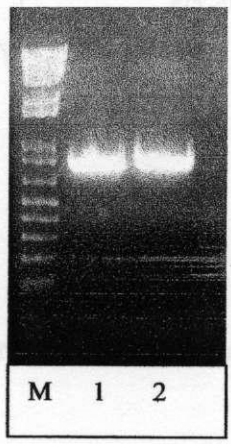
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi PCR

Pada penelitian konstruksi gen harus mempertimbangkan dua hal yaitu urutan nukleotida gen yang akan dikonstruksi dan vektor ekspresi yang akan digunakan. Pada penelitian ini telah dilakukan tahapan sebelumnya untuk mendapatkan genTc*PIN* yang diinginkan yaitu gen Tc*PIN* yang didapat dari klon buah kakao yang tahan PBK. Untuk menkonstruksi gen yang nantinya akan digunakan untuk transformasi ke tanaman maka dilakukan design primer lagi. Design primer dilakukan dari hasil sekuensing pada klon kakao yang tahan yang bertujuan digunakan untuk konstruksi gen Tc*PIN* ke tanaman.

Hasil DNA plasmid Ary (klon tahan PBK) yang didapat dari tahap penelitian sebelumnya digunakan untuk amplifikasi PCR dengan sepasang primer yang didesign baru, yaitu PIN F (GCTTAACGGGATCCATGCTTCGCGTTAACAACTTG) dan PIN R (GCAATTCGGTCGACTATAGAATACTCAAGCTATGC). Ini bertujuan untuk mengkonstruksi gen *PIN* ke vektor ekspresi (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil PCR DNA plasmid Ary

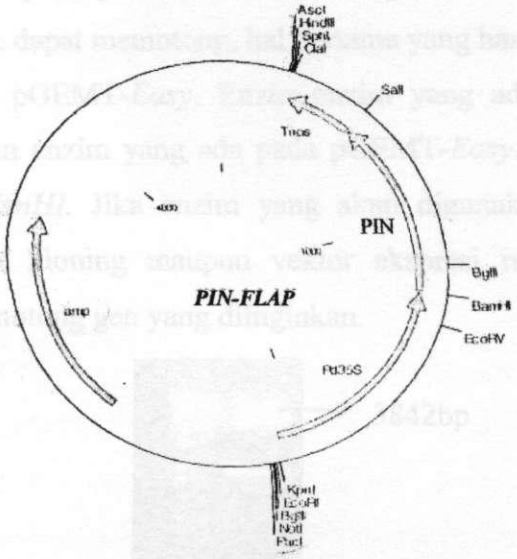
Digesti Gen Tc*PIN* dan p*Flap* dengan Enzim Restriksi

Manipulasi gen memerlukan sarana khusus seperti vektor dan sel inang. Vektor digunakan sebagai pembawa gen yang akan dimasukkan ke dalam sel dan juga berperan dalam mereplikasi gen yang diklon. Untuk dapat digunakan sebagai vektor, ciri-ciri DNA antara lain harus dapat memasuki sel inang dan bisa bereplikasi. Dua jenis DNA

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

yang ditemukan secara alami yang umum digunakan sebagai bahan dasar vektor adalah DNA plasmid dan DNA kromosom virus, khususnya kromosom bakteriofaga.

Plasmid merupakan DNA sirkular berukuran kecil yang ditemukan pada bakteri, *yeast* dan beberapa organisme lain yang mampu bereplikasi sendiri tanpa bergantung pada replikasi DNA kromosom sel inang. Sedangkan DNA vektor adalah molekul DNA yang *diperlukan untuk membawa dan memperbanyak fragmen DNA yang dibawanya* (Lehninger 1994). Dalam hal ini vektor yang digunakan pada penelitian ini adalah p*Flap* yang berfungsi sebagai vektor kloning. Plasmid p*Flap* digunakan terlebih dahulu sebelum dimasukan ke vektor ekspresi karena plasmid p*Flap* tersebut mempunyai promotor dan terminator.



Gambar 2 Vektor klon pFlap dan peta restriksi yang dimiliki.

Tahap awal untuk mengkonstruk gen ini adalah digesti gen *PIN* dan p*flap* itu sendiri. Digesti dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi dari *Biolabs*. Plasmid yang mengandung gen Tc*PIN* dan p*Flap* dipotong dengan enzim restriksi yang sama. Enzim restriksi digunakan untuk memotong DNA secara tepat pada sekuen tertentu dan dapat diibaratkan sebagai gunting pada tingkat molekul. Selain itu, enzim restriksi juga dapat digunakan untuk membuat fragmen DNA yang bersifat kompatibel (klop) untuk disambungkan dengan fragmen DNA lain. Pada banyak spesies bakteri, sistem restriksi

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

merupakan mekanisme pertahanan terhadap introduksi DNA asing ke dalam sel. Sistem restriksi terdiri atas dua tahap; tahap pertama adalah metilasi, penambahan gugus metil terhadap basa C atau A diantara urutan yang dikenali dalam DNA seluler. Tahap kedua adalah endonuklease yang mengenali urutan DNA pendek (4-8 nukleotida) dan simetris serta memotong (hidrolisis) ikatan DNA pada tiap rantai pada sisi spesifik diantara urutan DNA (Turner *et al*. 2000).

Enzim restriksi yang digunakan untuk memotong p*Flap* dan gen *PIN* pada penelitian ini adalah Sal*I* dan *BamHI*. Enzim tersebut tergolong dalam enzim endonuklease restriksi yang hanya memotong DNA utas ganda pada sekuen tertentu yang disebut sekuen pengenalan atau situs pengenalan (*recognition site*). Alasan enzim Sal*I* dan *BamHI* digunakan pada penelitian ini karena gen *PIN* akan dimasukkan ke dalam vektor ekspresi. Untuk dapat memotong, hal pertama yang harus dilihat adalah *restriction map* dari p*Flap* dan pGEMT-*Easy*. Enzim-enzim yang ada pada p*Flap* disesuaikan terlebih dahulu dengan enzim yang ada pada pGEMT-*Easy*. Pada peta restriksi p*Flap*, terdapat Sal*I* dan *BamHI*. Jika enzim yang akan digunakan tersebut sesuai dengan terdapat pada vektor kloning maupun vektor ekspresi maka enzim tersebut dapat digunakan untuk memotong gen yang diinginkan.

Gambar 3. Hasil elektroforesis *pFlap* digesti dengan enzim Sal*I* dan *BamHI*

Gambar 4. Hasil purifikasi plasmid *Flap*

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Setelah dipotong dengan enzim Sal*I* dan *BamHI* (Gambar 3). menunjukkan pita dengan ukuran sekitar 3842 bp. Pita dengan ukuran 3842 bp tersebut merupakan ukuran p*Flap* yang berhasil dipotong dengan enzim Sal*I* dan *BamHI*. Setelah itu, fragmen *pFlap* tersebut dipotong dari gel untuk dielusi dengan *Pure Link* ™ *Quick Gel Extraction* (Invitrogen). Hasil purifikasi dari plasmid *pFlap* disajikan pada Gambar 4. Hasil purifikasi tersebut menunjukkan bahwa adanya pita dengan ukuran 3842 bp. Hal ini menggambarkan bahwa purifikasi plasmid *pFlap* hasil digesti telah murni didapatkan.

Gambar 5. Hasil purifikasi gen *PIN*

Begitu pula sebaliknya, gen *PIN* dipotong dengan enzim restriksi Sal*I* dan *BamHI* dari vektor kloning (pGEMT-*Easy*) untuk disambungkan pada vektor kloning *pFlap*. Setelah dipotong dengan enzim Sal*I* dan *BamHI*, hasil elektroforesis menunjukkan adanya 2 pita dengan ukuran 3000 bp dan 600 bp. Dua pita DNA ini disebabkan adanya dua sisi restriksi yang dikenali oleh enzim restriksi dalam urutan nukleotida plasmid. Pita dengan ukuran 3000 bp merupakan ukuran dari vektor kloning (pGEMT-*Easy*) sedangkan pita dengan ukuran 600 bp merupakan ukuran dari gen Tc*PIN*. Dengan demikian disimpulkan bahwa gen Tc*PIN* sudah terpisah sempurna dari vektor kloning (pGEMT-*Easy*). Selanjutnya fragmen dari gen Tc*PIN* dipotong dari gel lalu dielusi (Gambar 5.) dengan *Pure Link* ™ *Quick Gel Extraction* (Invitrogen) untuk diligasi dengan p*Flap*.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

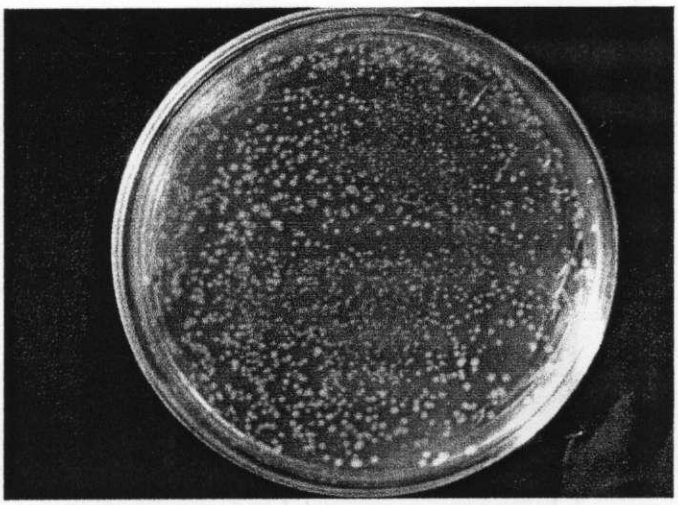
Kloning dan pemeriksaan komponen DNA

Gen *PIN* dan p*Flap* yang telah dipotong dengan enzim Sal*I* dan *BamHI*, kemudian diligasi. Enzim DNA ligase berfungsi menempelkan rantai tunggal pada ujung molekul *ds*DNA, yang memiliki ujung 5' dengan gugus fosfat dan yang memiliki ujung 3' dengan gugus hidroksil. Sifat komplementer hasil restriksi dari enzim restriksi yang sama (atau enzim berbeda yang menghasilkan ujung lancip yang sama) sangat penting untuk menempelkan DNA dari sumber yang berbeda. Enzim ligase memiliki efisiensi lebih tinggi untuk menempelkan ikatan fosfodiester yang putus pada pasangan ujung lancip daripada ujung tumpul (Turner *et al.* 2000).

Hasil ligasi antara p*Flap* dan gen Tc*PIN* kemudian ditransformasi ke *E. coli* strain XL1-*Blue*. Transformasi merupakan proses memasukkan DNA asing biasanya plasmid, ke dalam suatu organisme. Metode transformasi dilakukan antara lain dengan metode fisika (injeksi, partikel *bombardment*, pulsa medan listrik), metode kimia (melarutkan DNA dalam larutan PEG dan penggunaan kejut panas), atau secara biologis (menggunakan vektor *E.coli* atau *Agrobacterium*) (Endress 1994). Transformasi ke sel bakteri biasanya dilakukan dengan perlakuan Ca^{2+} sehingga membuat bakteri tersebut kompeten untuk dimasuki DNA plasmid. (Turner *et al.* 2000). Transformasi ke *E. coli* dilakukan untuk memperbanyak jumlah DNA plasmid rekombinan. Sel kemudian disebarkan diatas medium LB agar yang telah ditambahkan dengan ampisilin 100 ppm. Setelah itu diinkubasi semalam pada suhu 37°C.

Dalam hal transformasi koloni, seleksi transforman antara gen *PIN* dengan p*Flap* melalui warna koloni yang terbentuk berbeda dengan seleksi transforman antara gen *PIN* pada pGEMT-*Easy*. Warna koloni yang terbentuk pada hasil transformasi gen *PIN* dengan p*Flap* ke dalam sel kompeten hanya menghasilkan satu warna koloni saja, yaitu koloni berwarna putih (Gambar 6.). Setelah hasil transformasi menghasilkan warna koloni putih yang mengandung plasmid rekombinan, maka dari koloni yang terbentuk tersebut diduplikat dan dikultur untuk memperbanyak jumlah plasmid rekombinan.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

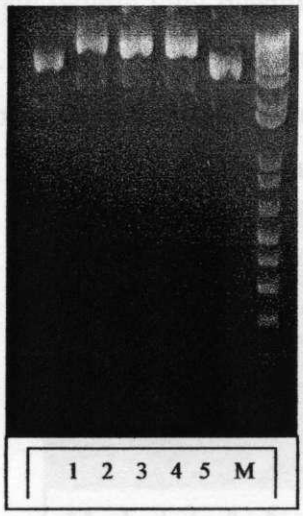


Gambar 6. Contoh transformasi koloni gen *PIN* dengan p*Flap* ke dalam sel kompeten (XL1-*Blue*).

Hasil transformasi diambil 5 (lima) koloni transforman untuk isolasi plasmid. Isolasi DNA plasmid pada penelitian ini menggunakan *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche). Isolasi DNA plasmid dengan menggunakan kit ini, pada prinsipnya sama dengan pemisahan plasmid berdasarkan ukuran. Proses pemisahan plasmid berdasarkan ukurannya dimulai dengan pembuatan ekstrak sel. Jika sel dipecah secara perlahan pada kondisi terkendali hanya sebagian kecil DNA kromosom yang putus, sehingga fragmen DNA kromosom berukuran jauh lebih besar dari ukuran plasmid dapat dipisahkan dari plasmid dengan cara mengendapkan DNA kromosom bersama serpihan sel melalui sentrifugasi. Cara ini dapat meminimalkan kerusakan DNA kromosom dan selanjutnya dari proses sentrifugasi akan menghasilkan larutan jernih yang mengandung DNA yang hampir seluruhnya berupa DNA plasmid.

Hasil isolasi DNA plasmid dielektroforesis pada gel agarosa sehingga menghasilkan pita-pita DNA yang berbeda ukurannya dapat terpisah. Elektroforesis DNA plasmid yang mengandung sisipan gen *PIN* disajikan pada Gambar 7. Berdasarkan hasil isolasi DNA plasmid gen *PIN* yang ditransformasi ke dalam sel *E.coli* menghasilkan satu ukuran yaitu ± 4442 bp. Ukuran ini didapat dari penggabungan ukuran p*Flap* yaitu 3842 bp dan gen *PIN* itu sendiri yang mempunyai ukuran sekitar 600 bp.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/



Gambar 7. Hasil elektroforesis isolasi DNA plasmid gen Tc*PIN* dengan *pFlap*

Kloning Gen *PIN* dari vektor kloning ke vektor ekspresi

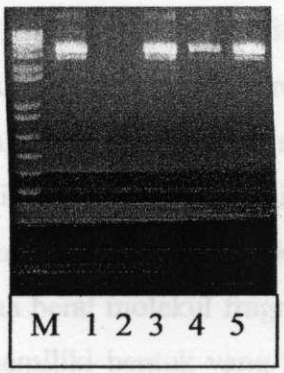
Setelah verifikasi pada gel agarosa menunjukkan hasil sesuai dengan yang diharapkan, selanjutnya kloning gen dilakukan dengan menggunakan p*BIN*$^+$ sebagai vektor ekspresi.

Hasil ligasi antara gen *PINFlap* dan p*BIN*$^+$ kemudian ditransformasi ke *E. coli* strain XL1-*Blue* sebagai tahap terakhir proses kloning. Transformasi merupakan proses memasukkan DNA asing biasanya plasmid, ke dalam suatu organisme. Transformasi ke *E. coli* dilakukan untuk memperbanyak jumlah DNA plasmid rekombinan. Sel kemudian disebarkan diatas medium LB agar yang telah ditambahkan dengan kanamisin 25 ppm. Setelah itu diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Seleksi sel yang telah mengandung vektor dilakukan berdasarkan pada marka seleksi yang dimiliki oleh vektor. Marka seleksi biasanya berupa gen yang membawa sifat resistensi terhadap antibiotik tertentu dan vektor yang digunakan pada penelitian ini memiliki sifat resistensi terhadap ampisilin. Setelah hasil transformasi menghasilkan warna koloni putih yang mengandung plasmid rekombinan, maka dari koloni yang terbentuk tersebut dikultur dengan mengambil beberapa koloni untuk memperbanyak jumlah plasmid rekombinan.

Selanjutnya dilakukan isolasi plasmid dari setiap kultur menggunakan high pure plasmid isolation kit dari *Roche*. Hasil isolasi plasmid kemudian diverifikasi pada gel agarosa 1% dengan voltase 75 volt. Hasil isolasi DNA plasmid rekombinan memiliki

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

ukuran yang tidak jauh dengan ukuran total plasmid p*BIN*$^{+}$ sekitar 12000 bp dan ukuran gen *TcPIN* sekitar 2600bp. Hasil klon transforman dan ukuran plasmid rekombinan membuktikan bahwa transformasi gen target ke dalam sel kompeten *E. Coli* XL-1 *Blue* dengan vektor ekspresi telah berhasil dilakukan (Gambar 8).



Gambar 8. Hasil elektroforesis isolasi DNA plasmid gen *PIN* Flap dengan p*BIN*$^{+}$

Secara umum dalam keteknikan asam nukleat atau rekayasa genetika, ada tiga jenis DNA yang biasa diisolasi dan dimurnikan yaitu DNA total sel, DNA plasmid dan DNA faga. DNA total sering diperlukan sebagai sumber gen untuk diklon. Sedangkan DNA plasmid umumnya digunakan sebagai vektor dan DNA faga biasanya diisolasi dari partikel bakteriofaga. Biasanya, startegi isolasi dan pemurnian plasmid hampir sama dengan strategi isolasi dan pemurnian DNA total, yaitu melibatkan proses pembiakan sel pembawa plasmid, pemanenan sel, pembuatan ekstrak sel, penghilangan protein dan RNA, lalu DNA dipekatkan melalui presipitasi etanol. Namun pada isolasi DNA plasmid selalu perlu untuk memisahkan DNA plasmid dengan DNA kromosom yang ada di dalam sel.

Teknik yang dapat digunakan untuk memisahkan DNA plasmid dari DNA kromosom sehingga menghasilkan DNA plasmid murni dapat dilihat dari segi ukuran. Ukuran plasmid jauh lebih kecil dibandingkan DNA kromosom. Selain berbeda ukuran, DNA plasmid juga memiliki perbedaan konfirmasi dengan DNA kromosom. Konfirmasi yang dimaksud adalah konfigurasi ruang molekul DNA secara keseluruhan. Pada proses preparasi, plasmid umumnya tetap berbentuk sirkular sedangkan DNA kromosom berbentuk linier akibat putus atau terfragmentasi selama proses preparasi.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

Proses pemisahan plasmid berdasarkan ukurannya dimulai dengan pembuatan ekstrak sel. Jika sel dipecah secara perlahan pada kondisi terkendali hanya sebagian kecil DNA kromosom yang putus, sehingga fragmen DNA kromosom berukuran jauh lebih besar dari ukuran plasmid dapat dipisahkan dari plasmid dengan cara mengendapkan DNA kromosom bersama serpihan sel melalui sentrifugasi. Cara ini dapat meminimalkan kerusakan DNA kromosom dan selanjutnya dari proses sentrifugasi akan menghasilkan larutan jernih yang mengandung DNA yang hampir seluruhnya berupa DNA plasmid.

Timbulnya beberapa pita DNA hasil isolasi disebabkan oleh adanya perbedaan konfirmasi dari plasmid-plasmid tersebut. Pergerakan fragmen DNA pada gel agarosa proporsional terhadap logaritma berat molekul fragmen tersebut. Plasmid yang memiliki putaran (koil) lebih banyak memiliki bentuk yang lebih kompak sehingga lebih mudah melalui pori-pori dalam gel agarosa daripada plasmid yang putarannya lebih sedikit. Sehingga, plasmid yang memiliki putaran lebih banyak lebih cepat jalannya di dalam gel dibanding dengan plasmid yang memiliki putaran lebih sedikit.

Geometri molekul superkoil bisa berubah oleh bermacam-macam faktor yang mempengaruhi putaran intrinsik DNA heliks. Sebagai contoh, peningkatan temperatur dapat menurunkan jumlah putaran dan peningkatan kekuatan ion dapat meningkatkan jumlah putaran. Faktor penting lain yang berpengaruh adalah kehadiran interkalator. Interkalator yang paling terkenal adalah etidium bromida. Etidium bromida merupakan senyawa polisiklik aromatik bermuatan positif yang akan berikatan dengan DNA yang bermuatan negatif dengan menginsersikan dirinya diantara pasangan basa (interkalasi). Interkalasi menyebabkan DNA heliks melonggar sekitar 26°C (Turner *et al.* 2000). Proses isolasi, elektroforesis dan pewarnaan DNA dengan etidium bromida juga mempengaruhi putaran DNA heliks.

Digesti Gen *PIN BIN*$^{+}$ dengan Enzim Restriksi

Plasmid yang telah diisolasi selanjutnya dianalisis pola restriksinya dengan pemotongan menggunakan enzim *Asc1* dan *Pac1* untuk memastikan bahwa sel yang tumbuh adalah sel transforman *E. coli XL1-blue* (berisi konstruk *PIN BIN*$^{+}$). Setelah dipotong dengan enzim restriksi DNA rekombinan dengan *Asc*1 dan *Pac*1 menghasilkan

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/

2(dua) pita yaitu pita vektor ekspresi dan pita gen *PIN* yang mempunyai promotor dan terminator.

SIMPULAN

Konstruk gen *PIN* telah berhasil disisipkan ke dalam vektor ekspresi *BIN*$^+$. DNA rekombinan yang terkonstruksi dapat dibuktikan dengan pemotongan kembali menggunakan enzim restriksi *Asc*I dan *Pac*I, menghasilkan 2 pita, yaitu pita dengan ukuran ± 12000 bp yang merupakan ukuran dari p*BIN*$^+$ dan pita dengan ukuran 2600 bp yang merupakan ukuran dari gen *TcPIN* yang mempunyai promotor dan terminator.

SARAN

DNA rekombinan yang telah berhasil ditransformasikan ke dalam vektor ekspresi sebaiknya ditransformasikan pada tanaman kedelai untuk mempelajari aktifitasnya pada fase penggerek polong.

Repository University Of Riau
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS RIAU
http://repository.unri.ac.id/