



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

# **KLONING GEN PENYANDI COAT PROTEIN (V1) GEMINIVIRUS DARI TANAMAN CABAI (*Capsicum Annuum* L)**

**SKRIPSI**



**ESTER KRISTIN NATALIA  
0810212169**

**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2012**

**KLONING GEN PENYANDI *COAT PROTEIN* (V1) GEMINIVIRUS DARI  
TANAMAN CABAI (*Capsicum annuum* L.)**

**OLEH**

**ESTER KRISTIN NATALIA  
0810212169**



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2012**

**KLONING GEN PENYANDI *COAT PROTEIN* (V1) GEMINIVIRUS DARI  
TANAMAN CABAI (*Capsicum annum* L)**

**OLEH**

**ESTER KRISTIN NATALIA  
0810212169**

*Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat  
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Pertanian*



**FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG  
2012**

**HALAMAN PENGESAHAN**  
**KLONINGGEN PENYANDI *COAT PROTEIN*(V1) VIRUS GEMINIDARI**  
**TANAMAN CABAI (*Capsicum annum*L)**

Oleh

**ESTER KRISTIN NATALIA**  
**0810212169**

Menyetujui :

**Dosen Pembimbing I**



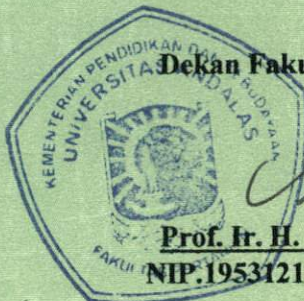
**Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. H. Jamsari, M.P.**  
**NIP. 196802021992031003**

**Dosen Pembimbing II**



**Ir. Sutoyo, M.S.**  
**Nip. 195909021984031002**

**Fakultas Pertanian Universitas Andalas**



**Dekan Fakultas Pertanian**

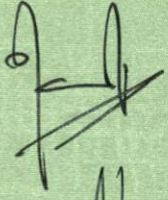
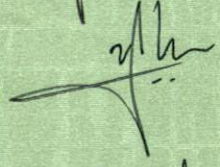
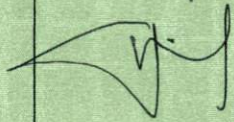


**Prof. Ir. H. Ardi, M.Sc.**  
**NIP.195312161980031004**

**Ketua Prodi Agroekoteknologi**



**Dr. Jumsu Trisno SP, M.Si.**  
**NIP.196911211995121001**

Skripsi ini telah diuji dan dipertahankan didepan sidang pada Ujian Sarjana Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang, pada tanggal :27 Juni 2012

No	Nama	Tanda Tangan	Jabatan
1	Dr. Ir. PK. Dewi Hayati, M.P.		Ketua
2	Dr. Yusniwati, SP., M.P.		Sekretaris
3	Dr. Ir. Trizelia, M.Si		Anggota
4	Prof.Dr.sc.agr.Ir.H. Jamsari, M.P.		Anggota
5	Ir. Sutoyo, M.S.		Anggota



*"Takut akan Tuhan adalah permulaan pengetahuan,  
Tetapi orang bodoh menghina hikmat dan didikan" ..(Amsal 1:7)*

*Aku telah datang.....*

*"Untuk menerima didikan yang menjadikan pandai,  
Serta kebenaran, keadilan dan kejujuran" ..(Amsal 1:3)*

*My Thankfulness....*

*Seems like gene expression,  
theres no perfectly and completly words unable to explain it,  
to my Savior Jesus Christ who promises me, send me to all of the corner in his  
World .....(I will keep your promise God.... ☺).....*

*next to my beloved family Mr. James George Taylor, Mr. Jofanda Widjaya, Mr.  
Edy Mukayat, Mrs. Emy Kadarsih, Andy Sakaria and Maria Eka Prasetya.*

*also.....*

*My great Advisors,*

*Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Jamsari, MP and Ir. Sutoyo, MS*

*Always help me to do my Best,*

*Let throw out all bad things to make better result....*

*Like transcription process did,*

*Should deletioned intron first to formed RNA.*

*Our memento...*

*Able losed by deathly but not with time*

*GANGSTA (Mami, Laron, Dedek, Wawak.. :\*)*

*Thanks 4 be my friend SEEDAirbender... who also graduated now....*

*Also all of member of Biotechnology laboratory....*

*Especially for my BigBang VIP Uri Maknae and Aul... Saranghamnida Cohal*

*Keep moving "Biotechnology 08"*

*Aku pasti kembali.....*

*"Untuk memberikan kecerdasan ,  
kepada orang yang tak berpengalaman dan pengetahuan, serta kebijakan kepada  
orang muda" ..(Amsal 1:5)*

## **BIODATA**

Penulis dilahirkan di Tunggul Jaya, Bengkulu pada tanggal 8 Desember 1989, sebagai anak kedua dari 3 (tiga) bersaudara, dari pasangan Edi Mukayat dan Emy Kadarsih. Pendidikan Sekolah Dasar (SD) ditempuh di SDN 26 Penarik, Bengkulu Utara dan lulus tahun 2002. Sekolah Menengah Pertama ditempuh di SLTPN 1 Mukomuko dan lulus tahun 2005. Sekolah Menengah Umum ditempuh di SMAS Kristen Kalam Kudus I Medan dan lulus tahun 2008. Pada tanggal 14 Agustus 2008, penulis diterima di Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas pada Bidang Kajian Ilmu Pemuliaan Tanaman dan Bioteknologi Pertanian.

Padang, Juni 2012

E.K. Natalia

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan kehadirat Tuhan Yang Maha Kuasa yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Kloning GenPenyandiCoat Protein(V1) Virus Gemini dariTanaman Cabai (*Capsicum annuum.L*).**

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Sc. Agr. Ir. Jamsari, MP sebagai dosen pembimbing pertama dan Ir. Sutoyo, MS. sebagai dosen pembimbing kedua yang telah memberikan saran, petunjuk, dan pengarahan selama penyusunan skripsi ini. Terima kasih juga penulis ucapkan kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi yang telah mendanai penelitian ini melalui program Strategi Nasional (STRANAS) KKP3T pembiayaan tahun 2010/2011 dan Pekan Kreativitas Mahasiswa Penelitian (PKMP) pembiayaan tahun 2012. Tak lupa pula kepada seluruh pihak dan rekan-rekan seperjuangan yang membantu penulis dalam penyusunan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak guna perbaikan skripsi ini dan peningkatan ilmu pengetahuan. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Padang, Juni 2012

E.K. Natalia

# DAFTAR ISI

	<u>Halaman</u>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	i
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	iv
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	vii
<b>ABSTRAK</b> .....	viii
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan .....	3
1.3 Hipotesis.....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Pengaruh Produksi Cabai pada Perekonomian Indonesia.....	4
2.2 Geminivirus .....	4
2.3 Gen Penyandi <i>Coat Protein</i> .....	6
2.4 Kloning sebagai Tahapan Transformasi Genetik .....	7
2.5 Manfaat Tanaman Transgenik dalam Aspek Kehidupan Manusia .....	8
<b>III. BAHAN DAN METODE</b> .....	12
3.1 Waktu dan Tempat.....	12
3.2 Metode Penelitian .....	12
3.3 Bahan dan Alat .....	12
3.4 Prosedur Pelaksanaan.....	13
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	21
4.1. Pengambilan Sampel ke Tanah Datar dan Pesisir Selatan .....	21
4.2. Isolasi DNA Geminivirus Sampel Tanah (TD) dan Pesisir Selatan .....	22
4.3. Pengujian Keberadaan Geminivirus pada sampel TD dan PSS .....	24
4.4. Kloning Gen <i>Coat Protein</i> .....	37
<b>V. PENUTUP</b> .....	54
5.1. Kesimpulan.....	54

5.2. Saran.....	54
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>55</b>
<b>LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR GAMBAR

<u>Gambar</u>		<u>Halaman</u>
1	Morfologi gejala pada tanaman cabai yang diduga terinfeksi oleh Begomovirus yang ditemukan di lapangan.....	21
2	Visualisasi hasil elektroforesis isolasi DNA.....	22
3	Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik WS-PYLCV-387 FR .....	25
4	Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan primer TD PYLCV – 455 FR.....	26
5	Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer PSS – PYLCV – 353.....	26
6	Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik AV TD21/PSS14 FR.....	29
7	Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik V1 TD21/PSS14.....	30
8	Visualisasi hasil optimalisasi suhu <i>annealing</i> produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik <i>Xba/SmaI</i> NT.....	32
9	Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik <i>XbaI/SmaI</i> NT.....	33
10	Visualisasi hasil gradient PCR DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik <i>BamHI</i> NT/ <i>SmaI</i> NT.....	35
11	Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik <i>BamHI</i> NT/ <i>Sma I</i> NT.....	37
12	Visualisasi hasil <i>plating</i> transformasi <i>E.coli</i> .....	38
13	Visualisasi hasil <i>plating</i> transformasi metode <i>heat shock</i> .....	42
14	Visualisasi hasil isolasi plasmid transforman gen CP.....	43
15	Visualisasi hasil amplifikasi isolasi plasmid transforman gen CP menggunakan primer spesifik.....	44

16	Visualisasi hasil <i>plating</i> transformasi metode <i>heat shock</i> .....	45
17	Visualisasi hasil <i>plating</i> transformasi metode <i>heat shock</i> .....	46
18	Visualisasi hasil PCR koloni menggunakan primer spesifik T7SP6.....	47
19	Visualisasi hasil elektroforesis isolasi plasmid transforman gen CP.....	48
20	Visualisasi ampikon hasil isolasi plasmid transforman gen CP.....	48
21	Visualisasi hasil restriksi plasmid hasil amplifikasi dengan primer Spesifik T7SP6 FR.....	49
22	Urutan sekuens gen <i>coat protein</i> berukuran 838 bp.....	51
23	Hasil <i>multiple alignment</i> gen V1 Pesisir Selatan dengan sekuens gen V1 Tanah Datar dan AB267834.1.....	54

## DAFTAR TABEL

<u>Tabel</u>		<u>Halaman</u>
1	Primer spesifik (urutan sekuens dan perkiraan panjang produk yang diharapkan ).....	15
2	Komposisi komponen bahan pada masing-masing reaksi PCR.....	16
3	Konsentrasi DNA yang diperoleh dari hasil isolasi DNA cabai Sampel Tanah Datar dan Pesisir Selatan.....	23
4	Keterangan tiap reaksi uji akurasi suhu <i>annealing</i> .....	35
5	Komposisi <i>cocktail</i> ligasi.....	40
6	Kondisi reaksi ligasi yang dibuat.....	41
7	Hasil analisis BLAST.....	52

## DAFTAR LAMPIRAN

<u>Lampiran</u>		<u>Halaman</u>
1	Jadwal kegiatan penelitian.....	62
2	Konstruksi plasmid pGEM <sup>®</sup> -T <i>Easy Vector</i> dan pBI121.....	63
3	Komposisi media Luria Bertani .....	64
4	Persentase kemiripan dan pengelompokan variasi hasil peninjauan sekuens.....	65

**“KLONING GEN PENYANDI COAT PROTEIN (V1) GEMINIVIRUS  
DARI TANAMAN CABAI (*Capsicum annuum* L)**

**ABSTRAK**

Geminivirus menyerang tanaman yang bernilai ekonomis tinggi seperti *Capsicum annuum* L (Cabai) hingga menyebabkan penurunan hasil yang signifikan. Sampai saat ini belum ditemukan pengendalian yang tepat untuk mengatasi permasalahan tersebut. Oleh sebab itu perakitan *Capsicum annuum* transgenik resisten Geminivirus merupakan salah satu cara untuk mengatasinya. Kloning gen penyandi *coat protein* (V1) merupakan bagian penting dalam perakitan *Capsicum annuum* tahan Geminivirus. Seperti yang diketahui, gen V1 adalah gen pengendali dalam proses enkapsidasi virus. Gen ini telah banyak berhasil digunakan dalam perakitan tanaman tahan. Penelitian ini telah diselesaikan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian, Universitas Andalas Padang. Kloning diawali dengan meligasikan gen V1 ke dalam plasmid pGEM®-T Easy Vector berdasarkan protokol promega. Selanjutnya plasmid ditransformasi menggunakan metode *heat shock*. Hasil *plating* menunjukkan adanya perbedaan warna koloni yang tumbuh pada media LB padat selektif dengan rincian 8 koloni berwarna biru muda (*pale blue colonies*) dan 40 koloni putih. Seluruh koloni transforman yang diuji melalui PCR menggunakan primer spesifik T7/SP6 dan V1 *Bam*HI/*Sma*I NT menunjukkan adanya 2 koloni positif yang mengandung gen penyandi *coat protein* yaitu isolat 25 NP TD2 berasal dari daerah Tanah Datar dan isolat dengan kode 25 berasal dari daerah Pesisir Selatan.. Hasil peninjauan sekuens menunjukkan bahwa keragaman dari gen *coat protein* sampel Pesisir Selatan tersebut rendah dengan persentase kecocokan sebesar 90%.

**Kata Kunci :** *Coat Protein (V1), kloning, Metode Kejut Panas, Geminivirus*

# CLONING OF GEMINIVIRUS COAT PROTEIN GENE (V1) FROM CHILI PLANT (*Capsicum annuum* L)

## ABSTRACT

Geminivirus affects plants which had high economic value like *Capsicum annuum* L (chili) and causes decreasing significant production. There's no precise control to handle this problem yet. Because of that, developing of transgenic *Capsicum annuum* resistance of Geminivirus is one of way to handle it. Cloning of coat protein (V1) gene was an important part for developing *Capsicum annuum* Geminivirus resistant. As known, V1 gene was a regulator gene on virus encapsidation process. This gene had been successfully used to develop resistance plant. This research was done at Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding, Agriculture Faculty Andalas University Padang. Cloning has begun by ligation of V1 gene to pGEM®-T Easy Vector plasmid based on promega protocol. Furthermore plasmid had been transformed by using heat shock method. Plating result had shown any differences of colony colour which was grown on selective solid LB medium with details 8 colonies were pale blue and 40 colonies were white. All transformant colonies assayed by PCR using specific primer T7/SP6 and V1 *Bam*HI/*Sma*I NT showed 2 positive colonies containing coat protein gene. They which was isolated 25 NP TD2 which was originated from Tanah Datar and 25 from Pesisir Selatan. Result of sequence alignment showed low variation on coat protein gene sequencing especially originated from Pesisir Selatan, showed 90% homology.

**Keywords** : Coat Protein (V1), cloning, encapsidation, heat shock method, Geminivirus

# I. PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang banyak mengkonsumsi cabai. Hal ini disebabkan karena hampir semua makanan khas Indonesia menggunakan cabai sebagai bumbunya. Oleh karena itu kebutuhan konsumen akan cabai tidak pernah berhenti, khususnya di daerah Sumatera Barat (Joni, 2011). Namun, jumlah produksi cabai tidak selalu dapat memenuhi kebutuhan konsumen sehingga harga cabai sering mengalami fluktuasi. Menurut Jamsari *et al.* (2009) salah satu penyebab fluktuasi harga dan produksi cabai disebabkan adanya serangan dari virus, khususnya Geminivirus.

Geminivirus yang telah tersebar di lahan pertanian saat ini merupakan salah satu penyebab penyakit yang sangat merugikan bagi produksi pertanian khususnya pada tanaman cabai. Geminivirus telah dilaporkan tersebar di beberapa negara seperti Brasil, Venezuela, Kuba, Portugal, Tanzania, Thailand, USA, Meksiko dan Karibia (Gusman *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1996; Louro *et al.*, 1996; Chiang *et al.*, 1997; Honda *et al.*, 1983; Zebirin *et al.*, 1996; Polston, 1996; Pacheco *et al.*, 1996). Di Indonesia sendiri juga telah dilaporkan adanya serangan Geminivirus pada tanaman cabai (Rusli, 2000).

Tanaman cabai normal pada umumnya memiliki masa produktif selama enam bulan dengan total jumlah produksi cabai yang dihasilkan selama satu kali musim tanam mencapai 18 ton/ha. Namun, bila tanaman cabai terinfeksi oleh Geminivirus sejak masa tanam masih sangat muda (30-35 hari setelah tanam) produktivitasnya akan menurun hingga 70-100% dan hanya mampu menghasilkan kurang dari 5 buah cabai per batang (Duriat, 2009). Kondisi seperti ini tentu sangat merugikan produksi pertanian dan hingga kini masih belum ditemukan pestisida yang tepat untuk mengendalikan virus tersebut.

Kegiatan yang telah dilakukan saat ini sebagai pengendalian preventif yaitu melalui penggunaan benih bebas virus, kultur resisten, menekan penyebaran virus dan pendeteksian virus secara dini yang dilakukan dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Menurut Sudiono *et al.* (2004), pendeteksian keragaman biologi

Geminivirus melalui teknik PCR dan RFLP bisa mengetahui penyebaran dari strain Geminivirus tersebut, khususnya di beberapa daerah di Indonesia. Namun, cara preventif yang dilakukan tersebut masih belum cukup karena virus tersebut masih terus berkembang dan menyerang tanaman. Selain itu, pengendalian secara pemuliaan konvensional sendiri juga tidak mungkin dilakukan karena tidak ditemukannya kerabat liar cabai yang memiliki ketahanan terhadap virus. Untuk itu perlu dilakukan cara lain untuk mengatasi serangan dari Geminivirus.

Salah satu cara yang bisa dilakukan yaitu dengan merakit tanaman yang resisten terhadap Geminivirus melalui rekayasa genetika. Melalui transformasi genetik dapat dilakukan pengembangan kultivar resisten virus berdasarkan pendekatan PDR (*pathogen-derived resistance*). Dengan demikian tanaman tersebut akan memiliki kemampuan sendiri untuk melawan serangan Geminivirus tanpa bantuan dari luar. Hal ini tentu akan memudahkan petani dalam mengatasi permasalahan itu. Tak hanya itu, dari segi ekonomis juga sangat menguntungkan karena bisa mengurangi penggunaan biaya untuk pembelian pestisida serta bisa menstabilkan hasil produksi dari tanaman.

Strategi yang dilakukan dengan menggunakan pendekatan berbasis PDR ini dibagi menjadi dua mekanisme yaitu *protein-based protection* dan *Nucleic acid-based protection*. Strategi *coat protein mediated resistance* (CPMR) merupakan salah satu mekanisme dari *protein-based protection*. Gen *coat protein* adalah gen yang relatif lebih mudah untuk diidentifikasi dan diperbanyak selain itu juga paling banyak digunakan untuk menghasilkan tanaman yang resisten terhadap virus (Powell-Abel, *et al.*, 1986).

Gen penyandi *coat protein* adalah salah satu dari empat gen penting yang menjadi struktur utama pembentuk Geminivirus. Gen lain yang juga menyusun tubuh Geminivirus antara lain, gen MP (*Movement Protein*), gen replikasi serta DNA satelit (Jamsari, 2009). Namun, yang paling menentukan virulensi dan patogenesis Geminivirus di dalam inangnya tersebut diawali dari kinerja fungsi *coat protein* (Powell *et al.*, 1989). Fungsi utama dari *coat protein* ini adalah sebagai pintu masuk virus ke dalam inti sel inang. Selain itu *coat protein* juga bertanggung jawab dalam proses pendeteksian, penginfeksi hingga akhirnya virus tersebut bisa masuk ke dalam tubuh inangnya.

Pengembangan tanaman resisten virus berbasis gen *coat protein* telah banyak yang berhasil dilakukan. Salah satu contohnya adalah pepaya transgenik yang resisten terhadap PRSV (*Papaya ringspot virus*) (Gonsalves, 2002). Perakitan tanaman yang resisten terhadap Geminivirus bukanlah suatu hal yang mudah, karena kegiatan itu membutuhkan proses dan prosedur yang panjang. Banyak tahapan yang harus dilakukan dalam proses tersebut, salah satunya adalah kloning.

Kloning adalah proses memperbanyak suatu fragmen DNA tertentu dalam agen pembawa yang dapat bereplikasi contohnya plasmid. Agen pembawa tersebut selanjutnya diintroduksi ke dalam sel bakteri agar dapat menghasilkan salinan DNA yang identik dalam jumlah jutaan (Alberts *et al.*, 1994). Melalui proses kloning, gen target dapat dipertahankan dalam jangka waktu yang panjang selama koloni bakteri tersebut dalam keadaan hidup.

Mempertimbangkan adanya kemungkinan akan keberhasilan perakitan tanaman resisten virus berbasis gen *coat protein* serta semakin maraknya perkembangan dan serangan Geminivirus dalam lahan pertanian cabai saat ini, maka salah satu cara yang bisa dilakukan adalah dengan merakit tanaman transgenik yang resisten Geminivirus. Oleh sebab itu penulis telah melakukan penelitian berjudul **“Kloning Gen Penyandi Coat Protein (V1) Geminivirus dari *Capsicum annuum*”**

### 1.2 Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengkloning gen penyandi *coat protein* dari Geminivirus ke dalam *Escherichia coli* sehingga dapat digunakan untuk keperluan transformasi lanjutan ke dalam sel tanaman.

### 1.3 Hipotesis

Berdasarkan penggunaan metode transformasi yang telah ditentukan maka akan didapatkan koloni *Escherichia coli* transforman.

## II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Pengaruh Produksi Cabai pada Perekonomian Indonesia

Tanaman cabai merupakan salah satu tanaman hortikultura yang secara nasional ataupun regional tercatat sebagai komoditi unggulan (Bahar, 2008). Sejak tahun 1990an produksi cabai di seluruh dunia mengalami peningkatan yang signifikan. Indonesia sendiri sempat tercatat sebagai negara penghasil cabai ketiga terbanyak di dunia setelah India dan China. Menurut BPS (Badan Pusat Statistik) produksi cabai Indonesia tahun 2009 adalah sekitar 1,378,727 ton dengan produktivitas sebesar 5,89% (Badan Pusat Statistik, 2009).

Kondisi di atas sayangnya masih belum memberikan dampak yang positif bagi kestabilan perekonomian Indonesia, khususnya pada tahun 2010. Hal ini terbukti saat terjadinya inflasi sebesar 0,29 % pada bulan Mei. Menurut BPS (2010), dari sisi komoditas, sumbangan terbesar kedua terhadap inflasi saat ini berasal dari cabai merah dengan persentase sebesar 0,05% setelah emas perhiasan.

Menteri Perdagangan Mari Elka Pangestu menyatakan bahwa cabai merah sempat mengalami defisit 4426 ton (Damanik, 2010). Hal ini tentu berdampak pada harga jual cabai di pasaran. Faktor penyebab kurangnya produksi cabai di Indonesia adalah kondisi cuaca yang tidak stabil serta adanya serangan hama dan penyakit pada tanaman cabai. Namun penyebab yang sering terjadi adalah penyakit akibat serangan virus, khususnya Geminivirus (Jamsari, 2009).

### 2.2 Geminivirus

Geminivirus merupakan salah satu penyebab penyakit tanaman hortikultura seperti sayur-sayuran dan buah-buahan. Virus ini dilaporkan telah banyak berkembang di daerah tropika, salah satunya Indonesia. Tanaman yang telah terserang Geminivirus di Indonesia yaitu kentang, tomat, tembakau dan cabai. Menurut Sukanto (2005) berdasarkan yang telah dilaporkan di Harian Kompas 11 Mei 2005, ratusan hektar tanaman cabai di Kecamatan Tambangan, Kabupaten

Mandailing Natal, Sumatera Utara, hancur dan gagal panen karena terserang virus. Akibatnya, petani mengalami kerugian jutaan rupiah dan terancam tidak mampu menanam cabai lagi pada musim tanam berikutnya.

Keadaan seperti ini tentu sangat berbahaya karena dampak yang diberikan tidak hanya sebatas mengurangi jumlah produksi dari hasil pertanian, tapi hingga menyebabkan kegagalan panen. *African cassava mosaic virus* misalnya menyebabkan kerugian hasil sebesar 70% di Afrika. Kerugian pada ubi kayu di Libanon dan Jordania akibat Geminivirus pada tanaman tomat mencapai 50-70% (Bock *et al.*, 1977).

Kerugian yang diakibatkan oleh Geminivirus ini merupakan suatu ancaman yang berat bagi kelangsungan produksi pertanian. Untuk itu perlu pengenalan sejak dini mengenai Geminivirus tersebut. Mulai dari ciri-ciri serangan Geminivirus terhadap bentuk fisik tanaman hingga struktur Geminivirus. Ini merupakan salah satu pengendalian preventif dalam mengatasi serangan Geminivirus (Sudiono *et al.*, 2004).

Ciri-ciri fisik dari tanaman yang terkena penyakit akibat Geminivirus akan menunjukkan gejala bercak-bercak kuning di atas permukaan daun dan perlahan-lahan bercak itu meluas ke seluruh permukaan daun hingga menguning. Bentuk daun menjadi lebih kecil dari ukuran daun normal, melengkung dan kaku. Pada cabai serangan yang berat bisa menyebabkan hamparan cabai berubah menjadi warna kuning lalu akan rontok (Sukamto, 2005).

Struktur Geminivirus berbentuk lingkaran dan berselubung protein dalam virion ikosahedral kembar (gemini) dengan ukuran 18-30 nm. Geminivirus mempunyai genom berupa DNA utas tunggal (ssDNA) (Sukamto, 2005). Selain itu Geminivirus memiliki genom monopartit dengan ukuran sebesar 2,7 kb yang disebut dengan DNA-A. Akan tetapi sebagian besar dari begomovirus memiliki struktur genom bipartit dengan struktur DNA-A dan DNA-B dimana masing-masing ukuran sekitar 2,7 kb. Selanjutnya ada empat gen pengkode Geminivirus yaitu gen replikasi, gen *coat protein*, dan gen *movement protein* virus yang didistribusikan searah dengan

DNA satelit, keduanya juga berperan dalam penginfeksi sistemik (Davies and Stanley, 1989).

Dari keempat gen pengkode yang ada dalam tubuh virus semuanya sangat berperan penting dalam proses penginfeksi inang, namun yang paling menentukan keberhasilan Geminivirus untuk menginfeksi inang dan menyerang inang adalah *coat protein* (Powell-Abell, 1989). Adapun beberapa fungsi dari *coat protein* pada Geminivirus yaitu sebagai pelindung virus, sebagai pendeteksi inang, bertanggung jawab dalam penginfeksi inang, sebagai tameng virus serta pintu masuk kedalam sel inang. Tak hanya pada Geminivirus saja *coat protein* ini sangat penting peranannya tapi juga bagi virus-virus lainnya seperti *Banana bunchy top virus* (BBTV) (Abdelkader, *et al.*, 2004).

### 2.3 Gen Penyandi *Coat protein*

Peranan dari *coat protein* menyebabkan Geminivirus menjadi salah satu virus yang susah untuk dikendalikan. Meskipun telah banyak dilakukan berbagai macam penelitian terhadap Geminivirus, namun belum ada satu pun formula yang dapat membasmi Geminivirus. Cara yang bisa dilakukan saat ini hanya sebatas pengendalian preventif saja. Itu pun masih belum maksimal hasilnya, padahal masalah Geminivirus telah muncul sebagai patogen tanaman yang secara ekonomis sangat penting, di seluruh dunia (Harrison dan Robinson, 1999).

Gen penyandi *coat protein* pada virus telah banyak digunakan dalam merakit tanaman transgenik. Sesuai dengan pernyataan Powell-Abel, *et al.* (1986) gen *coat protein* adalah gen yang paling banyak dikenal untuk digunakan dalam menghasilkan tanaman yang resisten terhadap virus. Berbagai macam tanaman yang telah dirakit menggunakan gen *coat protein* yaitu tembakau, tomat, pepaya, labu, kentang serta tanaman hias (Pang *et al.*, 2000; Tsukasa *et al.*, 2002; Xiao, 2000; Gonsalves, 2002).

Keberhasilan terhadap manfaat penggunaan gen *coat protein* ini menjadi tambahan pemikiran yang mendasari untuk melakukan kloning selain berdasarkan pada peranan *coat protein* terhadap virulensi dan patogenesis inang saja. Sehingga

apabila nanti telah dilakukan kloning terhadap gen penyandi *coat protein* tersebut selanjutnya bisa digunakan untuk tahapan transformasi genetik dalam merakit varietas tanaman yang tahan terhadap Geminivirus tersebut. Tak hanya itu, alasan lain dari penggunaan gen *coat protein* pada transformasi genetik karena gen *coat protein* adalah gen yang paling banyak dikenal untuk digunakan dalam menghasilkan tanaman yang resisten terhadap virus (Powell-Abel, *et al.*,1986).

#### 2.4 Kloning Sebagai Tahapan Transformasi Genetik

Salah satu cara yang saat ini sedang diupayakan oleh peneliti untuk mengatasi permasalahan tersebut yaitu dengan merakit tanaman yang tahan terhadap serangan Geminivirus. Salah satu penelitian yang telah dilakukan seperti identifikasi secara molekuler untuk mengetahui identitas dan variabilitas dari Geminivirus (Santoso, *et al.*,2009). Kegiatan lain yang diperlukan dalam transformasi genetik guna merakit tanaman yang tahan terhadap serangan Geminivirus adalah kloning untuk mendapatkan rekombinan dari gen yang dikehendaki yang memiliki susunan gen yang sama (Barnett , 2001).

Secara definisi klon adalah sekelompok organisme hewan maupun tumbuh-tumbuhan yang dihasilkan melalui reproduksi aseksual dan berasal dari satu induk yang sama. Sedangkan kloning sendiri merupakan prosesnya. Kloning yang akan dilakukan dalam proses transformasi genetik ini merupakan kloning gen. Kloning gen adalah suatu prosedur untuk memperoleh replika yang dapat sama dari sel atau organisme tunggal. Klon yang dihasilkan dari proses kloning tersebut mempunyai susunan dan jumlah gen yang sama dan kemungkinan besar fenotipnya juga sama (Wilmot, 1999).

Tahapan yang akan dilakukan dalam kloning gen yaitu, (1) suatu fragmen DNA yang mengandung gen yang akan diklon diinsersikan pada molekul DNA sirkular yang disebut vektor untuk menghasilkan molekul DNA rekombinan, (2) vektor bertindak sebagai perantara yang membawa gen masuk ke dalam sel tuan rumah (*host*) yang biasanya berupa bakteri, walaupun sel-sel jenis dapat juga

digunakan, (3) di dalam sel host vektor mengadakan replikasi, menghasilkan banyak kopi atau turunan yang identik, baik vektornya sendiri maupun gen yang dibawanya, (4) ketika sel host membelah, kopi molekul DNA rekombinan diwariskan pada progeni dan terjadi replikasi vektor selanjutnya, (5) setelah terjadi sejumlah besar pembelahan sel, maka dihasilkan koloni atau klon sel host yang identik. Tiap-tiap sel dalam klon mengandung satu kopi atau lebih molekul DNA rekombinan. Dengan demikian dikatakan bahwa gen yang dibawa oleh molekul rekombinan telah diklon (Brown, 1991).

Mangunwardoyo (2002) menyatakan bahwa transforman yang dihasilkan ada yang berwarna biru dan putih atau putih berubah menjadi biru, adanya warna biru karena senyawa *X-gal* dalam medium. Hal ini terjadi karena adanya  $\alpha$ -komplementasi dimana vektor plasmid pada bagian poli-lingkernya masing-masing mengkode 146 asam amino dari  $\beta\beta$ -galaktosidase ( $\beta\beta$ -gal), sedangkan inangnya mengkode bagian *C-terminal* dan merupakan komplemen dari  $\beta\beta$ -gal. Jika gen penyandi amino terminal  $\beta\beta$ -gal dari vektor plasmid dirusak dengan adanya fragmen DNA, maka protein  $\beta\beta$ -gal tidak terbentuk. Hal ini menyebabkan koloni yang berwarna putih pada medium mengandung *X-gal*, sedangkan koloni yang melakukan komplementasi berwarna biru. Terjadinya perubahan koloni yang berwarna putih menjadi biru kembali. kemungkinan disebabkan adanya pergeseran kerangka baca (*frameshift*) dari protein. Selain itu juga mungkin disebabkan adanya aktivitas eks nuklease yang memotong fragmen tersebut (Davis, 1994).

## **2.5 Manfaat Tanaman Transgenik (*Genetically Modified Organism*) dalam Aspek Kehidupan Manusia**

Menurut Badan Pusat Statistik (2010) penyumbang terbesar pada inflasi di Indonesia pada bulan Juni yaitu bahan pangan seperti beras, cabai, kentang, bawang putih dan lain-lainnya dengan total persentase 0,49 % (Badan Pusat Statistik, 2010). Hal ini bisa terjadi disebabkan oleh beberapa faktor salah satunya adalah kecilnya jumlah persediaan dibandingkan jumlah permintaan sehingga harga dari bahan

pangan pada waktu itu sempat melambung khususnya di daerah yang telah mengalami bencana seperti Jogjakarta dan Sumatera Barat (Suryanto, 2011; Anonim, 2011).

Jumlah persediaan yang kecil secara langsung dipengaruhi oleh jumlah produksi yang sedikit. Oleh sebab itu, tindakan yang harus dilakukan yaitu meningkatkan jumlah produksinya. Peningkatan produksi yang akan dilakukan saat ini telah menjadi salah satu program kerja dari Dinas Pertanian sejak tahun 2008 (Bahar, 2008). Namun, sampai saat ini hasil yang dicapai masih belum maksimal. Hal ini dibuktikan dengan masih adanya kebijakan Indonesia untuk mengimpor bahan pangan guna memenuhi kebutuhan permintaan bahan pangan dalam negeri. Padahal, program yang dilaksanakan telah dirancang sedemikian rupa berbasis pada prinsip dan kaidah panca usaha tani (Himpunan Kerukunan Tani Indonesia, 2011).

Salah satu cara yang bisa dilakukan untuk mengatasi minimnya jumlah persediaan akibat rendahnya hasil produksi selain melalui impor yaitu dengan penggunaan tanaman hasil produk rekayasa genetika atau yang biasa dikenal dengan tanaman transgenik. Tanaman transgenik dirakit dengan keunggulan tersendiri melebihi tanaman lokal pada umumnya. Keunggulannya sangat bervariasi baik dari segi kuantitas maupun kualitas, tergantung pada tujuan penggunaannya. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pemanfaatan tanaman transgenik ini bisa dijadikan sebagai salah satu cara untuk meningkatkan kuantitas dan kualitas produksi (AgBiotech, 2001).

Berdasarkan pengertiannya transgenik merupakan tanaman yang dihasilkan dari teknik rekayasa genetika atau biologi molekuler atau dikenal dengan *genetically modified organism* (GMO). Tanaman-tanaman tersebut dimodifikasi atau disisipi gen tertentu dengan tujuan untuk memperbaiki sifat-sifat yang diinginkan seperti meningkatkan resistensi terhadap pestisida, hama, kekeringan dan lain-lainnya. Rekayasa genetika sendiri merupakan bagian dari bioteknologi. Adapun pengertian bioteknologi sendiri adalah ilmu biologi molekuler berikut teknik dan aplikasinya yang digunakan untuk memodifikasi, memanipulasi atau merubah proses kehidupan

normal dari organisme-organisme dan jaringan-jaringan guna meningkatkan kinerjanya bagi keperluan manusia (Hodges, 2000).

Tanaman transgenik direkayasa pertama kali pada tahun 1980-an, yakni melalui proses mentransfer gen *b-phaseolin* dari kacang-kacangan ke kromosom bunga matahari. Hasilnya, bunga matahari ini memiliki biji yang kaya akan protein. Tak hanya sampai disini, perjuangan perakitan tanaman transgenik pun terus berlanjut. Hingga saat ini telah banyak tanaman transgenik yang dihasilkan yaitu jagung, pepaya, tomat, kopi, umbi, padi dan masih banyak lagi (D'Halluin, 1992; Gonsalves, 2002; Tsukasa, 2002; Hatanaka, 1999; *Crop Biotech Update*, 2010; Segelken, 2009).

Dalam proses perakitan tanaman transgenik, sumber gen yang akan digunakan tidak terbatas sumbernya apakah gen tersebut berasal dari tanaman, hewan, virus, bakteri atau lainnya selama masih dalam lingkup aturan yang berlaku (Adcock, 2006). Untuk itu, sebelum merencanakan perakitan suatu tanaman perlu pertimbangan yang matang sehingga apabila tanaman itu berhasil dirakit, maka sifat dan karakter yang muncul adalah sifat dan karakter unggul yang dikehendaki.

Secara genetika, tanaman transgenik memiliki keunggulan tersendiri dibandingkan tanaman pada umumnya. Pada tanaman padi misalnya, produksi padi transgenik lebih besar dibandingkan padi biasa walaupun padi tersebut ditanam pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan seperti salinitas tinggi atau ketidakstabilan suhu lingkungan (Segelken, 2009). Melihat kondisi di atas tanaman transgenik bisa menjadi solusi bagi negara-negara yang memiliki kondisi daerah yang tidak menguntungkan. Contohnya negara Indonesia yang banyak memiliki lahan marginal mampu meningkatkan produksinya bila menggunakan tanaman transgenik.

Kondisi ini secara tidak langsung bisa meningkatkan kestabilan perekonomian di Indonesia. Khususnya dalam mengatasi masalah inflasi yang sempat terjadi pada tahun 2010 akibat kurangnya jumlah produksi pertanian seperti beras (Badan Pusat Statistik, 2010) yang merupakan sumber karbohidrat utama bagi masyarakat Indonesia. Selain itu, tanaman transgenik yang dirakit juga disesuaikan dengan kebutuhan masyarakat khususnya dalam masalah peningkatan gizi dan kesehatan.

Ubi jalar oranye salah satu tanaman transgenik yang marak dibicarakan diberita akhir-akhir ini Ubi jalar oranye yang diproduksi oleh HarvestPlus memiliki kandungan vitamin A yang tinggi. Hal ini baik bagi kesehatan, khususnya bagi anak-anak dan perempuan yang kekurangan mikronutrien tersebut. Sehingga ubi jalar oranye ini dipromosikan secara meluas di Afrika yang notabene merupakan negara yang tergolong kurang gizi. (*Crop Biotech Update*, 2010).

### III. BAHAN DAN METODE

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan September hingga April 2012 di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. Pengambilan sampel tanaman cabai dilakukan di Kecamatan X Koto Tanah Datar dan Kecamatan Salido Pesisir Selatan. Jadwal kegiatan penelitian disajikan di Lampiran 1.

#### 3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada percobaan ini adalah metode eksperimen dan deskriptif. Metode eksperimen dilakukan dalam proses kloning dan metode deskriptif dilakukan setelah didapatkan hasil koloni transforman.

#### 3.3 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: sampel daun tanaman cabai dari 2 lokasi (Tanah Datar dan Pesisir Selatan), Tris, *pottasium asetat* 8M, *phenol*, *etanol absolut*, *etanol 70%*, 1xTE (Tris : EDTA) , agarose, buffer 0,5xTBE (Tris : Boric : EDTA), 10xBPB (Bromo Phenol Blue),  $\lambda$  DNA, *ethidium bromide*, NaCl, *yeast extract*, *tryptone*, NaOH, *ampicilin*,  $\text{CaCl}_2$  0,1 M, *agar powder*, *Go Taq Green*, *chloroform*, HCl, *etanol*, plasmid pGEM-T *easy Vector*,  $\text{MgCl}_2$ , *1 Kb ladder*, enzim *BamHI*, enzim *SmaI*, enzim *XbaI*,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , TBE, ddH<sub>2</sub>O, *agar for bacteriology*, alkohol, dNTPs 2,5 mM, enzim *taq polymerase*, Buffer Taq +  $\text{MgCl}_2$ , *RNAse*, *Solution I*, *Solution II*, *Lisozim*, Kalium asetat, *Isolamylalcohol*, primer spesifik, dan RTG (*Ready To Go*) PCR *Bead*.

Sedangkan alat yang digunakan adalah erlenmeyer, *beaker glass*, timbangan analitik, spatula, korek api, *Laminar Air Flow Cabinet*, bunsen, cawan petri, jarum ose, *autoclave*, kompor listrik, *magnetic stirrer*, oven, lemari es, *colony counter*, kamera digital, pipet tetes, *vortex*, tabung *eppendorf*, botol Scoot, tip biru, kuning dan putih, alat sentrifugasi, *tissue*, sarung tangan, tusuk gigi, korek api, gel dokumentasi sistem, lampu UV, nampan plastik, mesin PCR, *water bath*, *shaking incubator* dan lain-lainnya.

### 3.4 Posedur Pelaksanaan

#### 3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Kegiatan ini meliputi sterilisasi alat seperti *beaker glass*, cawan petri, spatula, botol kultur, erlenmeyer, botol kultur, botol media, tabung *ependorf*, tip mikro pipet, tusuk gigi, serta sterilisasi media dengan menggunakan *autoclave* pada tekanan 15 psi dan suhunya berkisar  $121^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.4.2 Pengambilan Sampel Tanaman Cabai Terserang Geminivirus

Pengambilan sampel daun dilakukan di Kecamatan X Koto Tanah Datar dan Kecamatan Salido Pesisir Selatan. Sampel yang diambil berasal dari tanaman yang berumur tiga bulan. Kriteria tanaman yang dijadikan sampel di lapangan merujuk pada ciri-ciri serangan Geminivirus pada cabai yang dikemukakan oleh Sukanto (2005) yaitu adanya gejala bercak-bercak kuning di atas permukaan daun yang perlahan-lahan bercak itu meluas ke seluruh permukaan daun. Bentuk daun menjadi lebih kecil dari ukuran daun normal, melengkung dan kaku.

#### 3.4.3 Isolasi DNA Geminivirus

Sebanyak 1 gram dari masing-masing sampel tanaman dihaluskan menggunakan tabung mikro dan pistil plastik. Kemudian ditambahkan 1 ml buffer ekstraksi, lalu diinkubasi pada suhu  $65^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan pottasium asetat 8 M 35  $\mu\text{l}$  dan didiamkan di es selama 30 menit. Selanjutnya sampel yang telah dihaluskan disentrifugasi pada kecepatan 10000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terpisah di dalam tabung tersebut ditransfer ke tabung baru dan ditambahkan *phenol chloroform* (1:1) yang sebelumnya sudah dijenuhkan dengan TE sebanyak 500  $\mu\text{l}$  yang dilakukan di ruang asam. Kemudian *di-tapping* sebentar lalu disentrifugasi kembali dengan menggunakan kecepatan dan waktu yang sama dengan sebelumnya. Kegiatan ini diulangi sebanyak dua kali. Hasil sentrifugasi akan terpisah menjadi 3 bagian, dan bagian yang diambil adalah bagian paling atas yang merupakan supernatannya kemudian ditransfer kembali ke tabung baru. Untuk proses pemanenan DNA ditambahkan *etanol absolute* hingga mencukupi 1,5 ml, lalu ditapping sebentar

bila tidak terdapat pelet setelah penambahan etanol tersebut, maka dilakukan inkubasi di kulkas suhu  $-20^{\circ}$  C selama 15 menit. Selanjutnya disentrifugasi kembali untuk mengendapkan peletnya. Kemudian, etanol absolut tersebut dibuang dan endapan pelet dicuci dengan menambahkan etanol 70% sebanyak 0,5 ml. Pelet yang didapatkan dikeringkan dan ditambahkan 1 x TE sebanyak 25  $\mu$ l.

#### **3.4.4 Analisis Kualitas dan Kuantitas DNA**

Larutan DNA yang diperoleh selanjutnya dipersiapkan untuk analisis kualitas dan kuantitas menggunakan teknik elektroforesis. Gel agarose dengan konsentrasi 1 % digunakan sebagai matriks untuk analisis elektroforesis. Gel agarose yang masih mencair ditambah dengan senyawa *ethidium bromide* (5mg/ml) dan dibiarkan mengeras pada lemari asam kurang lebih 30 menit. Larutan DNA sebanyak 2  $\mu$ l dicampurkan dengan 1  $\mu$ l 10x BPB. Pada sumur gel yang lain disertakan pula DNA- $\lambda$  dengan (50 ng/ $\mu$ l) sebagai acuan penentuan konsentrasi. Elektroforesis di-loading pada tegangan 100 V selama 30 menit menggunakan buffer 0,5x TBE. Setelah selesai, gel dipapari dengan sinar UV di bawah perangkat dokumentasi (*Gel-Doc*). Data visualisasi disimpan dalam bentuk data digital dan digunakan untuk analisis kualitas dan kuantitas DNA. Dari segi kualitatif akan diperoleh informasi mengenai konsentrasi DNA yang diperoleh. DNA yang diperoleh selanjutnya diencerkan sampai konsentrasi 15 ng/ $\mu$ l untuk keperluan analisis selanjutnya.

#### **3.4.5 Amplifikasi *In Vitro***

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan menggunakan kombinasi primer seperti yang disajikan pada Tabel 1. Amplifikasi dengan primer ini diperkirakan menghasilkan produk amplifikasi PCR yang berbeda-beda bergantung pada jenis primer yang digunakan.

**Tabel 1.** Primer spesifik (urutan sekuens dan perkiraan panjang produk yang diharapkan)

No	Primer	Sekuens	Kisaran Pita Harapan	Annealing (°C)
1	WS-PLYCV-387 FR	F : 5'- GCT CCC TGR AWG TTH GGA TGG AA - 3' R : 5' – GGA GCT AAR TMC AGY TCC GAY GTC A – 3'	2700 bp	55
2	TD 21-PYLCV-455 FR	F : 5' – CGT GCA GAC GTA TTT CCC TTC GAA T – 3' R : 5' – CAA CAG ATT CTT CGA CCT GGT AT – 3'	2749 bp	55
3	PSS 14-PYLCV-353 FR	F : 5' – CTG AAC TGG GCT TTA CCT TTG A -3' R : 5' – CGA CAC TTC GAT CTT ACA CA- 3'	2749 bp	55
4	AVI-TD 21/PSS14-WS- FR	F : 5'-GTA AAA ATT ATG CCG AAG CGT- 3' R : 5' -GCT TTA TTA ATT TGT TAC ATT- 3'	794 bp	55
5	VI Xbal – a F*) VI SmaI - a R*)	F : -5' <u>CAT GGT CTA GAG</u> TAA AAA TTA TGC CGA AGC GT -3' R : 5' – CCA <u>AGC CCG GGG</u> CTT TAT TAA TTT GTT ACA TT - 3'	794 bp	59,2
6	VI Xbal NT F*) VI SmaI NT R*)	F : 5' - CAT <u>GGT CTA GAA</u> TGC CGA AGC GTT CCA -3' R : 5' – CTA ATC <u>CCG GGT</u> TGT TAC ATT GTC GTA -3'	794 bp	59,2
7	VI BamHI NT F*) VI SmaI NT R*)	F : 5' – CAT <u>GGG GAT CCA</u> TGC CGA AGC GTT CCA -3' R : 5' – CTA ATC <u>CCG GGT</u> TGT TAC ATT GTC GTA -3'	794 bp	55

\*) : nukleotida yang diberi garis bawah adalah sisi pengenalan enzim yang ditambahkan ke dalam primer.

Amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR (Biometra-Jerman). Kondisi suhu *annealing* PCR yang digunakan ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil amplifikasi disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan. Untuk mengontrol keberhasilan reaksi amplifikasi, produk PCR sebanyak 5 µl dielektroforesis pada gel agarose dengan konsentrasi 1 % dalam buffer 0,5x TBE pada tegangan 100 Volt.

**Tabel 2.** Komposisi komponen bahan pada masing-masing reaksi PCR

No	Jenis Komposisi Reaksi		
	Master Mix PCR	Kit RTG PCR Bead	Kit Go Taq Green
1	2 µl enzim Taq Polymerase	1 bh RTG PCR Bead	12,5 µl Go Tag Green
2	5 µl Taq Buffer + MgCl <sub>2</sub>	3 µl DNA template	3 µl DNA template
3	5 µl dNTPS 2,5 mM	3 µl Primer (5 pmol/µl),	3 µl Primer (5 pmol/µl),
4	3 µl DNA template	19 µl ddH <sub>2</sub> O PCR	6,5 µl ddH <sub>2</sub> O PCR
5	3 µl Primer (5 pmol/µl)	-	-
6	32 µl ddH <sub>2</sub> O PCR	-	-
<b>Total</b>	<b>50 µl</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl</b>

### 3.4.6 Kloning

#### 3.4.6.1 Ligasi Produk PCR Ke dalam Plasmid *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector*

Ligasi produk PCR gen CP ke dalam plasmid *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector* (Lampiran 2) berdasarkan metode Promega USA (2009). Tujuannya sebagai stok bahan perbanyakkan dari gen CP. Adapun komposisi yang digunakan adalah :

<i>pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector</i>	1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
2 X Rapid <i>Ligation buffer</i>	5 µl
DNA produk PCR	3 µl +
	<hr/> 10µl

Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama dua jam atau pada 4°C selama 18 jam.

#### 3.4.6.2 Preparasi Sel Kompeten

Penyiapan sel kompeten dilakukan sesuai anjuran protokol yang terdapat dalam kit sel kompeten *E. coli* (Promega-USA) dengan melakukan sedikit modifikasi. Bakteri *E. coli* dikulturkan di dalam tabung reaksi yang mengandung 5 mL medium Luria-Bertani (LB) selama semalam dan digunakan sebagai kultur starter. Pada perlakuan lain koloni bakteri langsung dikulturkan pada 100 mL medium LB selama semalam. Kemudian diinkubasi selama 3 sampai 4 jam dikocok pada kecepatan 250 rpm dengan suhu 37°C untuk mendapatkan fase

eksponensial dari bakteri tersebut. Setelah 4 jam, suspensi sel dipanen ke dalam tabung *eppendorf* 2 mL. Kemudian sentrifugasi pada 14000 rpm, 4°C selama 5 menit. Fasa cair dibuang dengan hati-hati agar endapan pellet bakteri tidak ikut terbang. Selanjutnya, endapan bakteri ditambahkan 500 µL 0,1 M CaCl<sub>2</sub>. Kemudian didiamkan dalam es selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14000 rpm 4°C selama 10 menit. Endapan bakteri yang terbentuk ditambahkan dengan buffer 0,1 M CaCl<sub>2</sub> sebanyak 240 µL untuk membentuk suspensi. Sel kompeten bisa langsung digunakan atau disimpan pada suhu -80°C.

#### 3.4.6.3 Transformasi Plasmid Rekombinan Ke dalam *E. coli*

Plasmid rekombinan yang mengandung gen CP Geminivirus ditransformasikan ke dalam *E. coli* strain BL 21. Metode transformasi menggunakan metode *heat shock* (Froger, 2007) dan pada kondisi tertentu menggunakan metode elektroporasi dengan *Cell-Porator*<sup>TM</sup> *Voltage Booster* (*Life Technologies*, USA) (Wolf, 2010).

Metode *heat shock* dilakukan dengan mencampurkan 5 µl hasil ligasi dengan 50 µl sel kompeten *E. coli* BL21 dalam *eppendorf* 1,5 ml dan diinkubasi dalam es selama 30 menit. Selanjutnya diberi kejutan melalui inkubasi dalam *water bath* bersuhu 42°C selama 45 detik, diletakkan kembali ke dalam es selama 2 menit dan segera ditambahkan LB cair sebanyak 1 ml. Setelah itu ditumbuhkan dalam *shaking incubator* pada suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama satu jam sebelum di-*plating* pada media selektif.

Metode elektroporasi berdasarkan prosedur dari *Cell-Porator*<sup>TM</sup> *Voltage Booster* (*Life Technologies*, USA) dilakukan dengan mencampurkan 5 µl hasil ligasi dengan 50 µl sel kompeten *E. coli* BL21 dalam kuvet. Selanjutnya dimasukkan ke dalam mesin elektroforator untuk diberi kejutan listrik. Kemudian ditambahkan LB cair sebanyak 1 ml. Lalu diinkubasi dalam *shaking incubator* suhu 37°C dengan kecepatan 150 rpm selama satu jam. Di-*plating* pada media LB padat yang telah diberi antibiotik *chloramphenicol* (CAM) dan *ampicilin* (1µl/ml) dan diinkubasi pada 37°C selama *overnight*.

#### 3.4.6.4 Seleksi Rekombinan

Plasmid rekombinan Sampel Tanah Datar dan sampel Pesisir Selatan diuji dengan metode colony PCR menggunakan primer spesifik T7/SP6 dan primer spesifik V1. Adapun komposisi *cocktail* PCR koloni yang digunakan adalah:

- dNTP	: 2,5 $\mu$ L
- Dream Taq buffer	: 2,5 $\mu$ L
- Taq polymerase	: 1 $\mu$ L
- Primer	: 2,5 $\mu$ L
- ddH <sub>2</sub> O	: 16,5 $\mu$ L +
- Total	: 25 $\mu$ L

*Cocktail* PCR koloni dimasukkan ke dalam *tube* PCR, lalu diambil koloni tunggal bakteri yang diduga transforman dengan tusuk gigi steril dan dicelupkan ke dalam *cocktail* dan ditusukkan sedikit ke media LB padat pada *master plate*. Kemudian *cocktail* yang telah berisi bakteri transforman diamplifikasi dengan program T7/SP6 dan gen V1 Geminivirus pada mesin PCR dan hasilnya dicek dengan elektroforesis. *Master plate* (yang dibuat bersamaan pembuatan *cocktail* PCR sebelumnya) diinkubasi pada suhu 37 °C selama semalam (*over night*).

Selanjutnya pengujian juga dilakukan melalui DNA plasmid yang diisolasi menggunakan metode *Quick and Dirty* (Birnboim and Doly, ). Isolasi plasmid dilakukan dengan mempersiapkan 1800  $\mu$ l *Solution I*, lalu tambahkan lizozim sebanyak 200  $\mu$ l, ditempatkan dalam es dan disisihkan. Diambil sampel yang telah dikultur dan dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* 2 ml, disentrifugasi dengan kecepatan 14000 rpm selama 2 menit, yang bertujuan untuk mendapatkan pelet rekombinan. Supernatan dibuang dan di dasar tabung akan ada pelet DNA. Pelet DNA dipanen dan diresuspensikan dengan penambahan *Solution I* tadi sebanyak 200  $\mu$ l, di-*tapping* atau bila perlu di-*vortex* hingga homogen.

Campuran tadi ditambahkan lagi dengan *Solution II* sebanyak 200  $\mu$ l dan dibolak-balik selama 5 menit dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 5 menit. Kemudian ditambahkan larutan kalium asetat sebanyak 150  $\mu$ l dan dibolak-balik selama 5 menit dan dimasukkan ke dalam es batu selama 15 menit. Selanjutnya disentrifugasi pada suhu 4°C selama 10 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Supernatan diambil dan dipindahkan ke dalam tabung *eppendorf* 1,5 ml yang baru

serta ditambahkan 500  $\mu$ l CI (*chloroform : isoamylalkohol*), disentrifugasi kembali dengan suhu dan kecepatan yang sama selama 15 menit.

Supernatan dipindahkan ke tabung *ependorf* yang baru dan dipresipitasi dengan 700  $\mu$ l larutan etanol dingin 100%. Disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14000 rpm suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan dibuang dengan hati-hati, pelet DNA dicuci dengan etanol 70% sebanyak 150  $\mu$ l dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14000 rpm selama 10 menit. Pelet DNA dikeringkan dengan *heater block* pada suhu 55°C selama 5-10 menit. Pelet dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 50  $\mu$ l dan siap untuk diuji dengan elektroforesis. Hasil isolasi plasmid ini digunakan dalam pengujian lanjutan dengan menggunakan metode restriksi dan analisis sekuens plasmid transforman untuk memastikan keberadaan gen CP di dalam plasmid tersebut.

#### 3.4.6.5 Restriksi Produk PCR

Pengujian dengan metode restriksi terhadap produk PCR bertujuan untuk memastikan bahwa plasmid benar-benar mengandung gen V1. Adapun komposisi reaksi restriksi adalah sebagai berikut :

Produk PCR DNA	5 $\mu$ l	
Enzim 1 ( <i>Bam</i> H1)	1 $\mu$ l	
Enzim 2 ( <i>Sma</i> I)	1 $\mu$ l	
10x Buffer Restriksi	3 $\mu$ l	
ddH <sub>2</sub> O PCR	11 $\mu$ l	+
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>	

Campuran *cocktail* restriksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 jam, dan dianalisis menggunakan elektroforesis pada gel agarose 1%.

#### 3.4.6.6 Sekuensing dan Analisis Sekuens Fragmen Gen V1 (*Coat Protein*)

Sekuensing dilakukan di Laboratorium Dasar Universitas Andalas, Padang. Sekuensing dilakukan secara dua arah (*two read direction*) menggunakan primer T7 dan SP6. Untuk keperluan sekuensing digunakan 20  $\mu$ l produk PCR dengan konsentrasi masing-masing sekitar 25 ng/ $\mu$ l, yang diperlukan dalam amplifikasi menggunakan T7 SP6 FR dengan konsentrasi sebanyak 5 pmol/ $\mu$ l dengan volume sebanyak 10  $\mu$ l. Selanjutnya urutan sekuens DNA dianalisis

menggunakan software DNASTAR (Madison Wisconsin - USA). Data sekuens kemudian diidentifikasi dengan menggunakan *vector screening* secara *online* pada website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen>. Hasil *vector screening* kemudian dibandingkan dengan data yang ada di *gene bank* melalui program secara online melalui website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

## IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pengambilan Sampel Tanah Datar dan Pesisir Selatan

Pengambilan sampel dilakukan di Kecamatan X Koto, Tanah Datar dan Kecamatan Salido, Pesisir Selatan. Kriteria tanaman yang diambil untuk dijadikan sampel di lapangan merujuk pada ciri-ciri serangan Geminivirus pada cabai yang telah dijelaskan di Sub Bab 3.4.2. Tanaman cabai berumur kurang lebih tiga bulan yang menunjukkan gejala daun kuning, kerdil, tebal serta terkadang di bagian bawah daun terdapat hama berwarna putih yang merupakan vektor dari Geminivirus, diambil sebagai sampel seperti yang tertera pada Gambar 1.

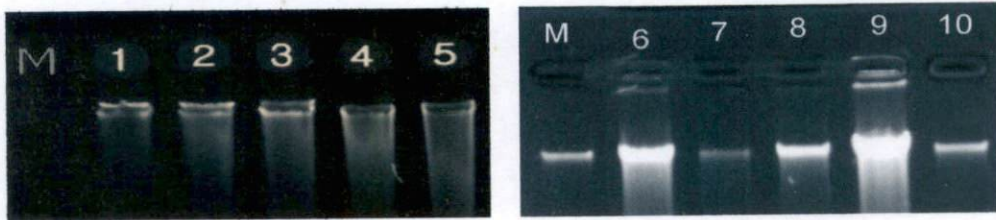


**Gambar 1.** Bentuk gejala pada tanaman cabai yang terinfeksi oleh Begomovirus yang ditemukan di lapangan. A = Lingkaran merah menunjukkan serangan Geminivirus pada sampel tanaman cabai Tanah Datar B = Sampel Tanaman cabai Pesisir Selatan

Pada Gambar 1.A daun tanaman cabai yang terserang Geminivirus menunjukkan bentuk daun berwarna kuning cerah serta bagian pucuk menumpuk keriting diikuti dengan bentuk helaian daun menyempit atau cekung. Lain halnya dengan Gambar 1.B daun tanaman cabai yang terserang hampir seluruhnya memperlihatkan bercak kuning cerah meskipun ukuran daun masih terlihat normal. Gejala serangan Geminivirus di Lapangan pada umumnya merujuk pada ciri-ciri yang ada pada Gambar 1 di atas. Di lapangan gejala ditemukan dalam berbagai stadia dari mulai gejala awal seperti tulang daun menjala atau kekuningan pada pucuk sampai seluruh daun bergejala kuning atau hijau parah (Duriat, 2009)

#### 4.2 Isolasi DNA Geminivirus Sampel Tanah Datar dan Pesisir Selatan

Daun dari sepuluh sampel cabai terserang Geminivirus dari kedua lokasi digunakan untuk studi identifikasi secara molekuler. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Dellaporta (1983). Prosedur kerja isolasi DNA dapat dilihat pada bahan dan metode (Bab 3.4.3). Visualisasi hasil isolasi DNA Geminivirus ditunjukkan di Gambar 2.



**Gambar 2.** Visualisasi hasil elektroforesis isolasi DNA. M =  $\lambda$  DNA 50 ng/ $\mu$ l, 1-5 = Sampel Pesisir Selatan, 6-10 = Sampel Tanah datar.

Gambar 2 menunjukkan adanya perbedaan intensitas pita DNA yang dihasilkan, baik secara kualitas dan kuantitas DNA. Secara kualitas DNA hasil isolasi sampel Tanah Datar terlihat lebih murni dibandingkan sampel Pesisir Selatan yang umumnya menunjukkan DNA yang *smear*. DNA hasil isolasi yang diperoleh, konformasi pita yang dibentuk secara keseluruhan berbentuk linear dan memiliki pita utama yang tegas. Perbedaan kualitas DNA ini disebabkan beberapa hal antara lain aktivitas saat isolasi serta perbedaan penggunaan protokol saat isolasi.

Saat isolasi DNA proses pemecahan dinding sel melalui penggerusan, diusahakan agar tidak terlalu lama. Sebab jika terlalu lama maka akan timbul senyawa sekunder yang menyebabkan sampel berwarna coklat (*browning*). Selain itu, proses penggerusan yang terlalu lama akan mengaktifkan enzim DNase. Enzim DNase ini mampu menguraikan molekul-molekul DNA, sehingga DNA yang diperoleh nantinya menjadi tidak utuh. Saat elektroforesis, molekul-molekul DNA yang telah diuraikan oleh enzim DNase ini dikenal dengan istilah DNA *smear*. Oleh karena itu, selama pemecahan dinding sel secara mekanis perlu diupayakan agar suhu selalu dingin sehingga aktifitas enzim DNase dapat dihambat.

DNA *smear* tersebut dapat dimurnikan melalui proses purifikasi DNA. Dalam praktik sebagaimana yang telah diungkapkan terdahulu, bahwa setiap jaringan memiliki kekhasan tersendiri. Meskipun berasal dari satu jenis tanaman yang sama namun efisiensi lisis sel pada masing-masing sampel sangat bervariasi. Sehingga protokol yang digunakan sering menggunakan kombinasi dari teknik-teknik dan metode yang ada, agar lebih optimal. Selain itu, efisiensi dari protokol yang digunakan juga dipengaruhi dengan adanya perbedaan penggunaan bagian tanaman yang akan dijadikan sampel. Bagian daun lebih umum digunakan dalam isolasi DNA dibandingkan bagian lainnya seperti batang. Hal ini disebabkan struktur sel penyusun daun lebih mudah untuk dihancurkan dibandingkan batang.

Jamsari (2007) memaparkan beberapa hal – hal penting yang harus diperhatikan dalam proses isolasi DNA yaitu keutuhan ukuran molekul DNA, efektifitas isolasi, kemurnian DNA hasil isolasi serta aspek praktis dan ekonomis. Secara kuantitas, hasil isolasi DNA sampel Pesisir Selatan memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan sampel Tanah Datar. Adapun ukuran konsentrasi dari setiap sampel Tanah Datar dan Pesisir Selatan yang berhasil diisolasi disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Konsentrasi DNA yang diperoleh dari hasil isolasi DNA Sampel Tanah Datar dan Pesisir Selatan

No	Tanah Datar		Pesisir Selatan	
	Kode Sampel	Konsentrasi DNA yang diperoleh (ng/μl)	Kode Sampel	Konsentrasi DNA yang diperoleh (ng/μl)
1	1 TD	25	1 PSS	200
2	2 TD	25	2 PSS	250
3	3 TD	75	3 PSS	300
4	4 TD	50	4 PSS	150
5	5 TD	50	5 PSS	150
6	6 TD	200	6 PSS	100
7	7 TD	25	7 PSS	75
8	8 TD	100	8 PSS	100
9	9 TD	250	9 PSS	150
10	10 TD	50	10 PSS	50
<b>Rata – rata (ng/μl)</b>		<b>80</b>	<b>Rata-rata (ng/μl)</b>	<b>152.5</b>

Berdasarkan Tabel 3, sampel Tanah Datar nomor 9 terlihat memiliki konsentrasi DNA yang tinggi berkisar 250 ng/ $\mu$ l bila dibandingkan dengan  $\lambda$  DNA 50 ng/ $\mu$ l. Kemudian disusul oleh nomor sampel 6 dan 8 yang juga memiliki konsentrasi cukup tinggi. Kuantitas DNA dari sampel Pesisir Selatan dengan nomor sampel 2 dan 3 menunjukkan kadar konsentrasi yang tinggi berkisar 250 - 300 ng/ $\mu$ l. Secara keseluruhan, sampel Pesisir Selatan tergolong lebih tinggi dibandingkan dengan sampel Tanah Datar. Hal ini dapat dilihat dari rata-rata konsentrasi DNA yang diperoleh dari sampel Pesisir Selatan mencapai 152.2 ng/ $\mu$ l dibandingkan dengan sampel Tanah Datar yang hampir setengah dari konsentrasi Pesisir Selatan hanya berkisar 80 ng/ $\mu$ l. Tinggi rendahnya konsentrasi hasil isolasi DNA yang diperoleh masih belum dapat mengindikasikan ada tidaknya keberadaan DNA Geminivirus di dalam sampel tersebut. Sebab interpretasi hasil yang didapatkan dari proses elektroforesis hanya sebatas kualitas dan kuantitas DNA saja. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, hal ini masih perlu dianalisis lebih lanjut.

#### **4.3. Pengujian Keberadaan Geminivirus pada Sampel TD dan PSS**

##### **4.3.1. Amplifikasi Sampel PSS dan TD Menggunakan Primer WS-PYLCV-387 FR**

Kegiatan amplifikasi awal dilakukan dengan menggunakan kombinasi primer WS-PYLCV-387 FR. Penggunaan kombinasi primer ini diharapkan menghasilkan fragmen produk PCR dengan ukuran sekitar 2700 bp. Prosedur lengkap dan komponen pada reaksi amplifikasi dapat dilihat pada bahan dan metode (Sub Bab 3.4.5). Sampel Pesisir Selatan yang diamplifikasi menggunakan primer ini sama sekali tidak menghasilkan produk. Meskipun telah dicobakan beberapa range suhu namun hasilnya sama saja. Berbeda dengan sampel dari Tanah Datar, hasil visualisasi amplifikasi pada Gambar 3 menunjukkan bahwa amplifikasi yang dilakukan pada sampel Tanah Datar berhasil dengan adanya pita pada ukuran berkisar 2700 bp.

Menurut Rusli *et al.* (1999), ukuran genom gemini virus berkisar antara 2,6-2,8 kb. Hal ini menunjukkan bahwa DNA sampel TD yang didapatkan positif mengandung Geminivirus. Hanya saja untuk sampel nomor 10, konsentrasi

produknya sangat kecil dibandingkan sampel lainnya. Fragmen produk PCR juga memperlihatkan ketebalan pita yang hampir sama. Pada Gambar 3, masih muncul beberapa pita dengan panjang produk yang tidak diinginkan seperti yang terlihat pada sampel nomor 2. Menurut Handoyo dan Rudiretna (2001), hal ini dapat terjadi dikarenakan terjadinya penempelan primer di tempat lain yang tidak diinginkan (*mispriming*), sehingga terbentuk produk meskipun ukurannya tidak sesuai dengan harapan. Menurut Yuwono (2006), suhu 55°C yang digunakan untuk penempelan primer pada dasarnya merupakan kompromi. Amplifikasi akan lebih efisien jika dilakukan pada suhu yang lebih rendah (37 °C), tetapi biasanya akan terjadi *mispriming*. Pada suhu yang lebih tinggi (55°C), spesifitas reaksi amplifikasi akan meningkat tetapi secara keseluruhan efisiensinya akan menurun.



**Gambar 3.** Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik WS-PYLCV-387 FR . M = 1 kb ladder (Fermentas) yang berasal dari sampel Tanah Datar.

#### 4.3.2 Amplifikasi Sampel TD dengan Primer Spesifik Lokasi TD PYLCV-455 FR dan Sampel PSS dengan Primer Spesifik Lokasi PSS primer PSS - PYLCV - 353 FR

Sampel Tanah Datar yang telah positif diuji menggunakan primer spesifik WS-PYLCV-387 FR FR, selanjutnya diamplifikasi kembali menggunakan primer spesifik lokasi Tanah Datar (TD -PYLCV-455 FR). Susunan basa primer dan kondisi program PCR yang digunakan telah dijelaskan di bahan dan metode (Bab 3.4.5). Hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan primer TD PYLCV – 455 FR. M = 1 kb ladder (Fermentas), berasal dari Sampel Tanah Datar

Pengujian menggunakan primer spesifik Tanah Datar pada seluruh sampel Tanah Datar menghasilkan pita pada ukuran 2794 bp. Hal ini mengindikasikan bahwa Sampel TD ini mengandung Geminivirus spesifik Sumatera Barat khususnya pada daerah Tanah Datar. Hanya saja pada sampel nomor tujuh, pitanya terlihat sangat samar dan hampir tidak menunjukkan adanya keberadaan pita. Namun, seluruh sampel ini tetap digunakan untuk pengujian lanjutan.

Selanjutnya dilakukan pengujian sampel PSS dengan mengamplifikasikan sampel PSS menggunakan primer PSS – PYLCV - 353 FR menghasilkan produk dengan panjang pita <1000 bp. Terlihat pada Gambar 5, pita yang terbentuk pada tiap sampel umumnya lebih dari satu pita kecuali sampel nomor 5 yang hanya memiliki satu pita berkisar 300 bp. Sampel nomor 1, 2, 3, 4, 8, 9 dan 10 memiliki dua produk pita utama yang berukuran lebih kurang 300 dan 600 bp. Berbeda dengan sampel nomor 6 dan 7 yang menghasilkan produk dengan panjang pita kira-kira 450 bp dan 600 bp.



**Gambar 5.** Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer PSS – PYLCV - 353. M = 1 kb ladder (Fermentas), 1-10 Sampel Pesisir Selatan

Keseluruhan produk yang dihasilkan tidak satu pun yang sesuai dengan kisaran pita yang diharapkan. Hal ini dapat mengindikasikan bahwa amplifikasi kali ini masih belum berhasil. Diasumsikan bahwa penyebabnya dikarenakan masih belum optimalnya suhu *annealing* yang digunakan, atau telah terjadinya perubahan basa DNA pada sampel tersebut sehingga primer menjadi tidak komplementer dengan *template* yang ada.

Yuwono (2006) menyatakan ada beberapa hal penentu keberhasilan PCR yaitu deoksiribonukleotida triphosphat (dNTP), oligonukleotida primer, DNA template, komposisi larutan buffer, jumlah siklus reaksi, enzim yang digunakan dan faktor teknis dan non teknis lainnya, misalnya kontaminasi. Mengacu pada faktor-faktor yang telah disebutkan sebelumnya, kemungkinan terbesar yang terjadi adalah pada oligonukleotid primer yang digunakan. Suhu *annealing* primer tersebut masih belum optimal sehingga munculnya produk yang tidak sesuai harapan. Suhu yang ditetapkan menggunakan formula  $T_m = ((G+C) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}) + ((A+T) \times 2 \text{ } ^\circ\text{C})$  (Jamsari, 2007) terkadang pada penggunaannya masih belum dapat mengoptimalkan kerja PCR, sehingga perlu dilakukan optimasi kembali untuk mendapatkan suhu yang tepat.

Proses optimasi dapat dilakukan dengan menggunakan kisaran suhu *annealing* yang tidak terlalu jauh berbeda dari suhu *annealing* yang telah dihitung menggunakan formula  $T_m$ , hanya berbeda 2 – 3 $^\circ\text{C}$ . Berdasarkan kendala yang telah dialami sebelumnya maka pengujian sampel PSS dilakukan kembali menggunakan dua sampel terbaik yang dipilih berdasarkan data hasil isolasi sampel PSS. Adapun kedua sampel itu adalah sampel nomor 6 PSS dan 7 PSS. Amplifikasi dilakukan menggunakan primer PSS – PYLCV - 353 FR dan primer WS – PYLCV - 387 FR dengan satu ulangan (sampel 6 dan 7) dan primer PSS dengan satu ulangan (sampel 6 dan 7).

Tujuan dilakukannya amplifikasi dengan menggunakan dua primer tersebut untuk mendeteksi keberadaan Geminivirus Sumatera Barat dan spesifik Pesisir Selatan. Hal ini bertujuan sekaligus optimasi primer untuk mencari suhu yang sesuai untuk primer PSS dan WS terhadap sampel Pesisir Selatan. Hasil amplifikasi pada sampel 6 dan 7 PSS menggunakan primer WS dan primer PSS tidak menghasilkan produk. Seperti yang telah terjadi pada amplifikasi PSS

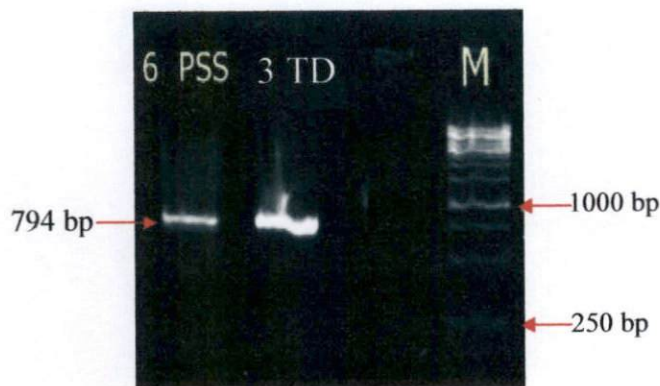
sebelumnya, amplifikasi tidak menghasilkan produk. Untuk menjawab permasalahan diatas juga telah dilakukan optimasi PCR dengan berbagai *range* suhu dan cara ini juga belum menunjukkan hasil yang memuaskan. Faktor yang dapat menyebabkan tidak teramplifikasinya sampel Pesisir Selatan dikarenakan kompleksitas dari DNA tersebut, seperti kandungan basa A, T, G dan C yang tidak seimbang.

Menurut Yuwono (2006) beberapa faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan amplifikasi suatu fragmen DNA antara lain adalah kandungan G + C yang tinggi. Kandungan G + C dalam suatu fragmen DNA akan menentukan kestabilan DNA tersebut. Jika kandungan G + C suatu fragmen DNA tinggi maka ada kecenderungan bahwa fragmen DNA tersebut akan lebih stabil karena masing-masing ikatan G dan C mempunyai tiga ikatan hidrogen. Dengan demikian, akan dibutuhkan energi lebih besar untuk memisahkan untaian DNA tersebut. Sebagai contoh, DNA yang mempunyai kandungan G + C sebesar 40% akan terdenaturasi pada suhu 87°C, sedangkan DNA yang mempunyai kandungan G + C nya sebesar 60% baru akan terdenaturasi pada suhu 95°C (Lewin, 1994). Padahal salah satu langkah penting PCR adalah pemisahan kedua untaian DNA tersebut sehingga primer yang digunakan menempel pada bagian yang komplementer.

Faktor kedua yang mungkin dapat mempengaruhi PCR adalah struktur untaian DNA yang akan diamplifikasi. Geminivirus memiliki *single stranded* DNA (ssDNA) dengan ciri khas penanda *hairpin-loop* yang terbentuk pada saat amplifikasi DNA. Menurut Yuwono (2006), struktur untaian DNA *hairpin-loop* (jepit rambut) yang terbentuk karena DNA untai tunggal yang diamplifikasi mempunyai urutan-urutan nukleotida yang komplementer dan letaknya berdekatan dalam molekul DNA yang sama. Struktur semacam ini dapat menghambat proses penempelan atau pemanjangan primer.

Selain dari kedua faktor diatas, kemungkinan lain penyebab tidak terbentuknya produk amplifikasi adalah bahwa seluruh sampel PSS yang telah diisolasi tidak mengandung Geminivirus strain Sumatera Barat dan Pesisir Selatan. Namun demikian, pengujian tetap dilanjutkan dengan mengamplifikasi sampel menggunakan primer spesifik *Coat protein* (V1).

Amplifikasi menggunakan primer V1 menunjukkan adanya pita berukuran 794 bp pada sampel 6 PSS yang mengindikasikan adanya keberadaan gen *coat protein* didalam sampel tersebut. Melihat keberhasilan dari amplifikasi menggunakan primer V1, maka untuk sampel-sampel pesisir selatan lainnya akan dilakukan juga amplifikasi untuk memverifikasi keberhasilan ini. Hasil amplifikasi terlihat pada gambar di bawah ini.



**Gambar 6.** Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik AV TD21/PSS14 FR. M = 1 kb ladder (Fermentas), 6 PSS = Sampel Pesisir Selatan, 3 TD = Sampel Tanah Datar.

Berdasarkan visualisasi hasil Gambar 6, sampel PSS yang tidak terdeteksi saat diuji menggunakan primer WS dan PSS kemungkinan besar mengalami beberapa perubahan pada genom virus tersebut sehingga saat diuji menggunakan primer yang sama dengan yang sebelumnya tidak dapat menghasilkan produk. Berbeda kasusnya pada pengujian dengan primer V1 yang dapat menghasilkan produk dengan kisaran ukuran yang sesuai harapan. Sesuai dengan pernyataan Brown (2001), gen penyandi *coat protein* lebih *conserved* dan unik dibandingkan gen lainnya sehingga kemungkinan untuk terjadi perubahan itu sangat kecil sekali. Namun asumsi terhadap kondisi gen sampel Pesisir Selatan masih harus dilakukan melalui analisis sekuen nukleotida gen V1 yang merupakan gen yang mempunyai sekuens *conserved* untuk mempelajari secara detail adanya diversitas genetik pada sampel tersebut (Santoso, 2008).

#### 4.3.3 Pengujian Keberadaan Gen V1 (*Coat Protein*) TD dan PSS

Oleh karena dari hasil pengujian sebelumnya sampel Tanah Datar memperlihatkan hasil yang lebih meyakinkan dibandingkan sampel Pesisir Selatan, maka dalam pengujian kelanjutan hanya menggunakan sampel Tanah Datar yang digunakan. Sepuluh sampel Tanah Datar digunakan sebagai *template* untuk uji keberadaan gen penyandi *coat protein* (CP). *Coat protein* yang dikode dengan lambang V1, merupakan gen yang mengekspresikan protein selubung yaitu suatu protein yang bertanggung jawab dalam enkapsidasi partikel virus dan berperan di dalam penentuan spesifitas penularan virus serta perkembangan gejala (Santoso, 2008).

Pengujian sampel TD menggunakan primer spesifik untuk V1 (V1-TD/PSS14-WS FR) menunjukkan hasil positif dengan diduplikasinya pita berukuran sekitar 760 bp. Sama halnya dengan penelitian Siregar (2005) mengenai gen penyandi *coat protein*, amplifikasi gen penyandi *coat protein* menghasilkan panjang produk 760 bp. Sampel 1 hingga 10 secara keseluruhan menunjukkan posisi pita *utama* yang sama dengan konsentrasi yang cenderung sama pula. Hanya pada sampel 10 saja yang konsentrasinya agak sedikit berbeda, terlihat dari konformasi pita yang berpendar. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa seluruh sampel sampel TD mengandung gen penyandi *coat protein* Geminivirus.



**Gambar 7.** Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik V1 TD21/PSS14. M = 1 kb ladder (Fermentas), 1-10 = Sampel Tanah Datar

Dalam tahapan teknik rekayasa genetika khususnya kloning gen dibutuhkan gen dalam bentuk potongan-potongan fragmen yang lebih kecil guna memudahkan proses transfer gen. Fragmen gen dalam ukuran kecil ini dapat didapatkan melalui restriksi gen dengan menggunakan enzim tertentu. Proses

restriksi dapat berjalan dengan efektif apabila adanya sisi pengenalan dan sisi pemotongan pada sekuens DNA yang akan dipotong. Restriksi dapat dilakukan terhadap DNA hasil PCR maupun dari genom secara langsung. Namun kendala yang sering terjadi dalam merestriksi genom adalah sulit ditentukannya sisi pengenalan dan sisi pemotongan pada genom yang akan dipotong, atau hampir sama sekali tidak ditemukan sehingga restriksi menjadi lebih sulit untuk dilakukan.

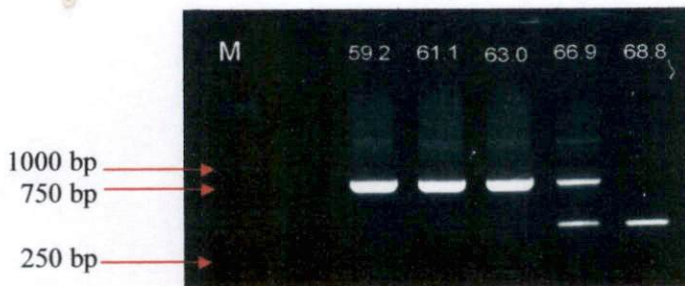
#### 4.3.4 Inkorporasi Adaptor Kloning

Penelitian-penelitian rekayasa gen lebih memilih untuk menggunakan produk amplifikasi PCR yang ditambah dengan beberapa perlakuan terhadap produk amplifikasi. Untuk mempermudah kloning hasil PCR tersebut biasanya primer yang digunakan untuk amplifikasi didesain sedemikian rupa sehingga pada ujungnya mengandung sekuens tempat pemotongan oleh enzim restriksi tertentu (Yuwono, 2006). Posisi tempat kloning pada plasmid pBI121 (Lampiran 2) yang akan digunakan sebagai vektor dalam transformasi ke dalam sel tanaman memiliki sisi pengenalan enzim yang tidak ditemukan pada fragmen gen VI. Oleh karena itu, fragmen gen VI perlu dimodifikasi sehingga terminalnya memiliki sisi pengenalan enzim yang memungkinkan untuk diligasikan ke dalam plasmid pBI121

Untuk tujuan tersebut, primer spesifik VI didesain dengan sisi pengenalan enzim restriksi *XbaI* dan *SmaI*. Adapun urutan basa primer dengan sisi pengenalan enzim telah dijelaskan sebelumnya pada Tabel 1. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, penggunaan formula  $T_m$  untuk mengetahui suhu *annealing* dari suatu primer tidak begitu dapat menentukan kondisi optimum dari suatu primer, oleh sebab itu dilakukan optimalisasi suhu dari primer ini. Primer *XbaI/SmaI* NT merupakan primer pendeteksi gen CP awal yang di bagian ujungnya telah ditambahkan sisi pengenalan terhadap enzim *XbaI* dan *SmaI*. Tujuan penambahan tersebut adalah memudahkan proses restriksi sebagai salah satu tahapan kloning. Adapun suhu *annealing* dari primer ini telah dijelaskan pada bahan dan metode (Sub Bab 3.4.5).

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan *range* suhu berdasarkan perhitungan formula  $T_m$ . Modifikasi suhu  $T_m$  ini diharapkan dapat memberikan

informasi mengenai suhu optimum dari primer yang digunakan. Sehingga untuk tahapan kloning nantinya, produk amplifikasi yang dihasilkan memiliki kualitas dan kuantitas yang layak digunakan. Hasil optimalisasi suhu *annealing* primer dapat dilihat di Gambar 8.



**Gambar 8.** Visualisasi hasil optimalisasi suhu *annealing* produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik *XbaI/SmaI* NT. M = 1 kb ladder (Fermentas), 59.2 - 68.8 = Suhu *annealing* yang digunakan dari Sampel Pesisir Selatan

Dari Gambar 8, dapat dilihat bahwa hampir semua *range* suhu menghasilkan pita. Pada suhu 59.2°C pita yang dihasilkan memiliki kadar kuantitas yang sama dengan suhu 61.1°C dan 63.0°C, namun lebih tinggi dibandingkan dengan suhu 66.9 dan 68.8°C. Selain itu, untuk suhu 59.2 °C tidak begitu terlihat adanya pita sekunder, seperti yang terlihat pada suhu 61.1°C, 63.0°C dan 66.9 °C. Pada suhu 66.9 °C, pita yang dihasilkan ada dua dan hampir tidak dapat dipastikan antara pita utama dan pita sekunder sebab konsentrasi kedua produk relatif sama. Namun dari keseluruhan suhu yang digunakan, suhu optimal yang dapat menghasilkan produk dengan panjang ukuran yang dikehendaki (794 bp) terletak pada suhu 59,2°C. Sedangkan pada suhu 66.9 °C, kisaran panjang pita yang dihasilkan sesuai pada salah satu pita (794 bp) dan berbeda jauh pada pita di bawahnya (500 bp) pada suhu 68.8 °C. Untuk itu dapat dikatakan bahwa suhu optimum primer *XbaI* NT dan *SmaI* NT terletak pada suhu 59.2°C.

Selanjutnya amplifikasi dilakukan menggunakan komposisi *master mix*, sebab produk PCR yang dihasilkan ini akan digunakan dalam proses restriksi. Adapun komposisi yang digunakan sesuai dengan komposisi yang disarankan

oleh Nellen (2011) seperti yang telah tertera pada Tabel 1. Hasil yang diperoleh dari amplifikasi ini dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik *XbaI/SmaI* NT. M = 1 kb ladder (Fermentas); 1-5 = Sampel Tanah Datar.

Pada nomor sampel 1, 2, 3, 4 dan 5 dapat dilihat bahwa produk yang dihasilkan sesuai dengan panjang ukuran yang diharapkan yakni ~ 800 bp. Sampel yang menghasilkan produk terbaik adalah sampel 3 dimana hanya terdapat satu pita utama saja. Berbeda dengan sampel 1, 2 dan 4 yang mempunyai bayangan di atas pita utama. Visualisasi yang dihasilkan pada keseluruhan pita (termasuk *marker*) tidak begitu baik. Hal ini dapat terjadi karena dipengaruhi oleh beberapa hal seperti menurunnya kualitas dari agarose gel yang digunakan (lebih dari 3 kali pemakaian) atau kurang fokusnya alat dokumentasi yang digunakan. Sampel nomor 5, terlihat samar seakan tidak ada produk yang terbentuk, namun seluruh sampel tetap digunakan untuk restriksi sebagai tahapan preparasi kloning.

#### 4.3.4 Preparasi Gen CP Sebagai Tahapan Kloning

Lima produk amplifikasi sampel Tanah Datar, direstriksi menggunakan *double restriction method* dengan tujuan agar fragmen yang dihasilkan memiliki dua pola ujung yang berbeda. Bagian yang direstriksi menggunakan enzim *XbaI* akan menghasilkan ujung kohesif kompatibel dengan sisi pengenalan 5' T↓CTAGA 3'. Sedangkan enzim *SmaI* dengan sisi pengenalan 5' CCC↓GGG 3' nantinya akan menghasilkan ujung buntu. Pada restriksi seperti ini akan memudahkan dalam proses ligasi. Dari hasil restriksi yang telah dilakukan, tidak diperoleh adanya produk restriksi yang dihasilkan. Hanya terlihat satu pita utama

yang sejajar dengan pita non restriksi. Hal ini mengindikasikan bahwa enzim restriksi tidak bekerja sama sekali meskipun memiliki sisi pengenalan dan sisi pemotongan pada ujung amplifikasi. Asumsi ini terbukti, setelah diketahui bahwa ternyata enzim *XbaI* yang digunakan mengalami metilasi (Fermentas, 2011).

Menurut Jamsari (2007), metilasi adalah suatu mekanisme imunisasi sebagai upaya untuk mempertahankan keutuhan molekul DNA sendiri dari pemutusan yang disebabkan oleh enzim restriksi yang dimilikinya. Enzim *XbaI* yang digunakan mengalami metilasi pada senyawa adenin dengan urutan sekuens GATC yang disebut dengan *dam-methylase*. Oleh sebab itu, primer yang telah digunakan perlu didesain ulang, sebab jika tidak proses restriksi tidak akan dapat berhasil. Selanjutnya kegiatan transformasi dilakukan tanpa diawali kegiatan restriksi terlebih dahulu.

Akibat adanya aktivitas *dam-methylase* pada enzim *XbaI* NT, maka didesainlah primer baru yang memiliki sisi pengenalan enzim *BamHI*. Adapun urutan sekuens primer dengan sisi pengenalan enzim ini tertera pada Tabel 1. Uji akurasi primer ini awalnya menggunakan *range* suhu antara 55,2°C - 63,9°C, namun tidak ada produk yang dihasilkan. Untuk mengoptimalkan kerja PCR dicoba beberapa *range* suhu mulai dari 56° C – 70° C dengan berbagai kondisi reaksi.

Perbedaan penggunaan komposisi reaksi didasarkan pada perbedaan hasil produk yang mampu dibentuk akibat penggunaan Kit PCR yang berbeda produsen. Untuk analisis DNA yang hanya sebatas melihat keberadaan suatu gen tertentu dan hasil amplifikasi tidak digunakan untuk analisis lanjutan, kit yang digunakan umumnya cukup dengan *Go Taq Green* (Promega, 2009). Namun jika hasil amplifikasi tersebut ditujukan sebagai bahan awal bagi analisis lanjutan seperti sekuensing dan transformasi maka kit yang dapat digunakan salah satunya *Ready To Go* (RTG) PCR *Bead*.

Dalam penggunaannya, komposisi PCR ini memiliki performa yang berbeda. Kit RTG PCR *bead* akan menghasilkan produk dengan pita utama tanpa adanya produk sekunder, seperti yang kerap terjadi bila menggunakan *Go Taq Green*. Dari segi kuantitas hasil yang diperoleh penggunaan kit ini lebih baik dibandingkan *master mix* yang manual. Namun dipandang dari segi ekonomis,

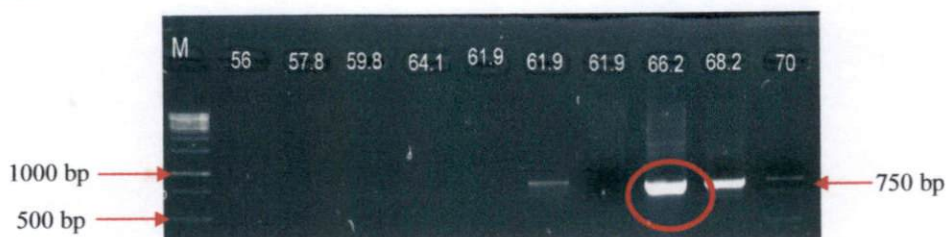
penggunaan kit RTG PCR *bead* cukup mahal bila dibandingkan Kit *Go taq Green* dan *master mix*. Berdasarkan pertimbangan di atas, maka untuk optimasi primer ini digunakan berbagai macam pasangan primer dan komposisi reaksi pada.

**Tabel 4.** Keterangan tiap reaksi uji akurasi suhu *annealing*

No	Suhu <i>Annealing</i> (°C)	Nomor Sampel	Primer	Komposisi Reaksi*
1	56	8 TD	<i>Bam</i> HI NT/ <i>Sma</i> I-a	<i>Master mix</i> PCR
2	57,8	8 TD	<i>Bam</i> HI NT/ <i>Sma</i> I-a	<i>Master mix</i> PCR
3	59,8	8 TD	<i>Bam</i> HI NT/ <i>Sma</i> I-a	<i>Master mix</i> PCR
4	64,1	8 TD	<i>Bam</i> HI NT/ <i>Sma</i> I-a	<i>Master mix</i> PCR
5	61,9	Sampel TD Labor	<i>Bam</i> HI NT/ <i>Sma</i> I-a	<i>Master mix</i> PCR
6	61,9	8 TD	<i>Bam</i> HI NT/ <i>Sma</i> I NT	<i>Master mix</i> PCR
7	61,9	8 TD	<i>Bam</i> HI NT/ <i>Sma</i> I-a	<i>Go Taq Green</i>
8	66,2	3 TD	<i>Bam</i> HI NT/ <i>Sma</i> I NT	<i>Go Taq Green</i>
9	68,2	3 TD	<i>Bam</i> HI NT/ <i>Sma</i> I NT	<i>Go Taq Green</i>
10	70	3 TD	<i>Bam</i> HI NT/ <i>Sma</i> I NT	<i>Go Taq Green</i>

\*Komposisi reaksi yang digunakan telah disajikan pada Sub Bab 3.4.5.

Dari berbagai macam kondisi reaksi tersebut, dihasilkan produk PCR seperti yang tertera pada Gambar 10. Dapat dilihat bahwa produk yang muncul adalah produk dari primer *Bam*HI/*Sma*I NT. Sedangkan dengan menggunakan primer *Bam*HI NT/*Sma*I-a tidak menghasilkan produk sama sekali. Hal ini berarti bahwa primer spesifik yang sesuai untuk mendeteksi keberadaan gen CP dengan pola pengenalan enzim *Bam*HI dan *Sma*I adalah *Bam*HI/*Sma*I NT. Suhu optimal dari primer ini berkisar pada suhu 66.2 °C. Sedangkan untuk suhu 70 °C, pita yang terbentuk lebih dari satu, sehingga dapat dipastikan bahwa untuk suhu tersebut kinerja primer menjadi semakin menurun. Kondisi ini dapat dilihat jelas pada Gambar 10.

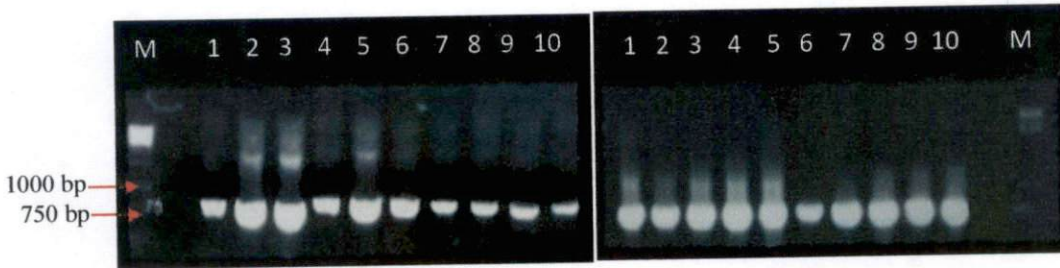


**Gambar 10.** Visualisasi hasil gradient PCR DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik *Bam*HI NT/*Sma*I NT. M = 1 kb ladder (Fermentas), 56 - 70 = kisaran suhu *annealing* yang digunakan untuk amplifikasi Sampel Tanah Datar.

Pada suhu 61.9 °C yang menggunakan pasangan primer *Bam*HI NT dan *Sma*I NT, terlihat adanya pita dengan ukuran yang sesuai, hanya saja kuantitas yang dihasilkan sangat kecil. Hal ini terjadi dikarenakan suhu yang digunakan untuk penempelan primer belum optimal. Primer akan membentuk ikatan hidrogen dengan cetakan pada daerah sekuens yang komplementer dengan sekuens primer. Amplifikasi akan lebih efisien jika dilakukan pada suhu yang lebih rendah (37°C), tetapi biasanya akan terjadi *mispriming*.

Selain itu juga penggunaan komponen reaksi PCR dengan *master mix*, yang cenderung menghasilkan produk jauh lebih kecil kuantitas dibandingkan penggunaan kit PCR. Seperti yang telah dipaparkan sebelumnya, penggunaan kit PCR akan menghasilkan visualisasi yang lebih baik dibandingkan dengan yang manual. Sebab kit-kit yang dijual di pasaran memiliki ketepatan jumlah dan konsentrasi yang lebih baik dibandingkan yang manual. Selain itu, kit yang dijual di pasaran umumnya didasarkan pada kebutuhan konsumen. Meskipun terkadang harganya mahal, namun jika hanya dengan menggunakan sistem inilah yang sesuai dengan target serta kompatibel untuk alat yang dimiliki, penggunaan kit akan lebih menghemat waktu pada awal rancangan percobaan dan optimasi (Takara Bio USA, 2008).

Setelah didapatkannya suhu optimasi dari primer *Bam*HI NT dan *Sma*I NT, maka dilakukan amplifikasi seluruh sampel, baik dari Tanah Datar maupun Pesisir Selatan untuk memverifikasi keberadaan gen penyandi coat protein pada seluruh sampel. Dari hasil amplifikasi diperoleh (Gambar 11), gambar A menunjukkan adanya pita pada ukuran sekitar 800 bp dari seluruh sampel yang diuji. Hanya saja terdapat perbedaan kuantitas yang dihasilkan dari masing-masing sampel. Sampel 2, 3, 5 dan 6 memiliki konsentrasi yang cukup tinggi dibandingkan dengan sampel nomor 1, 4, 7, 8, 9, dan 10. Sedangkan untuk sampel Pesisir Selatan, hampir seluruh sampel menghasilkan pita dengan konsentrasi yang sama kecuali sampel nomor 6 yang terlihat sedikit rendah. Hasil ini mengindikasikan bahwa seluruh sampel, baik Tanah Datar maupun Pesisir Selatan mengandung gen penyandi *coat protein*.



**Gambar 11.** Visualisasi produk amplifikasi DNA Geminivirus dengan kombinasi primer spesifik *Bam*HI NT/ *Sma*I NT. M = 1 kb ladder (Fermentas), A = Tanah Datar, B = Pesisir Selatan

#### 4.4 Kloning Gen *Coat protein*

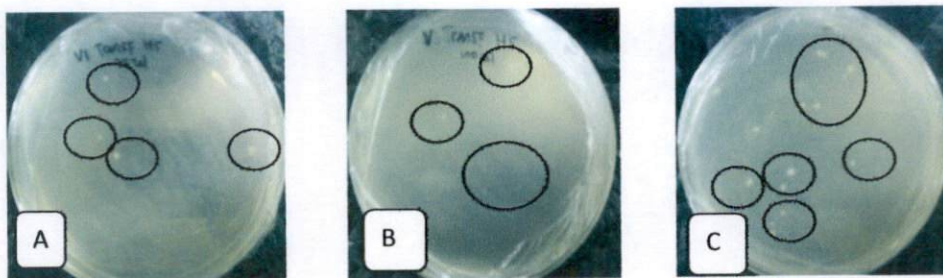
##### 4.4.1. Ligasi Gen Penyandi *Coat protein* ke dalam Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T *Easy vector* dan Transformasinya ke dalam *E. coli*.

Ligasi gen penyandi *coat protein* ke dalam plasmid pGEM<sup>®</sup>-T *Easy vector* diawali dengan mengamplifikasi sampel TD menggunakan primer spesifik VI *Bam*HI NT dan *Sma*I NT. Tujuan pengkloning fragmen gen VI ke pGEM<sup>®</sup>-T *Easy vector* adalah untuk menyimpan fragmen DNA sehingga mempermudah perbanyakan fragmen dan pemilihan enzim restriksi yang sesuai untuk kloning (Santoso, 2008).

Hasil amplifikasi yang diperoleh selanjutnya digunakan dalam proses ligasi. Kualitas dan kuantitas dari hasil amplifikasi tersebut akan mempengaruhi keberhasilan dan efektivitas ligasi. Ligasi produk PCR ke dalam pGEM<sup>®</sup>-T *Easy vector* adalah sebagai salah satu tahapan untuk perbanyakan fragmen atau yang biasa dikenal dengan kloning. Ligasi produk PCR ke dalam plasmid pGEM<sup>®</sup>-T *Easy vector* dilaksanakan menggunakan protokol sesuai rekomendasi dari Promega USA (2009). Hasil ligasi dari fragmen ke dalam suatu plasmid sulit untuk dideteksi secara langsung, sebelum dilakukan transformasi ke dalam bakteri. Salah satu cara untuk mendeteksi keberhasilan ligasi adalah dengan mengamplifikasi fragmen DNA menggunakan primer spesifik yang dilanjutkan dengan proses sekuensing DNA. Namun cara tersebut dianggap tidak ekonomis dan efisien. Oleh sebab itu, setelah kegiatan ligasi dilakukan tahapan transformasi plasmid rekombinan ke dalam inangnya yaitu bakteri *Escherichia coli*.

Transformasi plasmid hasil ligasi dilakukan dengan menggunakan dua metode. Metode pertama menggunakan metode *heat shock* (Froger, 2007) dan metode kedua menggunakan elektroporasi berdasarkan prosedur dari *Cell-Porator*<sup>TM</sup> *Voltage Booster* (Life Technologies, USA) (Wolf, 2010). Transformasi plasmid ke dalam *E.coli* menggunakan kedua metode diatas tidak membuahkan hasil. Hal ini terlihat dari hasil *plating* kedua metode tidak menunjukkan adanya koloni yang tumbuh pada media LB padat selektif yang dilengkapi dengan *chloramphenicol*, *ampicilin*, IPTG dan *X-gal*. Penyebab tidak tumbuhnya *E. coli* transforman pada media tersebut karena tidak adanya plasmid di dalam sel *E. coli*. Dapat dikatakan bahwa proses transformasi masih belum berhasil sehingga akhirnya ligasi dilakukan kembali.

Transformasi dilakukan menggunakan metode *heat shock* yang sama dengan transformasi sebelumnya. Selanjutnya hasil transformasi di-*plating* ke dalam media LB padat yang berisi antibiotik *ampicilin*, IPTG dan *X-gal* (*blue-white selection*).



**Gambar 12.** Visualisasi hasil *plating* transformasi *E.coli*. A = Transformasi *Heat Shock* 75  $\mu$ L, B = Transformasi *Heat Shock* 100  $\mu$ L, C = Sel Kompeten (Kontrol Negatif)

Pada Gambar 12 (A dan B) terlihat beberapa koloni putih yang tumbuh pada medium LB padat. Pada gambar A lebih kurang ada 4 koloni yang tumbuh, gambar B 5 koloni, gambar C kurang lebih ada 10 koloni. Pada *plating* sel kompeten gambar C, jumlah koloni yang tumbuh lebih banyak dibandingkan dengan *plating* Gambar A dan B. Seharusnya pada kontrol negatif (Gambar C) diharapkan tidak ada koloni yang tumbuh. Sehingga bila mengacu pada kontrol

negatif tersebut, asumsinya bahwa *plating* A dan B bukanlah hasil transformasi, melainkan kontaminan.

Keberadaan plasmid di dalam sel *E. coli* merupakan sumber gen ketahanan terhadap antibiotik (*ampicilin*) yang dapat membuatnya bertahan dalam medium LB selektif. Namun kenyataannya hasil *plating* pada kontrol negatif tersebut ditumbuhi oleh beberapa koloni asing yang kemungkinan besar bukanlah bakteri *E.coli* transforman, melainkan bakteri lain yang memiliki ketahanan terhadap *ampicilin*. Untuk memastikan kebenaran ini dilakukan pengujian dengan menggunakan metode PCR koloni.

Pengujian hasil *plating* melalui metode PCR koloni dilakukan menggunakan primer spesifik T7/SP6 yang merupakan primer penanda untuk plasmid pGEM<sup>®</sup>-T *Easy Vector*. Apabila didapatkan produk >800 bp berarti transformasi plasmid rekombinan ke dalam *E. coli* berhasil. Hasil PCR koloni menunjukkan bahwa tidak ada produk yang sesuai ukuran. Hal ini semakin memperkuat asumsi bahwa koloni yang tumbuh adalah bakteri kontaminan.

Kontaminasi merupakan masalah yang serius pada proses transformasi. Secara morfologi, bakteri yang tumbuh ini memiliki bentuk morfologi yang mirip dengan bakteri transforman (berwarna putih). Penggunaan bakteri *E.coli* strain DH5 $\alpha$  beresiko tinggi untuk terkontaminasi. Alasannya karena bakteri strain ini tidak memiliki plasmid R (resistensi) yang tahan terhadap antibiotik tertentu sebagai seleksi. Sehingga tidak semua bakteri dapat tumbuh dalam medium seleksi kecuali bakteri yang memiliki ketahanan terhadap antibiotik tertentu itu juga. Strain bakteri *E. coli* yang memiliki plasmid R salah satunya adalah *E. coli* BL21( DE3).

*E.coli* strain BL21 memiliki ketahanan terhadap antibiotik *chloramphenicol* sebagai seleksinya. Selain itu keunggulan dari *E.coli* BL21 ini bersifat *high-level expression* yang sesuai dengan T7 promoter (Tolia, 2006). Oleh karena itu transformasi dilakukan kembali dengan menggunakan metode *heat shock* ke dalam bakteri *E.coli* strain BL21. Pada awal penggunaan bakteri BL21 tidak ada satu pun koloni yang tumbuh pada media. Kondisi demikian terjadi pada bakteri *E.coli* strain BL21 yang tergolong *low copy number*.

Bakteri yang tidak tumbuh dalam medium *plating* dikarenakan tidak adanya plasmid yang terinsersi dalam bakteri tersebut. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa plasmid berfungsi sebagai seleksi. Kondisi ini mengindikasikan bahwa tidak berhasilnya proses transformasi salah satunya diakibatkan karena tidak berhasilnya proses ligasi. Proses ligasi sangat ditentukan oleh kemurnian DNA yang diligasi. Penggunaan *system clean up* DNA melalui pemisahan pita DNA dari gel agarose (purifikasi gel) meningkatkan persentase akan koloni yang berisi plasmid *correct insert* (Zhou, 2000).

Pada proses ligasi ada beberapa kemungkinan yang dapat terjadi. Anam (2009) menjelaskan ada tiga kemungkinan yang dapat terjadi. Pertama vektor menyambung pada vektor itu sendiri, kedua vektor menyambung dengan vektor lain (terjadi ligasi antar vektor) dan ketiga vektor menyambung dengan insert. Untuk meminimalisasi kemungkinan pertama dan kedua, sebaiknya diperlakukan dengan enzim *alkaline phosphatase* (Yuwono, 2006).

Haqqi (1992) juga menyarankan untuk melakukan purifikasi produk PCR terlebih dahulu agar meningkatkan efisiensi transformasi. Selain purifikasi, faktor lain yang juga mempengaruhi proses ligasi adalah konsentrasi dari plasmid dan DNA yang digunakan. Oleh sebab itu, dilakukan sedikit modifikasi dari konsentrasi plasmid pGEM<sup>®</sup>-T *Easy vector* yang digunakan. Adapun komposisi yang digunakan sebagai berikut.

**Tabel 5.** Komposisi *cocktail* ligasi

Komposisi	Pengenceran (μL)	Non Pengenceran (μL)
T4 DNA Ligase	1	1
2x Rapid Ligation Buffer	5	10
pGEM <sup>®</sup> -T <i>Easy Vector</i>	1	1
DNA Hasil PCR	3	1
Water/ddH <sub>2</sub> O	-	7
Total	10	20

**Tabel 6.** Kondisi reaksi ligasi yang dibuat

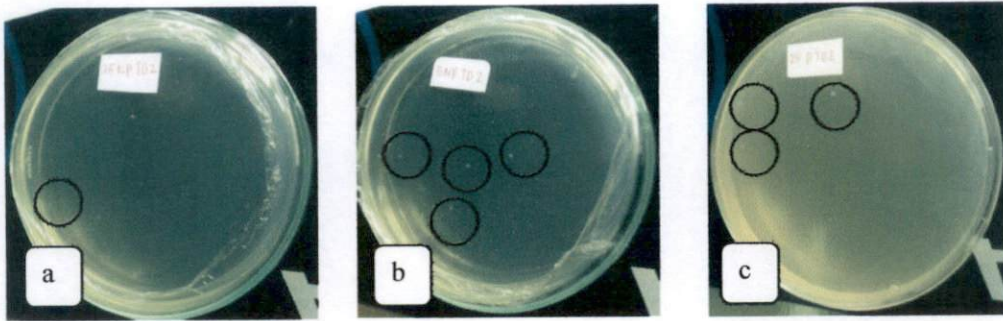
Konsentrasi pGEM®-T <i>Easy Vector</i>			
Pengenceran (5 ng/ $\mu$ L)		Non Pengenceran (25 ng/ $\mu$ L)	
Purifikasi	Non Purifikasi	Purifikasi	Non Purifikasi
Sampel TD 2	Sampel TD 2	Sampel TD 2	Sampel TD 2
Sampel PSS 2	Sampel PSS 2	Sampel PSS 2	Sampel PSS 2

Tujuan dilakukan pengenceran adalah untuk menyesuaikan antara konsentrasi plasmid dan fragmen hasil amplifikasi. Jika konsentrasi insert kecil maka konsentrasi plasmid yang digunakan juga kecil. Perbandingan konsentrasi antara plasmid dan DNA adalah 1 : 3 (Promega, 2009). Diketahui juga bahwa fraksi/banyaknya koloni koloni berwarna putih tergantung pada konsentrasi hasil PCR yang digunakan. Hasil optimal diperoleh jika perbandingan antara fragmen hasil PCR dengan vektor yang digunakan adalah 3 : 1. Plasmid yang mempunyai tambahan ujung T ini juga diketahui memberikan efisiensi hasil kloning yang 25 kali lebih tinggi dibanding dengan plasmid yang mempunyai ujung tumpul (Yuwono, 2006).

Transformasi dilakukan menggunakan metode *heat shock* lalu di-*plating* pada medium seleksi LB padat selektif. Hasil *plating* pada delapan petri memperlihatkan tiga *petridish* yang ditumbuhi oleh bakteri *E.coli* seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 13. Bakteri *E.coli* yang tumbuh berbentuk koloni bulat dan berwarna biru muda. Pada petri A (25NPTD 2) ditumbuhi 1 koloni, sedangkan pada petri B (5NPTD 2) ditumbuhi 4 koloni dan petri C (25PTD 2) ditumbuhi 3 koloni. Koloni yang tumbuh merupakan koloni hasil ligasi gen penyandi *coat protein* menggunakan sampel Tanah Datar (Gambar A, B, C).

Grooms (2009) menyebut koloni yang berwarna biru muda ini dengan *pale blue colonies*. *Pale blue colonies* ini tidak mengidentifikasi bahwa koloni ini memiliki insert atau tidak. Sebagai mana prinsip dari *blue white selection* ini adalah akan muncul koloni putih apabila gen asing telah terinsert, sebaliknya bila tidak ada ada insert maka koloni yang terbentuk adalah berwarna biru terang. Namun, untuk koloni yang berwarna biru muda masih belum dapat dinyatakan

ada atau tidaknya insert. Koloni berwarna biru muda dapat dilihat pada Gambar di bawah ini.



**Gambar 13.** Visualisasi hasil *plating* transformasi metode *heat shock*. Koloni biru muda (*Pale blue*) pada plate a, b dan c. a (25NPTD 2) = 1 koloni, b (5NPTD 2) = 4 koloni, c (25PTD2) = 3 koloni. Transformasi sampel Tanah Datar.

Dalam seleksi biru putih, sering ditemukannya fenomena koloni biru yang memiliki DNA insersi. Hal ini dapat terjadi saat stop kodon “*absent*” pada *insert* sehingga gen *LacZ* tetap fungsional mengekspresikan protein atau adanya proses perubahan kembali dari warna putih menjadi warna biru. Mangunwardoyo (2002) menyatakan bahwa transforman yang dihasilkan ada yang berwarna biru dan putih atau putih berubah menjadi biru, adanya warna biru karena senyawa *X-gal* dalam medium. Hal ini terjadi karena adanya  $\alpha$ -komplementasi dimana vektor plasmid pada bagian poli-lingkernya masing-masing mengkode 146 asam amino dari  $\beta$ -galaktosidase ( $\beta$ -gal), sedangkan inangnya mengkode bagian C-terminal dan merupakan komplemen dari  $\beta$ -gal.

Jika gen penyandi amino terminal  $\beta$ -gal dari vektor plasmid dirusak dengan adanya fragmen DNA, maka protein  $\beta$ -gal tidak terbentuk. Hal ini menyebabkan koloni yang berwarna putih pada medium mengandung *X-gal*, sedangkan koloni yang melakukan komplementasi berwarna biru. Terjadinya perubahan koloni yang berwarna putih menjadi biru kembali. kemungkinan disebabkan adanya pergeseran kerangka baca (*frameshift*) dari protein. Selain itu juga mungkin disebabkan adanya aktivitas eksonuklease yang memotong fragmen tersebut (Davis, 1994). Oleh sebab itu perlu dilakukan pengujian lanjut dengan

mengisolasi plasmid tersebut dan mengamplifikasinya dengan primer spesifik. Isolasi plasmid telah dilakukan dengan metode *Quick and Dirty* (Bi). Adapun hasil yang didapatkan tertera pada Gambar 14.



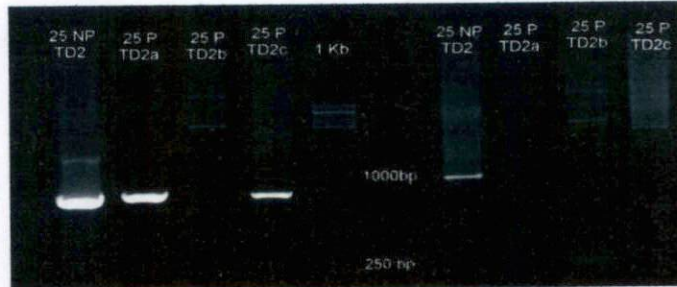
**Gambar 14.** Visualisasi hasil isolasi plasmid transforman gen CP; M =  $\lambda$  DNA 50 ng/ $\mu$ l, 1 kb ladder (Fermentas); 1 = 25 PTD2 (a); 2 = 25 PTD2 (b); 3 = 25 PTD2 (c); 4 = 25 NPTD2; 5 = 5 PTD2 (a); 6 = 5 PTD2 (b); 7 = 5 PTD2 (c); 8 = 5 PTD 2 (d).

Hasil isolasi plasmid menunjukkan adanya tiga bentuk pita DNA pada seluruh sampel dan lebih terlihat jelas pada sampel 1 hingga 4, yaitu plasmid berbentuk superheliks yang posisinya paling jauh dari sumur gel. Sedangkan pita kedua yang posisinya sejajar dengan lamda DNA berbentuk linear. Pita terakhir yang posisinya berada dekat sumur gel ini disebut dengan bentuk sirkuler terbuka. Semakin kompak suatu DNA, maka migrasinya akan semakin cepat sehingga pada saat yang bersamaan akan bermigrasi lebih jauh dibandingkan dengan bentuk yang kurang kompak. DNA superheliks lebih kompak dibandingkan dengan DNA plasmid dalam keadaan sirkuler terbuka atau linear (Anam, 2009).

Sampel nomor 1 – 4 menunjukkan bentuk yang hampir sama dengan konsentrasi yang sama pula. Berbeda dengan sampel nomor 4 – 8 yang cenderung lebih tipis. Hal ini dipengaruhi oleh penggunaan plasmid yang telah diencerkan sebelumnya (Tabel 5 dan 6). Sampel 1-4 menggunakan plasmid pGEM<sup>®</sup>-T *Easy vector* tanpa pengenceran, berbanding terbalik dengan sampel 5-8. Untuk itu plasmid yang dihasilkan pun memiliki konsentrasi yang berbeda. Sehingga untuk tahap pengujian selanjutnya, dipilih 4 sampel terbaik dengan konsentrasi tinggi.

Sebanyak 4 sampel terpilih (25 NPTD2, 25 PTD2 (a), 25 PTD2 (b), 25 PTD2 (c)) diuji untuk memverifikasi keberadaan plasmid rekombinan melalui PCR

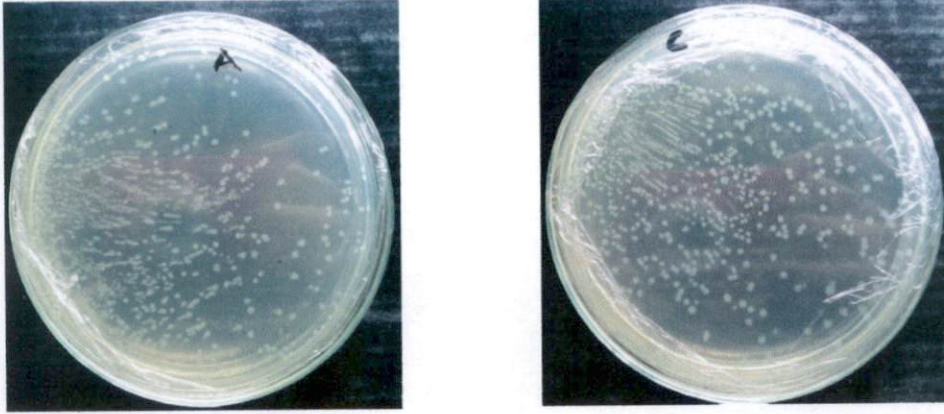
menggunakan primer spesifik V1 *Bam*HI/*Sma*I NT dan primer T7/SP6. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa sampel plasmid 25 NPTD 2 menghasilkan produk berukuran sekitar 800 bp untuk *coat protein gene* (V1) dan sekitar 1000 bp untuk pGEM<sup>®</sup>-T yang telah terinsersi gen CP. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



**Gambar 15.** Visualisasi hasil amplifikasi isolasi plasmid transforman gen CP menggunakan primer spesifik. M = 1 kb ladder (Fermentas); NP = Non Purifikasi, P = Purifikasi.

Berdasarkan Gambar 15, hanya satu sampel yang terbukti positif terinsersi gen CP sampel Tanah Datar. Berbeda dengan sampel 25 PTD2 yang hanya positif dengan primer V1 namun negatif pada primer T7/SP6. Begitu juga dengan yang lainnya. Dari hasil ini dapat dikatakan bahwa tanpa adanya pengenceran dan purifikasi proses ligasi tetap menunjukkan keberhasilan.

Hal ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan Haqqi (1992) dalam jurnalnya “*Direct ligation of PCR products for cloning and sequencing*” yang membuat protokol kloning DNA produk PCR secara langsung tanpa adanya manipulasi seperti purifikasi gel, memberi perlakuan pada ujung pita produk PCR dengan T4 DNA *polymerase* dan fosforilasi melalui T4 *polynucleotide kinase* atau menggunakan vektor khusus. Sampel tersebut selanjutnya digunakan untuk dilakukan transformasi ke dalam *E. coli* BL21 menggunakan metode *heat shock*. Gambaran mengenai hasil transformasi dapat dilihat pada Gambar 16.

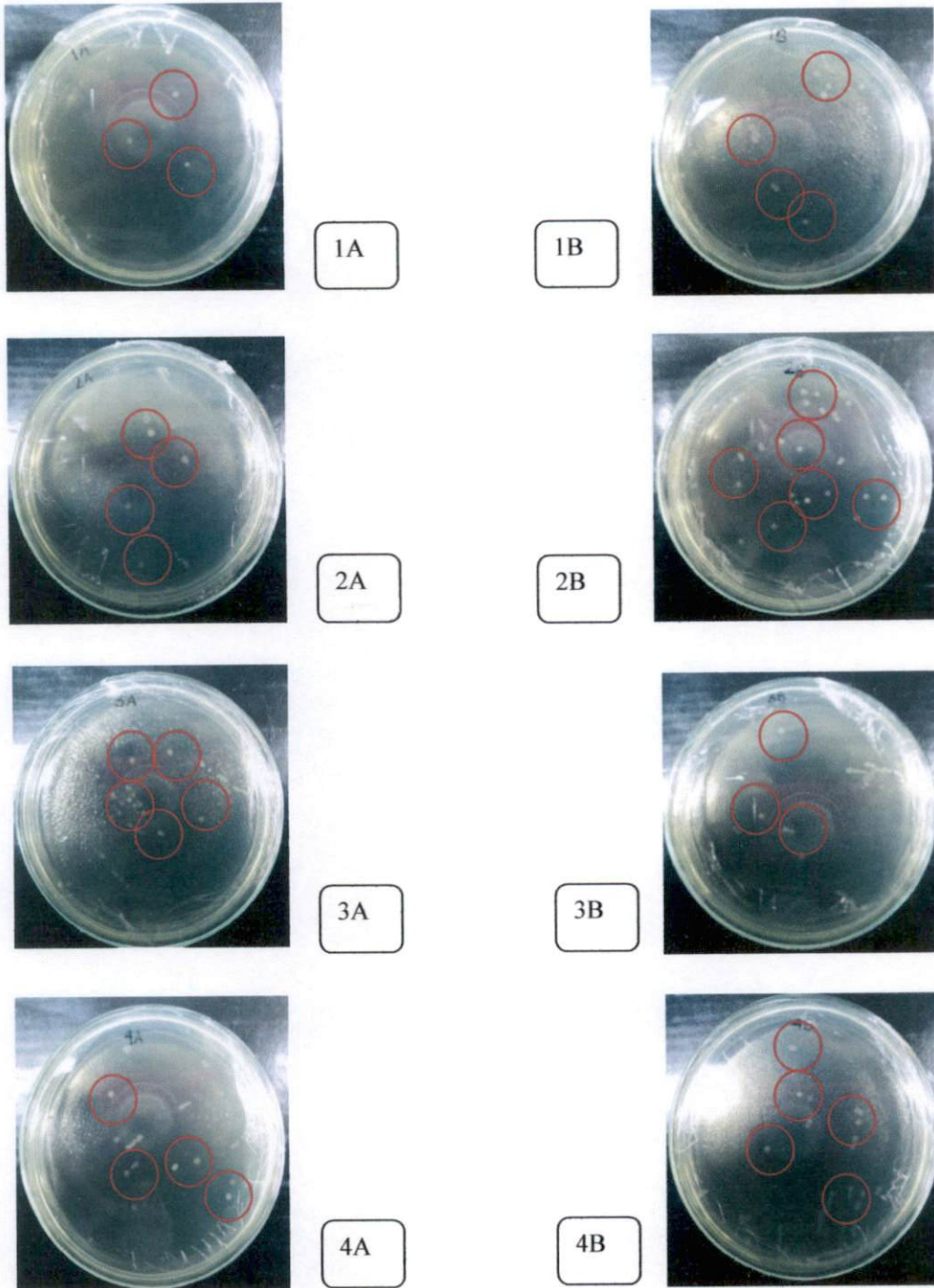


**Gambar 16.** Visualisasi hasil *plating* transformasi metode *heat shock*. Koloni putih pada *plate* A dan C. A = 5  $\mu$ L plasmid 25 NP TD2, C = 10  $\mu$ L 25 NP TD 2.

Dari kedua hasil *plating* tersebut dipilih lima koloni tiap petri secara acak untuk memverifikasi plasmid rekombinan menggunakan PCR koloni. Hasil PCR koloni menunjukkan bahwa seluruh koloni positif membawa plasmid rekombinan insersi gen CP sampel Tanah Datar dengan diperolehnya pita berukuran sekitar 800 bp pada penggunaan primer spesifik V1 *Bam*HI/*Sma*I NT, dan 1000 bp pada penggunaan primer T7/SP6.

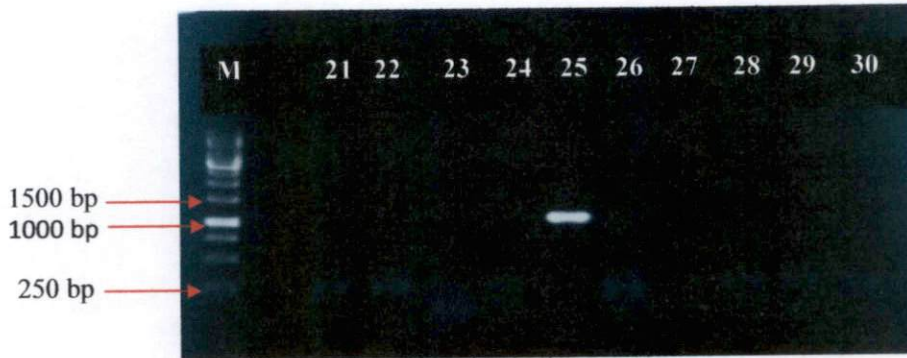
Dikarenakan masih belum didapatkannya transforman sampel Pesisir Selatan maka kloning dilakukan kembali. Hasil *plating* menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri berwarna putih pada delapan media selektif. Namun, tidak dapat dipastikan antara koloni yang berisi plasmid rekombinan dengan koloni yang berisi plasmid kosong. Hal ini disebabkan karena tidak diberikannya *X-gal* dan IPTG dalam media selektif yang merupakan substrat bagi gen *LacZ* untuk mengekspresikan warna biru.

Dipilih lima koloni secara acak dari delapan *petridish* (Gambar 17) untuk diuji dengan PCR koloni. Masing-masing koloni diamplifikasi menggunakan primer T7/SP6 dan sekaligus dibuat *master plate* dari keseluruhan koloni yang digunakan.



**Gambar 17.** Visualisasi hasil *plating* transformasi metode *heat shock*. Koloni putih pada plate yang dilingkari pada gambar 1A – 4B adalah koloni transforman. 1A - 2B = Sampel Tanah Datar, 3A-4B = Sampel Pesisir Selatan,

Dari empat puluh reaksi yang telah dibuat hanya sampel nomor 25 yang terbukti positif membawa gen CP sampel Pesisir Selatan (Gambar 18). Hal ini dibuktikan dengan diperolehnya pita berukuran sekitar 1000 bp. Selanjutnya, koloni bakteri transforman tersebut di isolasi plasmidnya, untuk dilakukan pengujian lanjutan.

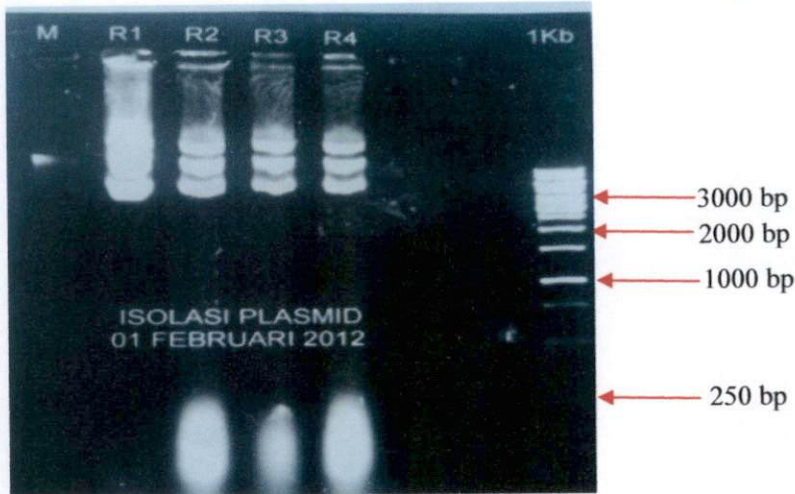


**Gambar 18.** Visualisasi hasil PCR koloni menggunakan primer spesifik T7SP6. Sampel 21-30 = Koloni hasil transformasi Sampel Pesisir Selatan. Sampel 25 = positif tertransformasi gen CP dengan panjang pita 1000 bp, Sampel 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 29 dan 30 = plasmid kosong dengan panjang pita 250 bp.

Isolasi plasmid dilakukan tiga ulangan yaitu R1, R2, R3 dan R4. Hasil isolasi plasmid menunjukkan tiga konformasi pita yang hampir sama dengan isolasi plasmid sampel Tanah Datar. Hanya saja konformasi dari ketiga pita ini cenderung hampir sama. Selain itu, hasil isolasi plasmid yang diperoleh tidak begitu murni hasilnya dikarenakan adanya molekul RNA pada sampel kode R2, R3, dan R4. Hal ini terjadi akibat tidak adanya penggunaan RNA-se pada sampel R2 dan R4. Sampel R1 dan R3 menggunakan RNA-se, namun hanya sampel R1 saja yang tidak menunjukkan adanya RNA.

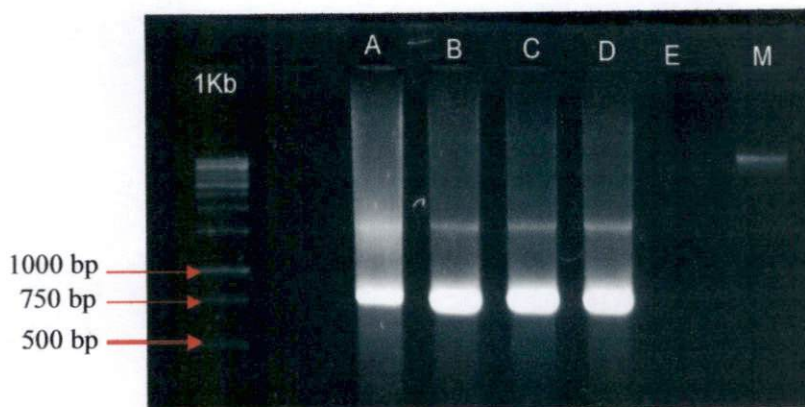
Penggunaan RNA-se dapat membantu menghilangkan molekul-molekul RNA yang masih tersisa. Molekul RNA yang masih tersisa dianggap sebagai kontaminan yang dapat mempengaruhi efisiensi tindakan rekayasa yang akan dilakukan selanjutnya. Untuk itu segera setelah diperolehnya DNA hasil isolasi, maka tindakan yang mutlak dilakukan adalah melakukan kontrol terhadap kualitas DNA yang diperoleh. Kegiatan ini dapat dilakukan dengan merunning DNA pada

elektroforesis standar dengan menggunakan gel agarose berkonsentrasi 0,75% atau 1% selama lebih kurang 60-90 menit (Jamsari, 2007).



**Gambar 19.** Visualisasi hasil elektroforesis isolasi plasmid transforman gen CP. M =  $\lambda$  DNA 50 ng/ $\mu$ l, 1 kb ladder (Fermentas). R1, R2, R3 dan R4 = hasil isolasi dari Master plate nomor 25 yang diambil dari plate 3A (Gambar 18).

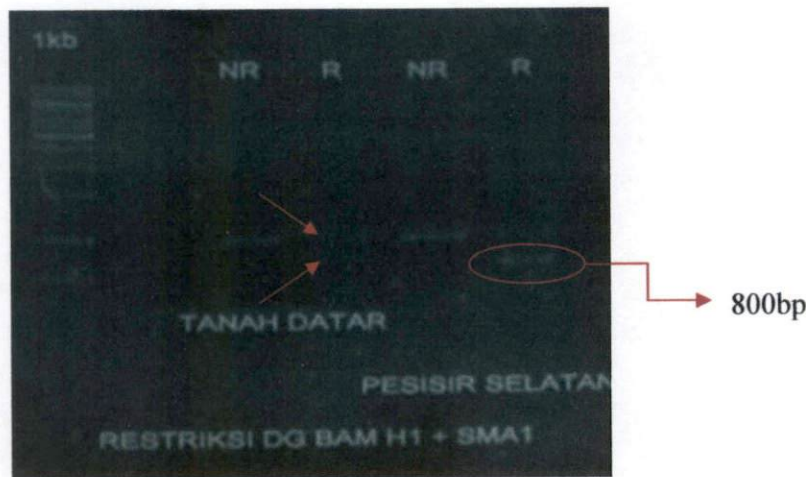
Hasil isolasi plasmid rekombinan, tersebut diamplifikasi kembali untuk memverifikasi plasmid rekombinan menggunakan primer spesifik spesifik CP. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa seluruh sampel positif membawa gen CP sampel pesisir selatan dan layak digunakan sebagai bahan bagi analisis selanjutnya. Adapun hasilnya dapat dilihat pada Gambar 20.



**Gambar 20.** Visualisasi amplikon hasil isolasi plasmid transforman gen CP. M =  $\lambda$  DNA 50 ng/ $\mu$ l, 1 kb ladder (Fermentas). A=R1, B=R2, C=R3 dan D=R4.

#### 4.4.2 Uji Keberhasilan Kloning

Salah satu pengujian keberhasilan kloning adalah dengan metode restriksi. Gen CP telah diamplifikasi menggunakan primer spesifik *coat protein* yang dibagian ujungnya telah ditambahkan sisi pengenalan enzim restriksi tertentu untuk memudahkan dalam proses rekayasa gen. Sisi pengenalan akan enzim ini yang digunakan sebagai acuan bagi keberhasilan kloning. Restriksi dilakukan dengan metode yang telah dijelaskan pada bahan dan metode (Sub Bab 3.4.6.5). Adapun visualisasi hasil restriksi tertera pada Gambar 21.



**Gambar 21.** Visualisasi hasil restriksi plasmid hasil amplifikasi dengan primer Spesifik T7SP6 FR. NR = *Non restriction* R = *Restriction*. Marker 1 Kb ladder (Fermentas). Pita yang dilingkari merupakan gen CP yang berhasil dipotong dengan kedua enzim diatas. Panah menunjukkan 2 posisi pita yang berbeda.

Pengujian hasil transformasi ke dalam Vektor pGEM®-T menggunakan metode restriksi dapat mengetahui secara dini keberadaan gen insert didalam vektor tersebut. Vektor kloning ini mempunyai beberapa keuntungan, di antaranya adalah (1) dapat digunakan untuk mengkloning fragmen hasil PCR yang menggunakan enzim DNA polimerase tertentu yang akan menghasilkan fragmen dengan ujungnya mempunyai ekor basa A di mana vektor pGEM-T mempunyai ujung T, (2) vektor ini juga mempunyai *polycloning site* yang akan mempermudah di dalam pemilihan enzim restriksi untuk kloning, (3) vektor ini juga merupakan

menggunakan enzim DNA polimerase tertentu yang akan menghasilkan fragmen dengan ujungnya mempunyai ekor basa A di mana vektor pGEM-T mempunyai ujung T, (2) vektor ini juga mempunyai *polycloning site* yang akan mempermudah di dalam pemilihan enzim restriksi untuk kloning, (3) vektor ini juga merupakan plasmid yang memiliki kemampuan propagasi tinggi sehingga sangat membantu di dalam perbanyakannya pada sel kompeten seperti *E.coli* (Santoso *et al.*, 2011)

Dipilih satu sampel plasmid rekombinan terbaik dari masing-masing sampel Tanah Datar dan Pesisir Selatan, selanjutnya dilakukan restriksi dengan *double restriction method*. Hasil restriksi menunjukkan adanya pita yang terpotong pada sampel Pesisir Selatan dan Tanah Datar (Gambar 21). Pada sampel Pesisir Selatan telah terbentuk 2 pita, namun posisi pita pertama tidak berada pada ukuran yang diharapkan (sejajar dengan NR). Sedangkan pada sampel Tanah Datar, tanda panah menunjukkan adanya pita samar yang terbentuk setelah restriksi, namun pita tersebut tidak jelas terlihat saat didokumentasikan. Ukuran pita yang diperoleh tidak menunjukkan ukuran gen CP. Berbeda dengan sampel Pesisir Selatan yang berhasil dipotong oleh enzim *BamHI* dan *SmaI*, menunjukkan adanya pita pada ukuran sekitar 800 bp. Hal ini mengindikasikan keberadaan gen CP.

Secara teoritis, hasil restriksi menggunakan 2 enzim yang berbeda akan menghasilkan 2 potongan pita, yaitu pita gen CP dan pita ujung plasmid yang telah direstriksi. Hasil restriksi sampel pesisir selatan memperlihatkan pita samar yang posisinya sejajar dengan pita non restriksi. Hal ini diasumsikan sebagai sisa pita yang masih belum terrestriksi. Kemungkinan besar munculnya pita ini dikarenakan masih belum optimalnya kerja enzim restriksi. Namun, untuk lebih memastikan hasil kloning ini dilakukan analisis sekuensing.

Analisis sekuensing menggunakan primer T7/SP6 menunjukkan bahwa kloning gen penyandi *coat protein* berhasil. Hal ini ditunjukkan dengan adanya produk berukuran 838 bp. Selain itu, dibagian ujung dari sekuens terdapat sisi pengenalan primer yang mengindikasikan bahwa sekuens yang terinsersi merupakan sekuens komplit hasil amplifikasi. Adapun susunan basa hasil sekuensing tertera pada Gambar 22.

```

CATGGGGATCCATGCCGAAGCGTTCCATCGATACAGTGTCTGTCGTTGCCAATGTCTATA
ACACGCCGGAGACTAAACTACGCCGAGTCAGTACAGTCTCCCCTGCTGCTGCCCCACTG
CCCCAGGCATGTCTGACAAACGTAAGAGCATTGGGGTGAAATCGGCCCTATGAATCTGAAA
ACCCAGATTGCTACAGGGGTCGAAGGATGCTAGTTGAATGGTTGCCGCCGGGGGTTTGTG
GAAGGACCCTTGTAAAGTCCAATCTTTTTGAACAGCCGACATGACATAACACATACTGG
GAATGGCCCTTAGTCGTTTCTGATGTCACAAGAGGTAATGGTATTACGCACAGAGTTGGT
AAAAGATTCTGTGTGAAATCTGTATATATATTATTGGCGAAGTATGGATGGACGAGAACATC
AAGTCGAAGAACCACACTAACAACGTCATGTTCTGGCTGGTGCGTGACCGCCACCAGTT
TACAATCTCCTATATGGTTTTTCGGAGGAGTTTGTTCACCCATGTTATGATAATGAA
CCCAGTACAGCCAACCTTATCAAGAACGATCTTCGCTGATCGTGTTCAGGTGTTACATCGT
TTCTCAGCCACGGTGACAGGTGGTCAGTATGCAAGCAAAGCAACAAGCAATCGTGAAGAG
ATTCTTTAGAGTTAACAATCTATGTTGTTTACAACCATCAGGAAGCAGCCAAATATGTAA
ATCACACTGCAAATGCATTATTGTTGTATATGGCATGTAATCATGCATCCAATCCGTGTA
TACGCGACATTGAGAAATTCGTATTTACTTCACGACAATGTAACAAACCCGGGATTAG

```

**Gambar 22.** Urutan sekuens gen *coat protein* berukuran 838 bp. Warna hijau merupakan sisi pengenalan primer V1 *Bam*HI NT dan warna merah muda merupakan sisi pengenalan enzim *Bam*HI, sedangkan warna kuning merupakan sisi pengenalan primer V1 *Sma*I NT dan warna biru muda merupakan sisi pengenalan enzim *Sma*I.

Selanjutnya, sekuens DNA *coat protein* tersebut di BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) melalui NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) yang bertujuan untuk mencari sekuens asam nukleat yang mirip dengan sekuens tertentu yang dimilikinya. BLAST merupakan cara untuk mendapatkan dan menganalisis *alignment databases* gen-gen atau protein target dengan sekuens yang bersesuaian dengan sekuens gen atau protein lainnya. Hal ini berguna misalnya untuk menemukan gen sejenis pada beberapa organisme atau untuk memeriksa keabsahan hasil sekuensing maupun untuk memeriksa fungsi gen hasil sekuensing.

Berdasarkan analisis BLAST, gen penyandi *coat protein* yang telah di kloning ke dalam plasmid pGEM®-T *Easy vector* memiliki tingkat kemiripan pada aksesori AB267834.1 yaitu *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus DNA, segment DNA-A complete genom* dengan *query coverage* berkisan 100% dan *maximum identity* sebesar 90%, kemudian disusul oleh aksesori AB267838. dengan akurasi data dan *maximum identity* yang sama dengan sebelumnya. Hasil BLAST tersebut dapat dilihat pada Tabel 7.

**Tabel 7.** Hasil analisis BLAST

Aksesi	Deskripsi	Akurasi data ( <i>Query coverage</i> )	<i>Maximum identity</i>
AB267834.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus DNA, segment DNA-A, complete genome	100%	90%
AB267838.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus- [Ageratum] DNA, segment DNA-A complete genome	100%	90%
DQ083765.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus isolate Bogor tomato, complete genome	100%	89%
DQ083764.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus isolate Bogor, complete genome	100%	89%
AB267836.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia-[Tomato] DNA, segment DNA-A, complete genome	100%	88%

Mengacu pada hasil yang telah didapatkan diatas, maka dipilihlah satu aksesi yang memiliki tingkat kekerabatan yang cukup tinggi dengan sekuens gen penyandi *coat protein* sampel Pesisir Selatan. Meskipun aksesi AB267834.1 dan AB267838.1 memiliki akurasi data dan maximum identity yang sama, namun penjajaran sekuens dilakukan pada aksesi AB267834.1. Hal ini dikarenakan sumber gen yang diambil pada aksesi ini berasal dari tanaman tomat yang cenderung lebih sama dibandingkan dengan ageratum (aksesi AB267838.1) Penjajaran sekuens adalah proses penyusunan / pengaturan dua atau lebih sekuens sehingga persamaan sekuens-sekuens tersebut tampak nyata. Penjajaran sekuens dapat dilakukan menggunakan program ClustalW2 pada website NCBI. Clustal adalah program bioinformatika untuk penjajaran secara multipel (*multiple alignment*), yaitu *alignment* beberapa sekuens sekaligus. Dua varian utama clustal adalah clustalW dan clustalX. ClustalW digunakan untuk membandingkan sekuens gen target dengan sekuens lainnya, atau beberapa sekuens yang akan diteliti (Fatchiyah, 2008)

Melalui *sequences alignment*, maka akan memudahkan dalam mempelajari evolusi sekuens-sekuens dari leluhur yang sama (*common ancestor*). Berdasarkan

pada hasil clustalW, dapat dilihat ada sekitar 710 basa yang bertanda bintang antara aksesori AB267834.1 dan sekuens gen V1 Tanah Datar. Hal ini menunjukkan kesamaan basa antara gen *coat protein* dengan aksesori tersebut. Apabila dipersentasakan lebih kurang mencapai 90% (Lampiran 4) kecocokannya (*match*) dan 10% ketidakcocokannya (*mismatch*). Ketidakcocokan dalam alignment diasosiasikan dengan proses mutasi, sedangkan kesenjangan (*gap*, tanda “-“) diasosiasikan dengan proses insersi atau delesi.

Persentase kecocokan juga mampu menginterpretasikan tingkat keragaman yang berkaitan erat dengan adanya proses evolusi. Dengan demikian *sequences alignment* memberikan hipotesis atau proses evolusi yang terjadi dalam sekuens-sekuens tersebut. Dalam kaitannya dengan hal ini, *alignment* juga dapat menunjukkan posisi –posisi yang dipertahankan (*conserved*) selama evolusi dalam sekuens-sekuens protein, yang menunjukkan bahwa posisi-posisi tersebut dapat jadi penting bagi struktur atau fungsi protein tersebut (Fatchiyah, 2008).

Merujuk pada hasil ClustalW, dapat dinyatakan bahwa tingkat keragaman dari gen *coat protein* sampel Pesisir Selatan tersebut tidak cukup tinggi. Keragaman yang tinggi ditandai dengan semakin rendahnya tingkat kecocokan antara sekuens pembandingan dengan sekuens yang dibandingkan. Demikian halnya dengan sekuens gen *coat protein* pesisir selatan yang memiliki persentase kecocokan sebesar 90%. Hal ini sesuai dengan pernyataan Brown (2001) yang menyatakan bahwa gen *coat protein* merupakan gen yang cukup *conserved*. Karena pada kenyataannya gen tersebut masih mampu mempertahankan posisi sekuens-sekuensnya selama proses evolusi. Adapun urutan sekuens tersebut tertera pada Gambar 23.

V1-TD	ATGCCGAAGCGTTCCATCGATACAGTGTCTGTTGCGCAATGTCTATAACACGCCGGAG	59
AB267834.1	ATGCCGAAGCGTTCCATCGATACAGTGTCTGTTGCGCAATGTCTATAACACGCCGGAG	59
V1-PSS	ATGCCGAAGCGTTCCATCGATACAGTGTCTGTTGCGCAATGTCTATAACACGCCGGAG *****	60
V1-TD	ACTAAACTACGC-GAGTCAGTACAGTCTCCC-TGCTGCTGCCCCACTGCCCCAGGCATG	117
AB267834.1	ACTAAACTACGC-GAGTCAGTACAGTCTCCC-TGCTGCTGCCCCACTGCCCCAGGCATG	117
V1-PSS	ACTAAACTACGC-GAGTCAGTACAGTCTCCC-TGCTGCTGCCCCACTGCCCCAGGCATG *****	120
V1-TD	TCGTACAAACG-AAGAGCAT--GGGT-AAATCGGCCTATGAATC-GGAAACCCAGATT-C	171
AB267834.1	TCTTACAAACG-AAGAGCAT--GGGT-AAATCGGCCTATGAATC-GGAAACCCAGATT-C	171
V1-PSS	TCTTACAAACG-AAGAGCAT--GGGT-AAATCGGCCTATGAATC-GGAAACCCAGATT-C ** *****	180
V1-TD	TACAGGGGTCGAAGGA--GCAGT--GATGTT----CCGCGGGGTTGTG-AAGGACC-TT	220
AB267834.1	TACAGGGGTCGAAGGA--CCAGT--GATGTT----CCACGGGGTTGTG-AAGGACC-TT	220
V1-PSS	TACAGGGGTCGAAGGATGCTAGTTGAATGGTTGCCGCGGGGTTTGTGGAAGGACCCTT *****	240
V1-TD	GT-AAGGTCCAATCTTTT-GAACAGC-GACATGACATAACACATACTGGGAA-GGCCCTT	276
AB267834.1	GT-AAGGTCCAATCTTTT-GAACAGA-GACATGACGTAACACATACTGGGAA-GGTCTT	276
V1-PSS	GTTAAGGTCCAATCTTTTGAACAGCCGACATGACATAACACATACTGGGAATGGCCCTT ** *****	300
V1-TD	TG-CGTTTCCGATGTCAAGAGGTAATGGTATTACGCACAGAGTTGGTAAAAGATTCTG	335
AB267834.1	TG-CGTTTCCGATGTCACTAGAGGTAATGGTATTACGCATAGAGTAGGAAAAGATTCTG	335
V1-PSS	AGTCGTTTCTGATGTCAAGAGGTAATGGTATTACGCACAGAGTTGGTAAAAGATTCTG * *****	360
V1-TD	TGTGAAATCTGTATATATATAGGCAAGTTGGATGGACGAAAACATCAAGTCGAAGAA	395
AB267834.1	TGTGAAATCTGTATATATATATGGCAAAGTATGGATGGACGAGAACATCAAGTCGAAGAA	395
V1-PSS	TGTGAAATCTGTATATATATATGGCAAAGTATGGATGGACGAGAACATCAAGTCGAAGAA *****	420
V1-TD	CCACACTAACAATGTCATGTTCTGGCTGGTTGTCGTGACCGGCACCTGTT-ACTA-CGCCG	453
AB267834.1	CCACACTAATAACGTCATGTTTTGGCTGGTTGTCGTGACCGGCACCTGTT-ACAA-CTCCT	453
V1-PSS	CCACACTAACAACGTCATGTTCTGGCTGGTTGTCGTGACCGGCACCTGTTTACAATCTCCT *****	480
V1-TD	-TATGGCTT--CGGAGAG--TTGTT--CAACA--TGT-ATGATAATGAACCCAGTACAGC	503
AB267834.1	-TATGGCTT--CGGAGAG--TTGTT--CAACA--TGT-ATGATAATGAACCCAGTACAGC	503
V1-PSS	ATATGGTTTTTCGGAGGAGTTGTTTTCAACATTGTTATGATAATGAACCCAGTACAGC *****	540
V1-TD	-AACT-ATCAAGAACGATCTTCG-TGATCGTGTGCAGGTGTTACACCGTTTTTCAGCTAC	560
AB267834.1	-AACT-ATCAAGAACGATCTTCG-TGATCGTGTGCAGGTGTTACATCGTTTTCAGCCAC	560
V1-PSS	CAACTTATCAAGAACGATCTTCGCTGATCGTGTTCAGGTGTTACATCGTTTTCAGCCAC *****	600
V1-TD	AGTCACTGGTGGTCAAGCAAGG-AACAAGCAATCGTGAAGAGATTTTTTAGAG	619
AB267834.1	GGTGACAGGTGGTCAAGCAAGG-AACAAGCAATCGTGAAGAGATTTTTTAGAG	619
V1-PSS	GGTGACAGGTGGTCAAGCAAGCAAGCAAGCAATCGTGAAGAGATTTTCTTAGAG * * *	660
V1-TD	TTAACAAC-TATGTTGTTTATAATCATCAGGAAGCAGCAAAATATGAAAATCACACTGAA	678
AB267834.1	TTAACAAT-TATGTTGTTTACAATCATCAAGAAGCAGCAAAATATGAAAATCACACTGAA	678
V1-PSS	TTAACAATCTATGTTGTTTACAACCATCAGGAAGCAGCAAAATATGAAAATCACACTGCA *****	720
V1-TD	AATGCATTATTGTTGTATATGGCATGTACTCATGCATCCAATCC-TGTATACGGCAGATT	737
AB267834.1	AATGCATTATTGTTGTATATGGCATGTACTCATGCATCCAATCC-TGTATACGGTACATT	737
V1-PSS	AATGCATTATTGTTGTATATGGCATGTACTCATGCATCCAATCCGTTATACGGCAGATT *****	780
V1-TD	GA-AAATTCGTATTTACTTCTACGACAAATGTAACAATTA 777	
AB267834.1	GA-AAATTCGTATATACTTCTACGACAAATGTAACAATTA 777	
V1-PSS	GAGAAATTCGTATTTACTTCTACGACAAATGTAACA----- 815 ** *****	

**Gambar 23.** Hasil *multiple alignment* gen V1 PSS dengan sekuens gen V1 TD dan AB267834.1. memiliki persentase kecocokan berkisar 90%.

## **V. PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan tujuan penelitian kloning gen penyandi *Coat Protein* (V1) Geminivirus dari tanaman cabai (*Capsicum annuum* L), dapat disimpulkan bahwa telah berhasilnya kloning gen penyandi *coat protein* ke dalam *Eschericia coli* BL21 yang membawa plasmid rekombinan berisi gen penyandi coat protein serta memiliki persentase kemiripan dengan gen V1 yang ada di Indonesia sebesar 90%.

### **5.2 Saran**

Untuk memperoleh informasi yang lebih luas, sebaiknya kegiatan sekuensing dilakukan juga pada hasil kloning sampel Tanah Datar secara dua arah (*bidirectional*) menggunakan kedua primer yang digunakan pada proses amplifikasi (T7 F dan SP6 R) agar dapat digunakan sebagai pembanding dalam analisis keragaman sekuens gen tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdelkader, H.S., A.M. Abdel-Salam, S.M., El Saghir & M.H. Hussein. 2004. Molecular cloning and expression of recombinant coat protein gene banana bunchy to virus in *E. coli* and its use in the production of diagnostig antibodies. *Arab J. Biotech*, 7(2): 173-188.
- Adcock, Mike. 2006. EU Legislation on Genetically Modified Organisms. [internet] 2006 [dikutip 2011 Januari 20]. Tersedia dari <http://www.biosafety.be/GB/Dir.Eur/Del.Rel./90220/PR.html>
- AgBiotech. 2001. Infosource : What is Genetic Transformation?. Issue 68  
Published By : AG-WEST Biotech INC. Research Drive Saskatoon  
Saskatchewan, Canada. 2001. 101-111 E-mail:sabic@agwest.sk.ca
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, dan JD. Watson. 1994. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc: New York.
- Anam, Khairul. 2009. DNA Rekombinasi. Laporan Praktikum Genetika Molekuler. Bioteknologi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Anonim. 2011. Bom Kemiskinan Sumbar Bakal Meledak [internet] 2011 [dikutip 2011 Februari 3] Tersedia dari <http://saribulih.-wordpress.com/-2011-/02/-01/-bom-kemiskinan-sumbar-bakal-meledak/>
- Badan Pusat Statistik (BPS) Berita Resmi Statistik No. 34/06/Th. XIII, 1 Juni 2010
- Bahar, Yul Hari. 2008. Depertemen Pertanian : Pengembangan Komoditas Hortikultura Pada Tahun 2008. [Internet] 2008 [Dikutip 2011 Februari 4] Tersedia dari <http://hortikultura.go.id/>
- Barnett J. US Italian Exsperts Plan to Clone humans", E-mail: <http://daily news. Yahoo.com/h/nm/20010309/ts/italy-kloning-dc-2.html>.
- Bock, K.R, E.J. Gutric, G. Meredith & H. Baker. 1977. RNA and protein component of maize Streak Virus Cassava Leaf Virus Ann. Appl. Biol. 85:305-308
- Brown, J.K, A. M. Idris, I. Torres-Jerez, G. K. Banks and S. D. Wyatt. 2001. The Core Region Of The Coat Protein Gene Is Highly Useful For Establishing The Provisional Identification And Classification Of Begomoviruses. *Archives of Virology*. 146(8) : 1581-1598. 10.1007/s007050170080
- Chiang, B.T., M.K. Nakhla, D.P. Maxwel, W. Schoeanfelder& S.K. Green. 1997. A New geminiviruses association with a leaf curl disease of tomato in tanzania. *Plant disease* 81:1111(abstract)

- Clontech Inc. 1996. *Peta sirkular plasmid pBII21*. Di dalam website: Plant Molecular Genetics (Lecture 2, part 3 of 4, B.Transformation teknologi) [[http://www.umanitoba.ca/afs/plant\\_science/COURSES/39\\_768/102/102.3.html](http://www.umanitoba.ca/afs/plant_science/COURSES/39_768/102/102.3.html)] diakses 15 Februari 2012 : 15.38 Wib
- Crop Biotech Update. 2010. Ubi jalar Oranye Masa Depan yang Cerah bagi Afrika. [internet] 2010. [dikutip 2011 Januari 28]. Tersedia dari : <http://www.harvestplus.org/content/orange-sweet-potato-faces-bright-future-africa-0>
- D'Halluin, K., E. Bonne, M. Bossut, M. De Beauckleer, and J. Leemans. 1992. J. Plant Cell. Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation. (4) : 1495-1505
- Damanik, Caroline.2010. Mendag: Produksi cabai mulai naik.(Online) <http://www.kompas.com>. Diakses pada tanggal 20 Januari 2011.
- Davis, L. G., W.W. Kuehl dan J.F. Battey.1994. Basic Methods in Molecular Biology, 2<sup>nd</sup>, Prentice Hall International.
- Dellaporta. S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A Plant DNA Miniprep: Version 11. Plant Mol. Biol. Rep 1(4) 19-21.
- Duriat, A.S.2009. Pengendalian Penyakit Kuning Keriting Pada Tanaman Cabai. IPTEK Hortikultura. Balai Penelitian Tanaman Sayuran; Bandung. Hal 43-46.
- Fatchiyah. 2008. Pengantar Bioinformatika Kedokteran. Lembaga Penerbitan Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya. LSIHpress©2008, Universitas Brawijaya. Malang
- Fermentas. 2011. Product Information Thermo Scientific FastDigest XbaI. [www.thermoscientific.com/Fermentas](http://www.thermoscientific.com/Fermentas)
- Froger, A. J. Hall. 2007. Transformation of Plasmid DNA into E. Coli using The Heat Shock Method. J. Vis. Exp (6).e253. DOI. 10.3791/253.
- Gonsalves D. 2002. Transgenic Papaya: A case study on the theoretical and practical application of virus resistance. In: Vasil IK(ed), plant biotechnology 2002 and beyond. Kluwer academic publisher, dordrecht , NL, pp.115-118.
- Grooms, Kelly. 2009. Selecting the Right Colony : The answer is there in blue and white. Promega connections. (Online). <http://promega.wordpress.com/2009/05/28/selecting-the-right-colony-the-answer-is-there-in-blue-and-white/> Diakses pada tanggal 9 Maret 2012.

- Gusman, P.C., C.R. Arendando, D. Emndji, R.J. Portillo, Heinz & R.L. Gilbertson. 1997. Partial characterization of two whiteflies transmitted geminiviruses infecting tomatoes in Venezuela. *Plant Disease*. 81:312(abstract)
- Haqqi, Tariq M. 1992. Direct Ligation Of PCR Products For Cloning And Sequencing. *Nucleic Acids Research*, 20 (2) 1992 Oxford University Press. Case
- Harrison, B. D., and D. J. Robinson. 1999. Natural genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (begomoviruses). *Annu. Rev. Phytopathol.* 37:369-398
- Hatanaka, T., Y.E. Choi, T. Kusano & H. Sano.1999. J. Transgenic Plants of Coffe (*Coffea canephora*) from embryonic callus via *agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant cell Rep.* 19: 106-110
- Himpunan Kerukunan Tani Indonesia (HKTI). 2011. Impor Beras Tahun 2010 Capai 1,8 Juta Ton. [internet] 2011 [dikutip 2011 Januari 30] Tersedia dari <http://hkti.org/impor-beras-tahun-2010-capai-18-juta-ton/>
- Hodges, J. 2000. Why Lifestock, Ethics and Quality of Life ? In : *Lifestock, Ethics, and Quality of Life*. J . Hodgens dan In K. Han (eds). CABI publishing: New York, USA
- Honda, Y., M. Iwahi, Y. Saito, P.Thongmeearkom, K Kittisak & N. Deema. 1983. Mechanical transmission, purrification and some properties of whiteflies borne Mungbean Yellow Mosaic Virus in Thailand. *Plant Disease*. 67:801-844.
- Jamsari. 2007. Bioteknologi Pemula : Prinsip dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler.Unri Press : Riau
- Jamsari, I.Suliansyah, I.Manti, & 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; bekerjasama dengan Sekretariat Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian: Padang.
- Joni, 2011. Produksi cabe Sumbar. Pro 1 RRI PADANG. Berita daerah pagi.
- Louro, D., E. Noris, F.Verralt & G.P. accoto. 1996. First report Tomato Leaf Curl Virus in Portugal . *Plant Disease*, 80:1079 (abstract).
- Mangunwardoyo, Wibowo.2002. Transformasi Fragmen DNA kromosom *Xanthomonas campestris* ke dalam *Eschericia coli*. Makara Sains, 6 (1). Jurusan Biologi FMIPA Universitas Indonesia. Depok, 16424. Email : w\_mangunwardoyo@hotmail.com

- Nellen, Wolfgang. 2011. Molecular Biology Modul 1. Indonesian German Network Teaching, Training and Research Collaboration (IGN TTRC). Deutscher Akademischer Austausch Dienst. Universität Kassel. Germany
- Pacheco, I.T., J.A.G. Tiznado, & J.K. Brown. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and Southern United States, *Phytopathol.* 86: 1186-1192
- Pang SZ, FJ. Jan, DM. Tricoli, PF. Russell, KJ. Carney, JS. Hu, M. Fucs, HD. Quemada & D. Gonsalves. 2000. Resistance to squash mosaic comovirus host adaptation defects in bipartite geminivirus. *Virology* 212:263-267.
- Polston, J.E. 1996. Tomato geminiviruses in Caribbean: their identification and management. *Phytopathol.* 86:S71(abstract)
- Powell PA, DM. Stark, PR. Sanders & RN. Beachy. 1989. Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America* 86: 6949-6952
- Powell-Abel P, RS. Nelson, B. De, N. Hoffman, SG. Rogers, RT. Fraley & RN. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.
- Promega USA. 2009. Technical Manual : pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Instructions For Use of Products A1360, A1380, A3600 and A3610. Printed in USA. Revised 12/10. Part#TM042.
- Ramos, P.L., O. Guerra, V. Dorestes & N. Ramires. 1996. Detection of TLCV in Cuba, *Plant Disease* 80: 1208(abstract)
- Rusli E.S, S.H. Hidayat, R. Suseno, B. Tjahjono. 1999. Virus Gemini Pada Cabai : Variasi Gejala dan Studi cara Penularan. Buletin Hama dan Penyakit Tumbuhan 11(1):26-31 (1999) *Bulletin of Plant Pests and Diseases*, ISSN 0854-3836
- Rusli, E.S. 2000. Deteksi dan karakterisasi virus gemini asal cabe rawit (*capsicum frutescens L.*) Tesis . Pascasarjana Institut pertanian Bogor. Bogor. 42 halaman.
- Santoso, Tri J., Hidayat, H. Sri, M. Herman, Aswidinnoor, Sudarsono. 2009. Identities and genetic variabilities of begomoviruses associated with leaf curl disease of tomato based on the *Polymerase chain Reaction* and *Restriction Fragment Length Polymorphism*. *Indonesian Journal of Agriculture* 2(2). 65-73.

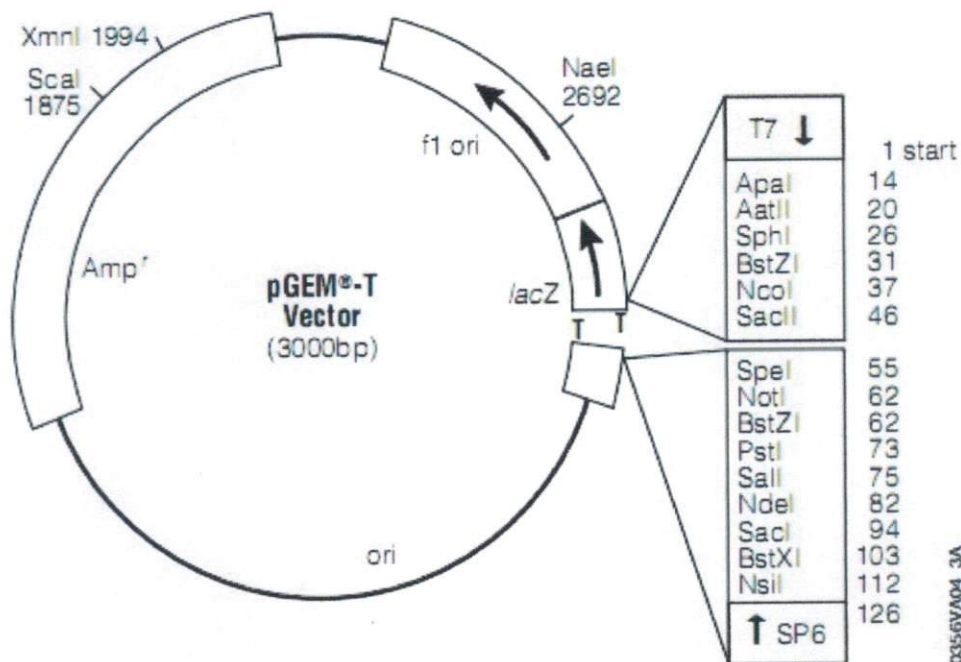
- Santoso, Tri Joko. 2008. Identifikasi Begomovirus Indonesia pada Tomat dan Analisis Diversitas Genetik Gen AV1 Serta Pemanfaatannya Untuk Pengembangan Tanaman Tahan Virus. Disertasi Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Segelken, Roger. 2009. CU Biologist Devise Engineering Method of Fortify Rice Plants. [internet] 2009 [dikutip 2011 Januari 28] . Tersedia dari : <http://www.news.cornell.edu/chronicle/chronicle.html>
- Siregar, E.B.M. 2005. Konstruksi Gen CP CMV pada *Agrobacterium*. e-usu repistory©2005. Jurusan Kehutanan, Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara.
- Sudiono, S.H., Hidayat, R. Suseno, S. Sosromarsono. 2004. Penggunaanteknik PCR dan RFLP untuk deteksi dan analisis keragaman virus gemini pada tanaman tomat yang berasal dari berbagai daerah di Jawa barat dan Lampung. *J. Hama dan Penyakit tumbuhan Tropika*. 2:89-93
- Sukamto.2005.*Artikel IPTEK-bidang biologi, pangan & kesehatan : Mengenal virus tanaman cabai.*(Online)[http://www.berita-iptek.com/zberita-berita-iptek-2005-07-13\\_mengenal\\_-\\_virus\\_-\\_tanaman-cabai.shtml](http://www.berita-iptek.com/zberita-berita-iptek-2005-07-13_mengenal_-_virus_-_tanaman-cabai.shtml). Diakses tanggal 13 Juli 2005
- Suryanto. 2011. Ekonomi : Harga Kebutuhan Pokok di Jogjakarta Masih Tinggi. [internet] 2011 [dikutip 2011 Januari 24] Tersedia dari : <http://www.antaraneews.com/ekonomi.html>
- Takara Bio USA.2008. Successful PCR Guide 3rd Edition. [www.takarabiousa.com](http://www.takarabiousa.com) To Order: Phone: 888-251-6618 or 608-441-2844 Fax: 608-441-2845 email: [info@takarabiousa.com](mailto:info@takarabiousa.com)
- Tolia N.H., L.J. Tor. 2006. Strategies for Protein Coexpression in *Eschericia Coli*. Nature Publishing Group.<http://nature.com/naturemethods>. Vol 3. No 1. Januari 2006. Tolian.cshl.edu. Newyork, USA
- Tsukasa N, F. Fumiyoishi, T. Fumihiro, H. Kaoru & H. Masashi. 2002. Development of breeding materials of transgenic tomato plants with a truncated replicase gene of cucumber mosaic virus for resistance to the virus. *Breeding science* 52: 219-223. Western Reserve University, 2074 Abbington Road, Cleveland, OH 44106, USA
- Wilmot I, AE. Schnieke, J. McWhir, AJ. Kind, KHS. Campbell. 1993. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*. 385:810-3.
- Wolf, Julie. B. 2010. Transformation of *E. coli* by Electroporation. (electroporation procedure from Cell-Porator™ Voltage Booster, Life Technologies, Cat. Series 1612). Department of Biological Sciences, 1000 Hilltop Circle Baltimore, MD 21250.

- Xiao XW, PWG. Chu, MJ. Frenkel, LM. Tabe, DD. Shukla, PJ. Hanna, TJV. Higgins, WJ. Muller & CW. Ward. 2000. Antibody-mediated improved resistance to CIYVV and PVY infection in transgenic tobacco plants expressing a single chain variable region antibody. *Molecular Breeding* 6: 421-431.
- Yuwono, Triwibowo. 2006. Teori dan Aplikasi *Polymerase Chain Reaction*. Ed. 1. Penerbit Andi. Yogyakarta
- Zerbirin, F.M., E.M., Zambolin, I.V. Cerrijo & R.L. Gilberston. 1996. A New Bipartite geminiviruses infecting tomatoes in Minas Gerais State, Brazil, *Phytopathol.* 86:S1 (abstract)
- Zhou, M.Y. and C. E. Gomez-Sanchez. 2000. Universal TA Cloning. Endocrinology, The University of Mississippi Medical center, 2500 north State Street, Jackson, MS 39216, USA. GV (Sonny) Montgomery VA Medical Center, Jackson, MS and The University of Missouri – Columbia, MO USA. ©Caister Academic Press.

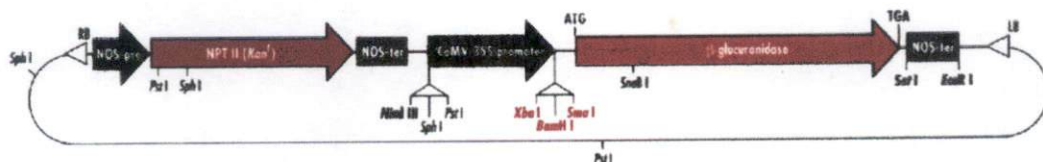


## Lampiran 2 . Konstruksi plasmid pGEM®-T Easy Vector dan pBI121

### pGEM®-T Vector Map and Sequence Reference Points



Sumber : Promega (2009)



**pBI121**

.....  
 TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG  
 XbaI BamHI

from Clontech  
 catalogue 1996 / 97

**Lampiran 3. Komposisi media Luria Bertani**Media LB Padat 250 ml

1. NaCl	1,25 g
2. Yeast Extract	1,25 g
3. Trypton	2,5 g
4. Agar for bacteriology	3,75 g
5. NaOH 10 N	25 $\mu$ l

Cukupkan dengan 250 ml aquades

Media LB Cair 250 ml

1. NaCl	1,25 g
2. Yeast Extract	1,25 g
3. Trypton	2,5 g
4. NaOH 10 N	25 $\mu$ l

Cukupkan dengan 250 ml aquades

**Lampiran 4.** Persentase kemiripan dan pengelompokan variasi hasil penjajaran sekuens

$$\text{Persentase Kemiripan (\%)} = \frac{\text{Jumlah Tanda Bintang} \times 100 \%}{\text{Total Urutan Basa V1 PSS}}$$

**Persentase Penjajaran Sekuens V1 PSS dan V1 TD 21**

$$\text{Persentase Kemiripan (\%)} = \frac{732 \times 100 \%}{815^*} = 89,8 \% \text{ (dibulatkan menjadi 90\%)}$$

**Persentase Penjajaran Sekuens V1 PSS dan AB267834.1**

$$\text{Persentase Kemiripan (\%)} = \frac{729 \times 100 \%}{815^*} = 89,5 \% \text{ (dibulatkan menjadi 90\%)}$$

\*Total urutan basa yang digunakan saat ClustalW.

**Pengelompokan variasi hasil penjajaran sekuens**

No	Urutan Basa Ke-	Sumber Gen			Tipe Variasi
		V1 - PSS	V1 - TD 21	AB267834.1	
<b>Baris ke-1</b>					
1	32	G	-	-	Inseri/Delesi
<b>Baris ke-2</b>					
2	13, 32	C	-	-	Inseri/Delesi
<b>Baris ke-3</b>					
3	3	G	G	T	Substitusi
4	12, 44	T	-	-	Inseri/Delesi
5	20-21	TG	--	--	Inseri/Delesi
6	26, 59	G	-	-	Inseri/Delesi
7	46	A	G	G	Substitusi
<b>Baris ke-4</b>					
8	(16-17), (23-24)	TG	--	--	Inseri/Delesi
9	18	C	G	C	Substitusi
10	19	T	C	C	Substitusi
11	25	A	G	G	Substitusi
12	30	G	T	T	Substitusi
13	32-36	TGCCG	-----	-----	Inseri/Delesi
14	39	G	G	A	Substitusi
15	40	G	C	C	Substitusi
16	44	T	G	G	Substitusi
17	50	G	-	-	Inseri/Delesi
18	58	C	-	-	Inseri/Delesi
<b>Baris ke-5</b>					
19	3, 19, 53	T	-	-	Inseri/Delesi
20	15	T	T	C	Substitusi
21	26	C	C	A	Substitusi
22	27	C	-	-	Inseri/Delesi

23	36	A	A	G	Substitusi
24	56	C	C	T	Substitusi
<b>Baris ke-6</b>					
25	1	A	T	T	Substitusi
26	3	T	-	-	Inseri/Delesi
27	10	T	C	C	Substitusi
28	19	A	A	T	Substitusi
29	40	C	C	T	Substitusi
30	46	T	T	A	Substitusi
31	49	T	T	G	Substitusi
<b>Baris ke-7</b>					
32	22	T	A	T	Substitusi
33	26	G	A	A	Substitusi
34	31	A	T	A	Substitusi
35	43	G	A	G	Substitusi
<b>Baris ke-8</b>					
36	10, 22	C	C	T	Substitusi
37	13	C	T	C	Substitusi
38	28	G	G	T	Substitusi
39	31	G	T	T	Substitusi
40	42	C	G	G	Substitusi
41	46, 53	A	T	A	Substitusi
42	50, 55	T	-	-	Inseri/Delesi
43	57, 60	T	G	T	Substitusi
<b>Baris ke-9</b>					
44	1	A	-	-	Inseri/Delesi
45	7	T	C	C	Substitusi
46	10-11	TT	--	--	Inseri/Delesi
47	15	A	A	C	Substitusi
48	17	G	A	A	Substitusi
49	18	A	G	G	Substitusi
50	19-20	GT	--	--	Inseri/Delesi
51	26-27	TT	--	--	Substitusi
52	32	C	A	A	Substitusi
53	33-34	AT	--	--	Inseri/Delesi
54	38	T	-	-	Inseri/Delesi
55	55	T	T	A	Substitusi
<b>Baris ke-10</b>					
56	1, 24	C	-	-	Inseri/Delesi
57	6	T	-	-	Inseri/Delesi
58	34	T	G	T	Substitusi
59	46	T	C	T	Substitusi
60	52, 58	C	T	C	Substitusi
<b>Baris ke-11</b>					
61	1	G	A	G	Substitusi
62	4	G	C	G	Substitusi
63	7	A	T	A	Substitusi
64	19	T	C	T	Substitusi

## Lampiran 4 (lanjutan)

65	28	A	G	A	Substitusi
66	30	C	-	-	Inseri/Delesi
67	53	C	T	T	Substitusi
<b>Baris ke-12</b>					
68	8	T	C	T	Substitusi
69	9	C	-	-	Inseri/Delesi
70	21	C	T	C	Substitusi
71	24	C	T	T	Substitusi
72	30	G	G	A	Substitusi
73	39, 59	C	A	A	Substitusi
74	47	T	A	A	Substitusi
<b>Baris ke-13</b>					
75	9, 49	A	A	G	Substitusi
76	39	C	C	T	Substitusi
77	45	G	-	-	Inseri/Delesi
78	55	G	G	T	Substitusi
<b>Baris ke-14</b>					
79	3	G	-	-	Inseri/Delesi
80	14	T	T	A	Substitusi
81	36-41	-----	AATTAA	AATTAA	Inseri/Delesi