukan dimasukkan ke dalam LAFC yang sebelumnya telah disterilkan dengan alkohol 70% terlebih dahulu. Sorensen-Phospat Buffer diteteskan sebanyak 10 µL ke atas *object glass* kemudian koloni tunggal bakteri diambil dengan tusuk gigi dan digoreskan pada *object glass*. Preparat diamati pada mikroskop *fluorescent* dengan menggunakan cahaya biasa terlebih dahulu dan kemudian baru digunakan cahaya biru. Dilakukan pengamatan dari pembesaran terkecil (10x10) hingga yang terbesar (10x40). Hasil diamati dan dideskripsikan.

### 3.4.6 Preparasi Plasmid pBI121 Rekombinan

Kegiatan preparasi plasmid dilakukan dengan cara mengisolasi DNA plasmid dari sel bakteri. Kegiatan isolasi dilakukan dengan menggunakan *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermoscientific). Cara kerja sebagaimana yang telah dijelaskan pada Sub Bab 3.4.2.1 mengenai Isolasi Plasmid pBI121.

Verifikasi keberadaan plasmid pBI121-GFP diuji menggunakan teknik PCR menggunakan primer spesifik NPTII 1.2. *Cocktail*/PCR yang digunakan adalah :

dNTPs : 2,5 µl

Taq Polymerase	: 1 $\mu$ l
Taq Buffer	: 2,5 $\mu$ l
Primer NPTII 1+2	: 5 $\mu$ l
DNA Plasmid	: 3 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O PCR	: 11 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>: 25 <math>\mu</math>l</b>

*Cocktail* dibuat didalam *epENDORF* 0,2 ml, kemudian di-*running* pada mesin PCR (Biometra-Jerman) dengan program PCR sebagaimana yang telah dijelaskan sebelumnya pada Sub Bab 3.4.5.1 mengenai uji PCR koloni. Estimasi produk plasmid positif yang diharapkan adalah  $\pm$  500 bp. Visualisasi dilihat dengan gel dokumentasi.

### **3.4.7 Restriksi Plasmid pBI121 Rekombinan**

Restriksi dilakukan untuk memotong plasmid pBI121-GFP. Langkah pertama *cocktail* dipersiapkan dengan komposisi: nuclease free water sebanyak 18  $\mu$ L, plasmid pGEM-*Rep* 5  $\mu$ L, Enzim Restriksi EcoRI 1  $\mu$ L dan 10x Buffer EcoRI sebanyak 1  $\mu$ L dimana total volume *cocktail* yang dibuat adalah 25  $\mu$ L. *Cocktail* dimasukkan ke dalam *epENDORF* 0,5 mL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam di *water bath*. Setelah selesai diinkubasi, sampel dielektroforesis bersama *1 kb ladder* 5  $\mu$ L dan 2  $\mu$ L  $\lambda$  DNA sebagai pembanding selama 30 menit dengan voltase 100 volt dan diamati hasil visualisasi keberhasilan proses restriksi pada gel dokumentasi.

Purifikasi dilakukan untuk mengambil Plasmid pBI121-GFP yang berhasil dipotong pada proses restriksi sebelumnya, proses ini dilakukan dengan menggunakan *Kit Purification SV Clean Up* (Promega). Cara kerja sebagaimana yang telah dijelaskan pada Sub Bab 3.4.3.1 (A) mengenai purifikasi gel hasil restriksi.

### **3.4.8 Kloning Gen *Rep* (C1)**

#### **3.4.8.1 Ligasi gen *Rep* ke plasmid pBI121-GFP**

Tahapan selanjutnya dilakukan ligasi dari gen *Rep* yang telah direstriksi ke dalam plasmid pBI121-GFP rekombinan. Cara kerja sebagaimana yang telah dijelaskan pada Sub Bab 3.4.4.1 mengenai ligasi gen GFP ke dalam plasmid pBI121.

#### **3.4.8.2 Transformasi plasmid rekombinan pBI121-GFP-*Rep* ke *A. tumefaciens***

Kegiatan transformasi dilakukan dengan metoda elektroporasi, kegiatan ini dimaksudkan untuk memasukkan plasmid pBI121 rekombinan kedalam *A.tumefaciens*. Cara kerja sebagaimana yang telah dijelaskan pada Sub Bab 3.4.4.2 mengenai transformasi plasmid rekombinan pBI121-GFP ke *A.tumefaciens*.

#### **3.4.9 Uji PCR Koloni Bakteri Transforman**

PCR Koloni dilakukan untuk pengecekan keberhasilan transformasi plasmid pBI121 ke dalam *A.tumefaciens* dengan penggunaan primer spesifik C1-TD21-SmaI/BamHINT. *Cocktail* dipersiapkan dengan komposisi sebagai berikut :

dNTPs	: 2,5 µl
Taq Polymerase	: 1 µl
Taq Buffer	: 2,5 µl
Primer	: 3 µl
DNA Plasmid	: 3 µl
ddH <sub>2</sub> O PCR	: 13 µl
<b>Total</b>	<b>: 25 µl</b>

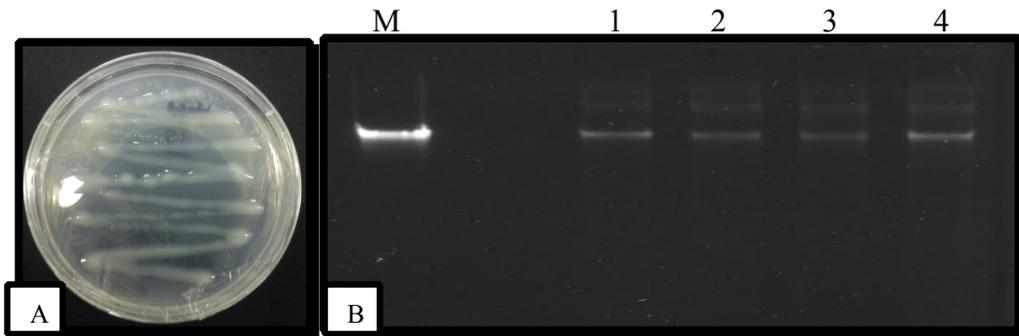
*Cocktail* dibuat didalam *ependorf* 0,2 ml, kemudian di-*running* pada mesin PCR (Biometra-Jerman) dengan program PCR sebagaimana yang telah dijelaskan sebelumnya pada 3.4.2.3 mengenai isolasi plasmid pGEM-*Rep*. Estimasi produk plasmid positif yang diharapkan adalah 1132 bp. Visualisasi dilihat dengan gel dokumentasi.

## **IV. HASIL DAN PEMBAHASAN**

## 4.1 Preparasi Plasmid

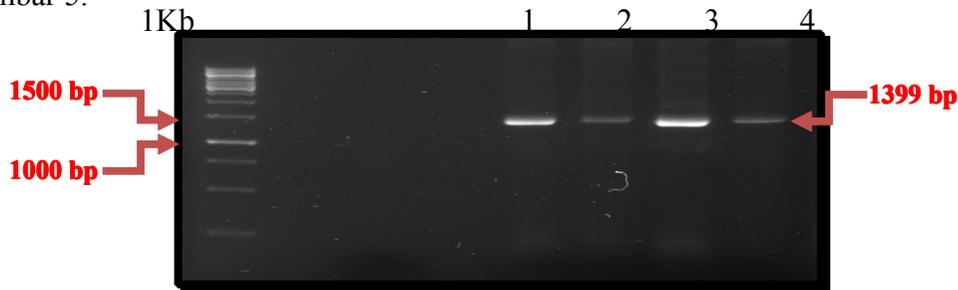
### 4.1.1 Isolasi plasmid pBI121

Plasmid pBI121 didapatkan dengan cara mengisolasi dari sel *A. tumefaciens* LBA4404 + pBI121 yang merupakan stok Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang. Semua isolat yang diisolasi menunjukkan hasil positif dengan adanya pita DNA yang sesuai dengan marker yang digunakan, seperti yang terlihat pada Gambar 4 (B).



**Gambar 4.** Preparasi plasmid pBI121. (A) Bakteri *A. tumefaciens* + plasmid pBi121, (B) Hasil isolasi plasmid pBI121. M =  $\lambda$  DNA (100ng), Lane 1-4 = Sampel.

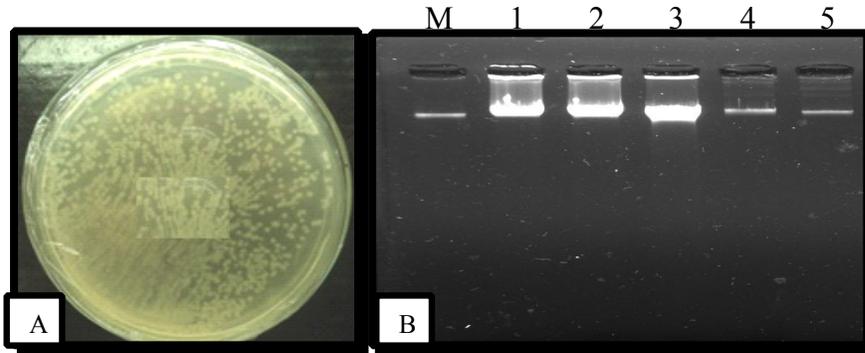
Verifikasi hasil dilakukan dengan cara amplifikasi menggunakan primer spesifik pBI121 yakni 35SPGUS3 dimana estimasi produk yang diharapkan 1399 bp. Dari 4 sampel yang diuji dari hasil isolasi plasmid didapatkan produk PCR dengan ukuran sebesar 1399 bp yakni dibandingkan dengan size marker dimana pita DNA yang didapat berada di antara pita 1000bp dan 1500bp, seperti yang terlihat pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Hasil PCR plasmid pBI121 dengan primer 35SPGUS3. 1Kb = Size marker 1Kb

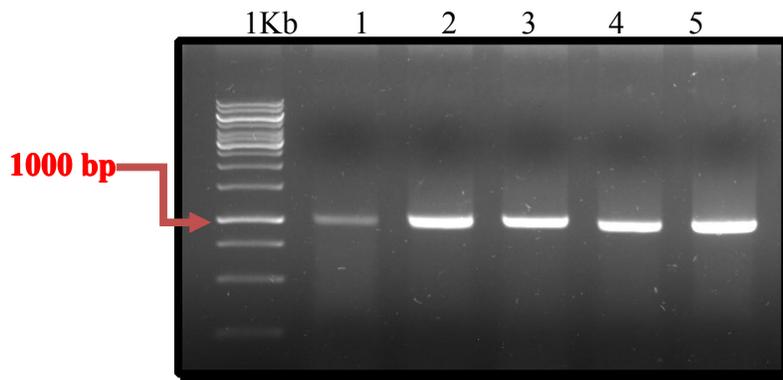
### 4.1.2 Isolasi plasmid pET15b-S65T-GFP

Bakteri *E.coli* BL21 yang mengandung plasmid pET15b-S65T-GFP merupakan stok Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang. Bakteri yang tersedia diisolasi untuk mengambil plasmid pET15b-S65T-GFP yang berada di dalamnya. Semua hasil isolasi yang dilakukan menunjukkan hasil yang positif ditunjukkan dengan adanya pita DNA yang sesuai dengan marker, seperti yang terlihat pada Gambar 6 (B).



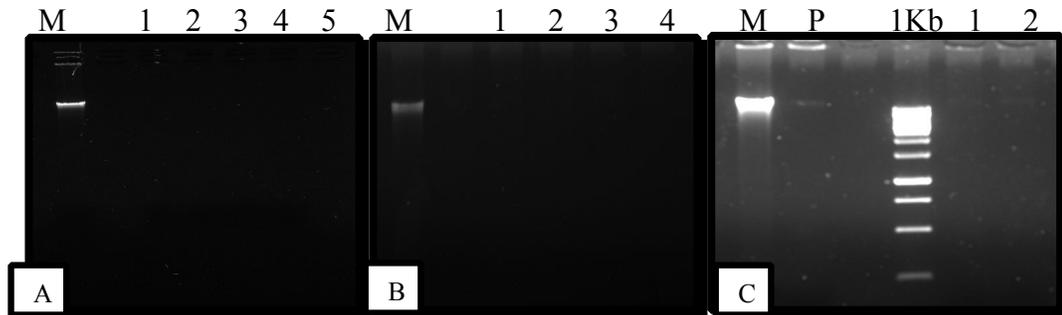
**Gambar 6.** Preparasi plasmid pET15b-S65T-GFP. (A) Bakteri *E.coli* BL21+pET15b-S65T-GFP stok labor, (B) Hasil isolasi plasmid pET15b-S65T-GFP. M =  $\lambda$  DNA (50ng), Lane 1-5 = Plasmid pET15b-S65T-GFP.

Verifikasi hasil yang didapatkan dilakukan dengan metoda PCR-3-Primer menggunakan primer spesifik P1, P2, dan P3 dimana estimasi produk yang diharapkan ~1000 bp. Seperti yang terlihat pada Gambar 6 hasil amplifikasi gen GFP memiliki ukuran ~1000 bp dibandingkan dengan size marker.



**Gambar 7.** Hasil PCR-3-Primer pET15b-S65T-Gen GFP yang dibutuhkan dalam skala besar untuk kloning diperlukan dalam jumlah banyak, maka dari itu stok bakteri labor kembali diisolasi untuk mendapatkan plasmid pET15b-S65T-GFP. Dari total 6 kali kegiatan isolasi yang

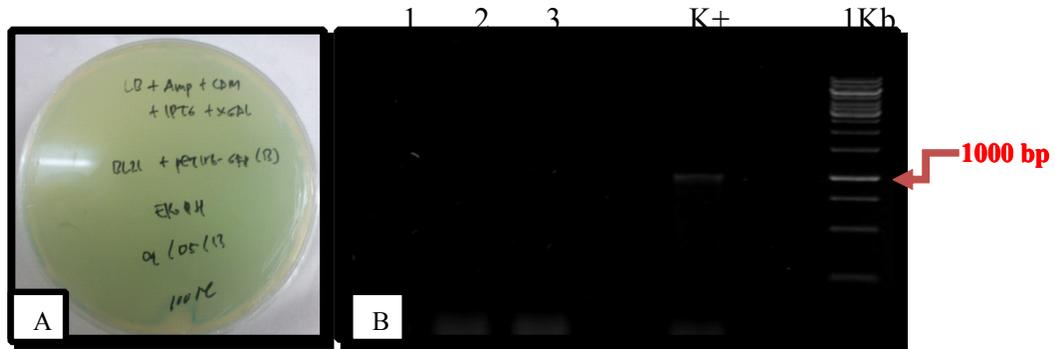
dilakukan menunjukkan hasil yang negatif dengan tidak adanya pita DNA yang didapatkan, seperti yang ditampilkan pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Hasil isolasi plasmid pET15b-S65T-GFP. (A) dan (B) hasil isolasi plasmid menggunakan metoda Solution I dan II, (C) Hasil isolasi plasmid menggunakan Minipreps Kit Qiagen (Germany). M =  $\lambda$  DNA (50ng), Lane 1,2,3,4,5 = Sampel, P = Plasmid, 1K = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas), 1-2 = Sampel PCR-3-Primer (P1, P2, dan P3) Plasmid pET15b-S65T-GFP.

Regenerasi bakteri pada media baru telah dicoba untuk dilakukan namun tidak ada satu koloni pun yang tumbuh, kegagalan tersebut disebabkan karena stok bakteri yang ada tidak *viable* lagi, seperti yang diketahui bahwa pertumbuhan bakteri terjadi dalam 4 fase; fase lag, fase log, fase statis, dan fase kematian. Menurut Volk and Wheeler (1990), fase kematian terjadi ketika laju kematian bakteri melampaui laju pembiakannya, hal tersebut terjadi karena jumlah makanan dalam medium yang berkurang sehingga pembiakan bakteri terhenti dan keadaan lingkungan yang jelek dan mengganggu pertumbuhan bakteri. Disebabkan oleh hal tersebut maka hasil isolasi plasmid yang dilakukan memberikan hasil yang negatif dengan tidak adanya produk pita DNA yang didapatkan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 8. Ketersediaan plasmid pET15b-S65T-GFP yang sedikit memberikan kendala dalam ketersediaan gen GFP karenanya disiasati dengan coba dilakukan transformasi stok plasmid yang dimiliki kedalam bakteri *E.coli* BL21 dengan metode *Heat Shock*.

Dari hasil plating terlihat koloni bakteri putih dan biru tumbuh menyebar pada media plating, tidak terdapat satu pun koloni tunggal, hal tersebut diakibatkan proses plating yang kurang lama sehingga bakteri tumbuh secara *smear* di media selektif yang digunakan, seperti yang terlihat pada Gambar 9 (A).



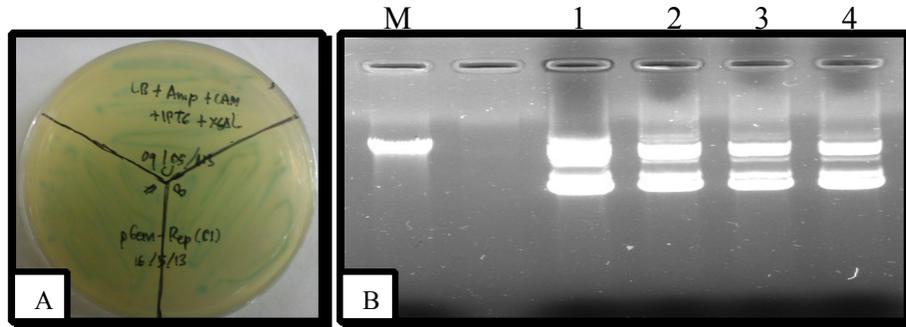
**Gambar 9.** Hasil transformasi (A) bakteri *E.coli* transforman dan (B) Hasil PCR koloni bakteri *E.coli* BL21 transforman. 1Kb = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas), K+ = Plasmid pET15b-S65T-GFP, Lane 1- 3 = Sampel.

Untuk memverifikasi keberadaan gen GFP didalam koloni bakteri transforman dilakukan PCR-3-Primer dengan primer spesifik P1, P2, dan P3. Dari tiga koloni yang diuji terlihat bahwa tidak adanya pita DNA hasil amplifikasi yang terlihat seperti halnya pada kontrol positif (K+) dengan produk ~1000bp maka dapat dikatakan bahwa proses transformasi yang dilakukan tidak berhasil, seperti yang terlihat pada Gambar 9 (B). Kegagalan transformasi genetik dapat disebabkan oleh banyak faktor diantaranya kondisi bahan yang digunakan seperti  $\text{CaCl}_2$  yang jika tidak berada pada kondisi yang baik dapat mempengaruhi proses transformasi, serta optimasi metoda seperti lama serta suhu inkubasi yang digunakan.

Upaya lain yang telah dilakukan untuk mengatasi keterbatasan plasmid pET15b-S65T-GFP, yakni dengan mendatangkan stok plasmid dari Universitas Brawijaya, Malang. Verifikasi keberadaan plasmid pET15b-S65T-GFP pada bakteri *E.coli* BL21 dilakukan dengan menggunakan teknik PCR-3-Primer dengan menggunakan primer spesifik untuk pET15b dan gen GFP yakni P1, P2, dan P3, dimana estimasi produk PCR yang diharapkan adalah sekitar 1000 bp. Dari semua koloni bakteri *E.coli* BL21 yang diamplifikasi memberikan hasil yang negatif yakni dengan tidak adanya produk PCR seperti yang terdapat pada kontrol positif (K+) yang berkisar ~1000bp. Akibat keterbatasan stok plasmid yang digunakan maka diputuskan stok yang tersedia dilanjutkan untuk proses kloning ke plasmid pBI121.

#### 4.1.3 Isolasi plasmid pGem-Rep

Bakteri *E.coli* BL21 yang mengandung plasmid pGEM-*Rep* didapatkan dari stok Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas, Padang (Syafriani, 2012). Pada semua isolat yang diisolasi terlihat bahwa terdapat pita DNA hasil isolasi dengan konsentrasi yang tinggi melebihi dari ketebalan  $\lambda$  marker (100ng) serta berada dibawah marker karena pGEM-*Rep* memiliki ukuran  $\sim$ 3000bp, seperti yang terlihat pada Gambar 10 (B).

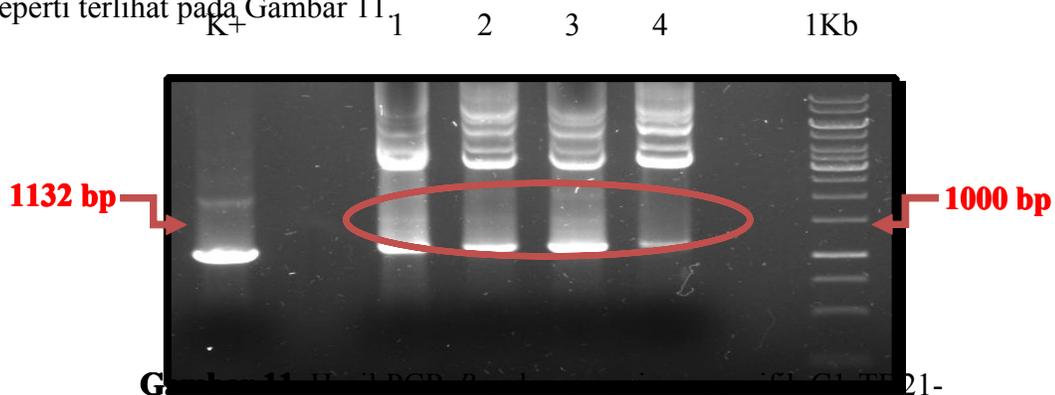


**Gambar 10.** Preparasi plasmid pGEM-*Rep*. (A) Regenerasi bakteri *E.coli*

BL21 + pGEM-*Rep* (B) Hasil isolasi plasmid pGEM-*Rep*.

M =  $\lambda$  DNA marker (100ng), Lane 1-4 = Sampel.

Dilakukan verifikasi menggunakan uji PCR dengan primer spesifik untuk gen *Rep* (C1) yakni C1-TD21-*Sma*I/*Bam*HI-NT dengan estimasi produk 1132bp (Syafriani, 2012) untuk melihat keberadaan gen *Rep* (C1) pada plasmid hasil isolasi. Hasil amplifikasi dengan primer spesifik untuk gen *Rep* (C1) memberikan hasil positif pada semua sampel dengan produk PCR yang sesuai dengan kontrol positif yakni 1132bp, seperti terlihat pada Gambar 11.



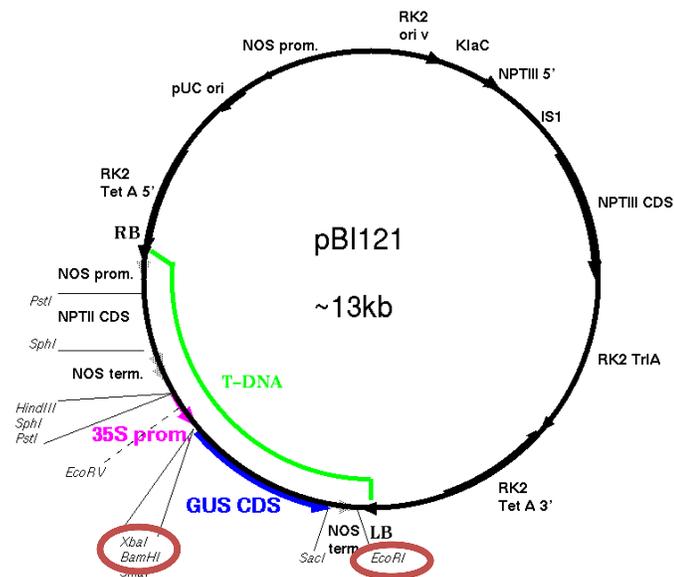
**Gambar 11.** Hasil uji PCR dengan primer spesifik untuk gen *Rep* (C1) TD21-

*Sma*I/*Bam*HI-NT. K(+) = Plasmid pGEM-*Rep* (C1), Lane 1-4 = Sampel, 1Kb = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas).

Seperti halnya pada hasil isolasi pada hasil PCR juga terdapat genom bakteri yang ikut teramplifikasi dengan menghasilkan produk PCR yang diatas estimasi produk yang diinginkan, dikarenakan ukuran genom bakteri yang besar bisa saja terdapat titik pengenalan untuk primer tersebut pada genom bakteri sehingga dapat teramplifikasi.

#### **4.2 Restriksi Gen GFP dan Plasmid pBI121**

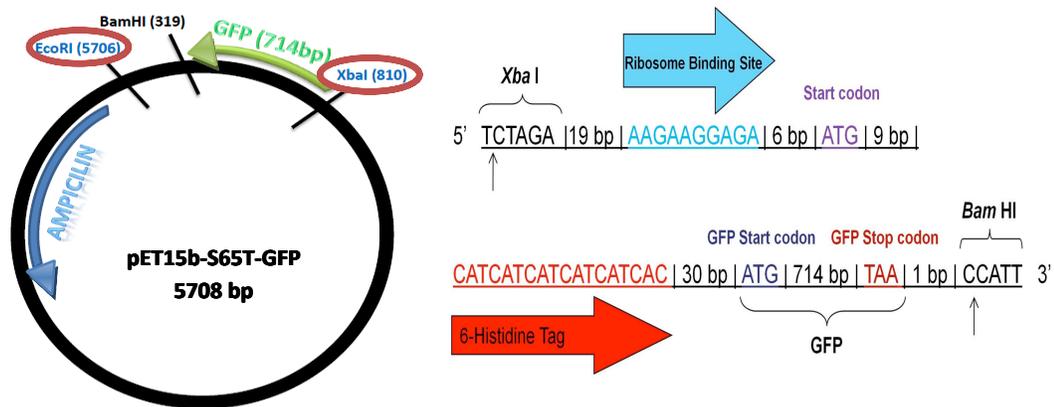
Restriksi dilakukan untuk mendapatkan ataupun melepaskan urutan sekuens tertentu yang berada di antara dua titik pemotongan enzim yang digunakan. Pada Plasmid pBI121 (14758bp), restriksi digunakan untuk membuang gen GUS. Pemilihan enzim restriksi pada awalnya didasari atas keberadaan sekuens gen GUS pada pBI121 sehingga dipilih *Bam*HI (5822) dan *Eco*RI (7983) sebagai enzim restriksi yang mana titik potongnya berada di antara sekuens gen GUS, seperti yang terlihat pada Gambar 12 dengan estimasi akan didapatkan dua pita DNA hasil restriksi dimana pita diatas adalah plasmid pBI121 dan pita di bawah adalah gen GUS dengan ukuran ~2100 bp. Estimasi ukuran gen GUS yang didapatkan dengan kombinasi enzim *Bam*HI dan *Eco*RI didapatkan dengan menghitung selisih angka pada titik pemotongan masing-masing enzim yakni 5822 dan 7983 sehingga didapat angka 2161, sebagai panjang produk gen GUS.



**Gambar 12.** Peta Plasmid pBI121 (Fristensky, 2012)

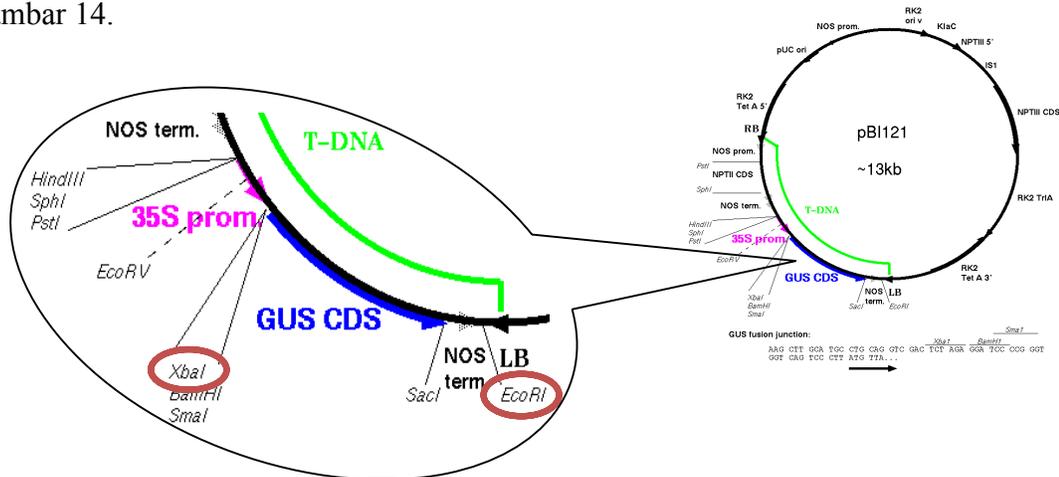
Enzim restriksi *Bam*HI (G↓GATCC) dan *Eco*RI (G↓AATTC) memiliki pola pemotongan yang unik yang dikenal dengan *sticky end* dimana dengan hasil pola ini dapat memudahkan proses penyambungan (ligasi) kedua sekuens hasil pemotongan dengan kombinasi enzim. Enzim Restriksi *Bam*HI dan *Eco*RI pada plasmid pET15b-S65T-GFP tersedia dan berada pada orientasi transkripsi yang benar dan sesuai dengan arah orientasi *Bam*HI dan *Eco*RI pada sekuens pBI121.

Berdasarkan pada skema sekuens dari He *et. al*, (2009) pada Gambar 13 dimana pada skema tersebut digunakan kombinasi enzim restriksi *Xba*I dan *Bam*HI yang berada diantara sekuens gen GFP, sedangkan posisi *Eco*RI berada jauh setelah *Bam*HI yang mana berada di luar daerah sekuens gen GFP dan terdapat pada satu sisi yang sama, sehingga pemotongan gen GFP tidak dapat dilakukan dengan kombinasi enzim tersebut. Pemotongan pada titik potong di daerah sekuens GFP didalam plasmid pET15b-S65T-GFP dimaksudkan untuk mendapatkan gen GFP, enzim restriksi yang digunakan adalah *Xba*I dan *Bam*HI, namun terlihat pada plasmid pBI121 kombinasi enzim *Xba*I dan *Bam*HI berada pada satu sisi di daerah sekuens GUS sehingga kombinasi ini tidak dapat digunakan untuk melepaskan gen GUS dari plasmid pBI121.



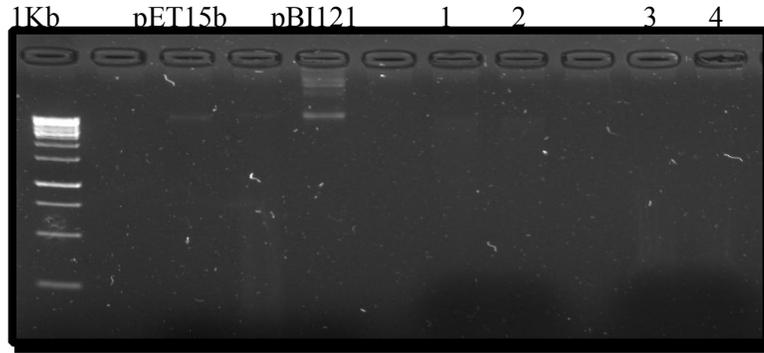
**Gambar 13.** Plasmid pET15b-S65T-GFP dan skema ekspresi region gen GFP.

Mempertimbangan pada peta plasmid pBI121 dimana *XbaI* dan *BamHI* terletak pada posisi yang sama dimana tidak dapat digunakan untuk memotong gen GUS, karenanya dipilih titik potong dengan pemotongan pola unik yang lain untuk menggantikan *BamHI*, kombinasi enzim restriksi yang memenuhi syarat untuk dapat memotong gen GUS dan gen GFP yakni *XbaI* – *EcoRI*, seperti yang terlihat pada Gambar 14.



**Gambar 14.** Enzim restriksi pada plasmid pBI121

Dilakukan proses restriksi menggunakan kombinasi enzim restriksi *XbaI* – *EcoRI* terlihat bahwa dari semua sampel tidak terjadi pemotongan baik pada pBI121 ataupun pET15b, seperti terlihat pada Gambar 15.



**Gambar 15.** Hasil restriksi plasmid pBI121 dan pET-15b-S65T-GFP dengan enzim restriksi *Xba*I dan *Eco*RI. 1Kb = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas), pET15b dan pBI121 = non restriksi, Lane 1-2 = pET15b-S65T-GFP, Lane 3-4 = pBI121.

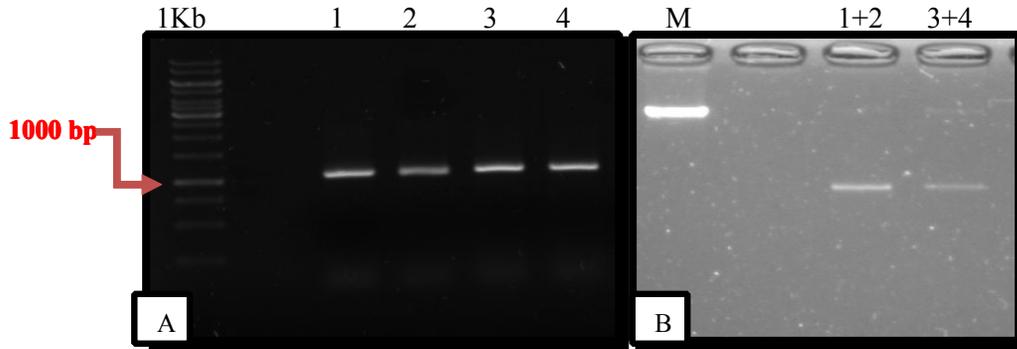
Dari hasil restriksi terlihat bahwa proses restriksi gen GFP dan plasmid pBI121 tidak berhasil dilakukan, hal tersebut terjadi dapat diakibatkan oleh banyak faktor diantaranya konsentrasi plasmid yang digunakan, konsentrasi enzim yang digunakan, optimasi suhu serta waktu inkubasi yang digunakan. Akibat tidak dapat dilakukannya optimasi restriksi yang optimal pada plasmid pET15b-S65T-GFP, maka diusahakan agar proses pengkloningan gen GFP ke dalam plasmid pBI121 dengan cara lain, salah satunya adalah dengan metode kloning berbasis PCR menggunakan kloning vektor pGEM T-easy.

### 4.3 Kloning Gen GFP

Permasalahan yang dihadapi dalam proses penelitian ini salah satunya adalah ketersediaan gen GFP yang dalam hal ini adalah plasmid pET15b-S65T-GFP yang terbatas. Akibat keterbatasan tersebut maka proses restriksi gen GFP yang merupakan cara untuk mendapatkan gen GFP untuk nantinya dapat di kloning ke dalam pBI121 menjadi terhambat. Untuk menyasati keterbatasan tersebut maka dicarilah cara lain yang dapat digunakan untuk mendapatkan gen GFP, salah satunya dengan kloning produk PCR gen GFP kedalam plasmid vektor pGEM-T easy.

Dari beberapa kali uji PCR yang dilakukan pada plasmid pET15b-S65T-GFP seperti yang ditampilkan pada Gambar 16 (A) terlihat bahwa semua sampel memberikan hasil positif keberadaan gen GFP ditandai dengan adanya produk PCR dengan ukuran sekitar 1000bp. Hasil PCR gen GFP tersebut kemudian dipurifikasi untuk mendapatkan gen GFP dari gel hasil elektroforesis. Hasil purifikasi gel hasil

PCR menunjukkan adanya produk yakni pita DNA dengan ukuran dibawah dari Marker  $\lambda$  DNA yang mana merupakan gen GFP hasil purifikasi, seperti yang terlihat pada Gambar 16 (B).



**Gambar 16.** Kloning gen GFP (A) Hasil PCR-3-Primer isolat pET15b-S65T-GFP. (B) Hasil purifikasi gen GFP. M =  $\lambda$  DNA marker (50ng), 1Kb = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas), 1,2,3,4 = Sampel.

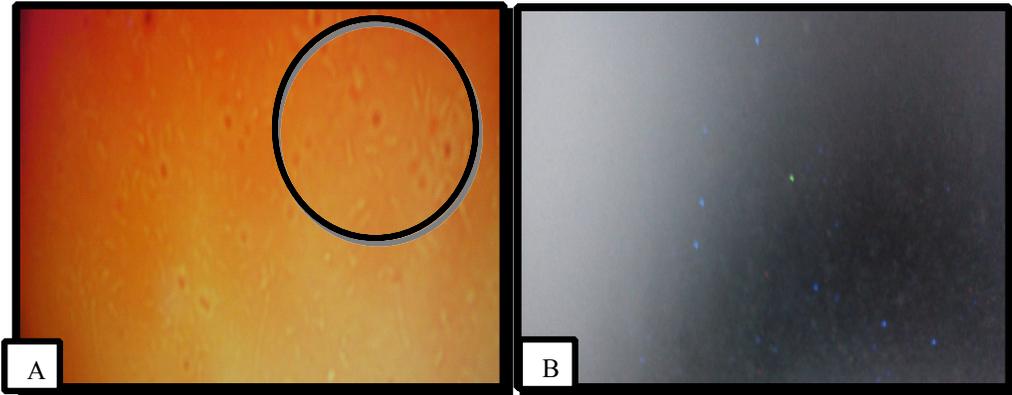
Pada Gambar 16 (B) memberikan hasil purifikasi yang baik ditunjukkan dengan terdapatnya pita DNA hasil purifikasi yang berada dibawah pita marker. Lane 1+2 serta 3+4 pada Gambar 16 (B) maksudnya adalah penggabungan antara sampel 1 dan 2, serta 3 dan 4 sesuai dengan kode isolat pada Gambar 16 (A) dari hasil uji PCR pada saat di-*elute* dengan *nuclease free water* pada proses purifikasi. Selanjutnya dilakukan kloning gen GFP ke pGEM T serta transformasi kedalam *E.coli*.

Hasil plating bakteri transforman menunjukkan adanya bakteri yang tumbuh pada media selektif LB yang mengandung Ampicilin dan Kloramphenikol (CAM) walaupun tidak terdapat koloni tunggal namun media dipenuhi oleh bakteri hasil plating. Fakta dari adanya koloni yang tumbuh pada medium selektif menunjukkan bahwa terdapat gen ketahanan terhadap antibiotik tertentu pada bakteri transforman yang ditumbuhkan tersebut. Bakteri *E.coli* BL21 non transforman tidak akan dapat tumbuh pada media selektif yang mengandung Ampicilin namun dari hasil pada Gambar 17 terlihat adanya koloni-koloni yang tumbuh walaupun bukan koloni tunggal hal tersebut mengindikasikan adanya gen ketahanan pada *E.coli* BL21 transforman yang ditumbuhkan pada media selektif, satu-satunya sumber ketahanan yang memungkinkan untuk ter-*insert* pada *E.coli* BL21 adalah dari plasmid pET15b-S65T-GFP yang dicoba untuk di transformasi kedalam bakteri. Indikasinya dapat



#### 4.4.2 Uji mikroskop *fluorescent*

Data penunjang untuk meyakini keberadaan bakteri dari hasil transformasi yang tumbuh pada media selektif adalah *E.coli* maka dilakukan uji mikroskop *fluorescent*, hasil seperti yang terlihat pada Gambar 19.



**Gambar 19.** Uji mikroskop *fluorescent*. (A) = Bakteri *E.coli* dibawah sinar biasa, (B) = Setelah diberi sinar biru.

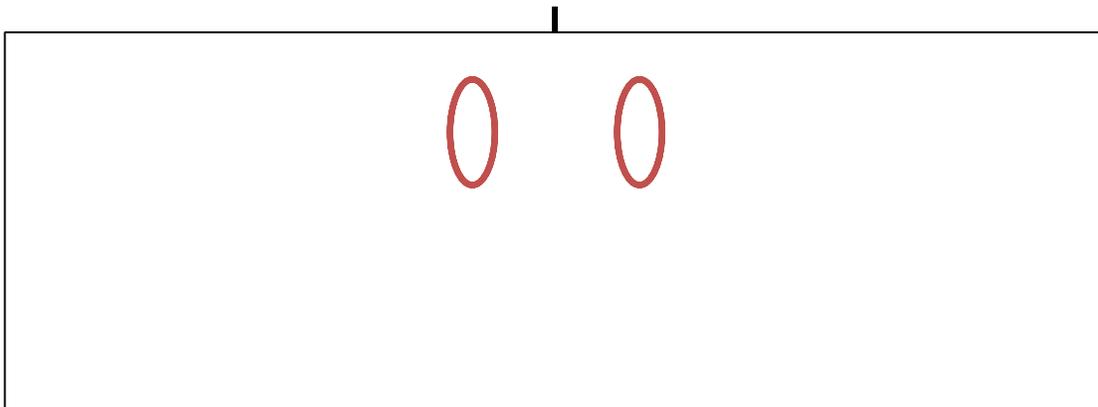
Dari Gambar 19 (A) terlihat bakteri *E.coli* dengan bentuk basil dibawah mikroskop *fluorescent* dengan cahaya biasa maka diyakini bahwa bakteri yang tumbuh pada media selektif benar adalah *E.coli*. Ekspresi dari gen GFP terlihat jika diberi sinar biru yang menyebabkan bakteri transforman mengeluarkan efek *fluorescent*-nya, namun pada Gambar 19 (B) yakni setelah diberi cahaya biru tidak terlihat adanya ekspresi gen GFP dari bakteri transforman yang diuji. Hal tersebut mengindikasikan bahwa meskipun kegiatan transformasi berhasil dilakukan dari fakta bahwa adanya koloni yang tumbuh pada media selektif namun kegiatan kloning gen GFP belum berhasil dilakukan. Akibat penyimpanan material DNA plasmid yang terlalu lama mungkin dapat menyebabkan mutasi pada material DNA yang ada baik dalam bentuk pengurangan (delesi) ataupun menambahkan (insersi) urutan basa nitrogen dari DNA tersebut, serta dari ketersediaan gen GFP yang terbatas sehingga kloning gen GFP tidak dapat diteruskan dan optimasi transformasi untuk gen GFP belum dapat ditentukan. Kegagalan transformasi kemungkinan diakibatkan oleh ketidaksesuaian vektor yang digunakan, dimana gen GFP terintegrasi pada *expression*

*vector* plasmid pET15b, dimana dibutuhkan penyesuaian yang lebih matang untuk dapat menunjang atau membantu proses pengkloningan gen GFP ke dalam vektor plasmid yang lain.

#### 4.5 Kloning Gen *Rep* (C1)

Gen *Rep* (C1) merupakan gen yang mengatur *Replikasi* dan transkripsi pada geminivirus. Pada pendekatan pembentukan tanaman transgenik berbasis PDR (*Pathogen Derived Resistance*) penggunaan gen asal sumber penyakit sebagai bahan atau gen pembawa resistensi yang nantinya akan disisipkan ke tanaman untuk mendapatkan tanaman transgenik tahan geminivirus. Proses kloning gen *Rep* dilakukan kedalam vektor biner plasmid pBI121 sebagai langkah awal pembentukan bahan transformasi sebagai vektor pembawa gen ketahanan.

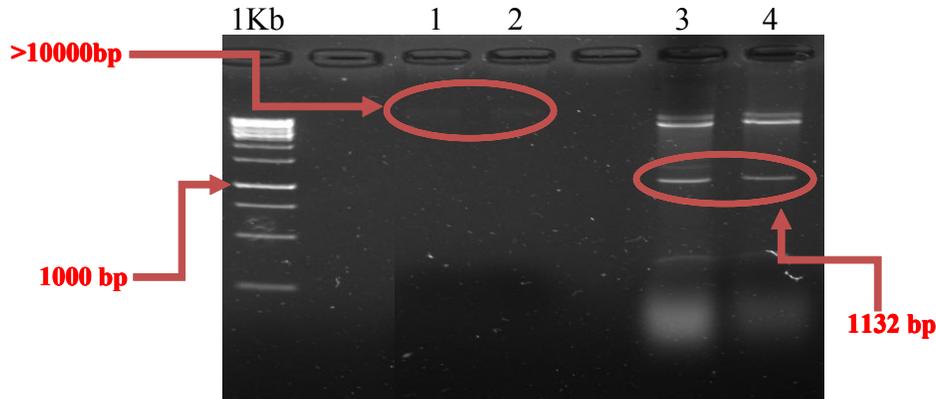
Persiapan gen *Rep* dilakukan dengan cara merestriksi plasmid pGEM T easy rekombinan yang telah mengandung gen *Rep* dengan ukuran sekitar 1132 bp (Syafriani, 2012) dengan enzim restriksi *EcoRI* yang merupakan enzim restriksi yang berada diantara gen *Rep* pada plasmid pGEM, dan persiapan plasmid pBI121 yang direstriksi dengan *EcoRI* sebagai vektor kloning gen *Rep*.



**Gambar 20.** Plasmid pGEM-T easy vektor

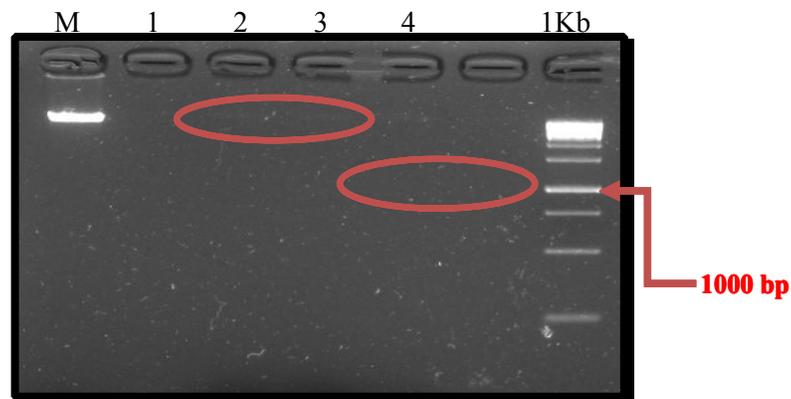
Dari hasil restriksi dengan *EcoRI* terdapat pita DNA, yakni pada pBI121 (1 dan 2) dengan ukuran > 10.000bp karena hanya dipotong dengan satu enzim maka hanya terdapat satu pita dari plasmid pBI121 yang menjadi linear serta pGEM-*Rep* (3 dan 4) dimana terlihat ada dua pita hasil pemotongan dikarenakan titik potong *EcoRI*

pada pGEM ada dua, diatas merupakan plasmid pGEM T dengan ukuran sekitar 3000 bp dan yang dibawah adalah gen *Rep* dengan ukuran sekitar 1132 bp, seperti yang terlihat pada Gambar 21.



**Gambar 21.** Hasil restriksi plasmid dengan enzim *EcoRI*. 1Kb = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = Plasmid pBI121, Lane 3-4 = pGEM-*Rep*.

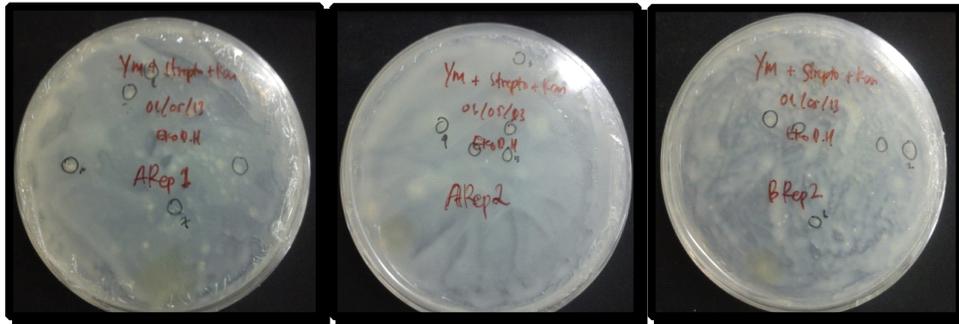
Selanjutnya dilakukan purifikasi gel hasil restriksi untuk mendapatkan gen *Rep* dan plasmid pBI121 yang telah terpotong dengan *EcoRI*. Dari hasil purifikasi terlihat masing-masing pita DNA walaupun sangat tipis, hal tersebut kemungkinan diakibatkan karena volume DNA yang di-*running* hanya 2  $\mu$ L dari total 25  $\mu$ L yang di-*elute* dari hasil purifikasi yang dilakukan, seperti terlihat pada Gambar 22.



**Gambar 22.** Hasil purifikasi gel hasil restriksi. 1Kb = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas), M =  $\lambda$  DNA marker (100ng), Lane 1-2 = pBI121, Lane 3-4 = *Rep* (C1).

Untuk memastikan keberhasilan proses kloning yang dilakukan maka selanjutnya dilakukan proses transformasi pBI121 dan *Rep* hasil ligasi ke dalam

bakteri *A.tumefaciens* menggunakan metode elektroporasi. Dari hasil plating yang dilakukan, bakteri transforman hasil ligasi pBI121 dan *Rep* yang tumbuh pada media selektif YM padat yang mengandung Kanamysin (100µg/mL) dan Streptomycin (50µg/mL) maka perkiraan awal adalah proses transformasi berhasil dilakukan karena bakteri transforman berhasil tumbuh pada medium selektif, seperti yang terlihat pada Gambar 23.



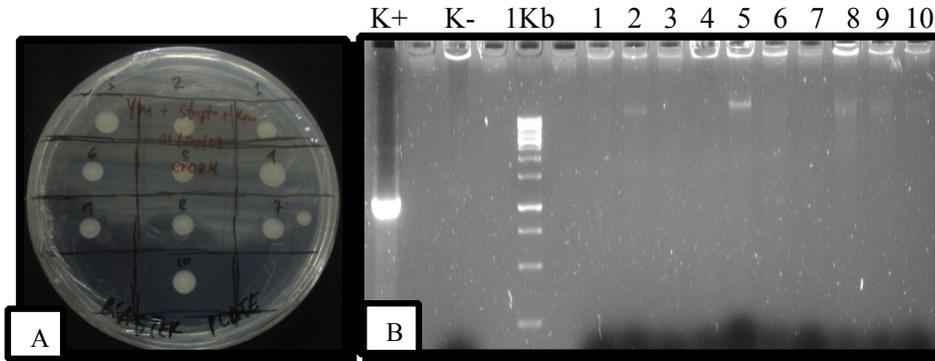
**Gambar 23.** Hasil plating bakteri *A.tumefaciens* transforman pBI121-*Rep*.

Verifikasi keberadaan gen *Rep* (C1) pada bakteri transforman dilakukan uji PCR koloni dengan menggunakan primer spesifik C1-TD21-*Sma*I/*Bam*HINT dengan estimasi produk sekitar 1132 bp.

## **4.6 Verifikasi Keberhasilan Kloning Gen *Rep* ke dalam *A. tumefaciens***

### **4.6.1 Uji PCR koloni**

Dari semua koloni yang diuji terlihat bahwa tidak ada satu koloni pun memberikan hasil yang positif yakni dengan adanya produk PCR sekitar 1132bp seperti yang terlihat pada Kontrol positif (K+), artinya adalah kloning gen *Rep* kedalam plasmid biner pada *A.tumifaciens* belum berhasil dilakukan, seperti yang terlihat pada Gambar 24.



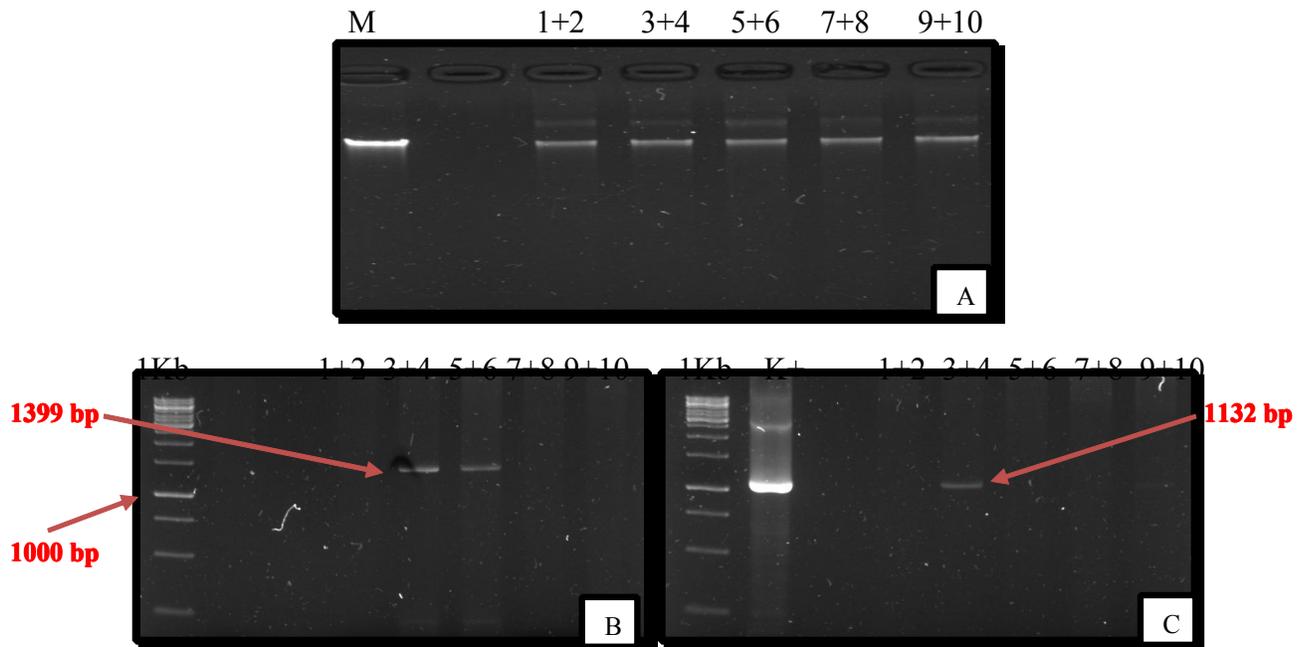
**Gambar 24.** Verifikasi keberhasilan transformasi pBI121-*Rep* ke *A. tumefaciens*. (A) *Master Plate A. tumefaciens* transforman, (B) Hasil PCR Koloni. K(+) = Plasmid pGEM-*Rep*, (K-) = *A. tumefaciens* non transforman, 1Kb = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas), Lane 1-10 = Sampel koloni.

Kegagalan hasil PCR koloni juga dapat disebabkan akibat koloni bakteri yang diambil terlalu banyak sehingga reaksi PCR tidak bekerja dengan optimal atau koloni yang diambil terlalu sedikit atau bahkan tidak terambil sama sekali sehingga reaksi PCR tidak dapat bekerja dengan baik, Untuk membahas dugaan tersebut maka dilakukan isolasi plasmid pBI121 transforman.

#### 4.6.2 Isolasi plasmid pBI121 transforman

Semua isolat bakteri dari *Master Plate* yang diisolasi menunjukkan adanya DNA plasmid setelah dilakukan elektroforesis, terlihat pada Gambar 25 (A). Lane 1+2 dan seterusnya adalah penggabungan koloni dari kode *Master Plate* yang diambil pada saat isolasi, dimana 1+2 artinya hasil isolasi dari koloni no 1 dan no 2, dan seterusnya.

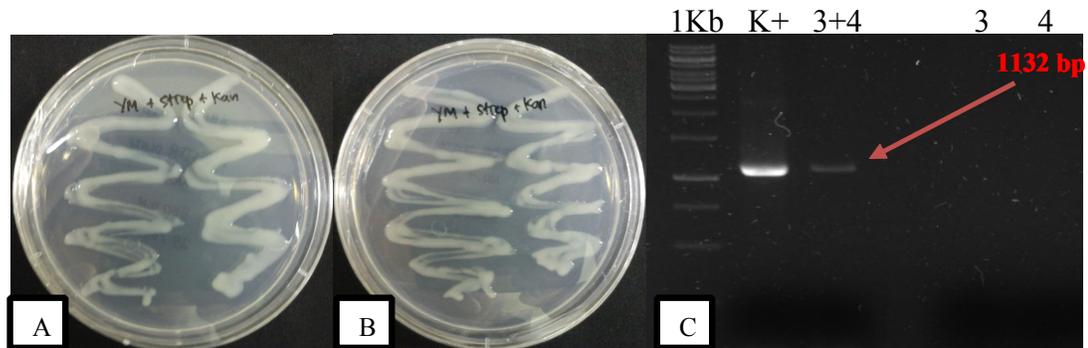
Pengujian keberhasilan kloning gen dari hasil isolasi yang didapat maka dilakukanlah Uji PCR menggunakan primer spesifik 35SPGUS3 untuk memastikan keberadaan plasmid pBI121 dan primer spesifik C1-TD21-*SmaI/BamHI*-NT untuk keberadaan gen *Rep* (C1), seperti yang dapat dilihat pada Gambar 25 (B) dari 5 isolat yang di PCR dengan 35SPGUS3 terdapat 2 isolat yang positif yakni 3+4 dan 5+6 dengan estimasi produk PCR sekitar 1399 bp. Selanjutnya pada Gambar 25 (C) dari 5 isolat yang diuji dengan primer C1 terdapat satu isolat yang positif yakni no. 3+4 dengan estimasi produk sesuai dengan kontrol positif (K+) yakni 1132 bp.



**Gambar 25.** Verifikasi keberhasilan Transformasi pBI121-*Rep* (A) Hasil Isolasi Plasmid pBI121 Rekombinan, (B) Hasil PCR Plasmid PBI121 Rekombinan dengan Primer 35SPGUS3, (C) Hasil PCR Plasmid pBI121 Rekombinan dengan Primer C1-TD21-*Sma*I/*Bam*HINT. M =  $\lambda$

DNA Marker (100ng), K(+) = Plasmid pGEM-*Rep*, 1Kb = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas), Lane 1+2 – 9+10 = Sampel Isolasi berdasarkan Nomor pada *Master Plate*.

*Master Plate* no 3 dan 4 dilakukan regenerasi ke media selektif yang baru untuk kebutuhan uji selanjutnya, hasil plating terlihat pada Gambar 26 (A) dan (B), serta dilakukan uji PCR koloni dari *A.tumefaciens* transforman hasil regenerasi dengan primer spesifik C1-TD21-*Sma*I/*Bam*HINT, seperti pada Gambar 26 (C).

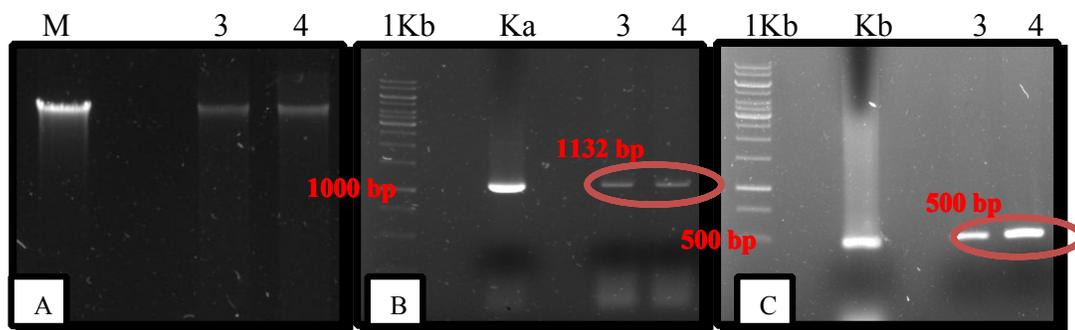


**Gambar 26.** Regenerasi bakteri *A.tumefaciens* rekombinan plasmid pBI121-*Rep* dari *Master Plate* No. 3 (A) dan No. 4 (B). (C) Hasil PCR bakteri

transforman. 1Kb = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas), K+ = pGEM-*Rep*, 3+4 = Plasmid pBI121 transforman, Lane 3-4 = Sampel.

Pada Gambar 26 (C) terlihat pada lane K+ dan 3+4 terdapat produk dari hasil PCR sekitar 1132 bp namun pada lane 3 dan 4 yang merupakan sampel koloni tidak terdapat produk. Fakta bahwa dari hasil Isolasi isolat bakteri no. 3 dan 4 memberikan hasil positif pada PCR menggunakan primer C1 sedangkan tidak terdapat produk positif pada hasil PCR koloni menunjukkan terjadinya kesalahan dalam proses PCR Koloni yang dilakukan.

Koloni bakteri transforman hasil regenerasi kembali diverifikasi untuk kebenaran bakteri transforman yang didapatkan, dilakukan isolasi plasmid pBI121 rekombinan pada bakteri kemudian dilakukan uji PCR menggunakan primer spesifik untuk pBI121 dan gen *Rep* (C1), seperti yang terlihat pada Gambar 27.



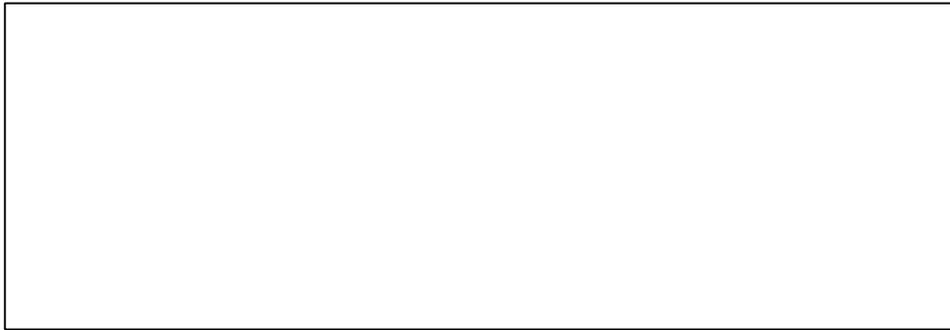
**Gambar 27.** Verifikasi plasmid pBI121 transforman gen *Rep* (C1). (A) Hasil isolasi DNA plasmid pBI121 transforman, (B) Hasil PCR C1 plasmid pBI121 transforman. (C) Hasil PCR NPTII 1.2 plasmid pBI121 transforman. 1Kb = Size marker 1Kb Ladder (Fermentas), Ka = pGEM-*Rep*, Kb = Plasmid pBI121, M =  $\lambda$  DNA (100ng) Lane 3 dan 4 = Plasmid pBI121 transforman regenerasi no 3 dan 4.

Dari hasil terlihat bahwa kloning gen *Rep* (C1) ke dalam pBI121 telah berhasil dilakukan. Pada Gambar 27 (A) adalah hasil isolasi plasmid pBI121 transforman gen *Rep*, yang kemudian di uji PCR menggunakan primer spesifik C1-TD21-*Sma*I/*Bam*HINT untuk menguji keberadaan gen *Rep* (C1) serta NPTII 1.2 untuk menguji keberadaan plasmid pBI121 seperti yang terlihat pada Gambar 27 (B) dan (C) uji PCR yang dilakukan memberikan hasil yang positif dengan amplifikasi sesuai dengan estimasi dan kontrol positif masing-masing yakni 1132 bp untuk C1

serta 500 bp untuk NPTII pada pBI121, sehingga diyakini bahwa plasmid yang dihasilkan merupakan vektor biner plasmid pBI121 rekombinan gen *Rep* (C1).

#### **4.7 Plasmid pBI121 Rekombinan Gen *Rep* (C1)**

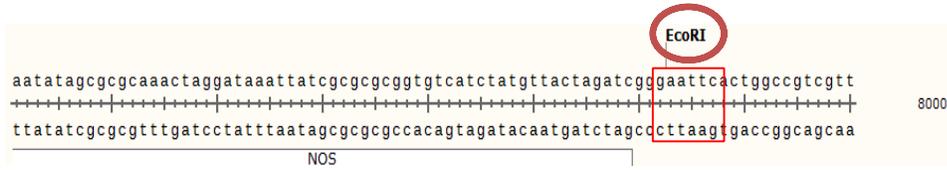
Berdasarkan dari skema ilustrasi hasil rekombinan yang diinginkan, maka dapat dibuat struktur *cassette* plasmid pBI121 rekombinan yang didapatkan dari hasil penelitian ini, seperti yang dapat di lihat pada Gambar 28.



**Gambar 28.** T-DNA plasmid pBI121 rekombinan gen *Rep*

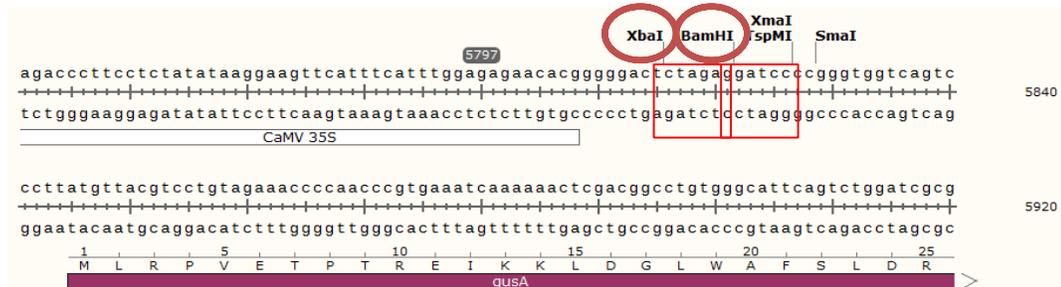
Hasil kloning gen sumber ketahanan pada T-DNA vektor plasmid seperti pBI121 bertujuan sebagai bahan transformasi yang nantinya dapat diintegrasikan ke dalam genom tanaman sehingga didapatkan tanaman transgenik yang tahan terhadap geminivirus dari karakter ketahanan yang dibawa oleh gen *Rep*. Munculnya suatu karakter pada makhluk hidup dikendalikan oleh gen yang mengekspresikan karakter tersebut, regulasi ekspresi genetik suatu karakter diatur dengan adanya *promotor* serta *start codon* yang meregulasikan awal terjadinya proses transkripsi dan diakhiri oleh *stop codon* dan *terminator* yang mengatur berakhirnya proses ekspresi gen.

Plasmid rekombinan yang dihasilkan pada penelitian ini merupakan plasmid pBI121 yang membawa gen ketahanan terhadap geminivirus yakni gen *Rep*, namun permasalahannya apakah regulasi ekspresi gen tersebut dapat terjadi nantinya. Suatu *cassette* T-DNA rekombinan normalnya gen insersi disisipkan diantara sekuens gen reporter dan promotornya, yang dalam hal ini adalah promoter CamV-35S serta gen reporter GUS pada pBI121, dimana nantinya dapat diketahui apabila ekspresi gen GUS terjadi dengan dapat diamatinya menggunakan uji histokimia maka dapat dipastikan bahwa gen insersi juga ikut terekspresi.



**Gambar 29.** Posisi titik potong *EcoRI* pada T-DNA pBI121 (sumber: NCBI)

Namun pada *cassette* T-DNA plasmid rekombinan yang dihasilkan diketahui bahwa gen *Rep* yang disisipkan ke dalam plasmid pBI121 berada setelah gen GUS dan *terminator* NOS yang mengakhiri ekspresi gen GUS (Gambar 29), maka dari itu dapat diketahui bahwa dalam regulasi ekspresi gen T-DNA pBI121 rekombinan yang dihasilkan, gen *Rep* tidak ikut terekspresi bersamaan dengan gen reporter GUS.



**Gambar 30.** Titik potong rekomendasi untuk kegiatan kloning gen (sumber: NCBI)

Dari hasil yang didapatkan ini setidaknya tergambar mengenai usaha kloning gen *Rep* yang sudah dilakukan sehingga dapat menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya, melihat dari titik potong enzim restriksi yang terbatas untuk mencocokkan titik potong pada pBI121 dan pGEM-*Rep* (Gambar 30) sepertinya salah satu upaya yang dapat dilakukan adalah dengan penambahan promoter untuk titik potong enzim tertentu pada plasmid pBI121 untuk menyesuaikan enzim restriksi yang digunakan untuk memotong gen *Rep*.

## **V. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1 Kesimpulan**

Dari hasil yang didapatkan disimpulkan bahwa kloning gen GFP yang dilakukan tidak berhasil namun kloning gen *Rep* (C1) kedalam pBI121 dan *A.tumefaciens* telah berhasil dilakukan dengan dihasilkannya plasmid rekombinan pBI121 yang mengandung gen *Rep* (C1) yang terdapat didalam bakteri *A.tumefaciens*.

### **5.2 Saran**

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disarankan dilakukannya optimasi yang lebih dalam pada usaha untuk dapat mengkloning gen GFP kedalam vektor plasmid yang lain, serta dilakukan uji selanjutnya untuk dapat meregulasikan gen *Rep* (C1) sehingga dapat dimanfaatkan sebagai bahan transformasi dalam tahapan pembentukan tanaman transgenik tahan geminivirus.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Arencibia, A., PR Molina., G Dela Riva and G Selman-Housein. 1995. *Production of transgenic sugarcane (Saccharum officinarum L.) plants by intact cell electroporation*. *Plant Cell Rep* 14 : 305-309.
- Berita IPTEK.2011.*Mewarnai dan Memendarkan Gen*  
<http://www.kamusilmiah.com/biologi/mewarnai-dan-memendarkan-gen/>  
 diakses pada 11 Desember 2011 pukul 13.06
- Binns, AN. 1990. *A.tumefaciens-mediated gene Delivery and Biology of Host Limitations*. *Physiologia Plantarum*. 79:135-139.
- Chalfie, M., Y Tu, G Euskirchen, WW Ward, DC Prasher . *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. *Science* 1994; 263: 802-805.
- Day, AG., CP Lichstenstein.1990. *Plant Genetic Transformation*. In : Flower MW, Warren GS, Mooyoun M, (eds.). *Plants Biotechnology*. Pergamon Press. Tokyo. 152-177.
- Frame, B. R., H. Shou, R. K. Chikwamba, Z. Zhang, C. Xiang, T.M.. Fonger, S. Ellen, K. Pegg, B. Li, D.S. Nettleton, D. Pei, and K. Wang. 2002. *A.tumefaciens tumefaciens-Mediated Transformation of Maize Embryos Using a Standard Binary Vector System*. *Plant Physiol*. 129:13-22.
- Fritensky, B. 2012. *Plasmid pBI121*.  
[http://www.umanitoba.ca/faculties/afs/plant\\_science/courses/39\\_768/102/102.3.html](http://www.umanitoba.ca/faculties/afs/plant_science/courses/39_768/102/102.3.html)  
 diakses pada 18 Februari 2012
- Gelvin, SB. 1990. *Crown Gall Disease and Hairy Root Disease*. A. Sledgehammer and A. Tackhammer. *Plan Physiol*. 92:281-285.
- Gordon-Kamm, W.J., T.M. Spencer, M. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Adams Jr, and N.G. Willetts. 1990. *Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants*. *Plant Cell* 2: 603-618.
- Grover, A., G. Samuel, V.S. Bisaria, and D. Sundar. 2013. *Enhanced withanolide production by overexpression of squalene synthase in Withania somnifera*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol 115, Issue 6, June 2013, Pages 680–685
- He, L., D. Krstevski, J. Kwan, J. Li, and M. Stanikic. *Wild Type LLP "Project Bravo"*. Clinical and Business Report Monday, June 6, 2009.
- Helianti. 2007. *GFP, Gen Pewarna yang Berpendar Indah*. Pusat Pengkajian dan Penerapan Teknologi Bioindustri, BPPT.

- Ishida, Y., H. Saito, S. Ohta, Y. Hiei, T. Komari, T. Kumashiro. 1996. *High efficiency transformation of maize (Zea Mays L.) mediated by A.tumefaciens tumefaciens*. Nature Biotechnol 14: 745-750.
- Jamsari, I. Suliansyah, I. Manti, dan Nasrun. 2009. *Gen-Gen Penentu Virulensi Virus Gemini dan Transformasi Genetik untuk Menghasilkan Tanaman Cabai Merah Tahan Penyakit Virus Kuning Keriting (tahun I-2009)*. Laporan Hasil Penelitian. Universitas Andalas: Padang.
- Kaeppler, HF., W Gu, DA Somers, HW Rines and AF Cockburn. 1990. *Silicon carbide fiber mediated DNA delivery into plant cells*. Plant Cell Report 9 : 415-418.
- Loedin, Inez H.S. 1994. *Transformasi Genetik Pada Tanaman : Beberapa Teknik dan Aspek Penting*. Hayati, vol 01 no 02 hal 66-67.
- Maftuchah, 2005. *Transformasi Anggrek Dendrobium dengan Gen GUS-A Melalui Perantaraan A.tumefaciens tumerfaciens*. Laporan Program Penelitian Unggulan (P2U). Universitas Muhammadiyah Malang.
- Maqbool, SB., T Husnain, S Riazuddi, L Masson and P Christou. 1998. *Effective control of yellow stem borer and rice leaf folder in transgenic rice indica varieties Basmati 370 and M7 using the novel  $\delta$ -endotoxin cry2A Bacillus thuringiensis gene*. J. Mol.Breed 4 : 501-507.
- Mujaddad, M. 2004. *RNAi Mediated Resistance Against Geminivirus*. Quaidi-Azam University. Islamabad.
- Nasution, B.S. 2010. *Transformasi Genetik Fragmen Spesifik Padi (Oryza sativa L.) Hasil RAPD Terkait Toleransi Gulma Echinochloa cruss-galli L.(Beauv)*. Universitas Andalas. Padang.
- Nathans, D., and H.O. Smith, *Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA Molecules*. Ann. Rev. Biochem., 44:273, 1975.
- Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A.R. Wench, G. Hansen. 2000. *The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (Zea mays L.) via A.tumefaciens transformation*. Plant Cell Rep. 19: 798-803.
- Prasher, D., Virginia K.E, William W.W, Frank G.P and Milton J. *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene 1992; 111(2): 229-233.
- Rahmawati, S. 2003. *Gen Penyeleksi Alternatif untuk Transformasi Tanaman*. AgroBio 6(1):26-33.

- Rathore KS, VK Chowdhury and TK Hodges. 1993. *Use of bar as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplast*. Plant Mol Biol. 21 : 871-884.
- Ratnasari, D. 2011. *Triparental Mating, Ttransformasi Gen GFP pada Cendawan P.grisea dengan Menggunakan A.tumefaciens*. Laporan Praktikum Mata Kuliah Rekayasa Genetika. Institut Pertanian Bogor.
- Shimomura, O., FH Jhonson, Y. Saiga. 1962. *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol 59; 223-239.
- Syafriani, E. 2012. *Kloning Gen Rep (C1) Kedalam Escherichia coli*. Skripsi. Padang: Universitas Andalas.
- Utomo, S.D. 2004. *Pengaruh Strain A.tumefaciens Terhadap Efisiensi Transformasi Genetik Jagung Genotipe Hibrida HiII*. Ilmu Pertanian Vol. 11 No. 2, : 1-10.
- Volk and Wheeler. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Jilid 2 edisi V. Diterjemahkan oleh Sumarto Adisumartono. Jakarta: Airlangga.
- Widayati, W. E. 2008. *Penggunaan Penanda Gen Green Fluorescence Protein untuk deteksi Keberadaan Bakteri Diazotrof Endofit dalam Jaringan Tebu*. MPG; 3:156-167.
- Winans, SC. 1992. *Two-way Chemical Signaling in A.tumefaciens Plant Interasction*. Microbiol.Rev.56(1):12-13.
- Yusniwati. 2008. *Galur Cabai Transgenik Toleran Kekeringan Dengan Gen P5CS Penyandi Enzim Kunci Biosintesis Prolina : Regenerasi dan Karakterisasi Regeneran*. Institut Pertanian Bogor: Disertasi Pascasarjana.
- Zambryski, P., Tempe J, Schell J. 1989. *Transfer and Function of T-DNA genes from A.tumefaciens Ti- and Ri-plasmid in Plants*.J.Mol.Biol.56:193-201.
- Zhao, Z.Y., W. Gu, T. Cai, L.A. Tagliani, D.A. Hondred, D. Bond, S. Krell, M.L. Rudert, W.B. Bruce, D.A. Pierce. 1998. *Molecular analysis of T<sub>0</sub> plants transformed by A.tumefaciens and comparison of A.tumefaciens-mediated transformation with bombardment transformation in maize*. Maize Genet. Coop. Newslett. 72: 34-37.