



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 CI (Rep) Geminivirus ke dalam Escherichia coli BL21

SKRIPSI

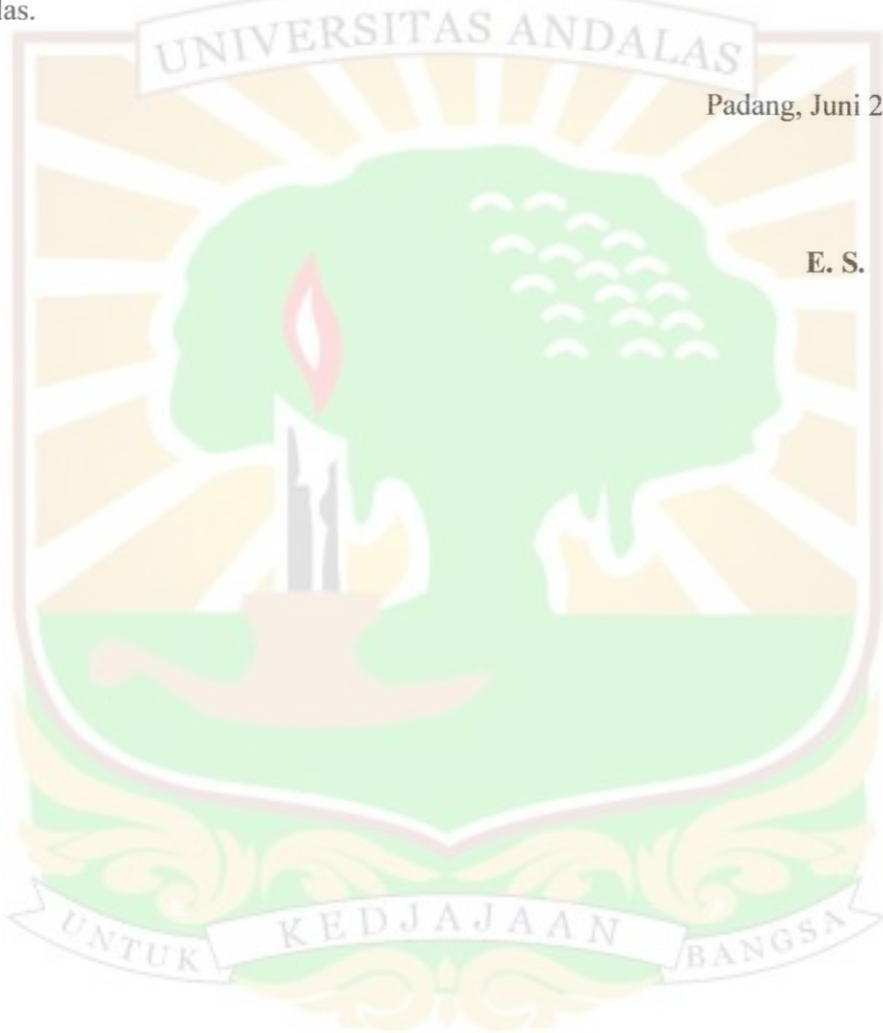


**ELLY SYAFRIANI
0810212216**

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011**

BIODATA

Penulis dilahirkan di Medan, Sumatera Utara pada tanggal 14 September 1989, sebagai anak keenam dari 7 (tujuh) bersaudara, dari pasangan Wirtomo dan Nur Chairuna. Pendidikan Sekolah Dasar (SD) ditempuh di SDN 066657, Martubung, Medan dan lulus tahun 2002. Sekolah Menengah Pertama ditempuh di SMPN 45 Medan dan lulus tahun 2005. Sekolah Menengah Umum ditempuh di SMUN 3 Medan dan lulus tahun 2008. Pada tanggal 7 Agustus 2008, penulis diterima di Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas.



Padang, Juni 2012

E. S.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT, atas berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “**Kloning Gen C1 (Rep) Geminivirus ke dalam *Escherichia coli* BL21**”. Shalawat serta salam juga penulis ucapkan kepada Nabi besar Muhammad SAW yang telah membawa umatnya ke alam yang penuh dengan ilmu pengetahuan.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak **Prof. Dr. sc. agr. Ir. Jamsari, MP.** dan Bapak **Ir. Irwan Darfis, MP.** selaku pembimbing yang telah memberikan arahan, nasehat dan masukan yang sangat penulis butuhkan dalam penulisan skripsi ini. Ucapan terimakasih juga penulis ucapkan kepada seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini, terutama untuk Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional melalui Skim Hibah Penelitian Strategis Nasional yang telah membiayai penelitian ini. Terimakasih yang sebesar-besarnya kepada seluruh peneliti dan analis di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman (Fakultas Pertanian) yang cukup banyak membantu penulis selama melakukan penelitian, kepada seluruh karyawan Program Studi Agroekoteknologi, dan juga kepada seluruh dosen di Fakultas Pertanian yang telah mengajarkan penulis berbagai ilmu pengetahuan yang bermanfaat selama menempuh kuliah di Universitas Andalas.

Harapan penulis semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca sekalian. Terima kasih.

Padang, Juni 2012

E. S.

DAFTAR ISI

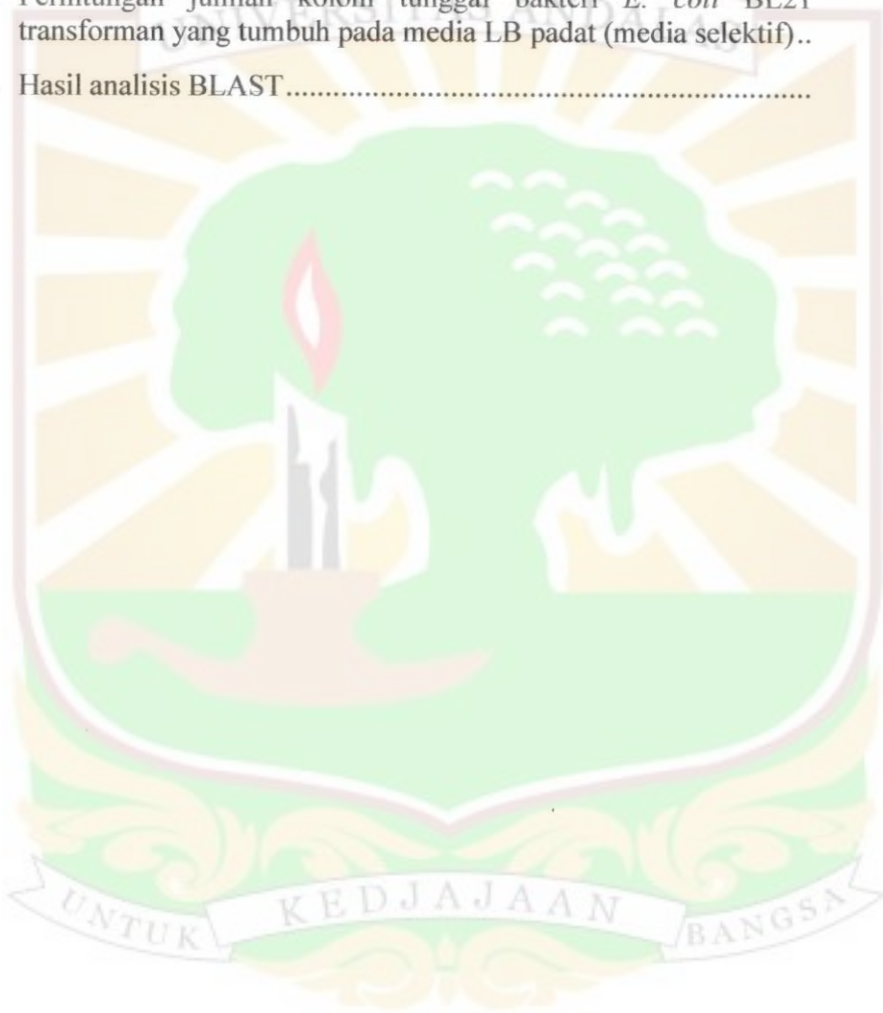
	<u>Halaman</u>
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
ABSTRAK	xii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Geminivirus	4
2.2. Strategi Mengatasi Geminivirus	8
2.3. Teknologi DNA Rekombinan, Transformasi Genetik, dan Kloning Gen	11
2.4. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR), Ligasi, Restriksi, dan Sekuensing	14
III. BAHAN DAN METODE	19
3.1. Waktu dan Tempat	19
3.2. Bahan dan Alat	19
3.3. Metode Penelitian	21
3.4. Pelaksanaan	21
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1. Pengambilan Sampel di Lapangan.....	33
4.2. Isolasi DNA Genom Geminivirus.....	34
4.3. Amplifikasi Isolat dengan Primer WS-PYLCV-387F/R, TD21- PYLCV-455F/R pada Isolat TD dan PSS14-PYLCV-353F/R pada Isolat PSS	37
4.4. Amplifikasi Gen C1 Geminivirus dengan Primer Spesifik Gen C1	41

4.4.1. Amplifikasi Gen C1 Geminivirus Isolat Tanah Datar (TD) dengan Primer C1-TD21-WS-F/R dan C1-TD21-BamHI/SmaI-NT	41
4.4.2. Amplifikasi Gen C1 Geminivirus Isolat Pesisir Selatan (PSS) dengan Primer C1-PSS14-WS-F/R dan C1-TD21-BamHI/SmaI-NT	51
4.5. Evaluasi DNA Geminivirus Stok Laboratorium	53
4.6. Kloning Gen C1 Geminivirus ke dalam <i>E. coli</i> BL21	60
4.7. Koloni PCR pada Bakteri <i>E. coli</i> BL21 Transforman dan pembuatan <i>Master Plate</i>	63
4.8. Verifikasi Gen Insert pada DNA Rekombinan	64
4.8.1. Isolasi DNA Plasmid rekombinan	64
4.8.2. Verifikasi Gen C1 dengan Metode PCR pada DNA Plasmid Rekombinan	66
4.8.3. Restriksi Hasil Amplifikasi Plasmid Transforman dengan Enzim <i>SmaI</i> dan <i>BamHI</i>	67
4.8.4. Analisis Sekuens Parsial Gen C1	68
V. KESIMPULAN DAN SARAN	75
5.1. Kesimpulan	75
5.2. Saran	75
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN	81



DAFTAR TABEL

<u>Tabel</u>	<u>Halaman</u>
1. Jenis dan fungsi gen <i>Begomovirus</i>	6
2. Data primer yang digunakan dalam penelitian	20
3. Data konsentrasi DNA genom Geminivirus dari tiap isolat	36
4. Data konsentrasi DNA genom Geminivirus dari tiap isolat stok laboratorium	54
5. Perhitungan jumlah koloni tunggal bakteri <i>E. coli</i> BL21 transforman yang tumbuh pada media LB padat (media selektif)..	61
6. Hasil analisis BLAST	70



DAFTAR GAMBAR

<u>Gambar</u>	<u>Halaman</u>
1. Pembagian genus Geminivirus beserta genomnya	7
2. Proses kloning ke dalam sebuah plasmid	13
3. Visualisasi analisis sekuensing pada salah satu software.....	18
4. Bagan alir penelitian.....	21
5. Visualisasi sampel segar tanaman cabai merah yang terserang Geminivirus di lapangan.....	33
6. Hasil isolasi DNA genom Geminivirus.....	35
7. Hasil amplifikasi isolat TD dengan primer WS-PYLCV-387F/R..	37
8. Hasil amplifikasi isolat PSS dengan primer WS-PYLCV-387F/R.	37
9. Hasil amplifikasi seluruh isolat TD dengan primer TD21-PYLCV-455F/R.....	39
10. Hasil amplifikasi keenam isolat PSS dengan primer PSS14-PYLCV-353F/R	40
11. Hasil amplifikasi beberapa isolat TD dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT secara langsung (non reamplifikasi).....	43
12. Hasil amplifikasi beberapa isolat TD dengan primer C1-TD21-WS-F/R.....	44
13. Hasil reamplifikasi isolat TD8	45
14. Hasil amplifikasi beberapa isolat TD dengan primer spesifik gen C1 Geminivirus Tanah Datar	47
15. Hasil amplifikasi beberapa isolat TD dengan primer C1-TD21-WS-F/R (variasi konsentrasi DNA <i>template</i>)	48
16. Hasil amplifikasi isolat TD10	50
17. Hasil amplifikasi isolat PSS dengan primer spesifik gen C1 Geminivirus	52
18. Hasil elektroforesis isolat stok laboratorium	53
19. Hasil amplifikasi isolat PSS stok laboratorium dengan primer WS-PYLCV-383F/R menggunakan GTG.....	55
20. Hasil amplifikasi isolat PSS stok laboratorium dengan primer PSS14-PYLCV-353F/R.....	56
21. Hasil amplifikasi beberapa isolat PSS stok laboratorium dengan primer C1-PSS14-WS-F/R	57

22. Hasil amplifikasi isolat PSS2.1 menggunakan RTG.....	58
23. Hasil purifikasi gel produk amplifikasi template PSS2.1 dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT.....	59
24. Hasil reamplifikasi terhadap hasil purifikasi gel dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT.....	59
25. Pertumbuhan bakteri <i>E. coli</i> BL21 transforman di media LB padat.....	62
26. Hasil koloni PCR bakteri <i>E. coli</i> BL21 transforman.....	63
27. Hasil isolasi plasmid.....	65
28. Hasil amplifikasi plasmid rekombinan dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT dan Primer T7/SP6.....	66
29. Hasil restriksi plasmid transforman dengan enzim <i>SmaI</i> dan <i>BamHI</i>	67
30. Hasil <i>VecScreen</i> yang telah ditandai sekuens primer <i>SmaI</i>	69
31. Hasil penjajaran sekuens C1 Geminivirus menggunakan Clustal-W2.....	72



DAFTAR LAMPIRAN

<u>Lampiran</u>	<u>Halaman</u>
1. Jadwal kegiatan penelitian.....	81
2. Komposisi media LB (Luria Bertani).....	82
3. Gambar plasmid pBI121.....	83
4. Gambar plasmid <i>pGem-T-easy vector</i>	84

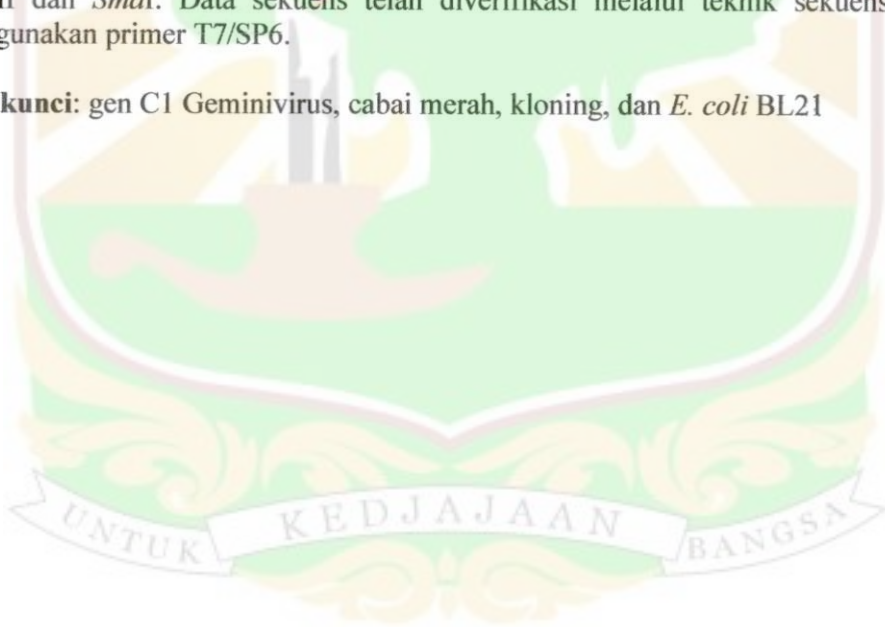


Kloning Gen C1 (*Rep*) Geminivirus ke dalam *Escherichia coli* BL21

Abstrak

Kloning gen ke dalam suatu vektor untuk stok gen sangat penting dilakukan sebagai langkah awal metode *Phatogen Derived Resistance* (PDR), guna merakit tanaman cabai merah yang resisten dari serangan Geminivirus. Di dalam Geminivirus, gen C1 (*Rep*) memiliki peranan yang sangat penting untuk replikasinya. Oleh karena itu, penggunaan gen C1 akan lebih efektif jika gen tersebut digunakan pada metode PDR daripada gen-gen lainnya dari Geminivirus. Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas. Percobaan kloning dilakukan dengan mentransformasi *pGem-T easy* rekombinan yang telah terinsersi oleh gen C1 melalui metode “kejut panas” dan seleksi antibiotik ke dalam *Escherichia coli* BL21. Hasil penelitian ini ialah satu koloni transforman yang mengandung *pGem-T easy vector* rekombinan yang telah terinsersi oleh gen C1 Geminivirus dari dua belas koloni *E. coli* BL21 transforman. Hasil penelitian telah diverifikasi menggunakan amplifikasi, restriksi, dan verifikasi sekuens DNA melalui sekuensing. Verifikasi amplifikasi menggunakan primer T7/SP6 dengan ukuran produk PCR sekitar 1307 bp dan primer C1-BamHI/SmaI-NT dengan ukuran produk sekitar 1132 bp. Verifikasi restriksi dilakukan menggunakan enzim *Bam*HI dan *Sma*I. Data sekuens telah diverifikasi melalui teknik sekuensing menggunakan primer T7/SP6.

Kata kunci: gen C1 Geminivirus, cabai merah, kloning, dan *E. coli* BL21



Cloning C1 Gene (Rep) of Geminivirus to *Escherichia coli* BL21

Abstract

Cloning a gene to vector as material gene is really important as the first step of Pathogen Derived Resistance (PDR) method to develop a resistance red chili pepper from Geminivirus attack. In Geminivirus, C1 gene (Rep) has very important role for its replication. So it will be more effective if it is used for PDR than other genes of Geminivirus. This research was done in Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Andalas University. Cloning was done by transformed recombinant pGem-T easy which was inserted by C1 gene by using heat shock method and antibiotic selection on *Escherichia coli* BL21. The result of this research was one transformant colony containing a recombinant pGem-T easy vector which is inserted by C1 gene from twelve selected colonies transformant *E. coli* BL21. Then the results have been verified by using amplification, restriction, and sequence DNA verification through sequencing. The amplification was verified by using T7/SP6 primers (size of PCR product is about 1307 bp) and C1-BamHI/SmaI-NT primers (size of product is about 1132 bp). The restriction was verified by using *Bam*HI and *Sma*I enzymes. The sequence was verified by sequencing using T7/SP6 primers.

Key words: C1 gene of Geminivirus, red chili pepper, cloning, and *E. coli* BL21.



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sayuran merupakan salah satu komoditi yang berperan penting dalam menunjang perekonomian Sumatera Barat. Salah satu jenis komoditi sayuran tersebut adalah cabai merah. Cabai merah mempunyai nilai ekonomi yang penting dibandingkan dengan jenis sayuran lainnya (Arneti *et al.*, 2009). Sumatera Barat merupakan salah satu provinsi penghasil cabai di Indonesia. Produksi cabai di Sumatera Barat sangat fluktuatif dan masih jauh dari potensi yang dapat dihasilkannya. Salah satu penyebabnya ialah adanya serangan hama dan penyakit.

Penyakit yang paling dominan dan sangat merugikan tanaman cabai merah pada saat sekarang ini adalah penyakit kuning keriting. Penyakit ini disebabkan oleh Geminivirus dan disebut dengan *Pepper Yellow Leaf Curl Virus* (PepYLCV) (genus: *Begomovirus*; famili: *Geminiviridae*). Di Sumatera Barat gejala penyakit ini dilaporkan pertama kali pada akhir tahun 2003 di Kabupaten Sawah Lunto, Sijunjung dan pada tahun 2004 telah menyebar di seluruh areal pertanaman cabai di Sumatera Barat (Syaiful, 2005).

Para pemulia tanaman saat ini berusaha untuk mengembangkan kultivar-kultivar tahan terhadap Geminivirus baik melalui pendekatan konvensional maupun pendekatan rekayasa genetik. Pendekatan pemuliaan konvensional belum memberikan peranan yang berarti terhadap penanganan penyakit kuning keriting karena spesies-spesies cabai yang diketahui memiliki ketahanan terhadap penyakit kuning keriting belum teridentifikasi sampai saat ini. Seiring dengan hal tersebut maka pendekatan pemuliaan nonkonvensional dengan menggunakan teknik rekayasa genetik juga dilakukan secara intensif (Gonsalves, 2002).

Strategi rekayasa genetik memiliki dua pendekatan dalam pengembangan kultivar resisten terhadap virus berdasarkan sumber gen yang digunakan. Pendekatan pertama disebut dengan pendekatan *Pathogen Derived Resistance* (PDR) dimana gen yang digunakan untuk menghasilkan ketahanan berasal dari patogen virus itu sendiri (Sanford dan Johnston, 1985). Pada pendekatan kedua,

gen-gen yang digunakan dapat berasal dari inang ataupun organisme lainnya (Margareta, 2004).

Strategi berbasis PDR dapat dibagi ke dalam beberapa kelompok tergantung kepada bagian genom virus yang digunakan. Salah satu gen yang dapat digunakan untuk menghasilkan resistensi berbasis PDR adalah penggunaan gen-gen yang mengkode protein untuk replikasi (gen replikasi) (Palukaitis dan Zaitlin, 1997). Pada Geminivirus, gen yang berperan sebagai gen replikasinya ialah gen C1 (Desbiez *et al.*, 1995; Hull, 2002). Pemanfaatan gen C1 (*Rep*) di dalam PDR telah dilakukan oleh Golemboski *et al.* (1990) pada tanaman tembakau untuk merakit kultivar tembakau yang tahan terhadap *Tobacco Mosaic Virus* (TMV).

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

Langkah awal dalam tahapan perakitan kultivar cabai merah tahan Geminivirus melalui pendekatan PDR dapat dilakukan dengan mengkloning gen target ke dalam plasmid yang diperbanyak di dalam vektor perbanyakan seperti bakteri *Escherichia coli* BL21. Bakteri *Escherichia coli* BL21 memiliki keunggulan untuk kloning gen dibandingkan bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) strain lainnya. *E. coli* BL21 memiliki kemampuan memperbanyak diri dalam

jumlah rendah (*low copy number*) tetapi memperlihatkan ekspresi yang lebih baik untuk tujuan transformasi gen/DNA daripada bakteri *E. coli* lainnya (Nellen, 2011). Selain itu, *E. coli* BL21 juga memiliki ketahanan terhadap antibiotik *chloramphenicol* sehingga memudahkan seleksi bakteri *E. coli* BL21 transforman di media selektif.

Kloning gen target sebagai langkah awal perakitan kultivar cabai merah tahan geminivirus sangat penting untuk stok gen dan memudahkan proses ligasi gen target ke dalam plasmid yang akan digunakan untuk proses transformasi serta diharapkan dapat terekspresi dengan baik di dalam tanaman. Adapun plasmid yang dapat mengekspresikan gen target dengan baik di dalam tanaman ialah plasmid pBI121, pBin19, pET-15b, dan masih banyak plasmid komersial lainnya yang biasa digunakan untuk proses transformasi genetik ke dalam tanaman. Namun kekurangan plasmid-plasmid ini ialah biasanya memiliki ujung lengket (*sticky end*) setelah dipotong dengan enzim restriksi, sedangkan gen target biasanya berujung tumpul (*blunt end*) (Brown, 1991). Sehingga perlu dilakukan penambahan adaptor pada proses ligasi gen target ke dalam plasmid tersebut. Untuk memudahkan ligasi gen target ke dalam plasmid yang dapat terekspresi di dalam tanaman, maka perlu dilakukan ligasi gen target ke dalam plasmid *pGem-T easy* terlebih dahulu, karena ujung basanya telah diketahui pasti yaitu basa T (Timin) dengan gen target hasil amplifikasi (PCR) yang ujung basanya sudah pasti A (Adenin). Sehingga persentase keberhasilan ligasi gen target ke dalam plasmid *pGem-T easy* lebih tinggi dibandingkan plasmid-plasmid lainnya.

Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik dan telah melakukan penelitian yang berjudul, “**Kloning Gen C1 (Rep) Geminivirus ke dalam *Escherichia coli* BL21**”, sebagai langkah awal terhadap upaya perakitan kultivar cabai merah yang resisten terhadap serangan penyakit Geminivirus melalui pendekatan PDR.

1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan plasmid dan bakteri *E. coli* BL21 rekombinan yang mengandung gen C1.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Geminivirus

Geminivirus termasuk dalam kelompok virus tanaman dengan genom berukuran 2,6-2,8 kb berupa utas tunggal DNA yang melingkar dan terselubung dalam virion ikosahedra kembar (*geminata*) (Rusli *et al.*, 1999). Replikasi virus terjadi dalam bagian nukleus tanaman melalui pembentukan utas ganda DNA (*double stranded DNA replicative form*). Geminivirus merupakan kelompok virus yang memiliki asam nukleat deoksiribonukleat (DNA) dalam bentuk utas tunggal [*single stranded (ssDNA)*] (Sudiono dan Purnomo, 2008).

Di Meksiko, Venezuela, Brazil, Amerika Serikat (Florida), dan di beberapa negara di Amerika Tengah serta Karibia, serangan Geminivirus yang ditularkan oleh kutu kebul *Gemadus* (Homoptera: *Aleyrodidae*) mengakibatkan hancurnya industri tomat (Sudiono dan Purnomo, 2008). Serangan *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Gemini* di Israel dan isolat cabai Geminivirus di Texas menyebabkan kehilangan hasil mencapai 100% (Pico *et al.*, 1996; Stenger *et al.*, 1990). Di Propinsi Lampung penyakit kuning telah menyebar sejak tahun 2000 di sentra-sentra tanaman tomat dan tanaman cabai (Sudiono dan Purnomo, 2008).

Geminivirus dibedakan menjadi tiga kelompok berdasarkan tanaman inang, serangga vektor, dan struktur genomnya. Kelompok I adalah Geminivirus yang menginfeksi tanaman monokotil, ditularkan oleh serangga vektor wereng daun, dan memiliki struktur genom monopartit. Kelompok II Geminivirus yang menginfeksi tanaman dikotil, ditularkan oleh serangga vektor wereng daun, dan struktur genomnya monopartit. Kelompok III adalah Geminivirus yang menginfeksi tanaman dikotil, ditularkan oleh serangga vektor kutu kebul, dan struktur genomnya bipartit. Geminivirus dalam kelompok III memiliki daerah penyebaran yang sangat luas terutama di daerah tropika dan subtropika dimana kutu kebul (*Bemisia tabaci* Genn.) dapat berkembang dengan baik (Sudiono *et al.*, 2005).

Geminivirus mempunyai satu jenis selubung protein dengan bobot molekul 28 kDa. Material genetik virus ini adalah rantai tunggal DNA (*ssDNA*). Genom

ssDNA pada subgrup I terdiri dari 2,6-2,8 kb, sedangkan pada subgrup II dan III ukuran ssDNA-nya 2,4-2,6 kb. Geminivirus mempunyai partikel isometrik yang selalu berpasangan (*geminata*) (Sugiarman, 2000).

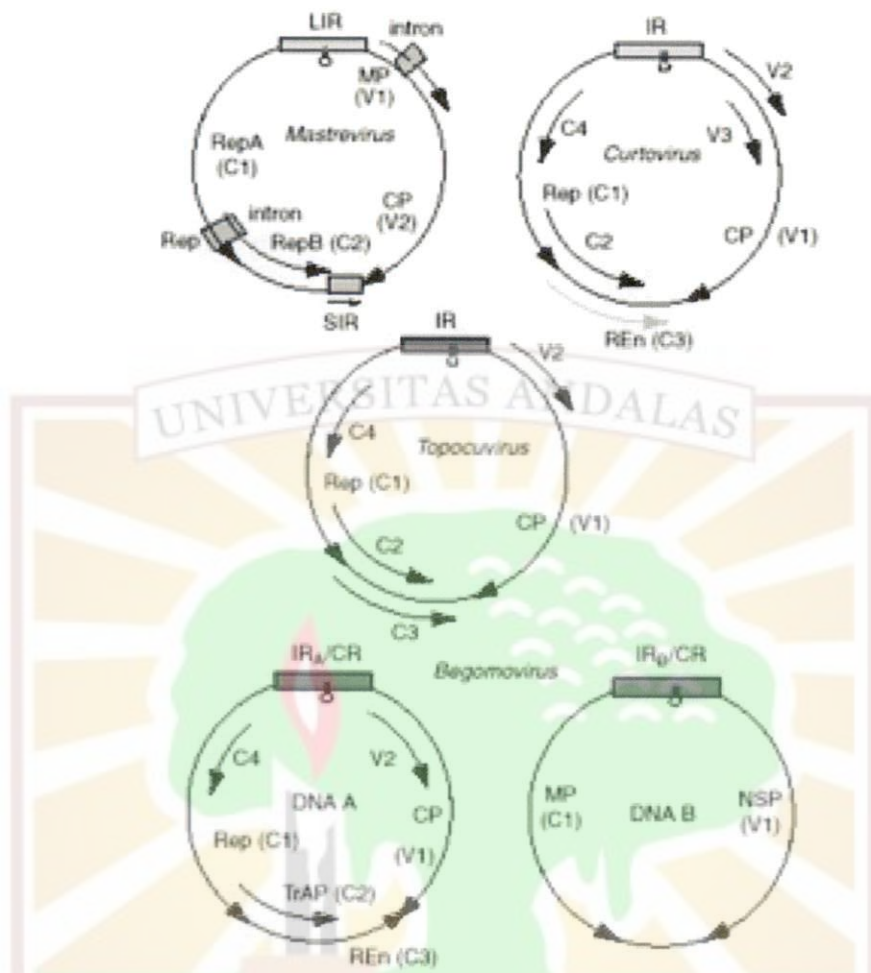
Geminivirus berdasarkan pengelompokan genom dan kelengkapan secara biologinya terbagi ke dalam empat kelompok. Keempat kelompok tersebut ialah genus *Mastrevirus* yang memiliki genom monopartit dan ditularkan oleh wereng hijau (*Leafhopper*) ke tanaman monokotil dan dikotil. Genus *Curtovirus* memiliki genom monopartit dan ditularkan oleh wereng hijau (*Leafhopper*) ke tanaman dikotil. Genus *Topocuvirus* memiliki genom monopartit oleh wereng pohon (*Treehopper*) ke tanaman dikotil. Genus keempat ialah *Begomovirus* yang memiliki genom bipartit (genom A dan genom B) dan monopartit, serta ditularkan oleh kutu kebul (*Whiteflies*) (Rojas, 2004).

Diantara genus-genus tersebut diatas, *Begomovirus* merupakan genus dengan jumlah anggota terbesar. Genus *Begomovirus* terdiri dari virus-virus dengan genom bipartit atau monopartit. Sebagian besar anggota genus *Begomovirus* memiliki genom bipartit yang terdiri dari dua molekul DNA utas tunggal sirkuler yang berbeda yaitu DNA A dan DNA B dengan masing-masing berukuran 2,7-2,8 kb. *Begomovirus* dengan genom monopartit, semua gennya terletak pada satu DNA utas tunggal sirkuler yang berukuran 2,8 kb. Komponen DNA Geminivirus baik monopartit maupun bipartit mengandung gen-gen yang menyandikan protein dengan fungsi yang khusus (Tabel 1). Gen penyandi protein selubung virus merupakan daerah genom yang mempunyai runutan DNA dengan derajat kesamaan yang tinggi antara anggota Geminivirus dalam satu genus (Meliansyah, 2010).

Menurut Bos (1994), yang termasuk kelompok Geminivirus adalah *maize streak virus* (MSV), *chloris striate mosaic virus* (CSMV), *bean golden mosaic virus* (BGMV), *cassava latent virus* (CLV) dan *tomato golden mosaic virus* (TGMV). Selain virus-virus tersebut, anggota Geminivirus lainnya menurut Agrios (1997), yaitu *tobacco mosaic virus* (TMV), *squash leaf curl virus* (SLCV), *tobacco leaf curl virus* (TLCV), *tomato mosaic virus* (ToMV), *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) dan *beat curly top virus* (BCTV).

Tabel 1. Jenis dan fungsi gen *Begomovirus* (Meliansyah, 2010).

Monopartit	Bipartit	Protein dan fungsinya
V1	AV1	Protein selubung virus (<i>coat protein</i>), berperan dalam penyebaran virus, pergerakan virus di dalam inangnya dan berperan dalam penularan yaitu melindungi partikel virus dari degradasi pada saat masuk sistem pencernaan kutu kebul.
V2	AV2	<i>Movement protein</i> (MP), berperan dalam pergerakan virus dalam tanaman terinfeksi.
C1	AC1	<i>Replication-associated protein</i> (Rep), berperan dalam proses replikasi virus.
C2	AC2	<i>Transcriptional activator protein</i> (TrAP), protein yang terlibat dalam pengaktifan transkripsi dari promotor protein selubung. Protein ini ditemukan pada inti dan berperan dalam patogenesis virus.
C3	AC3	<i>Replication enhancer protein</i> (REn), protein ini berinteraksi dengan protein C1 dan meningkatkan akumulasi DNA virus.
C4	AC4	Berinteraksi dengan C1 dan V2, berperan dalam penentu gejala dan terlibat dalam inisiasi pembelahan sel, pergerakan DNA virus dari sel ke sel mematahkan mekanisme pertahanan tanaman.
-	BV1	<i>Nuclear shuttle protein</i> (NSP) dan menyandakan virion DNA B.
-	BC1	<i>Movement protein</i> (MP), berperan dalam pergerakan virus di dalam tanaman terinfeksi.



Gambar 1. Pembagian genus Geminivirus beserta genomnya (Microbiologybytes, 2009)

Serangan Geminivirus pada tanaman cabai di Indonesia dilaporkan terjadi di daerah Jawa Barat pada tahun 1999 (Hidayat *et al.*, 1999). Gejala penyakit ini sangat khas meliputi: tulang daun menebal, tepi daun menggulung ke atas, dan helai daun berwarna kuning cerah (Sulandari *et al.*, 2006). Menurut BBPPTP (2008), variasi gejala yang mungkin timbul pada cabai akibat serangan Geminivirus ialah:

- a. Tipe-1: Gejala diawali dengan pucuk mengerut cekung berwarna mosaik hijau pucat, pertumbuhan terhambat, daun mengerut, dan menebal disertai tonjolan berwarna hijau tua.
- b. Tipe-2: Gejala diawali dengan mosaik kuning pada pucuk dan daun muda, gejala berlanjut pada hampir seluruh daun menjadi bulai.
- c. Tipe-3: Gejala awal urat daun pucuk atau daun muda berwarna pucat atau kuning sehingga tampak seperti jala, gejala berlanjut menjadi belang kuning, sedangkan bentuk daun tidak banyak berubah.
- d. Tipe-4: Gejala awal daun muda/pucuk cekung dan mengerut dengan warna mosaik ringan, gejala berlanjut dengan seluruh daun berwarna kuning cerah, bentuk daun berkerut dan cekung dengan ukuran lebih kecil, serta pertumbuhan terhambat.

2.2 Strategi Mengatasi Geminivirus

Pengendalian penyakit yang disebabkan oleh virus relatif sulit dilakukan. Virus sangat bergantung pada komponen inang untuk replikasinya, sehingga aplikasi senyawa antiviral mungkin dapat bersifat fitotoksik terhadap tanaman inang. Virus tanaman mempunyai keragaman genetik yang tinggi serta mekanisme replikasi dan patogenesisnya sangat kompleks. Kebanyakan penularan virus di alam terjadi melalui kutu daun dan bersifat non persisten (Taufik *et al.*, 2007) sehingga target pengendalian menjadi lebih luas dan sulit (Hull, 2002). Penggunaan kultivar tahan merupakan upaya pengendalian yang perlu dikembangkan. Salah satu keuntungan penanaman kultivar tahan adalah tidak diperlukan perlakuan khusus. Selain itu kultivar yang tahan atau toleran bersifat selektif dan secara ekologis aman dan dapat dikombinasikan dengan metode pengendalian lain seperti biokontrol atau dengan pestisida sekalipun (Fraser, 1992).

Strategi lain yang digunakan untuk mengatasi penyakit-penyakit yang disebabkan oleh virus biasanya meliputi pengendalian populasi vektor melalui penggunaan insektisida, penggunaan bahan tanaman yang bebas virus, perlakuan kultur teknis yang baik, serta penggunaan varietas-varietas tahan. Para pemulia tanaman saat ini berusaha untuk mengembangkan kultivar-kultivar tahan terhadap

Geminivirus baik dengan pendekatan konvensional maupun pendekatan rekayasa genetik. Sayangnya untuk tanaman cabai merah, spesies-spesies yang diketahui memiliki ketahanan terhadap penyakit kuning keriting belum teridentifikasi sampai saat ini. Oleh karena itu pendekatan pemuliaan konvensional belum terlihat memberikan peranan yang berarti terhadap penanganan penyakit virus kuning keriting. Seiring dengan hal tersebut maka pendekatan pemuliaan nonkonvensional dengan menggunakan teknik rekayasa genetik juga dilakukan secara intensif. Upaya-upaya yang telah dilakukan untuk menghasilkan beberapa tanaman transgenik yang tahan terhadap berbagai jenis virus antara lain telah dilakukan pada tomat, kentang, mentimun, padi, dan gandum (Jamsari *et al.*, 2009).

Berdasarkan sumber gen yang digunakan pada dasarnya ada dua pendekatan dalam pengembangan kultivar resisten terhadap virus. Pendekatan pertama disebut dengan pendekatan PDR (*Pathogen Derived Resisten*) dimana gen yang digunakan untuk menghasilkan ketahanan berasal dari patogen virus itu sendiri (Sanford dan Johnston, 1985). Pada pendekatan kedua, gen-gen yang digunakan dapat berasal dari inang ataupun organisme lainnya. Pendekatan pertama lebih banyak dilaporkan pada berbagai literatur dibandingkan dengan pendekatan kedua (Margareta, 2004).

Strategi berbasis PDR dapat dibagi ke dalam beberapa kelompok tergantung kepada bagian genom virus yang digunakan. Salah satu gen yang dapat digunakan untuk menghasilkan resistensi berbasis PDR adalah penggunaan gen-gen yang mengkode protein untuk replikasi (gen replikasi). Gen-gen replikasi memiliki struktur yang berbeda-beda pada setiap genus virus, dengan demikian pemilihan terhadap jenis virusnya akan mempengaruhi keberhasilan rekombinan resisten berbasis RMPDR (*Replicase-mediated PDR*). Dengan menggunakan baik keseluruhan gen replikasi, ataupun modifikasi melalui pemotongan ataupun mutasi paling sedikit dihasilkan tanaman yang resisten terhadap 14 jenis virus yang berbeda (Palukaitis dan Zaitlin, 1997).

Penggunaan sekuens gen replikasi secara utuh diketahui efektif untuk menghasilkan tanaman yang resisten terhadap *Potex-*, *Poty-*, *Luteo-*, *Sobemo-*, dan *Polerovirus* (Braun dan Hemenway, 1992). Efisiensi resistensinya juga telah

dibuktikan dengan percobaan lapang. Bahkan kultivar kentang resisten terhadap *Polerovirus Potato Leaf Roll Virus* telah diproduksi secara komersial (Lawson *et al.*, 2001). Salah satu kelemahan penggunaan gen-gen replikasi adalah kenyataan bahwa resistensinya biasanya efektif untuk virus-virus dan kerabat dekatnya yang merupakan sumber gen-gen replikasi tersebut. Namun demikian studi terakhir juga memperlihatkan adanya kemungkinan peningkatan level dan spektrum resistensi tersebut dengan menggabungkannya dengan resistensi berbasis PTGS (*Post Transcriptional Gene Silencing*) (Wintermantel dan Zaitlin, 2000; Goregaoker *et al.*, 2000).

DNA-A terdiri dari 5 *open reading frame* (ORF), 4 (*Rep*, *TrAP*, protein *REn*, dan *AC4*) yang melengkapi pita, satu selubung protein (*AVI*) di pita virion. *Rep* (protein inisiasi replikasi belum lama ini dikenal sebagai *AC1*) dan protein *REn* terlibat dalam replikasi sebagai mutasi dari replikasi viral penghambat *Rep*, dimana sebuah mutan protein *REn* dengan baik mereduksi level DNA dan menghasilkan beberapa penghambat dan mengurangi gejala-gejala (Mujaddad, 2004). *Rep* berada di dalam inti tanaman terinfeksi, dimana *Rep* memainkan peran kunci di dalam transkripsi dan replikasi DNA Geminivirus (Laufs *et al.*, 1995). *Rep* berperan dalam permulaan replikasi (Choi dan Stenger, 1995) dan menginisiasi pita-positif replikasi DNA (Laufs *et al.*, 1995).

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

Beberapa aktivitas biokimia gen *Rep* telah dilaporkan. Secara khusus *Rep* berperan dalam pembelahan dan penyatuan viral pita-positif DNA dengan simpul dari motif jepit rambut (Laufs *et al.*, 1995). Protein tersebut juga memproses aktivitas menakik DNA, sisi-spesifik topoisomerase dan aktivitas helikase (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995). Ikatan protein tersebut dengan retinoblastoma

seperti protein-protein tanaman yang terlibat di dalam siklus sel dan demikian memiliki fungsi terpenting di dalam ekspresi gen dan replikasi virus (Collin *et al.*, 1996). Aktivitas-aktivitas ini dapat terjadi dengan mengikuti langkah-langkah atau tahapan sebagai berikut :

- 1). Keterikatan *Rep* dengan retinoblastoma-berhubungan dengan protein untuk mencegah sel masuk ke dalam fase S oleh faktor-faktor transkripsi eksekusi (Collin *et al.*, 1996).
- 2). *Rep* mengarahkan kompleks replikasi ke daerah asal replikasi (Fontes *et al.*, 1992).
- 3). Cetakan-cetakan yang tidak terbelit oleh aktivitas helikase (Gorbalyena *et al.*, 1990).
- 4). DNA yang menantik untuk menginisiasi replikasi putaran (Koonin dan Ilyana 1992; Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995).
- 5). Pemisahan dari genom-genom yang direplika ke dalam unit lingkaran panjang monomer-monomer untuk produksi dari keturunan virus-virus oleh enzim nuklease dan aktivitas enzim ligase (Koonin dan Ilyana, 1992; Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995).

2.3 Teknologi DNA Rekombinan, Transformasi Genetik, dan Kloning Gen

DNA rekombinan merupakan teknik yang dapat dipergunakan untuk menguraikan mekanisme-mekanisme kompleks yang berkaitan dengan ekspresi gen. Rekayasa genetika merupakan salah satu teknik DNA rekombinan. Teknik ini mengubah urutan DNA untuk memodifikasi gen, yang selanjutnya dimasukkan kembali ke dalam sel atau organisme sehingga dapat meningkatkan (*over expression*) atau menurunkan (*silencing*) sejumlah protein yang dihasilkan tanaman transgenik. Gen yang direkayasa dapat berasal dari spesies yang sama atau berbeda dengan spesies tanaman yang akan disisipkan gen tambahan (Alberts *et al.*, 1994).

Transformasi genetik merupakan salah satu metode yang dapat dimanfaatkan untuk mempelajari regulasi gen, identifikasi fungsi gen, pengujian metabolisme, mempelajari fisiologi serta perkembangan tanaman. (Smith dan Hood, 1995). Transformasi genetik merupakan proses pengambilan DNA oleh

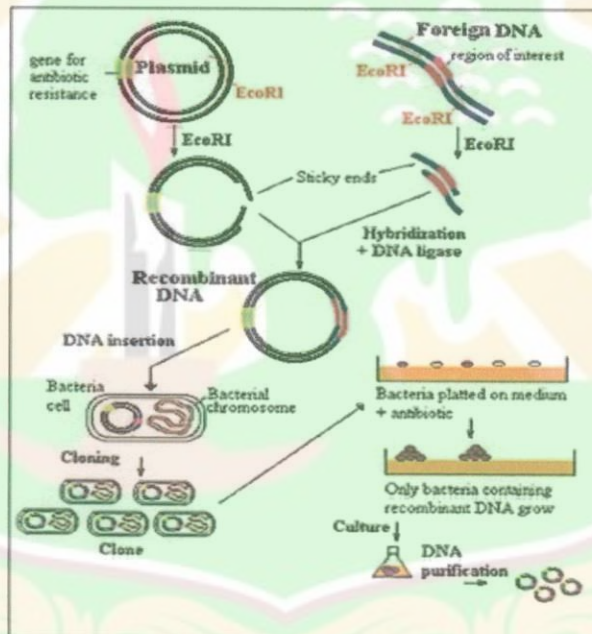
bakteri dari lingkungan di sekelilingnya. DNA yang berada disekitar bakteri dapat berupa fragmen DNA atau potongan DNA yang berasal dari sel bakteri lainnya atau organisme lainnya (Nasution, 2010). Teknologi transformasi genetik tanaman telah berkembang dengan memanfaatkan berbagai metode transformasi. Transformasi genetik dapat dilakukan melalui berbagai metode antara lain elektroporasi, *polyethylene glycol*, penggunaan serat *silicon carbide*, penembakan partikel DNA, dan melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* (Maftuchah, 2005).

Teknologi DNA rekombinan merupakan perpaduan sejumlah teknik dalam biologi molekuler. Beberapa teknik tersebut antara lain adalah (1) restriksi DNA dengan enzim nuklease, sehingga memudahkan isolasi dan manipulasi setiap gen yang dikehendaki; (2) kloning DNA, yaitu apabila sebuah fragmen DNA tertentu telah diintegrasikan ke dalam suatu unsur genetik yang dapat menggandakan diri sendiri (plasmid atau virus) dan hidup pada bakteri sehingga sebuah molekul DNA dapat direproduksi untuk menghasilkan salinan identik yang berjumlah jutaan; (3) rekayasa genetika, yaitu suatu cara mengubah urutan DNA untuk memodifikasi gen, yang selanjutnya dimasukkan kembali ke dalam sel atau organisme (Alberts *et al.*, 1994).

Kloning merupakan satu-satunya prosedur untuk menghasilkan suatu fragmen DNA yang mengandung gen spesifik dan oleh karena itu juga merupakan satu-satunya cara untuk mendapatkan bahan untuk penelitian langsung mengenai struktur serta kontrol ekspresi gen. Langkah-langkah dasar 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 inang (*host*) yang biasanya berupa bakteri, walaupun sel-sel jenis lainnya 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 inang 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 inang 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).

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



Gambar 2. Proses kloning ke dalam sebuah plasmid (Sciencebiotech, 2012)

Kebanyakan spesies bakteri, termasuk *E. coli*, dalam keadaan normal hanya dapat mengambil DNA dalam jumlah yang terbatas. Untuk melakukan transformasi spesies tersebut secara efisien, bakteri harus mengalami perlakuan fisik atau kimiawi tertentu yang akan meningkatkan kemampuannya untuk

mengambil DNA. Sel-sel yang telah mengalami perlakuan ini disebut sebagai sel yang kompeten (Brown, 1991).

DNA asing yang diambil oleh sel kompeten dapat berupa DNA bebas atau DNA sisipan dalam suatu vektor. Vektor-vektor yang membawa DNA tersebut terdiri dari plasmid, bakteriofage dan kosmid (Snyder and Champness, 1997). Plasmid sebenarnya adalah molekul DNA tambahan yang terdapat pada kebanyakan sel prokariot dan juga beberapa sel eukaryot. Struktur plasmid merupakan DNA sirkular tertutup, berpita ganda dengan panjang antara 1 kb sampai 200 kb. Plasmid secara umum bukan merupakan komponen esensial dari inangnya. Sebagai komponen ekstragenomik, plasmid memiliki gen yang mengendalikan kemampuan plasmid untuk memperbanyak diri atau replikasi secara autonom, sehingga perbanyakan molekul plasmid tersebut dapat tergantung kepada kendali perbanyakan sel inangnya. Replikasi DNA plasmid dikendalikan oleh seperangkat enzim yang sama dengan yang dipakai untuk duplikasi kromosom bakteri. Jika replikasi DNA plasmid bergabung dengan DNA kromosom inangnya, maka disebut replikasi plasmid tersebut berada dalam kondisi kontrol ketat. Pada kondisi ini, di dalam setiap sel bakteri hanya ada satu atau beberapa kopi saja dalam sel bakteri. Sebaliknya apabila replikasi berlangsung dalam kondisi kontrol longgar, maka jumlah kopi plasmid dapat mencapai 10-200 kopi pada setiap sel bakteri (Jamsari, 2007b).

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR), Ligasi, Restriksi, dan Sekuensing

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan cara untuk menggandakan urutan basa nukleotida tertentu secara *in vitro*. Penggandaan urutan basa nukleotida berlangsung melalui reaksi polimerisasi yang dilakukan berulang-ulang secara berantai selama beberapa putaran (siklus). Tiap reaksi polimerisasi membutuhkan komponen-komponen sintesis DNA seperti untai DNA yang akan digunakan sebagai cetakan (*template*), molekul oligonukleotida untai tunggal dengan ujung 3'-OH bebas yang berfungsi sebagai prekursor (primer), sumber basa nukleotida berupa empat macam dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), dan enzim DNA polimerase (Susanto, 2008).

Secara umum proses PCR pertama kali diawali dengan denaturasi pita ganda DNA melalui reaksi pemanasan dengan suhu 94°C selama beberapa saat, kemudian pengikatan primer-primer (*annealing*) ke pita tunggal molekul DNA. Selanjutnya adalah reaksi pembentukan molekul DNA sintetis (*extension*) dari bahan dNTPs pada suhu tertentu, tergantung karakteristik dari primer yang digunakan. Proses pembentukan/perpanjangan molekul DNA sintetis yang dikatalisis oleh enzim Taq-polymerase memiliki kecepatan pembentukan sekitar 150 nukleotid per detik (Jamsari, 2007b).

Ligasi ialah penyambungan molekul vektor dan molekul DNA yang akan diklon. Enzim yang mengkatalisis reaksi ligasi ini disebut enzim DNA ligase. Semua sel hidup menghasilkan DNA ligase, tetapi enzim yang dipakai dalam rekayasa genetik biasanya dimurnikan dari *E. coli* yang telah diinfeksi dengan fag T4. Di dalam sel, enzim ini melaksanakan fungsi yang sangat penting dalam reparasi tiap diskontinuitas yang mungkin timbul pada salah satu untai pada molekul untai ganda. Diskontinuitas sebenarnya hanya merupakan posisi tempat ikatan fosfodiester antara nukleotida yang berurutan terputus (berbeda dengan daerah putus (*nick*) tempat salah satu atau lebih nukleotida hilang). Walaupun diskontinuitas dapat terjadi pada waktu pemecahan DNA sel, hal ini juga dapat terjadi akibat proses-proses seperti replikasi dan DNA rekombinan. Oleh karena itu ligase memegang peran yang vital di dalam sel. Di dalam tabung percobaan, DNA ligase yang dimurnikan, disamping mereparasi diskontinuitas juga akan menyambung molekul DNA secara individual atau menyambung kedua ujung molekul yang sama (Brown, 1991).

Dalam teknik rekayasa DNA, menciptakan molekul-molekul kombinasi DNA baru adalah pekerjaan rutin yang harus dilakukan. Untuk keperluan tersebut persyaratan yang sangat dibutuhkan pertama sekali adalah ketersediaan fragmen-fragmen DNA tertentu dalam ukuran yang lebih kecil. Oleh sebab itu, maka dibutuhkan peralatan yang mampu memutuskan benang-benang DNA ke dalam ukuran fragmen yang lebih kecil dengan komposisi sesuai dengan yang dikehendaki (Jamsari, 2007b). Dalam kloning gen perlu bahwa molekul DNA dapat dipotong dengan cara yang sangat tepat dan dapat diulang. Tiap vektor harus dipotong pada posisi tunggal untuk membuka lingkaran sehingga molekul

DNA baru dapat diinsersikan. Molekul yang terpotong lebih dari satu kali akan terpecah menjadi dua fragmen atau lebih yang terpisah dan akan menjadi tidak berguna sebagai perantara kloning (Brown, 1991).

Sejak lama para ahli mikrobiologi telah mengamati bahwa strain-strain dari bakteri tertentu mampu menghalangi perkembangan virus-virus bakteriofage, sehingga virus-virus tersebut tidak mampu membiak lebih lanjut di dalam tubuh bakteri. Setelah diteliti lebih dalam ternyata fenomena tersebut disebabkan oleh adanya enzim-enzim yang ternyata mampu memotong senyawa-senyawa DNA Bakteriophage tersebut pada tempat-tempat yang spesifik. Para ahli biokimia menggolongkan enzim tersebut ke dalam golongan enzim nuklease, yaitu golongan enzim yang terlibat dalam proses modifikasi asam nukleat. Enzim-enzim tersebut disebut dengan enzim *endonuklease* sekuens spesifik karena memiliki mekanisme pemotongan dari bagian sekuens. Enzim-enzim ini juga diistilahkan dengan *endonuklease restriksi* atau sering disingkat dengan enzim restriksi (Jamsari, 2007b). Enzim restriksi memungkinkan ahli biologi molekuler memotong molekul DNA dengan cara yang tepat dan dapat diulang, yang diperlukan untuk kloning gen (Brown, 1991).

Informasi genetik pada suatu makhluk hidup tersimpan pada DNA-nya. Untuk mengetahui informasi genetik tersebut digunakan teknik *DNA Sequencing*, yaitu metode yang digunakan untuk menentukan urutan basa nukleotida (*adenine, guanine, cytosine, dan thymine*) pada molekul DNA. Saat ini teknik *DNA Sequencing* sudah memasuki tahap baru yang mengarah pada *large scale* atau *high-throughput sequencing*, jutaan bahkan miliaran basa nukleotida DNA dapat ditentukan urutannya dalam sekali proses saja. Sekuensing DNA menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sebagai pijakannya. DNA yang akan ditentukan urutan basa ACGT-nya dijadikan sebagai cetakan (*template*) untuk kemudian diamplifikasi menggunakan enzim dan bahan-bahan yang mirip dengan reaksi PCR, namun ada penambahan beberapa pereaksi tertentu. Proses ini dinamakan *cycle sequencing*. Perbedaan antara *cycle sequencing* dengan PCR biasa adalah (1) primer yang digunakan hanya satu untuk satu arah pembacaan, tidak dua (sepasang) seperti PCR, dan (2) ddNTPs (*dideoxy-Nucleotide*

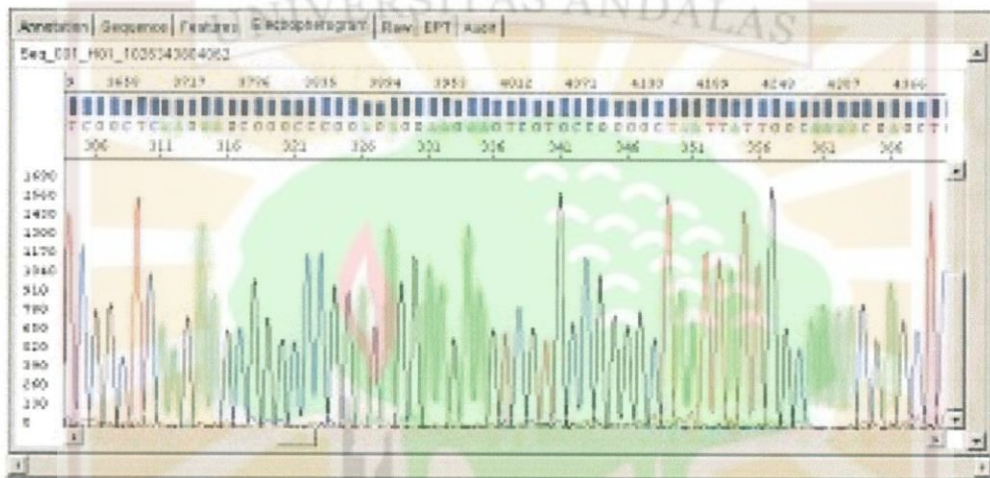
Triphosphate) adalah modifikasi dari dNTPs dengan menghilangkan gugus 3'-OH pada ribosa (Yepyhardi, 2009).

Cara pengurutan DNA telah ada sejak beberapa tahun yang lalu, tetapi baru sejak akhir tahun 1970-an dimungkinkan pengurutan yang cepat dan efisien. Dua macam teknik telah dikembangkan hampir secara bersamaan, yaitu cara pengakhiran rantai (*chain termination*) oleh F. Sanger dan A. R. Coulson di Inggris serta cara degradasi kimiawi oleh A. Maxam dan W. Gilbert di Amerika. Kedua teknik tersebut sangat berbeda, tetapi sama-sama bermanfaat. Keduanya memungkinkan penentuan urutan DNA yang panjangnya beberapa kb dalam waktu yang relatif pendek. Urutan DNA sekarang merupakan jenis informasi dasar pertama yang diperoleh mengenai gen yang diklon (Brown, 1991).

Pada awalnya metode sekuensing seperti yang dikembangkan oleh Sanger *et al.* melakukan identifikasi keempat jenis basa nitrogen dalam reaksi yang terpisah satu sama lain, sehingga prosedurnya cukup merepotkan dan tidak sesuai lagi untuk keperluan sekuensing molekul DNA dari organisme yang memiliki ukuran genom yang lebih besar apalagi untuk sekuensing seluruh total genom suatu organisme. Oleh karena itu, teknik sekuensing sejak 10 tahun terakhir lebih dikembangkan lagi ke arah otomatisasi. Dengan semakin mudah dan berkembangnya teknik otomatisasi sekuensing, saat ini banyak sekali sekuens dari databank yang dapat diakses secara bebas lewat internet. Sebagai contoh beberapa alamat websitenya adalah: www.ncbi., www.embl-heidel-berg.de., www.ebi.ac.uk., www.expasy.org. Masing-masing website tersebut bahkan juga menyediakan fasilitas analisis komparatif sekuens baik untuk membandingkan sekuens pada tingkat DNA, asam amino maupun pada tingkat protein seperti contohnya program BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Setiap sekuens yang diperoleh atau baru diidentifikasi dapat dibandingkan dengan sekuens yang sudah ada di databank untuk kemungkinan menentukan fungsi dan produk dari sekuens-sekuens yang diduga merupakan fragmen dari suatu gen yang telah dikenal (Jamsari, 2007b).

Para ilmuwan cerdas menemukan cara untuk melabel ddNTP dengan 4 label fluorescent yang berbeda-beda untuk ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP. Dengan demikian, reaksi *cycle sequencing* dapat dilakukan dalam satu tabung

reaksi dan diproses pada satu lajur gel elektroforesis saja. Dengan ditemukannya mesin *Automated Capillary Sequencer*, proses pemisahan fragmen dan pembacaan urutan basa DNA dapat dilakukan dengan lebih sederhana, cepat dan terotomatisasi. Jumlah kapiler pada mesin ini bervariasi, mulai dari 1, 4, 16, 48 hingga 96 kapiler dalam satu mesin, semakin banyak jumlah kapiler, semakin banyak pula jumlah sampel DNA yang bisa ditentukan urutan basanya. Hasil pembacaan mesin sequencer disebut *electropherogram*, yaitu peak-peak berwarna yang menunjukkan urutan basa DNA-nya (Yepyhardi, 2009).



Gambar 3. Visualisasi analisis sekuensing pada salah satu software (Yepyhardi, 2009)

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan September 2011 sampai dengan Februari 2012 di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas. Jadwal kegiatan percobaan dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini antara lain sampel daun cabai merah terserang Geminivirus asal Tanah Datar (TD) dan Pesisir Selatan (PSS), isolat DNA Geminivirus stok laboratorium, *pGemT-easy vector*, bakteri *Escherichia coli* BL21, enzim *Sma*I dan *Bam*HI, agarose, *Bromophenol Blue* (BPB), CaCl_2 0,1 M, *Ethidium bromide*, *Chloroform Isoamyl alcohol* (CI), *Phenol:Chloroform* (P:C), *Yeast extract*, *Ethanol absolute*, *Ethanol PA 70%*, *1 kb-ladder* (Fermentas), *Trypton*, *Agar Powder for Bacterial*, *ampicilin*, *chloramphenicol*, NaOH 10 N, glukosa, SDS, EDTA, Tris, NaCl, 0,5x TBE, 1x TE, ddH₂O PCR, *RTG PCR Bead*, *dNTPs*, *Taq polymerase*, *Taq buffer*, *Go Taq-Green* (GTG) *PCR Mix* (Promega-USA), Pottasium asetat 8M dan 3M, aquades, λ DNA 50 ng/ μL , *solution I*, *solution II*, *lizozim*, *2x Rapid Ligation Buffer* T₄ DNA *Ligase*, *water (free) nuclease*, T₄ DNA *Ligase*, *membran binding solution*, *membran wash solution*, es batu, tisu, dan kapas. Adapun keseluruhan primer yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Data primer yang digunakan dalam penelitian

No.	Nama Primer	Sekuens 5'-3'	Panjang basa (bp)	Estimasi panjang produk (bp)
1.	WS-PYLCV-387F	GCTCCCTGRAWGTT HGGATGGAA	23	2700
2.	WS-PYLCV-387R	GGAGCTAARTCMA GYTCCGAYGTCA	25	
3.	TD21-PYLCV-455F	CGTGCAGACGTATT TCCCTTCGAAT	25	2749
4.	TD21-PYLCV-455R	CAACAGATTCTTCG ACCTGGTAT	23	
5.	PSS14-PYLCV-353F	CTGAACTGGGCTGC TTTACCTTTGA	25	2748
6.	PSS14-PYLCV-353R	CGACTTCGATCT TACACA	20	
7.	T7	TAATACGACTCACT ATAGGGCGA	23	175
8.	SP6	ATTTAGGTGACACT ATAGAATAC	23	
9.	C1-PSS14-WS-F	GCAGTCTAAGTCAA TACGTCT	21	1108
10.	C1-PSS14-WS-R	GAGTCAAACATGCC TCGGTCA	21	
11.	C1-TD21-WS-F	GCAGTCTAAGTCAA TACGTCT	21	1110
12.	C1-TD21-WS-R	CGACTCCAAATG CCTCCA	20	
13.	C1-TD21-SmaI-NT *	CTAATCCCGGGTAC GTCTCCTGCGA	25	1132
14.	C1-TD21-BamH1-NT *	CATGGGGATCCATG CCTCCACCACGT	26	

(*) nukleotida yang bergaris bawah merupakan sisi pengenalan enzim restriksi yang ditambahkan ke dalam primer.

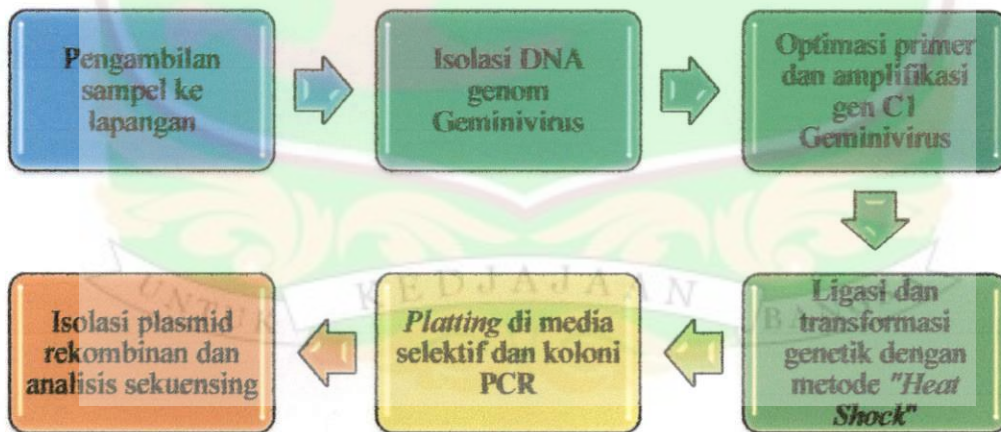
Sedangkan alat yang dibutuhkan antara lain *petridish* ukuran diameter 9 cm, labu ukur, botol media 100 mL dan 500 mL, *beaker glass*, mesin PCR (Biometra-Jerman), perangkat analisis gel elektroforesis, sistem dokumentasi gel, *erlenmeyer*, tip pipet, jarum ose, *aluminium foil*, plastik *wrap*, plastik bening, kertas label, sarung tangan, mesin sentrifugasi, oven, *microwave*, autoklaf, pH meter, timbangan analitik, kompor listrik, *water bath*, kulkas, *shaking incubator*, *tube eppendorf*, *hot plate magnetic stirrer*, LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*), pipet mikro, bunsen, *cutter*, dan *freezer bag*.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian ini ialah eksperimen dan deskripsi. Hal ini dimaksudkan karena untuk mendapatkan hasil sesuai yang diinginkan hanya dapat diperoleh berdasarkan percobaan yang dilaksanakan di laboratorium. Selain itu, keberhasilan seluruh hasil percobaan yang telah dilaksanakan dapat ditentukan atau dijelaskan berdasarkan visualisasi hasil yang diperoleh dan sumber-sumber literatur yang mendukung berhasil/tidaknya percobaan tersebut.

3.4 Pelaksanaan

Pelaksanaan penelitian ini dapat dilihat secara ringkas pada bagan alir berikut.



Gambar 4. Bagan alir penelitian

3.4.1 Persiapan Alat dan Bahan

Langkah awal pelaksanaan dari penelitian yang akan dilaksanakan ini ialah mempersiapkan ketersediaan alat dan bahan sesuai kebutuhan atau keperluan penelitian. Selanjutnya, dilakukan sterilisasi alat dan bahan seperti tip pipet, *tube eppendorf*, dan lain-lain.

3.4.2 Pengambilan Sampel ke Lapangan

Pengambilan sampel dilakukan di dua daerah yang berbeda yaitu di daerah Koto Laweh Padang Panjang Kabupaten Tanah Datar sebagai sampel Geminivirus Tanah Datar (TD) dan di daerah Salido Kabupaten Pesisir Selatan sebagai sampel Geminivirus Pesisir Selatan (PSS). Kedua daerah ini dipilih berdasarkan informasi bahwa agresivitas tertinggi Geminivirus Sumatera Barat terdapat pada Geminivirus yang berasal dari kedua daerah tersebut. Adapun cara pengambilan sampelnya adalah dengan memilih tanaman cabai yang akan diambil bagian pucuknya berdasarkan kriteria umur tanam yang masih berkisar 2,5-3 bulan atau yang belum memasuki fase berbunga dengan maksud agar serangan Geminivirus pada tanaman cabai yang akan diambil belum mengalami serangan lanjut, memperlihatkan ciri-ciri terserang Geminivirus yaitu daun menggulung dan menguning. Setelah didapati tanaman cabai dengan kriteria tersebut, bagian pucuk tanaman cabai dipotong menggunakan pisau, lalu pangkal batang yang dipotong ditutup dengan kapas basah (dibasahi oleh air biasa) dan sampel tersebut dimasukkan ke dalam plastik bening, diberi label dan disimpan di *freezer bag*.

3.4.3 Isolasi DNA Geminivirus dari Sampel Tanaman Cabai

Sampel yang telah ada, diisolasi daunnya untuk mendapatkan DNA Geminivirus yang berada di dalam daun tersebut dengan menggunakan metode Dellaporta *et al.* (1983). Sekitar 100 mg sampel daun cabai merah segar dihaluskan dalam *tube eppendorf* 2 mL menggunakan pistil (batang pengaduk). Setelah halus, ditambahkan 1000 μ L bufer (Tris 0,1M, pH 9, EDTA 0,1M, SDS 1%) dan diinkubasi di dalam *water bath* bersuhu 65⁰C selama 30 menit serta setiap 10 menit sekali dibolak-balik. Lalu ditambahkan Pottasium asetat 8M sebanyak 35 μ L dan diinkubasi di dalam es batu selama 30 menit. Kemudian

disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang terbentuk setelah disentrifugasi, selanjutnya dipindahkan ke dalam *tube eppendorf* 2 mL yang baru dan ditambahkan *Phenol:Chloroform* (1:1) sebanyak 500 μ L yang dilakukan di lemari asam. Lalu disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Hasil sentrifugasi yang kedua ini yaitu terbentuknya tiga lapisan yang terdiri dari supernatan pada lapisan atas, sisa gerusan sampel pada lapisan tengah, dan cairan klorofil pada lapisan bawah. Supernatan yang diperoleh tersebut dipipet ke dalam *tube eppendorf* 2 mL yang baru dan ditambahkan kembali *Phenol:Chloroform* sebanyak 500 μ L di lemari asam. Kemudian disentrifugasi selama 15 menit berkecepatan 10.000 rpm. Hasil sentrifugasi yang diperoleh yaitu terbentuknya dua lapisan terdiri dari supernatan pada lapisan atas dan sisa *Phenol:Chloroform* pada lapisan bawah. Supernatan dipipet ke dalam *tube eppendorf* 1,5 mL yang baru dan dicatat volumenya serta ditambahkan *ethanol absolute* sebanyak 2,5x volum supernatan. Lalu campuran supernatan dan *ethanol absolute* tersebut di-*tipping* hingga terlihat benang-benang berwarna putih bening (diindikasikan sebagai DNA). Selanjutnya diinkubasi di kulkas bersuhu -15°C selama 20 menit. Setelah 20 menit, disentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Kemudian supernatan dibuang dan endapan pelet DNA yang terbentuk dimurnikan dengan *ethanol* 70% sebanyak 500 μ L dan di-*tipping* sebentar. Setelah itu disentrifugasi lagi selama 3,5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm untuk mengendapkan pelet DNA. Sisa *ethanol* dibuang dan pelet DNA yang terendap dikeringanginkan di atas tisu selama 10 menit pada suhu ruang. Setelah kering, pelet dilarutkan dengan 1 x TE dan disimpan di dalam kulkas -20°C .

3.4.4 Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan untuk melihat kualitas dan kuantitas DNA hasil isolasi maupun hasil amplifikasi. Prosedur elektroforesis yang dilakukan selama penelitian ini yaitu: 1) Pembuatan gel agar 1%, agarose ditimbang sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam botol media serta ditambahkan 100 mL 0,5 x TBE. Kemudian campuran tersebut dimasak di dalam *microwave* selama 1,5 menit dengan suhu *medium high*. Hasilnya ditambahkan 10 μ L *ethidium bromida*

dan diaduk sebentar. Kemudian cairan agar dituang ke dalam *gel tray* dan dipasang sisir pada bagian atas *tray*. Cairan agar dibiarkan memadat sekitar 30 menit; 2) Pembuatan *cocktail* elektroforesis, terdiri dari:

- a. Untuk lambda (λ) DNA 50 ng/ μ L:

- λ DNA	: 2 μ L
- 10 x BPB	: 1 μ L
- 1 x TE	: 7 μ L +
- Total	: 10 μ L

- b. Untuk cek kualitas dan kuantitas setiap hasil isolasi DNA:

- DNA	: 2 μ L
- 10 x BPB	: 1 μ L
- 1 x TE	: 7 μ L +
- Total	: 10 μ L

- c. Untuk cek kualitas dan kuantitas setiap hasil PCR (amplifikasi) dengan RTG dan *Master Mix*:

- Hasil PCR	: 5 μ L
- 10 x BPB	: 1 μ L +
- Total	: 6 μ L

- d. Untuk cek kualitas dan kuantitas setiap hasil PCR (amplifikasi) dengan GTG (*Go Taq Green*), cukup langsung diloading di gel elektroforesis sekitar 10 μ L karena ia telah berwarna sehingga tidak perlu lagi dibuat *cocktail*-nya dengan penambahan warna 10 x BPB.

- e. Untuk cek kualitas dan kuantitas hasil isolasi plasmid:

- Hasil isolasi plasmid	: 5 μ L
- 10 x BPB	: 1 μ L +
- Total	: 6 μ L

Setelah agar memadat dan *cocktail* elektroforesis selesai dibuat, 3) Sisir pada gel diangkat dan gel diletakkan pada bak elektroforesis; 4) *Cocktail* di-*running* pada gel selama 30 menit dengan tegangan 100 Volt. Hasilnya didokumentasikan pada sistem dokumentasi gel.

3.4.5 Optimasi Primer dan Amplifikasi Genom Geminivirus serta Gen C1 Geminivirus.

Optimasi primer dilakukan dengan menggunakan mesin PCR untuk mendapatkan program PCR yang tepat dalam mengoptimalkan kerja primer. Amplifikasi DNA genom Geminivirus dari Tanah Datar dan Pesisir Selatan

c. Komposisi *cocktail* PCR menggunakan RTG PCR *Bead*:

- RTG : 1 buah
- Primer : 3 μ L
- DNA : 3 μ L
- ddH₂O PCR : 19 μ L +
- Total : 25 μ L

Setelah *cocktail* PCR selesai dibuat, *cocktail* tersebut diamplifikasi di dalam mesin PCR dengan program yang telah diatur suhu dan waktunya. Adapun program PCR yang digunakan selama penelitian ini yaitu:

a. Program PCR untuk amplifikasi genom Geminivirus Sumatera Barat menggunakan primer WS-PYLCV-387FR.

Steps	$^{\circ}$ C	m : s	Go to	Loops
1	94	5 menit	-	-
2	94	1 menit	-	-
3	60	2 menit	-	-
4	72	2 menit	2	29
5	72	10 menit	-	-
6	8	Pause	-	-

b. Program PCR untuk amplifikasi genom Geminivirus Sumatera Barat spesifik Tanah Datar menggunakan primer TD21-PYLCV-455FR.

Steps	$^{\circ}$ C	m : s	Go to	Loops
1	94	5 menit	-	-
2	94	1 menit	-	-
3	55	2 menit	-	-
4	72	2 menit	2	31
5	72	5 menit	-	-
6	8	Pause	-	-

c. Program PCR untuk amplifikasi genom Geminivirus Sumatera Barat spesifik Pesisir Selatan menggunakan primer PSS14-PYLCV-353FR.

Steps	$^{\circ}$ C	m : s	Go to	Loops
1	94	5 menit	-	-
2	94	1 menit	-	-
3	60	2 menit	-	-
4	72	2 menit	2	29
5	72	10 menit	-	-
6	8	Pause	-	-

- d. Program PCR untuk amplifikasi gen C1 Geminivirus dari Tanah Datar menggunakan primer C1-TD21-WS-FR.

Steps	^o C	m : s	Go to	Loops
1	94	5 menit	-	-
2	94	1 menit	-	-
3	60	2 menit	-	-
4	72	2 menit	2	29
5	72	10 menit	-	-
6	8	Pause	-	-

- e. Program PCR untuk amplifikasi gen C1 Geminivirus dari Pesisir Selatan menggunakan primer C1-PSS14-WS-FR.

Steps	^o C	m : s	Go to	Loops
1	94	5 menit	-	-
2	94	1 menit	-	-
3	60	2 menit	-	-
4	72	2 menit	2	29
5	72	10 menit	-	-
6	8	Pause	-	-

- f. Program PCR untuk amplifikasi gen spesifik C1 Geminivirus dari Pesisir Selatan dan Tanah Datar menggunakan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT.

Steps	^o C	m : s	Go to	Loops
1	94	5 menit	-	-
2	94	1 menit	-	-
3	60	2 menit	-	-
4	72	2 menit	2	29
5	72	10 menit	-	-
6	8	Pause	-	-

- g. Program PCR untuk amplifikasi fragmen T7/SP6.

Steps	^o C	m : s	Go to	Loops
1	95	2 menit	-	-
2	94	30 detik	-	-
3	55	1 menit	-	-
4	72	1 menit	-	-
5	94	1 menit	-	-
6	57	1 menit	-	-
7	72	1 menit 30 detik	5	24
8	72	5 menit	-	-
9	8	Pause	-	-

Hasil amplifikasi dicek dengan elektroforesis dan didokumentasikan pada sistem dokumentasi gel.

3.4.6 Persiapan Sel Kompeten

Persiapan 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 10 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 *tube eppendorf* 2 mL. Kemudian disentrifugasi pada 14.000 rpm, 4°C selama 5 menit. Fasa cair dibuang dengan hati-hati agar endapan pelet bakteri tidak ikut terbang. Selanjutnya, endapan bakteri ditambahkan 500 µL 0,1M CaCl₂. Kemudian didiamkan dalam es selama 30 menit. Selanjutnya disentrifugasi kembali dengan kecepatan 14.000 rpm 4°C selama 10 menit. Endapan bakteri yang terbentuk ditambahkan dengan bufer 0,1M CaCl₂ sebanyak 240 µL untuk membentuk suspensi. Sel kompeten bisa langsung digunakan atau disimpan pada suhu -80°C.

3.4.7 Ligasi Fragmen Gen C1 Geminivirus ke dalam Plasmid (*pGemT-easy vector*)

Ligasi dilakukan dengan menggunakan prosedur dari Promega (Promega-USA). Reaksi ligasi fragmen gen C1 Geminivirus hasil amplifikasi PCR akan dilakukan dengan prosedur sebagai berikut.

Komposisi *cocktail* sampel :

2x Rapid Ligation Buffer T ₄ DNA Ligase	: 5 µL
DNA Hasil Amplifikasi (PCR) 10 ng/µL	: 5 µL
pGemT-easy vector 50 ng/µL	: 1 µL
water (free) nuclease	: 8 µL
<u>T₄ DNA Ligase</u>	<u>: 1 µL +</u>
Total	: 20 µL

Kemudian *cocktail* diinkubasi selama satu malam (*over night*) pada suhu 4°C.

3.4.8 Transformasi Plasmid Rekombinan ke dalam Bakteri *E. coli*

Transformasi dilakukan dengan menggunakan prosedur Promega (Promega-USA) dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 5 μL dari setiap hasil ligasi atau plasmid dimasukkan secara hati-hati ke dalam *tube eppendorf* 1,5 mL yang telah berisi suspensi sel kompeten sebanyak 50 μL . Selanjutnya, campuran suspensi tersebut disimpan dalam es selama 30 menit. Setelah itu, *tube* berisi campuran suspensi dimasukkan ke dalam *water bath* untuk memberi kejutan panas (*heat shock*) pada suhu 42°C selama 45 detik dan didinginkan dalam es selama 2 menit, serta ditambah 250 μL LB cair. Kemudian campuran suspensi atau kultur cair bakteri yang diduga transforman tersebut diinkubasi di *shaking incubator* selama 60 menit pada 37°C dengan pengocokan berkecepatan 200 rpm. Setelah diinkubasi, kultur ditanam pada medium LB padat yang mengandung 50 $\mu\text{g/mL}$ *ampicilin* dan 34 $\mu\text{g/mL}$ *chloramphenicol*. Kultur bakteri diratakan di atas medium LB padat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam (16-18) jam. Diamati pertumbuhan bakteri yang tumbuh dan diduga sebagai bakteri transforman dengan ciri-ciri berwarna putih bening.

3.4.9 Koloni PCR dan Pembuatan *Master Plate*

Bakteri yang tumbuh dan diduga sebagai bakteri transforman pada hasil *plating*, selanjutnya diamplifikasi melalui koloni PCR dengan primer T7/SP6 dan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh tersebut memiliki sekuens T7-SP6 dan gen C1 Geminivirus atau tidak. Adapun komposisi *cocktail* PCR koloni yang digunakan ialah:

- dNTPs 2,5 mM	: 2,5 μL
- Dream Taq buffer	: 2,5 μL
- Taq polymerase	: 1 μL
- Primer T7/SP6 atau C1-TD21BamHI/SmaI-NT	: 2,5 μL
- ddH ₂ O PCR	: 16,5 μL +
- Total	: 25 μL

Setelah *cocktail* koloni PCR selesai dibuat, 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 (PCR) dengan

program T7/SP6 dan program gen C1 Geminivirus pada mesin PCR dan hasilnya dicek dengan elektroforesis. *Master plate* (yang dibuat bersamaan pembuatan *cocktail* PCR sebelumnya) diinkubasi pada suhu 37⁰C selama satu malam (*overnight*).

3.4.10 Isolasi DNA Plasmid

Bakteri yang tumbuh dan diduga positif sebagai bakteri transforman yang mengandung gen C1 pada *master plate* (sesuai informasi yang diperoleh dari koloni PCR), selanjutnya dikultur pada media LB cair sebelum digunakan untuk tujuan isolasi plasmid. Langkah awal melakukan kultur cair bakteri transforman ialah 10 mL media LB cair dituang ke dalam *erlenmeyer* berukuran 250 mL kemudian ditambahkan 10 μ L *chloramphenicol* dan 10 μ L *ampicilin* serta diaduk sesaat. Kemudian, koloni bakteri transforman yang tumbuh pada *master plate* diambil sedikit dengan tusuk gigi steril dan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* berisi media LB cair selektif. Setelah itu, *erlenmeyer* ditutup dengan *aluminium foil* dan plastik *wrap* serta di-*shaker* pada suhu 37⁰C selama satu malam (*overnight*).

Hasil kultur cair selanjutnya dipipet sebanyak 2 mL ke dalam *tube eppendorf* berukuran 2 mL dan disentrifugasi 14.000 rpm selama dua menit untuk tujuan mengendapkan pelet bakteri. Proses ini diulangi sebanyak 3-4 kali. Pelet yang diperoleh disuspensi dengan 200 μ L *solution* I : *lizozim* (10 : 1) dan divorteks. Kemudian hasil suspensi ditambahkan 200 μ L *solution* II dan dibolak-balik selama 5 menit dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 150 μ L potassium asetat 3M dan dibolak-balik selama 5 menit. Lalu hasilnya diinkubasi dalam es selama 15 menit dan kemudian disentrifugasi pada suhu 4⁰C dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dari hasil sentrifugasi ditransfer ke dalam *tube eppendorf* baru berukuran 1,5 mL dan ditambahkan 500 μ L C : I, selanjutnya dibolak-balik selama 5 menit. Lalu hasilnya disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit. Sekali lagi supernatan ditransfer ke dalam *tube eppendorf* 1,5 mL baru dan dipresipitasi dengan 500 μ L *ethanol absolut*. Dilakukan sentrifugasi kembali pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 150 μ L *ethanol* 70 %. Selanjutnya pelet yang dicuci dengan 150 μ L

ethanol 70% tersebut disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit. Terakhir, pelet dikeringkan dan disuspensi dengan 1 x TE sebanyak 50 μ L serta dielektroforesis sekitar 5 μ L untuk melihat kualitas dan kuantitasnya.

3.4.11 Amplifikasi Hasil Isolasi Plasmid dengan Primer T7/SP6 dan Primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT

Untuk memastikan bahwa isolasi plasmid yang dilakukan berhasil atau tidak, perlu dilakukan pengecekan dengan mengamplifikasi hasil isolasi plasmid tersebut dengan primer T7/SP6 dan C1-TD21BamHI/SmaI-NT. Amplifikasi dilakukan menggunakan GTG maupun RTG PCR *Bead*. Hasilnya dicek dengan elektroforesis. Prosedur kerja amplifikasi dapat dilihat pada subbab 3.4.5 dan prosedur kerja elektroforesis dapat dilihat pada subbab 3.4.4.

3.4.12 Restriksi Hasil Amplifikasi Plasmid Transforman dengan Enzim *SmaI* dan *BamHI*

Hasil amplifikasi plasmid transforman direstriksi dengan enzim *SmaI* dan *BamHI* untuk memastikan bahwa plasmid transforman yang diperoleh dapat direstriksi dengan kedua enzim tersebut atau tidak. Adapun komposisi *cocktail* restriksi yang digunakan sebagai berikut:

- | | |
|--------------------------|---------------|
| - ddH ₂ O PCR | : 10 μ L |
| - produk PCR | : 3 μ L |
| - FD 10 x buffer | : 3 μ L |
| - FD Bam-HI | : 2 μ L |
| - <u>FD Sma-I</u> | : 2 μ L + |
| - Total | : 20 μ L |

Cocktail diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37⁰C di dalam *water bath*. Setelah 3 jam, enzim restriksi dinaktifkan dengan penambahan inkubasi selama 20 menit pada suhu 80⁰C dan kemudian dielektroforesis sekitar 5 μ L untuk melihat hasilnya.

3.4.13 Analisis Sekuens Gen C1 Geminivirus dari Plasmid Transforman

Sekuensing dilakukan di Laboratorium Sentral Universitas Andalas, Padang. Sekuensing dilakukan secara dua arah (*two read direction*) menggunakan

primer T7/SP6. Urutan DNA hasil sekuensing diedit dan dikontrol secara manual dengan cara melihat peak tertinggi dari jenis peak lainnya. Urutan nukleotida dapat dibedakan karena masing-masing nukleotida memiliki warna yang berbeda-beda. Nukleotida A berwarna hijau, nukleotida G berwarna hitam, nukleotida C berwarna biru dan nukleotida T berwarna merah (Ratnayani, 2007). 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 databank pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov.

Selanjutnya, dipilih salah satu gen (aksesi) di database yang memiliki kemiripan dengan sekuens gen yang di-*input* untuk dilakukan analisis penjajaran sekuens (*sequence alignment*). Analisis pensejajaran sekuens bertujuan untuk melihat tingkat kesamaan dan variasi antara sekuens gen hasil kloning dengan salah satu gen dari database. Penjajaran sekuens ini dilakukan menggunakan program Clustal versi 2.1 secara *online* di situs: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toelform.ebi?tool=clustalw2>. Hasil pensejajaran ini dianalisis secara manual untuk melihat seberapa jauh tingkat kemiripan antar gen yang dibandingkan.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengambilan Sampel di Lapangan

Hasil pengambilan sampel segar daun tanaman cabai merah yang terserang Geminivirus di lapangan (daerah Tanah Datar dan Pesisir Selatan), dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Visualisasi sampel segar tanaman cabai merah yang terserang Geminivirus di lapangan. a) sampel Tanah Datar, b) sampel Pesisir Selatan

Pada Gambar 5. dapat dilihat bahwa serangan Geminivirus pada tanaman cabai merah menyebabkan pertumbuhannya terhambat dengan gejala yang ditunjukkan berupa pengkerdilkan di bagian pucuk dan pengkerutan (keriting) pada daun-daunnya serta perubahan warna akibat klorosis yang terjadi. Klorosis atau perubahan warna daun pada tanaman yang semula berwarna hijau menjadi kuning, terjadi akibat tidak cukup terbentuknya klorofil. Terhambatnya pembentukan klorofil ini merupakan pengaruh dari serangan Geminivirus pada tanaman tersebut.

Gambar 5a. memperlihatkan gejala klorosis dominan terjadi pada tanaman cabai merah di daerah Tanah Datar daripada daerah Pesisir Selatan (Gambar 5b.). Namun sebaliknya, gejala pengkerdilkan pucuk dan pengkerutan (keriting) daun dominan terjadi pada tanaman cabai merah di daerah Pesisir Selatan daripada di daerah Tanah Datar. Hal ini dapat terjadi akibat tingkat agresivitas yang sangat tinggi dimiliki oleh Geminivirus di Pesisir Selatan daripada di Tanah Datar.

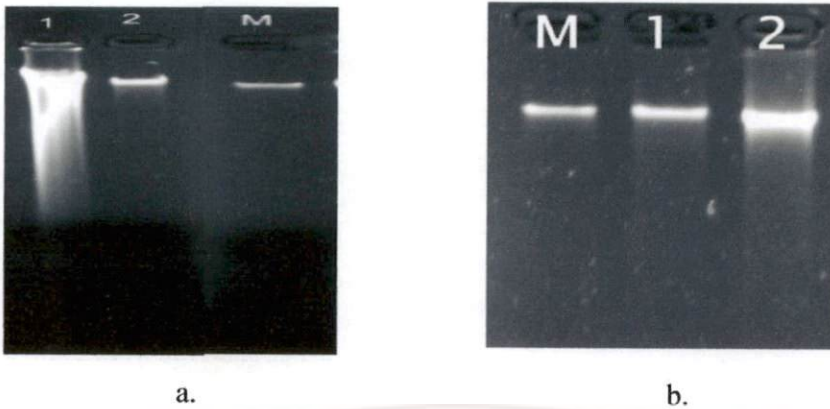
Sehingga, gejala serangan yang cukup berat pun terdapat pada sampel di Pesisir Selatan.

Sulandari *et al.* (2006) menyatakan bahwa gejala serangan Geminivirus sangat khas meliputi: tulang daun menebal, tepi daun menggulung ke atas, dan helai daun berwarna kuning cerah. BBPPTP (2008) membagi variasi gejala yang timbul pada tanaman cabai merah akibat serangan Geminivirus, antara lain: a). Tipe-1: gejala diawali dengan pucuk mengkerut cekung berwarna mosaik hijau pucat, pertumbuhan terhambat, daun mengkerut dan menebal disertai tonjolan berwarna hijau tua; b). Tipe-2: gejala diawali dengan mosaik kuning pada pucuk dan daun muda, gejala berlanjut pada hampir seluruh daun menjadi bulai; c). Tipe-3: gejala awal urat daun pucuk atau daun muda berwarna pucat atau kuning sehingga tampak seperti jala, gejala berlanjut menjadi belang kuning, sedangkan bentuk daun tidak banyak berubah; dan d). Tipe-4: gejala awal daun muda/pucuk cekung dan mengkerut dengan warna mosaik ringan, gejala berlanjut dengan seluruh daun berwarna kuning cerah, bentuk daun berkerut dan cekung dengan ukuran lebih kecil, serta pertumbuhan terhambat.

Berdasarkan pembagian variasi gejala yang dikemukakan oleh BBPPTP (2008) dapat diperkirakan bahwa gejala serangan Geminivirus pada tanaman cabai merah di daerah Tanah Datar adalah gejala tipe-2 atau tipe-3. Sedangkan gejala yang diperlihatkan pada tanaman cabai merah di daerah Pesisir Selatan merupakan gejala tipe-4. Perbedaan gejala yang diperlihatkan pada kedua sampel di atas, menunjukkan bahwa perbedaan daerah pertanaman mempengaruhi gejala serangan Geminivirus yang terdapat pada tanaman cabai merah tersebut. Polston dan Aderson (1997) menyatakan bahwa strains virus, kultivar, umur tanaman pada waktu terinfeksi dan kondisi lingkungan akan mempengaruhi gejala yang ditimbulkan akibat adanya virus.

4.2 Isolasi DNA Genom Geminivirus

Hasil isolasi DNA Geminivirus dari beberapa sampel segar tanaman cabai merah yang diperoleh dari lapangan (Tanah Datar dan Pesisir Selatan) pada bulan September 2011, diperlihatkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Hasil isolasi DNA genom Geminivirus. a) Isolat Tanah Datar (1-2), b) Isolat Pesisir Selatan (1-2), M: *marker* λ DNA 50 ng/ μ L

Gambar 6. di atas merupakan potongan visualisasi hasil elektroforosis isolat-isolat baik dari daerah Tanah Datar maupun daerah Pesisir Selatan. Dari isolasi DNA genom Geminivirus yang telah dilakukan, diperoleh sepuluh isolat dari daerah Tanah Datar dan enam dari daerah Pesisir Selatan. Setelah dilakukan pengecekan kualitas dan kuantitas keseluruhan isolat, diketahui bahwa beberapa isolat dari kedua daerah tersebut memiliki kualitas DNA yang cukup baik, yaitu pada isolat TD2, TD8, TD10, PSS1, PSS2, PSS3, dan PSS6. Sedangkan isolat TD3, TD6, TD7, dan TD9 memiliki kualitas DNA yang kurang baik karena terlihat sedikit adanya fragmen *smear* di bawah pita utama DNA masing-masingnya.

Begitu juga pada isolat TD1 yang memperlihatkan kualitas DNA yang jauh kurang baik karena terdapat fragmen *smear* yang berada di sekitar dan di bawah pita DNA utamanya dapat dilihat lebih jelas. Hal ini dapat terjadi karena masih terdapat sisa-sisa protein atau RNA yang mengkontaminasi DNA sehingga membentuk *smear* pada bagian sekitar atau di bawah pita utama DNA tersebut. Fragmen *smear* adalah fragmen yang muncul akibat terpotongnya untaian DNA utuh penyusun kromosom selama proses ekstraksi DNA. Terpotongnya fragmen tersebut dapat disebabkan oleh kerusakan mekanis sebagai akibat kegiatan penggerusan, maupun akibat aktifitas enzimatis oleh enzim DNAase selama rangkaian kegiatan isolasi (Jamsari, 2007b).

Berbeda pada isolat TD4, TD5, PSS4, dan PSS5 yang terlihat tidak menghasilkan DNA pada hasil isolasi tersebut. Hal ini memiliki dua kemungkinan, yaitu DNA tidak berhasil diisolasi atau konsentrasi DNA yang dihasilkan sangat rendah. Untuk mendeteksi keberadaan genom Geminivirus pada isolat-isolat tersebut dapat dilakukan melalui kegiatan amplifikasi menggunakan mesin PCR. Mesin PCR memiliki tingkat sensitivitas yang sangat tinggi, sehingga primer yang digunakan masih mampu bekerja dengan baik untuk mengamplifikasi genom Geminivirus tersebut walau konsentrasinya sangat rendah.

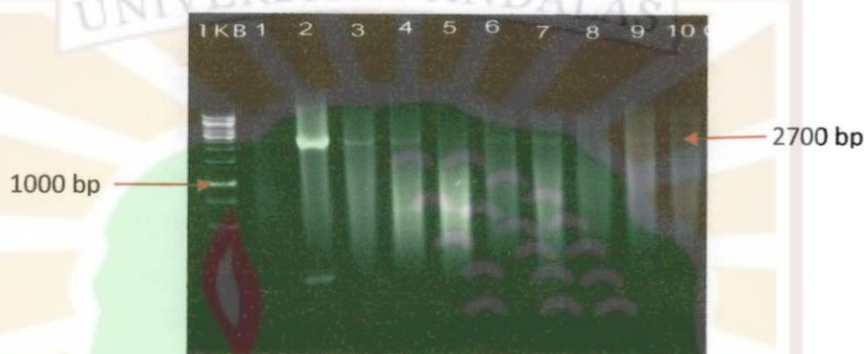
Gambar 6. juga memperlihatkan variasi jumlah konsentrasi DNA pada masing-masing isolat. Dalam isolasi DNA, hal penting yang harus diperhatikan yaitu: 1) Keutuhan ukuran molekul DNA, efektivitas isolasi, 3) Kemurnian DNA hasil isolasi, dan 4) Praktis dan ekonomis (Jamsari, 2007b). Konsentrasi DNA yang dihasilkan sangat tergantung pada efektivitas isolasi. Adapun variasi jumlah konsentrasi DNA dari tiap isolat dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Data konsentrasi DNA genom Geminivirus dari tiap isolat

No.	Daerah Sampel	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)
Tanah Datar		
1.	TD1	200
2.	TD2	100
3.	TD3	200
4.	TD4	25
5.	TD5	-
6.	TD6	175
7.	TD7	125
8.	TD8	75
9.	TD9	175
10.	TD10	125
Pesisir Selatan		
1.	PSS1	60
2.	PSS2	100
3.	PSS3	100
4.	PSS4	-
5.	PSS5	-
6.	PSS6	75

4.3 Amplifikasi Isolat dengan Primer WS-PYLCV-387F/R, TD21-PYLCV-455F/R pada isolat TD dan PSS14-PYLCV-353F/R pada Isolat PSS

Setelah diperoleh DNA hasil isolasi, dilakukan amplifikasi DNA genom Geminivirus dengan primer WS-PYLCV-387F/R pada seluruh isolat Tanah Datar (TD) dan 6 isolat PSS (PSS1-PSS6) menggunakan *Go Taq Green* (GTG). Primer yang digunakan merupakan primer yang mampu mengamplifikasi genom Geminivirus spesifik daerah Sumatera Barat. Adapun hasil amplifikasinya diperlihatkan pada Gambar 7. dan 8.



Gambar 7. Hasil amplifikasi isolat TD dengan primer WS-PYLCV-387F/R. 1-10: isolat TD, 1 KB: *marker DNA ladder*



Gambar 8. Hasil amplifikasi isolat PSS dengan primer WS-PYLCV- 387F/R. 1-6: isolat PSS, 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA 50 ng/μL*

Kedua gambar di atas menunjukkan bahwa amplifikasi isolat TD dan PSS untuk memastikan keberadaan genom Geminivirus spesifik Sumatera Barat hanya terdapat pada beberapa isolat dari kedua daerah tersebut. Dari sepuluh isolat TD

yang dicobakan, hanya TD1, TD2, TD3, TD4, TD5, TD6, TD7, dan TD9 yang menghasilkan produk DNA dengan panjang yang sesuai harapan yaitu sekitar 2700 bp setelah diamplifikasi dengan primer WS-PYLCV- 387F/R. Sedangkan dari enam isolat PSS yang diamplifikasi dengan primer WS-PYLCV- 387F/R, hanya isolat PSS1 dan PSS2 yang menghasilkan produk DNA dengan ukuran yang tepat (sesuai harapan) yaitu sekitar 2700 bp.

Pada isolat-isolat TD dan PSS yang menghasilkan produk DNA dengan ukuran yang sesuai harapan, terdapat empat isolat yang menghasilkan dua produk DNA (produk sampingan) selain produk DNA utamanya yaitu pada isolat TD2, TD4, TD5 dan PSS1. Produk sampingan yang terbentuk pada keempat isolat tersebut dapat terjadi karena adanya *mispriming* pada saat proses amplifikasi berlangsung. Tidak jauh berbeda pada isolat PSS6, walau tidak menghasilkan dua produk DNA, tetapi hasil amplifikasinya turut menunjukkan terbentuknya satu produk DNA yang ukurannya tidak sesuai harapan. Hal ini kemungkinan dapat dikarenakan adanya *mispriming*.

Handoyo dan Rudiretna (2001) menyatakan bahwa dalam merancang suatu primer perlu diperhatikan komposisinya. Rentetan nukleotida yang sama perlu dihindari, hal ini dapat menurunkan spesifitas primer yang dapat memungkinkan terjadinya *mispriming* di tempat lain. Kandungan G+C (% jumlah G dan C) sebaiknya sama atau lebih besar dari kandungan G+C DNA target. Sebab primer dengan %(G+C) rendah diperkirakan tidak akan mampu berkompetisi untuk menempel secara efektif pada tempat yang dituju. Dengan demikian akan menurunkan efisiensi proses PCR. Selain itu, urutan nukleotida pada ujung 3' sebaiknya G atau C. Nukleotida A atau T lebih toleran terhadap *mismatch* daripada G atau C, dengan demikian akan dapat menurunkan spesifitas primer. Interaksi primer-primer seperti *self-homology* dan *cross-homology* harus dihindari. Demikian juga dengan terjadinya *mispriming* pada daerah lain yang tidak dikehendaki, ini semua dapat menyebabkan spesifitas primer menjadi rendah.

Seperti yang juga dapat dilihat pada kedua gambar tersebut, beberapa isolat lainnya baik pada isolat TD dan PSS tidak menghasilkan produk DNA sama sekali. Hal ini dapat terjadi karena DNA Geminivirus spesifik Sumatera Barat

tidak terdapat pada isolat-isolat tersebut sehingga primer tidak dapat bekerja dan tidak menghasilkan produk DNA. Faktor lainnya adalah perubahan material genetik virus yang sangat mudah berubah merupakan faktor penting yang mempengaruhi keberhasilan primer mengamplifikasi DNA target (DNA virus). Perubahan sedikit saja basa sekuens pelekatan primer (*binding site*) pada DNA target yang akan diamplifikasi, dapat menyebabkan primer gagal mengamplifikasi sekuens DNA target tersebut. Menurut Wahyuni (2005), dalam kehidupannya, virus terus membentuk varian baru melalui suatu perubahan susunan nukleotida dalam asam nukleatnya dan perubahan ini terjadi sebagai akibat dari cekaman oleh faktor lingkungan, vektor, dan tumbuhan inang.

Untuk lebih memastikan hasil yang telah diperoleh di atas, maka seluruh isolat TD dan keenam isolat PSS yang telah dicobakan tersebut diamplifikasi dengan menggunakan primer spesifik Geminivirus sesuai daerahnya masing-masing agar diperoleh informasi yang akurat terhadap DNA Geminivirus yang berada pada isolat-isolat tersebut. Isolat-isolat Tanah Datar diamplifikasi dengan primer TD21-PYLCV-455F/R dan isolat-isolat Pesisir Selatan diamplifikasi dengan primer PSS14-PYLCV-353F/R. Sedangkan *cocktail* yang digunakan ialah GTG. Hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 9.



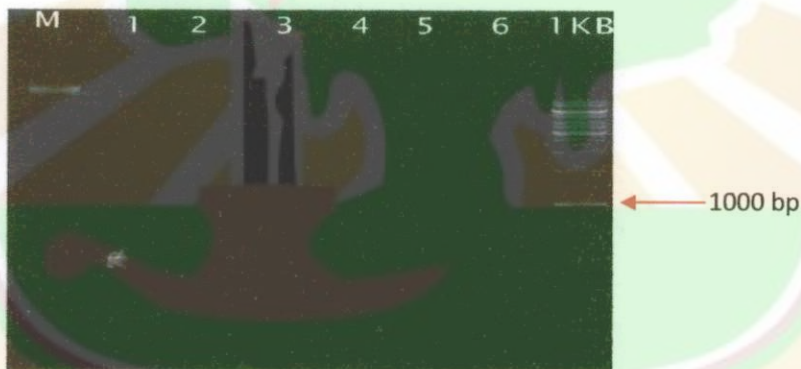
Gambar 9. Hasil amplifikasi seluruh isolat TD dengan primer TD21-PYLCV-455F/R. 1-10: isolat TD, 1KB: *marker DNA ladder*

Dari Gambar 9. dapat diketahui bahwa sebagian besar isolat TD yang diamplifikasi dengan primer TD21-PYLCV-455F/R mampu menghasilkan produk walau dengan konsentrasi DNA yang berbeda-beda. Dari kesepuluh isolat yang

dicobakan, delapan isolat yaitu TD1, TD2, TD3, TD4, TD6, TD8, TD9, dan TD10 menghasilkan produk DNA dengan ukuran yang sesuai dengan harapan (sekitar 2749 bp) dan dua isolat lainnya yaitu TD5 menghasilkan produk DNA sampingan (produk DNA dengan ukuran yang tidak sesuai dengan harapan) dan TD7 tidak menghasilkan produk DNA sama sekali.

Faktor yang menyebabkan terdapatnya produk DNA sampingan pada hasil amplifikasi isolat TD5 ialah akibat adanya *mispriming* yang mungkin terjadi pada saat proses PCR berlangsung seperti yang telah dijabarkan sebelumnya. Sedangkan pada isolat TD7 tidak menghasilkan produk DNA sama sekali dapat dikarenakan DNA Geminivirus spesifik daerah Tanah Datar tidak terdapat pada isolat-isolat tersebut sehingga primer tidak dapat bekerja dan tidak menghasilkan produk DNA. Faktor kemungkinan lainnya ialah telah terjadi perubahan material genetik pada Geminivirus yang terdapat di dalam isolat tersebut.

Adapun hasil amplifikasi isolat-isolat PSS dengan primer spesifik daerahnya dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Hasil amplifikasi keenam isolat PSS dengan primer PSS14-PYLCV-353F/R. 1-6: isolat PSS, 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Gambar 10. memperlihatkan bahwa keenam isolat PSS yang diuji tidak menghasilkan produk DNA setelah diamplifikasi dengan primer PSS14-PYLCV-353F/R. Hal ini menginformasikan bahwa DNA Geminivirus spesifik daerah Pesisir Selatan tidak terdapat pada keenam isolat tersebut atau juga telah terjadi mutasi atau perubahan material genetik pada Geminivirus di dalam isolat-isolat tersebut seperti penjelasan yang telah diuraikan sebelumnya. Mudah-mudahan material

genetik virus mengalami perubahan dalam waktu yang cukup singkat, sangat berpengaruh besar terhadap keberhasilan amplifikasi DNA target, sehingga tidak sedikit percobaan amplifikasi yang dilakukan pada penelitian ini gagal atau tidak menghasilkan produk DNA sesuai dengan harapan. Faktor ini terlihat jelas pada hasil-hasil amplifikasi isolat Tanah Datar dengan primer spesifik gen C1 Geminivirus yang akan dijelaskan pada subbab selanjutnya.

4.4 Amplifikasi Gen C1 Geminivirus dengan Primer Spesifik Gen C1

4.4.1 Amplifikasi Gen C1 Geminivirus Isolat Tanah Datar (TD) dengan Primer C1-TD21-WS-F/R dan C1-TD21-BamHI/SmaI-NT

Amplifikasi gen C1 Geminivirus merupakan salah satu langkah yang sangat penting dalam penelitian ini karena hasilnya digunakan untuk proses ligasi gen tersebut ke dalam *pGem-T easy vector* dan akan diteruskan untuk diperbanyak di dalam bakteri *E. coli* BL21. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen C1 Geminivirus spesifik Tanah Datar ialah primer C1-TD21-WS-F/R. Namun dalam penggunaan selanjutnya, primer ini bukan menjadi primer utama untuk mengamplifikasi gen C1 Geminivirus Tanah Datar karena beberapa alasan yang menyebabkan primer tersebut harus mengalami perubahan atau modifikasi.

Pada dasarnya, penelitian ini diarahkan untuk kepentingan penelitian yang dapat dilakukan pada waktu yang akan datang, yaitu untuk penelitian transformasi gen C1 ke dalam kalus tanaman cabai merah. Tujuannya, untuk merakit tanaman cabai merah yang resisten terhadap serangan Geminivirus. Tetapi, dari ketersediaan bahan yang terdapat di laboratorium, diketahui plasmid yang mampu menginfeksi tanaman dan tersedia di laboratorium hanya ada plasmid pBI121. Sehingga, hal yang sangat penting untuk diperhatikan dalam penelitian selanjutnya ialah peluang keberhasilan gen C1 Geminivirus tersebut dapat diligasikan ke daerah T-DNA (antara daerah LB hingga daerah RB) yang ada pada pBI121. Peluang tersebut sangat ditentukan oleh kecocokan antara sisi pengenalan enzim yang digunakan pada saat merestriksi gen tersebut dari *pGem-T easy vector* dengan sisi pengenalan enzim yang juga terdapat pada pBI121, sehingga memungkinkan keduanya berligasi.

Peta pBI121 yang terdapat pada Lampiran 3. menunjukkan daerah T-DNA plasmid tersebut memiliki promotor 35S dan gen GUS yang akan berguna untuk seleksi plasmid rekombinan dan seleksi kalus transforman. Oleh karena itu, gen C1 akan lebih tepat disisipkan diantara gen 35SP dan gen GUS. Diantara promotor 35S dan gen GUS tersebut, terdapat beberapa sisi pengenalan enzim restriksi, yaitu: *Bam*HI, *Xba*I, dan *Sma*I. Dengan pertimbangan bahwa pola ujung pemotongan yang diharapkan ialah *blunt end* dan *sticky end* agar kemungkinan terligasi kembalinya plasmid setelah mengalami pemotongan dapat dihindari, maka dipilih enzim restriksi *Bam*HI dan *Sma*I yang akan digunakan untuk proses restriksi karena hasil pemotongan dengan *Bam*HI akan menghasilkan pola ujung potongan *sticky end* dan *Sma*I dengan pola ujung potongan *blunt end*. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan modifikasi terhadap primer C1-TD21-WS-FR.

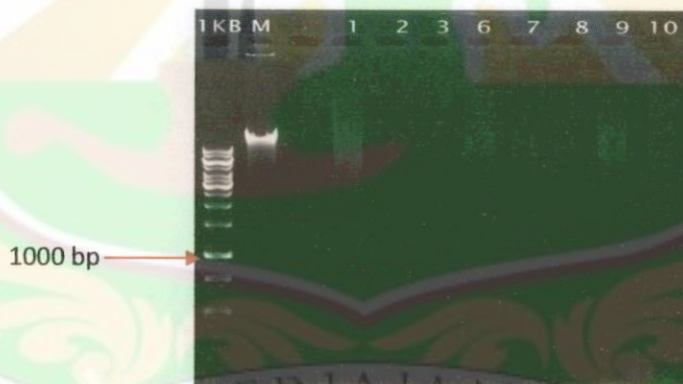
Kebanyakan enzim restriksi tidak mau bekerja jika situs pengenalanya terletak di ujung, perlu beberapa basa tambahan agar enzim dapat bekerja. Biasanya perlu ditambahkan sekitar 4 basa. Oleh karena itu, perlu ditambahkan beberapa basa di ujung C1-TD21-WS-FR agar proses restriksi yang akan dilakukan nantinya dapat berhasil. Adapun data sekuens primer untuk mengamplifikasi gen C1 Geminivirus yang telah dimodifikasi tersebut terdapat pada Tabel 2.

Selain bertujuan untuk memudahkan proses restriksi gen tersebut dari *pGem-T easy vector* dan memudahkan proses ligasinya ke pBI121, modifikasi primer juga dilakukan untuk mengamplifikasi gen C1 tanpa mengikutsertakan kodon terminatornya agar gen GUS masih dapat terekspresi pada tahap seleksi kalus transforman. Sebab, gen GUS yang hanya dapat terekspresi pada jaringan tanaman, tidak akan dapat terekspresi jika primer yang digunakan ikut mengamplifikasi kodon terminator gen C1 Geminivirus. Dengan terikutnya kodon terminator gen C1 tersebut akan menghentikan proses ekspresi genetik sebelum mencapai gen GUS, sehingga hal ini akan menyebabkan gen GUS tidak dapat terekspresi dan secara tidak langsung dapat menghambat penyeleksian kalus transforman dengan uji gen GUS. Adapun primer hasil modifikasi tersebut diidentitaskan dengan C1-TD21*Bam*HI-NT sebagai *forward* dan C1-TD21*Sma*I-

NT sebagai *reverse*. Dalam penggunaan selanjutnya, kedua primer tersebut digabung menjadi C1-TD21BamHI/SmaI-NT.

Walau demikian, pengamplifikasian gen C1 Geminivirus spesifik Tanah Datar menggunakan primer C1-TD21-WS-F/R tetap harus dilakukan karena hasilnya digunakan sebagai *template* pada proses pengamplifikasian gen C1 tersebut terhadap primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT (reamplifikasi). Hal ini sangat penting dilakukan karena setelah beberapa kali dilakukan percobaan pengamplifikasian langsung isolat Tanah Datar dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT, tidak ada satupun percobaan tersebut yang menghasilkan produk DNA dan bila menghasilkan produk DNA selalu konsentrasinya dalam jumlah yang sangat rendah sehingga meragukan untuk digunakan pada proses ligasi. Konsentrasi DNA yang rendah jika diligasikan ke dalam *pGem-T easy vector*, maka peluang keberhasilan DNA tersebut terligasi ke dalam *pGem-T easy vector* juga akan sangat rendah.

Adapun salah satu hasil percobaan amplifikasi gen C1 Geminivirus Tanah Datar yang gagal menghasilkan produk dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT secara langsung (non reamplifikasi) ditampilkan pada Gambar 11.



Gambar 11. Hasil amplifikasi beberapa isolat TD dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT secara langsung (non reamplifikasi). 1-10: isolat TD, 1KB: *marker DNA ladder*; M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Kemungkinan yang menyebabkan gen C1 Geminivirus sulit diamplifikasi dengan primer spesifiknya dikarenakan material genetik virus yang sangat mudah

berubah. Dibandingkan gen-gen lainnya yang berada di dalam genom Geminivirus, gen C1 lebih bersifat tidak stabil sehingga kemungkinan perubahan genetik pada gen C1 jauh lebih tinggi daripada gen-gen lainnya yaitu, V1, V2, C2, C3, dan C4 yang lebih bersifat *conserve*. Wahyuni (2005), menyatakan bahwa virus sering mengalami perubahan genetik. Angka mutasi yang terjadi dalam frekuensi tinggi adalah sebagai hasil dari perubahan dalam susunan nukleotida. Perubahan genetik lain dapat terjadi karena rekombinasi, pemilihan dan penggabungan kembali (*reassortment*) sepotong genom, kehilangan suatu material genetik atau karena akuisisi sekuensi nukleotida dari virus yang tidak sekerabat atau dari genom inang. Hal senada juga dinyatakan oleh Bos (1994), virus terus-menerus berubah dengan cara mutasi dan adaptasi selektif, misalnya adaptasi terhadap inangnya. Proses ini dapat terjadi akibat adanya perubahan dalam tipe tanaman atau kultivar.

Beberapa hasil amplifikasi isolat Tanah Datar dengan primer C1-TD21-WS-F/R memberikan hasil yang cukup baik untuk digunakan sebagai *template* pada reamplifikasi. Berikut salah satu hasil amplifikasi isolat Tanah Datar dengan primer C1-TD21-WS-F/R menggunakan *master mix*.

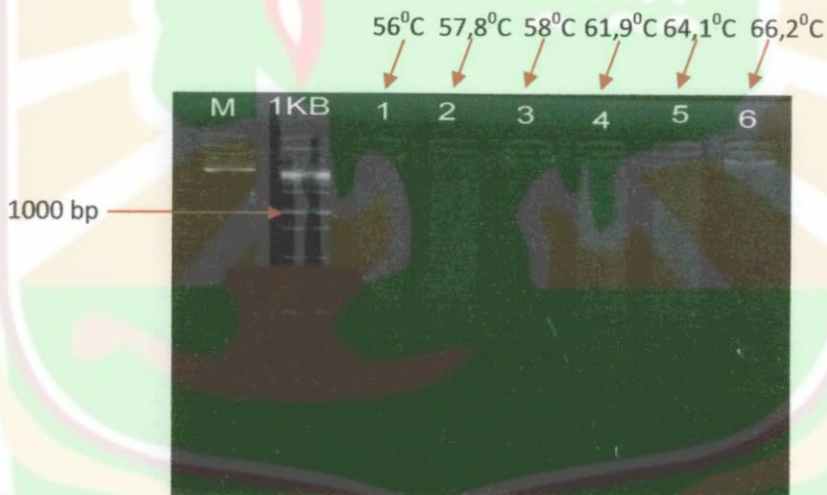


Gambar 12. Hasil amplifikasi beberapa isolat TD dengan primer C1-TD21-WS-F/R. 2-10: isolat TD, 1KB: *marker DNA ladder*; M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Gambar 12. memperlihatkan bahwa dari keempat isolat TD yang dicobakan, hanya satu isolat yaitu isolat TD2 yang tidak menghasilkan produk

DNA setelah diamplifikasi dengan primer C1-TD21-WS-F/R. Tidak terbentuknya produk pada isolat TD2 disebabkan telah terjadi perubahan pada sekuens gen C1 Geminivirus Tanah Datar dari isolat tersebut sehingga primer tidak dapat bekerja. Sedangkan ketiga isolat lainnya (TD8, TD9, dan TD10) memperlihatkan hasil yang cukup memuaskan setelah diamplifikasi dengan primer C1-TD21-WS-F/R. Ukuran panjang produk DNA yang dihasilkan ketiganya sesuai dengan ukuran panjang produk DNA yang diharapkan yaitu sekitar 1110 bp.

Hasil yang telah diperoleh tersebut dilanjutkan dengan reamplifikasi menggunakan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT. Hasil amplifikasi isolat TD8 dengan primer C1-TD21-WS-F/R dipilih sebagai *template* untuk reamplifikasi dengan perlakuan gradien suhu *annealing* pada saat proses amplifikasi di dalam mesin PCR berlangsung. Adapun range suhu *annealing* yang digunakan ialah 56; 57,8; 58; 61,9; 64,1; 66,2 ($^{\circ}\text{C}$). Reamplifikasi yang dilakukan menggunakan *master mix* (tanpa modifikasi volume). Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Hasil reamplifikasi isolat TD8. 1KB: *marker DNA ladder*; M: *marker λ DNA 50 ng/ μL*

Gambar 13. menunjukkan bahwa reamplifikasi yang dilakukan pada isolat TD8 dengan perlakuan gradien suhu *annealing* tidak menghasilkan produk DNA sama sekali. Hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor yang telah banyak dijelaskan pada pembahasan sebelumnya. Selain melakukan percobaan amplifikasi dengan perlakuan gradien suhu *annealing*, perlakuan lainnya pun telah

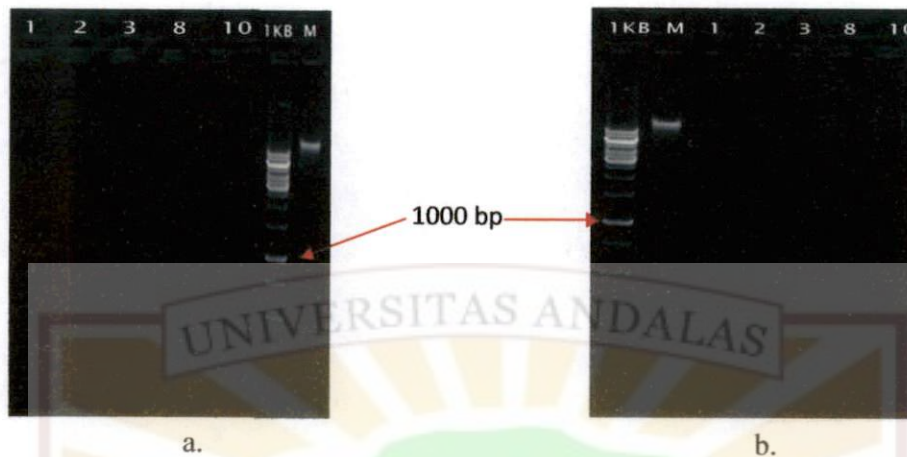
dicobakan, seperti modifikasi volume *template* dan primer yang digunakan pada saat pembuatan *cocktail* PCR. Namun, dari percobaan tersebut masih belum membuahkan hasil.

Kesesuaian antara jumlah konsentrasi DNA *template* (gen C1 Geminivirus) pada isolat TD dengan jumlah konsentrasi primer yang digunakan pada saat melakukan amplifikasi, perlu diperhatikan agar kemungkinan menghasilkan produk DNA dari kegiatan amplifikasi yang dilakukan tersebut dapat meningkat. Konsentrasi primer yang terlalu tinggi tidak akan menghasilkan produk DNA jika konsentrasi DNA *template*-nya jauh lebih kecil. Demikian sebaliknya, jika konsentrasi DNA *template* jauh lebih tinggi daripada konsentrasi primer yang digunakan, proses amplifikasi yang dilakukan tidak akan efektif sehingga tidak menghasilkan produk DNA yang baik dan bahkan menurunkan spesifitas kerja primer, serta meningkatkan peluang terjadinya *mismatch* maupun *mispriming* yang tidak diinginkan.

Oleh karena itu, untuk percobaan selanjutnya, dalam penelitian ini dilakukan penyetaraan konsentrasi DNA *template* yang digunakan untuk proses amplifikasi. Seluruh isolat baik isolat TD dan PSS disetarakan konsentrasinya menjadi 10 ng/ μ L dengan melakukan pengenceran dari isolat stoknya. Sedangkan untuk pemakaian primer dari awal percobaan amplifikasi telah diencerkan konsentrasinya menjadi 5 pmol dari stoknya masing-masing. Pengenceran DNA *template* pada seluruh isolat menjadi 10 ng/ μ L dipilih berdasarkan pertimbangan bahwa mesin PCR yang digunakan memiliki tingkat sensitivitas yang cukup tinggi yaitu mencapai 4 pikogram. Sehingga pemakaian DNA *template* dengan konsentrasi 10 ng/ μ L, dapat dikatakan sudah cukup efektif untuk proses amplifikasi.

Walau demikian, ternyata percobaan-percobaan amplifikasi gen C1 Geminivirus Tanah Datar dengan berbagai perlakuan yang telah diupayakan sedemikian rupa, masih belum membuahkan hasil yang memuaskan. Beberapa percobaan amplifikasi yang dilakukan baik dengan primer C1-TD21-WS-F/R maupun primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT (reamplifikasi maupun non reamplifikasi) menggunakan GTG, tidak menghasilkan produk DNA sama sekali.

Gambar 14. menunjukkan tidak terbentuknya produk DNA pada percobaan tersebut.

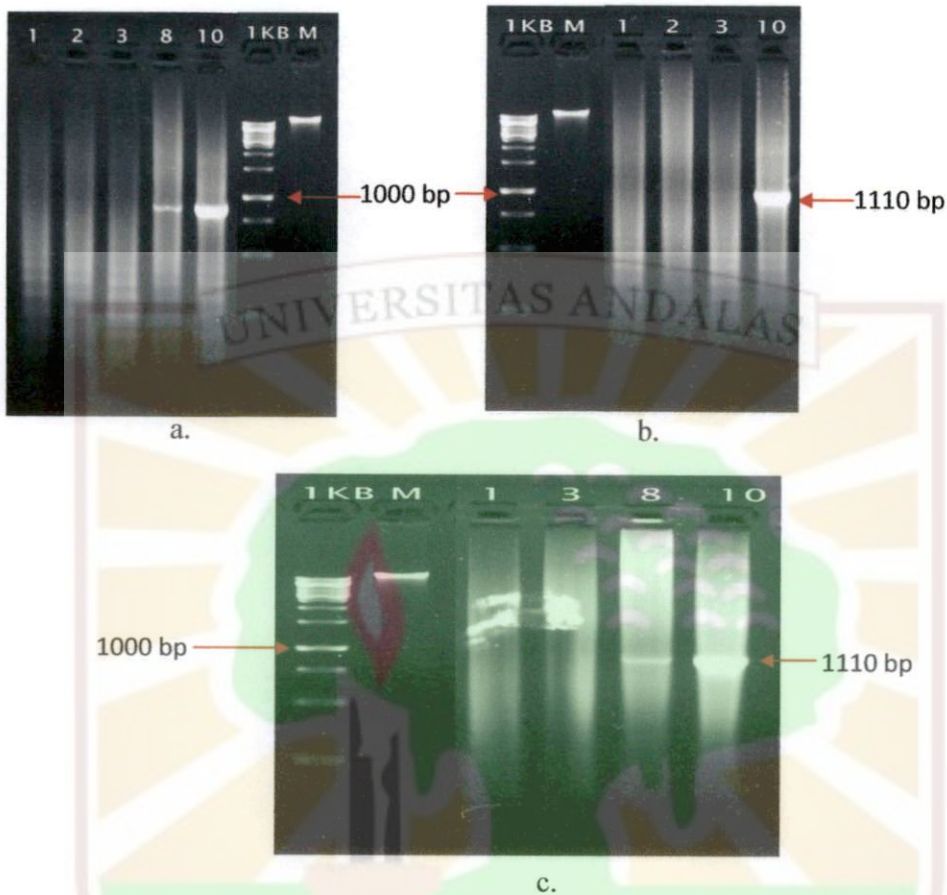


Gambar 14. Hasil amplifikasi beberapa isolat TD dengan primer spesifik gen C1 Geminivirus Tanah Datar. a) amplifikasi isolat TD dengan primer C1- TD21BamHI/SmaI-NT (non reamplifikasi), b) amplifikasi isolat TD dengan primer C1-TD21-WS-F/R, 1KB: *marker DNA ladder*; M: *marker λ DNA 50 ng/μL*, 1-10: isolat TD

Dengan tidak diperolehnya produk DNA sesuai Gambar 14. di atas, menunjukkan bahwa pengenceran konsentrasi DNA *template* menurunkan keberhasilan terbentuknya produk DNA karena besar kemungkinan jumlah DNA Geminivirus dalam isolat tersebut jauh lebih rendah daripada DNA genom cabai yang berhasil diisolasi. Oleh karena itu, walau sensitivitas mesin PCR mampu mencapai 4 pikogram, tetapi tetap tidak mampu mengamplifikasi gen C1 Geminivirus tersebut.

Semakin kecil konsentrasi *template* dari isolat yang digunakan maka semakin kecil jumlah gen C1 gemivirus di dalamnya sehingga ketersediaan *template* (gen C1 Geminivirus) semakin berkurang dan tidak memadai untuk diamplifikasi oleh primer. Berdasarkan hal tersebut, percobaan selanjutnya ialah mengamplifikasi beberapa isolat TD dengan variasi konsentrasi DNA *template* dari tiap-tiap isolat tanpa mempertimbangkan sensitivitas mesin PCR yang digunakan. Upaya ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi *template* yang terbaik untuk menghasilkan produk DNA ketika isolat-isolat tersebut

diampifikasi dengan primer C1-TD21-WS-F/R. Adapun hasil percobaan yang menggunakan GTG ini ialah seperti gambar di bawah berikut.



Gambar 15. Hasil amplifikasi beberapa isolat TD dengan primer C1-TD21-WS-F/R (variasi konsentrasi DNA *template*). a) 1-10: isolat TD (10 ng/ μ L), b) 1-10: isolat TD (50 ng/ μ L), c) 1-10: isolat TD (TD1: 37,5 ng/ μ L; TD3: 150 ng/ μ L; TD8: 100 ng/ μ L; TD10: 200 ng/ μ L), 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA* 50 ng/ μ L

Gambar 15. memperlihatkan bahwa hanya dua dari lima isolat TD yang menghasilkan produk DNA setelah diampifikasi dengan primer C1-TD21-WS-FR, yaitu TD8 dan TD10 baik pada konsentrasi 10 ng/ μ L, 50 ng/ μ L, maupun 100 ng/ μ L pada TD8 dan 200 ng/ μ L pada TD10. Konsentrasi produk DNA yang dihasilkan isolat TD10 cukup tinggi dibandingkan isolat TD8. Hal ini dikarenakan genom Geminivirus pada isolat TD10 lebih banyak daripada TD8, sehingga *template* yang dapat diampifikasi lebih banyak tersedia pada TD10 daripada

TD8. Ditinjau dari ukuran panjang produk DNA yang dihasilkan oleh isolat TD8 dan TD10, menunjukkan kemungkinan besar bahwa produk DNA yang dihasilkan adalah benar gen C1 Geminivirus yang berukuran sekitar 1110 bp.

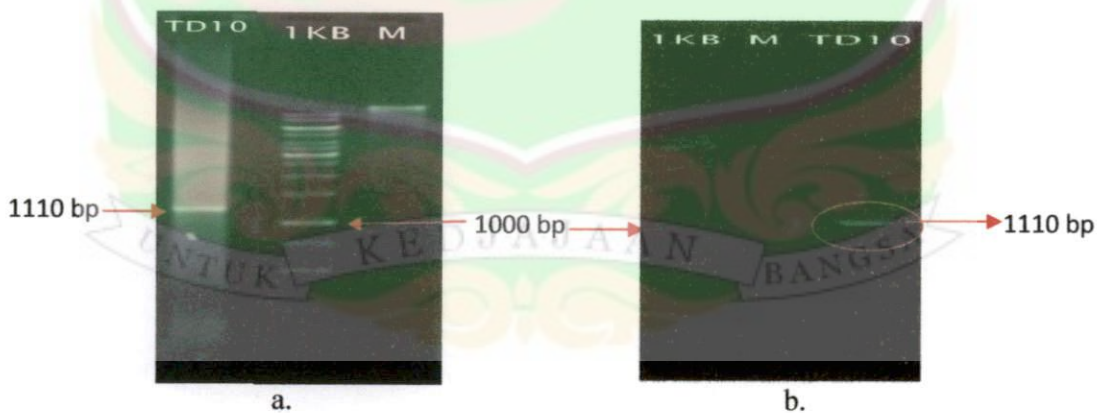
Melanjutkan hasil positif dan cukup baik yang diperoleh pada isolat TD10, maka percobaan selanjutnya ialah mengamplifikasi isolat TD10 dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT menggunakan gradien suhu *annealing* (range suhu: 55, 56, 57, 58, 60, 61, 62, 64, 65, dan 66⁰C). Untuk tujuan reamplifikasi, isolat TD10 (berkonsentrasi 50 ng/ μ L) diamplifikasi kembali dengan primer C1-TD21-WS-FR menggunakan *master mix* sebagai *cocktail* PCR-nya dengan suhu *annealing* 60⁰C. Hal ini dilakukan agar hasilnya dapat digunakan sebagai *template* pada reamplifikasi jika pengamplifikasian langsung isolat TD10 dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT (non reamplifikasi) tidak menghasilkan produk DNA walau sudah diperlakukan dengan gradien suhu *annealing*. Ternyata, hasil percobaan tersebut adalah negatif karena tidak ada satupun yang menghasilkan produk DNA. Hal ini tidak sesuai dengan perkiraan awal.

Berbeda jauh dengan hasil yang diperoleh pada Gambar 15., seharusnya pengamplifikasian ulang TD10 berkonsentrasi 50 ng/ μ L dengan perlakuan suhu *annealing* yang sama pada perlakuan sebelumnya dapat menghasilkan produk DNA. Satu hal yang dapat diasumsikan sebagai faktor utama perbedaan hasil tersebut dapat terjadi ialah akibat pemakaian *cocktail* PCR yang berbeda di kedua percobaan tersebut. Jika pada percobaan sebelumnya mampu menghasilkan produk DNA dengan menggunakan GTG, maka percobaan yang gagal tersebut menggunakan *master mix*. Hal ini mengindikasikan bahwa jenis *cocktail* PCR yang digunakan sangat menentukan hasil amplifikasi.

Dari ketiga jenis *cocktail* PCR yang secara umum digunakan untuk penelitian amplifikasi DNA yaitu *master mix*, *Go Taq Green* (GTG), dan RTG, masing-masingnya memiliki tingkat kemurnian zat-zat yang terkandung di dalamnya berbeda-beda. Jika ketiganya diurut berdasarkan tingkat kemurnian zat-zat yang terkandung di dalamnya tersebut, maka RTG berada di urutan pertama, selanjutnya GTG, dan di urutan terakhir ialah *master mix*. Oleh karena itu, harga RTG jauh lebih mahal dibandingkan harga kedua jenis lainnya. Pemakaian RTG dan GTG jauh lebih praktis dibandingkan pemakaian *master mix*. Karena

komponen-komponen yang diperlukan dalam amplifikasi DNA seperti dNTPs, *Taq polymerase*, *Taq buffer*, telah tersedia dalam satu kit sehingga kemungkinan ketiga zat tersebut terkontaminasi jauh lebih kecil daripada pemakaian *master mix*. Pada pemakaian *master mix*, ketiga komponen tersebut dimasukkan secara terpisah, hal ini akan memperbesar kemungkinan zat-zat tersebut terkontaminasi pada saat dipipet secara berulang-ulang.

Oleh karena itu, pada percobaan selanjutnya digunakan RTG untuk mengamplifikasi gen C1 Geminivirus Tanah Datar dari isolat TD10 berkonsentrasi 10 ng/μL dengan primer C1-TD21-WS-F/R. Diharapkan hasilnya dapat langsung digunakan sebagai *template* pada reamplifikasi menggunakan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT. Hasil amplifikasi isolat TD10 dengan primer C1-TD21-WS-F/R cukup baik dari ukuran panjangnya sesuai harapan dan kualitasnya yang hanya menghasilkan satu pita DNA utama. Berbeda dengan hasil reamplifikasi yang diperoleh, hasilnya tidak cukup memuaskan karena konsentrasinya cukup rendah, sehingga produk DNA tersebut tidak memungkinkan untuk digunakan pada proses ligasi. Selain itu, banyak produk DNA sampingan yang terbentuk akibat *mispriming* yang terjadi. Hal ini dapat diketahui dari banyaknya pita-pita DNA yang sangat tipis yang terbentuk setelah pita DNA utama (terlihat seperti *smear* di sekitar pita DNA utama). Hasil amplifikasi keduanya dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



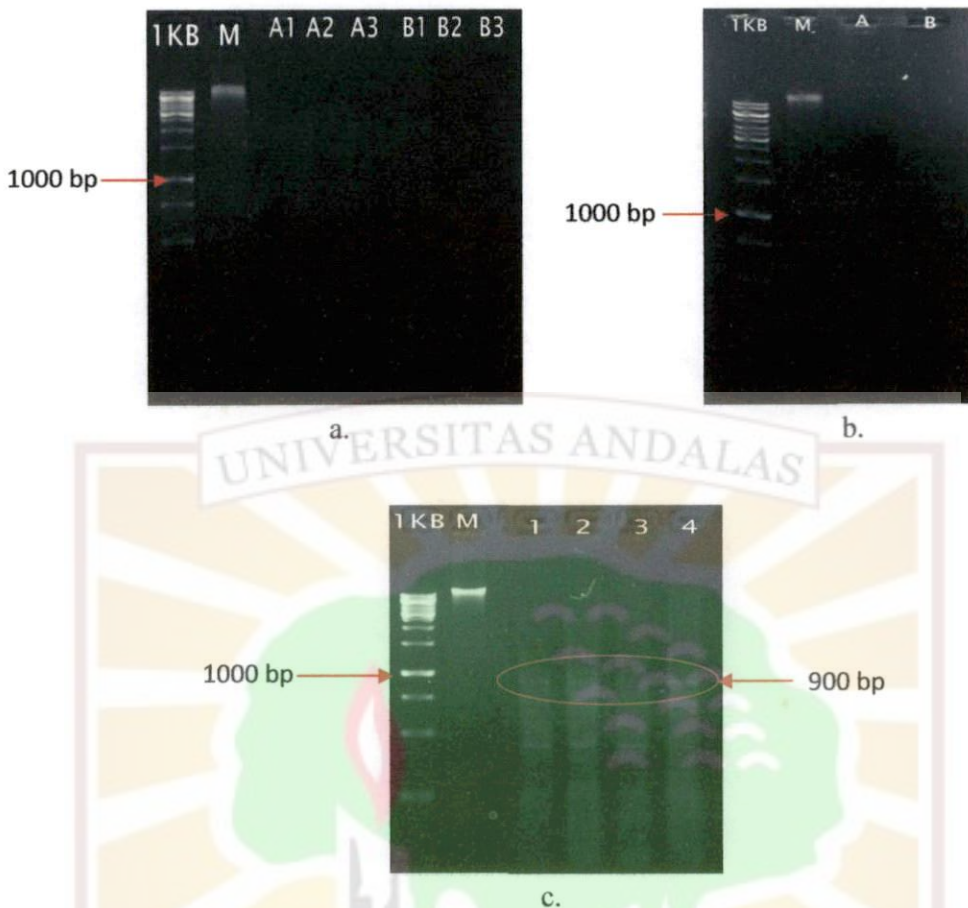
Gambar 16. Hasil amplifikasi isolat TD10. a) Hasil reamplifikasi isolat TD10 dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT, dan b) Hasil amplifikasi TD10 dengan primer C1-TD21-WS-F/R, 1KB: *marker DNA ladder*; M: *marker λ DNA 50 ng/μL*

Gambar 16. menunjukkan bahwa amplifikasi isolat TD10 (berkonsentrasi 10 ng/ μ L) menggunakan RTG baik dengan primer C1-TD21-WS-F/R maupun dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT (reamplifikasi) mampu menghasilkan produk DNA dengan ukuran keduanya sesuai harapan. Namun demikian, pada Gambar 16a. terlihat lebih banyak produk DNA sampingan yang terbentuk dengan konsentrasi produk DNA utama yang cukup rendah, tidak layak untuk dilanjutkan ke tahapan berikutnya yaitu pada proses ligasi. Oleh karena itu, hasil yang telah diperoleh ini tidak dilanjutkan ke tahapan berikutnya.

4.4.2 Amplifikasi Gen C1 Geminivirus Isolat Pesisir Selatan (PSS) dengan Primer C1-PSS14-WS-F/R dan C1-TD21-BamHI/SmaI-NT

Amplifikasi gen C1 Geminivirus spesifik Pesisir Selatan (PSS) dari isolat hasil isolasi penelitian ini sendiri menggunakan primer C1-PSS14-WS-F/R telah dicobakan. Namun hasil yang diperoleh tidak jauh berbeda dengan hasil-hasil amplifikasi gen C1 Geminivirus spesifik Tanah Datar. Rata-rata hasil pengamplifikasian isolat yang diisolasi dalam penelitian ini dengan primer C1-PSS14-WS-F/R, tidak membentuk produk DNA sama sekali atau menghasilkan produk DNA, namun ukuran panjang produk DNA yang dihasilkan tidak sesuai dengan harapan. Oleh karena itu, pemakaian isolat-isolat stok laboratorium menjadi alternatif terakhir yang terbaik. Sebab, primer-primer yang digunakan dalam penelitian ini merupakan primer yang didesain berdasarkan informasi sekuens gen C1 Geminivirus dari penelitian Jamsari *et al.* (2009). Sehingga kemungkinan tidak terbentuknya produk DNA hasil amplifikasi akibat faktor ketidaksesuaian primer dengan sekuens DNA *template* dapat dihindari atau dikurangi.

Adapun beberapa visualisasi hasil amplifikasi isolat PSS dari penelitian ini dengan primer spesifik gen C1 Geminivirus dapat dilihat pada Gambar 17.

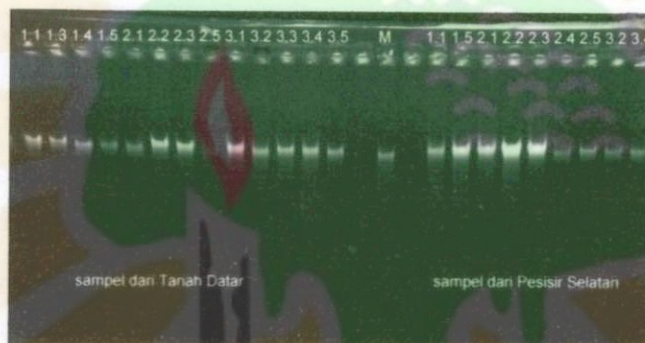


Gambar 17. Hasil amplifikasi isolat PSS dengan primer spesifik gen C1 Geminivirus. a) Hasil amplifikasi isolat PSS6 dengan gradien suhu *annealing* 58-62°C (A1-A3=dengan primer C1-PSS14-WS-F/R, B1- B3=dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT), b) Hasil amplifikasi PSS6 dengan primer C1-PSS14-WS-F/R (A dengan GTG, B dengan *master mix*), c) Hasil amplifikasi beberapa isolat PSS (PSS1, PSS2, PSS3, PSS56) berkonsentrasi 50 ng/μL dengan primer C1-PSS14-WS-F/R, 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA* 50 ng/μL

Gambar 17. menunjukkan bahwa ketiga percobaan tersebut gagal menghasilkan produk PCR sesuai harapan. Gambar 17a. dan 17b. menunjukkan bahwa produk PCR tidak terbentuk sama sekali dari percobaan tersebut. Sedangkan Gambar 17c. menunjukkan adanya produk PCR yang terbentuk, namun panjang produknya tidak sesuai harapan yaitu hanya sekitar 900 bp, memiliki produk sampingan, dan konsentrasinya sangat rendah.

4.5 Evaluasi DNA Geminivirus Stok Laboratorium

Sulitnya gen C1 Geminivirus untuk diamplifikasi dari isolat-isolat Tanah Datar yang diisolasi dari penelitian ini, mengharuskan *template* yang diamplifikasi berasal dari isolat penelitian terdahulu oleh Jamsari *et al.* (2007a) yang disimpan sebagai stok laboratorium. Upaya ini dilakukan agar primer yang dirancang berdasarkan sekuens gen yang telah diketahui dari penelitian terdahulu tersebut dapat bekerja dan menghasilkan produk DNA. Sebelum melakukan amplifikasi terhadap isolat-isolat stok laboratorium, perlu dilakukan pengecekan kualitas dan kuantitas DNA dari isolat-isolat tersebut. Gambar 18. memperlihatkan hasil pengecekan kualitas dan kuantitas DNA stok laboratorium yang telah dilakukan.



Gambar 18. Hasil elektroforesis isolat stok laboratorium. 1.1-3.5 (di sebelah kiri lambda): isolat TD, 1.1-3.4 (di sebelah kanan lambda): isolat PSS, M: marker λ DNA 50 ng/ μ L

Gambar 18. memperlihatkan bahwa seluruh isolat memiliki kandungan DNA dengan kualitas dan kuantitas yang baik. Secara kualitas, seluruh isolat dapat dinyatakan memiliki DNA yang baik karena *band* (pita) DNA yang dihasilkan ialah *band* (pita) DNA tunggal dan tidak terdapat *smear*. Secara kuantitas, konsentrasi masing masing DNA pada tiap isolat dapat dihitung dengan membandingkannya terhadap lambda DNA 50 ng/ μ L, sehingga diperoleh data sebagaimana pada Tabel 4.

Tabel 4. Data konsentrasi DNA genom Geminivirus dari tiap isolat stok laboratorium

No.	Isolat Tanah Datar	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)	Isolat Pesisir Selatan	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)
1.	TD1.1	100	PSS1.1	100
2.	TD1.3	75	PSS1.5	150
3.	TD1.4	87,5	PSS2.1	125
4.	TD1.5	50	PSS2.2	200
5.	TD2.1	65	PSS2.3	175
6.	TD2.2	165	PSS2.4	50
7.	TD2.3	165	PSS2.5	75
8.	TD2.5	5	PSS3.2	75
9.	TD3.1	175	PSS3.4	87,5
10.	TD3.2	100	-	-
11.	TD3.3	100	-	-
12.	TD3.4	100	-	-
13.	TD3.5	87,5	-	-
	Rata-rata	98,07	Rata-rata	115,28

Setelah diketahui kualitas dan kuantitas masing-masing isolat tersebut, langkah selanjutnya yang dilakukan ialah mengamplifikasi isolat-isolat tersebut dengan primer WS-PYLCV-387F/R dan primer spesifik daerahnya masing-masing yaitu TD21-PYLCV-455F/R untuk isolat-isolat dari Tanah Datar dan PSS14-PYLCV-353F/R untuk isolat-isolat dari Pesisir Selatan.

Berdasarkan beberapa pertimbangan yaitu sulitnya gen C1 Geminivirus dari Tanah Datar dapat diamplifikasi, sedikitnya stok bahan untuk pembuatan *cocktail* PCR yang tersisa, dan banyaknya isolat Tanah Datar dari stok laboratorium yang akan dicobakan, maka percobaan selanjutnya lebih difokuskan pada isolat-isolat Pesisir Selatan saja agar memberikan hasil yang lebih efektif dan efisien baik dari segi waktu dan biaya. Dari penelitian Jamsari *et al.* (2009), diperoleh informasi bahwa Geminivirus dari Pesisir Selatan memiliki tingkat serangan (agresivitas) yang jauh lebih tinggi dibandingkan Geminivirus dari Tanah Datar dan daerah-daerah lainnya di Sumatera Barat. Hal inilah yang menjadi pertimbangan besar mengapa isolat-isolat Pesisir Selatan lebih diutamakan pada akhir penelitian ini daripada isolat-isolat Tanah Datar. Pertimbangan ini diambil dengan harapan jika hasil kloning penelitian ini dapat

dilanjutkan untuk merakit tanaman cabai merah tahan Geminivirus dengan tingkat agresivitas yang sangat tinggi, maka tanaman cabai merah tahan Geminivirus yang berhasil dirakit dari gen C1 Geminivirus spesifik Pesisir Selatan tersebut juga mampu tahan dari serangan Geminivirus spesifik-spesifik daerah lainnya di Sumatera Barat dan dapat diaplikasikan ke seluruh daerah pertanaman cabai di Sumatera Barat.

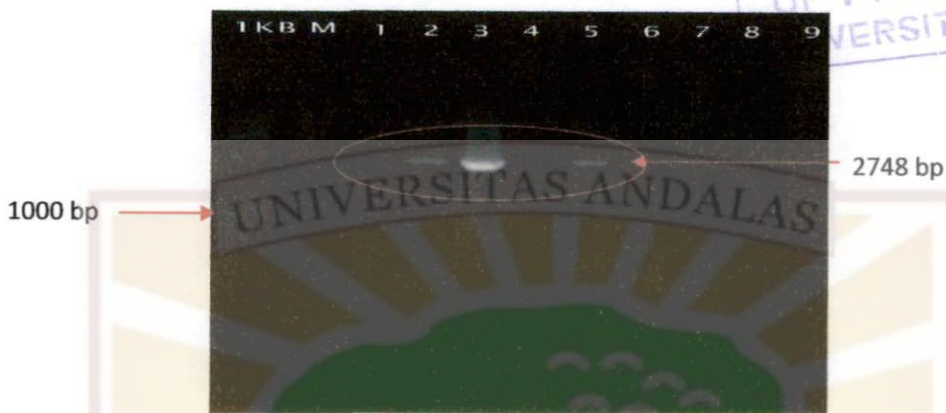
Adapun hasil amplifikasi isolat Pesisir Selatan dari stok laboratorium dengan menggunakan primer WS-PYLCV-387F/R dapat dilihat seperti pada Gambar 19.



Gambar 19. Hasil amplifikasi isolat PSS stok laboratorium dengan primer WS-PYLCV-387F/R menggunakan GTG. 1-9: isolat PSS, 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Gambar 19. menunjukkan bahwa dari sembilan isolat PSS yang diamplifikasi dengan primer WS-PYLCV-387F/R, hanya tujuh isolat saja yang menghasilkan produk DNA dengan ukuran yang sesuai harapan, sedangkan dua isolat lainnya yaitu nomor 6 (PSS2.4) dan nomor 7 (PSS2.5) tidak menghasilkan produk DNA sama sekali. Hal ini menginformasikan bahwa ketujuh isolat yang menghasilkan produk DNA tersebut mengandung genom Geminivirus spesifik Sumatera Barat. Sedangkan dua isolat lainnya yang tidak menghasilkan produk DNA dapat terjadi karena kedua isolat tersebut tidak mengandung genom Geminivirus spesifik Sumatera Barat atau karena faktor-faktor lainnya yang telah diuraikan pada penjelasan hasil-hasil amplifikasi sebelumnya.

Untuk memastikan keberadaan sekuens DNA Geminivirus spesifik daerah Pesisir Selatan, kesembilan isolat tersebut juga telah diamplifikasi dengan primer PSS14-PYLCV-353F/R menggunakan GTG. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 20.

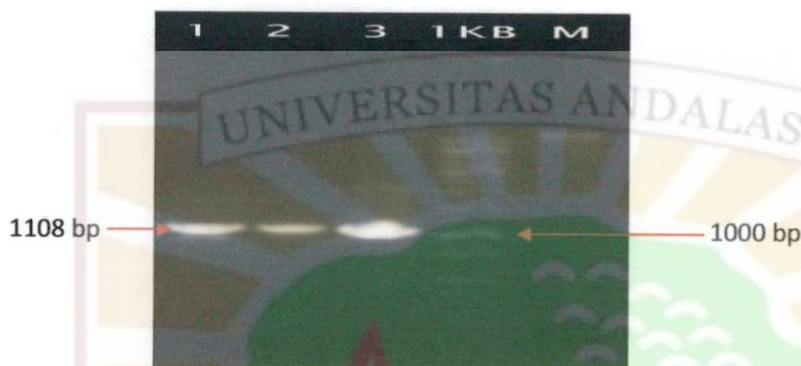


Gambar 20. Hasil amplifikasi isolat PSS stok laboratorium dengan primer PSS14-PYLCV-353F/R. 1-9: isolat PSS, 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Gambar 20. menunjukkan bahwa dari sembilan isolat PSS stok laboratorium yang diamplifikasi dengan primer PSS14-PYLCV-353F/R, hanya lima isolat yang menghasilkan produk DNA dengan ukuran sesuai harapan dan keempat isolat lainnya yaitu nomor 6, 7, 8, dan 9 (PSS2.4, PSS2.5, PSS3.2, dan PSS3.4) tidak menghasilkan produk DNA. Dari gambar tersebut juga dapat dilihat bahwa konsentrasi produk DNA yang dihasilkan bervariasi. Isolat nomor 3 (PSS2.1) menghasilkan produk DNA dengan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan keempat isolat lainnya yang juga menghasilkan produk DNA yaitu nomor 1, 2, 4, dan 5 (PSS1.1, PSS1.5, PSS2.2, dan PSS2.3). Konsentrasi produk DNA yang dihasilkan tergantung pada kombinasi volume dan konsentrasi antara primer dan DNA *template* yang digunakan pada saat pembuatan *cocktail* PCR.

Karena keterbatasan bahan GTG pada saat percobaan amplifikasi ini dilakukan, maka dari sembilan isolat PSS stok laboratorium yang ada, hanya tiga isolat yang berhasil diamplifikasi dengan primer C1-PSS14-WS-F/R menggunakan GTG. Pemakaian GTG dipilih berdasarkan pertimbangan bahwa

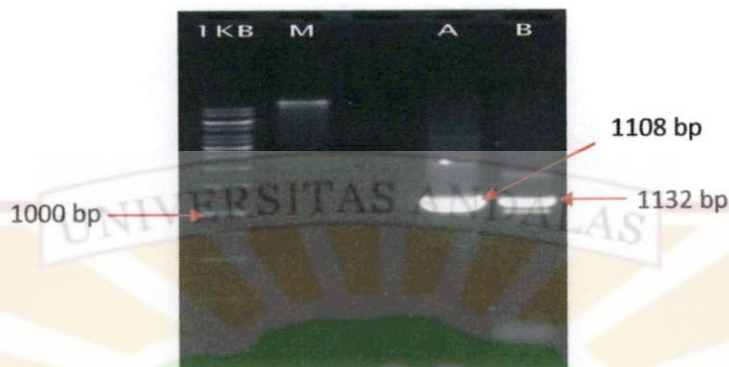
kemurnian zat-zat yang terkandung di dalamnya masih lebih tinggi dibandingkan *master mix* dan tujuan awal amplifikasi ini hanya sebatas mengetahui apakah gen C1 Geminivirus spesifik Pesisir Selatan terdapat pada ketiga isolat tersebut. Sehingga untuk tujuan tersebut, akan lebih efektif menggunakan GTG daripada *master mix* dan lebih murah biayanya daripada menggunakan RTG. Adapun hasil amplifikasi ketiga isolat tersebut dapat dilihat pada gambar berikut.



Gambar 21. Hasil amplifikasi beberapa isolat PSS stok laboratorium dengan primer C1-PSS14-WS-F/R. 1-3: isolat PSS (PSS1.1, PSS1.5, PSS2.1), 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA 50 ng/μL*

Gambar 21. menunjukkan bahwa ketiga isolat PSS yang diamplifikasi dengan primer C1-PSS14-WS-F/R mampu menghasilkan produk DNA dengan ukuran panjang produk DNA sesuai harapan. Untuk dapat digunakan sebagai *template* pada reamplifikasi, maka hasil amplifikasi sebelumnya harus menggunakan *cocktail PCR* dari *master mix* atau RTG. Oleh karena itu, setelah mendapatkan hasil yang positif dari ketiga isolat tersebut, tahap selanjutnya ialah amplifikasi salah satu dari ketiga isolat PSS tersebut dengan primer C1-PSS14-WS-F/R menggunakan RTG. Dari ketiga isolat PSS tersebut, dipilih isolat nomor 3 (PSS2.1) untuk diamplifikasi ulang dengan primer C1-PSS14-WS-F/R. Pemilihan isolat PSS2.1 untuk diamplifikasi ulang karena dari hasil yang diperlihatkan pada Gambar 21., menunjukkan bahwa konsentrasi produk DNA yang dihasilkan isolat PSS2.1 lebih tinggi dibandingkan kedua isolat lainnya. Sehingga, diharapkan pengamplifikasian ulang isolat PSS2.1 dengan menggunakan RTG juga akan menghasilkan produk DNA dengan konsentrasi

yang tinggi. Selain itu, isolat PSS2.1 juga diamplifikasi dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT untuk memastikan apakah isolat PSS2.1 dapat langsung diamplifikasi dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT, tanpa harus melakukan reamplifikasi. Adapun hasil amplifikasi keduanya dapat dilihat pada Gambar 22.

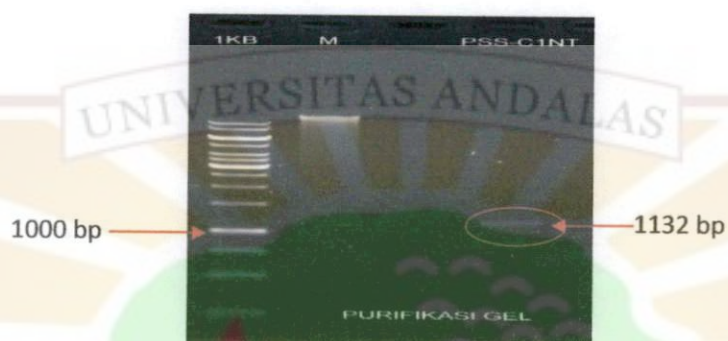


Gambar 22. Hasil amplifikasi isolat PSS2.1 menggunakan RTG. A: PSS2.1 dengan primer C1-TD21-WS-F/R, B: PSS2.1 dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT, 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Gambar 22. memperlihatkan bahwa pengamplifikasian menggunakan RTG memberikan hasil yang lebih baik daripada amplifikasi menggunakan GTG. Hal ini dapat dilihat dari konsentrasi produk DNA yang dihasilkan dengan RTG jauh lebih tinggi dibandingkan konsentrasi produk DNA dengan GTG (Gambar 21.). Bahkan, pengamplifikasian langsung isolat PSS2.1 (non reamplifikasi) dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT mampu menghasilkan produk DNA dengan konsentrasi yang cukup tinggi (sekitar $4 \times \lambda$ DNA 50 ng/ μ L).

Primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT merupakan primer spesifik gen C1 Geminivirus spesifik Tanah Datar tetapi dapat juga mengamplifikasi gen C1 Geminivirus dari Pesisir Selatan. Hal ini dapat diasumsikan bahwa gen C1 Geminivirus isolat Tanah Datar dan gen C1 Geminivirus pada isolat PSS2.1 memiliki sekuens titik pelekatan primer (*binding site*) yang sama sehingga primer mampu bekerja untuk mengamplifikasi gen C1 dari isolat yang dicobakan tersebut. Hasil yang jauh lebih baik juga ditunjukkan pada produk DNA yang diperoleh dari amplifikasi isolat PSS2.1 dengan primer C1-PSS14-WS-FR.

Namun, dari hasil amplifikasi isolat PSS2.1 dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT (non reamplifikasi), diperoleh produk DNA sampingan selain produk DNA utama yang terbentuk seperti yang diperlihatkan pada Gambar 22. Oleh karena itu, hasil amplifikasi tersebut harus dimurnikan terlebih dahulu dengan cara purifikasi gel. Adapun hasil purifikasi yang telah dilakukan dapat dilihat pada Gambar 23.



Gambar 23. Hasil purifikasi gel produk amplifikasi *template* PSS2.1 dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT. PSS-C1NT: Hasil purifikasi gel, 1KB: *marker DNA ladder*; M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Gambar 23. memperlihatkan bahwa hasil purifikasi gel yang dilakukan cukup berhasil dengan baik, hanya saja konsentrasinya menjadi cukup rendah dibandingkan λ DNA 50 ng/ μ L. Oleh karena itu, untuk meningkatkan konsentrasinya, dilakukan percobaan reamplifikasi hasil purifikasi tersebut dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT menggunakan RTG. Hasilnya seperti yang dapat dilihat pada Gambar 24.



Gambar 24. Hasil reamplifikasi terhadap hasil purifikasi gel dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT. C1PSS-NT: Hasil reamplifikasi, 1KB: *marker DNA ladder*; M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Berdasarkan Gambar 24. tersebut dapat dilihat bahwa reamplifikasi yang dilakukan mampu menghasilkan produk DNA dengan kualitas dan kuantitas yang cukup baik. Ukuran panjang produk DNA yang dihasilkan sesuai harapan yaitu sekitar 1132 bp, berpita tunggal, dan tidak terdapat *smear* maupun produk DNA sampingan pada produk DNA utama tersebut. Konsentrasi produk DNA yang dihasilkan setara λ DNA 50 ng/ μ L. Dengan demikian konsentrasi hasil amplifikasi tersebut diperkirakan 10 ng/ μ L.

4.6 Kloning Gen C1 Geminivirus ke dalam *E. coli* BL21

Walaupun konsentrasi produk DNA hasil amplifikasi yang diperoleh hanya 10 ng/ μ L, percobaan tetap dilanjutkan ke tahap selanjutnya yaitu proses ligasi ke dalam *pGem-T easy vector* untuk tujuan perbanyakan (kloning). Dalam proses ligasi ini, tidak dapat dipastikan 100% bahwa hasil yang diperoleh adalah *pGem-T easy vector* rekombinan yang telah ter-*insert* gen C1 Geminivirus. Seperti yang dinyatakan Brown (1991), campuran reaksi ligasi selain mengandung molekul rekombinan yang dikehendaki, mungkin juga mengandung: 1) Molekul vektor yang tidak mengalami ligasi, 2) Fragmen DNA yang tidak mengalami ligasi, 3) Molekul vektor yang telah melingkar tersambung kembali tanpa adanya insersi DNA baru (*self-ligated vector*), dan 4) Molekul DNA rekombinan yang membawa fragmen insersi DNA yang salah.

Oleh karena itu, untuk mendapatkan *pGem-T easy vector* rekombinan yang ter-*insert* atau terligasi dengan fragmen yang benar yaitu gen C1 Geminivirus, maka pada tahap selanjutnya perlu dilakukan PCR koloni dari koloni bakteri *E. coli* BL21 transforman yang akan dibahas pada subbab selanjutnya.

Metode transformasi yang digunakan ialah metode “*heat shock*” atau “kejut panas” dengan pertimbangan tidak memerlukan biaya tinggi dan kelengkapan alat yang tersedia di laboratorium. Sebelum dilakukan kegiatan transformasi, langkah awal yang harus dilakukan ialah pembuatan sel kompeten yang sangat dibutuhkan pada proses transformasi tersebut.

Bakteri *E. coli* BL 21 transforman yang mengandung *pGem-T easy vector* berinsert suatu fragmen akan tahan terhadap antibiotik *ampicilin* dan *chloramphenicol*, sebaliknya pada bakteri lain yang bukan *E. coli* BL21 yang juga

transforman karena mengandung *pGem-T easy vector* tetapi tidak ber-*insert* suatu fragmen akan masih mampu bertahan hidup pada media seleksi jika hanya diberi perlakuan antibiotik *ampicilin* tetapi akan mati jika diberi juga perlakuan antibiotik *chloramphenicol*. Penggunaan antibiotik *ampicilin* berguna untuk mengeleminasi bakteri-bakteri lain yang tidak mengandung *pGem-T easy vector*.

Dari volume total hasil ligasi yaitu sebanyak 20 μL , maka proses transformasi dilakukan sebanyak 4x ulangan (A, B, C, dan D), dimana volume hasil ligasi yang ditransformasi pada setiap ulangan ialah sebanyak 5 μL /50 μL sel kompeten. Setiap ulangan juga dibagi lagi menjadi 2 ulangan yaitu ulangan I (A1, B1, C1, dan D1) ialah hasil transformasi yang di-*plating* sebanyak 100 μL dan ulangan II (A2, B2, C2, dan D2) ialah hasil transformasi yang di-*plating* sebanyak 50 μL pada media LB (Luria Bertani) padat yang telah diperlakukan dengan antibiotik *ampicilin* dan *chloramphenicol* di dalam *petridish*. Setelah dilakukan *plating*, seluruh hasil *plating* diinkubasi pada suhu 37⁰C selama satu malam (*over night*) untuk menumbuhkan bakteri transforman di media LB padat tersebut.

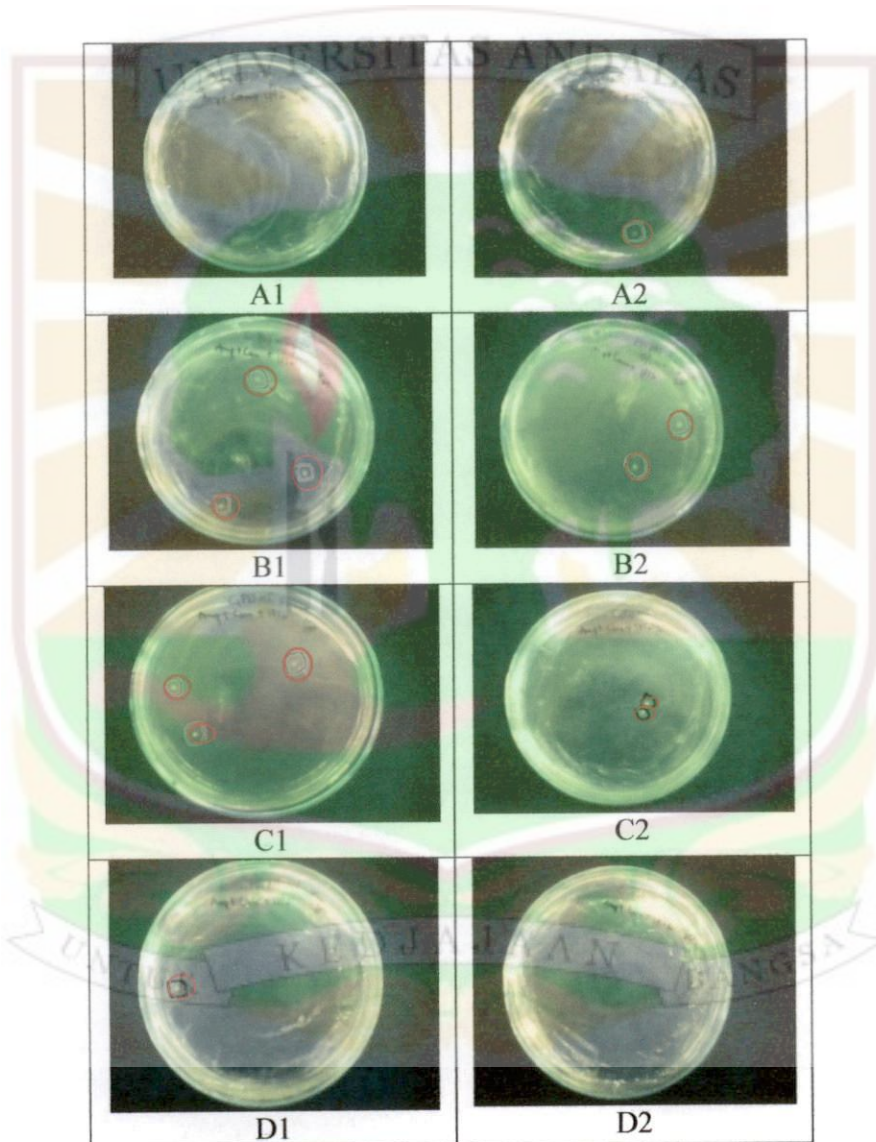
Dari hasil *plating* yang telah dilakukan dan diinkubasi selama satu malam, diperoleh 12 koloni tunggal. Kedua belas koloni tersebut diperoleh dari total bakteri transforman yang tumbuh pada kedelapan ulangan yang ada. Adapun tabel perhitungan koloni-koloni yang diperoleh dari tiap ulangan tersebut disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Perhitungan jumlah koloni tunggal bakteri *E. coli* BL21 transforman yang tumbuh pada media LB padat (media selektif)

No.	Jumlah koloni tunggal yang tumbuh/ 100 μL volume <i>plating</i>	Jumlah koloni tunggal yang tumbuh/ 50 μL volume <i>plating</i>
A	0	1
B	3	2
C	3	2
D	1	0
Total	7	5

Tabel 5. menginformasikan bahwa jumlah koloni tunggal transforman yang tumbuh dari hasil *plating* 100 μL lebih banyak dibandingkan hasil *plating* 50 μL . Hasil ini merupakan hasil yang wajar, karena volume *plating* 100 μL

lebih banyak 2x dari volume *plating* 50 μL . Sehingga, kemungkinan jumlah bakteri transforman yang ada pada volume *plating* 100 μL lebih banyak daripada volume *plating* 50 μL . Kedua belas koloni tunggal dari seluruh hasil *plating* tersebut diprediksi sementara sebagai bakteri-bakteri transforman yang mengandung *pGem-T easy vector* dengan *insert* fragmen yang benar (gen C1 Geminivirus). Adapun hasil *plating* yang telah dilakukan dapat dilihat pada Gambar 25.



Gambar 25. Pertumbuhan bakteri *E. coli* BL21 transforman di media LB padat. A1-D1: hasil *plating* 100 μL , A2-D2: hasil *plating* 50 μL .

4.7 Koloni PCR pada Bakteri *E. coli* BL21 Transforman dan Pembuatan *Master Plate*

Untuk memastikan apakah kedua belas koloni tunggal yang tumbuh pada seluruh ulangan tersebut merupakan *E. coli* BL21 transforman yang berisi gen C1 Geminivirus, maka pada tahap selanjutnya dilakukan koloni PCR dan pembuatan *master plate*. Pembuatan *master plate* bertujuan untuk mempertahankan keberadaan koloni-koloni tunggal bakteri *E. coli* BL21 transforman tersebut dalam kondisi hidup. Koloni PCR dilakukan dengan menggunakan primer T7/SP6. Sebagai kontrol negatif digunakan *pGem-T easy* kosong yang juga diamplifikasi dengan primer T7/SP6. Hasil koloni PCR dielektroforesis selama 30 menit pada tegangan 100 Volt dan ditampilkan pada Gambar 26.



Gambar 26. Hasil koloni PCR bakteri *E. coli* BL21 transforman. K: kontrol negatif, 1-12: hasil koloni PCR bakteri *E. coli* transforman, 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Gambar 26. menunjukkan bahwa kedua belas koloni tunggal bakteri *E. coli* BL21 transforman yang telah diamplifikasi dengan primer T7/SP6, hanya satu yang menunjukkan hasil positif yaitu pada koloni tunggal nomor 11 dengan ukuran panjang produk DNA sekitar 1307 bp. Ukuran panjang produk DNA tersebut memperkuat dugaan bahwa hasil amplifikasi tersebut adalah benar gen

C1 Geminivirus yang juga membawa sekuens T7 dan SP6, karena ukuran panjang gen C1 ialah sekitar 1132 bp dan ukuran panjang gabungan sekuens T7 dan SP6 ialah sekitar 175 bp, sehingga total panjangnya sekitar 1307 bp. Sedikitnya jumlah bakteri transforman yang mengandung *pGem-T easy* rekombinan ber-*insert* fragmen yang benar yaitu hanya 1 dari 12 koloni tunggal yang diperoleh, menunjukkan bahwa keberhasilan ligasi fragmen yang diinginkan dengan *pGem-T easy vector* tergantung pada ukuran panjang fragmen itu sendiri. Gen C1 memiliki ukuran panjang yang cukup besar sehingga memperkecil peluang keberhasilannya terligasi ke dalam *pGem-T easy vector*.

Sedangkan kesebelas hasil koloni PCR lainnya tidak menunjukkan hasil yang positif dikarenakan ukuran panjang produk DNA yang dihasilkan tidak sesuai dengan harapan yaitu rata-rata hanya sekitar 250–400 bp. Bahkan sebagian besar diantaranya menghasilkan band (pita) DNA ganda. Adanya *insert* inilah yang menyebabkan bakteri *E. coli* BL21 menjadi transforman (dapat tumbuh pada media selektif LB padat dengan perlakuan antibiotik), walaupun produk DNA (yang menjadi *insert* pada *pGem-T easy* tersebut) tidak memiliki ukuran panjang produk sesuai dengan harapan.

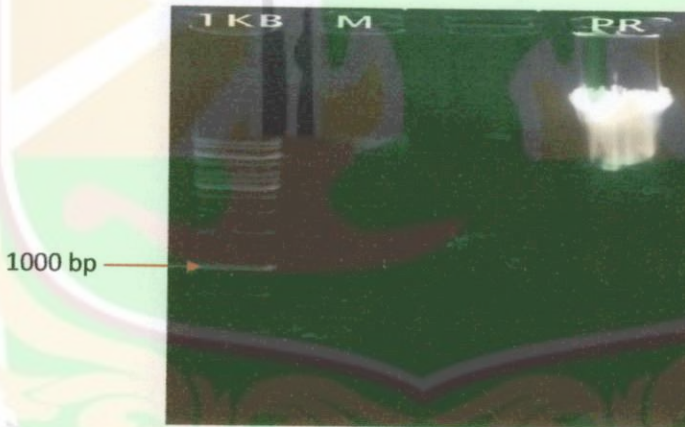
Insert-insert atau produk DNA yang tidak sesuai harapan tersebut (bukan fragmen yang diinginkan) dapat diasumsikan sebagai fragmen yang diduga berasal dari potongan-potongan fragmen vektor yang ikut terligasi ke dalam *pGem-T easy* atau gen C1 Geminivirus yang belum terligasi sempurna ke dalam *pGem-T easy* tersebut. Dengan panjangnya ukuran produk gen C1 Geminivirus, tentu akan menyulitkan gen tersebut dapat terligasi sempurna ke dalam *pGem-T easy* sehingga persentase keberhasilannya sangat kecil. Oleh karena itu, hal yang wajar jika dari 12 koloni tunggal yang diduga transforman dan telah diuji dengan koloni PCR menggunakan primer T7/SP6, hanya satu yang menunjukkan hasil yang positif (pada sampel nomor 11). Selain itu, *band* (pita) DNA yang terlihat ukurannya di bawah 250 bp pada seluruh hasil koloni PCR merupakan *pGem-T easy* kosong.

4.8 Verifikasi Gen *Insert* pada DNA Plasmid

4.8.1 Isolasi DNA Plasmid Rekombinan

Kultur cair dilakukan sebagai tahapan awal untuk melakukan isolasi plasmid. Kultur cair yang dilakukan selama satu malam (*over night*) menunjukkan hasil yang positif yaitu terlihat keruhnya warna dari kultur cair tersebut yang diindikasikan sebagai akibat tumbuh dan hidupnya bakteri *E. coli* BL21 transforman di dalamnya. Tidak semua hasil (stok) kultur cair digunakan untuk tujuan isolasi plasmid, sebagian disimpan di *tube eppendorf* 1,5 mL pada suhu minus 20°C untuk tujuan mempertahankan keberadaan bakteri *E. coli* BL21 transforman tersebut dalam kondisi hidup, selain sebelumnya juga telah diupayakan dengan menggunakan *master plate*.

Setelah dilakukan isolasi plasmid dari kultur cair bakteri *E. coli* BL21 transforman nomor 11, diperoleh hasil berupa pelet plasmid yang dilarutkan dengan 1 x TE sebanyak 50 µL. Setelah dielektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 100 Volt, hasil isolasi DNA plasmid dapat dilihat pada Gambar 27.



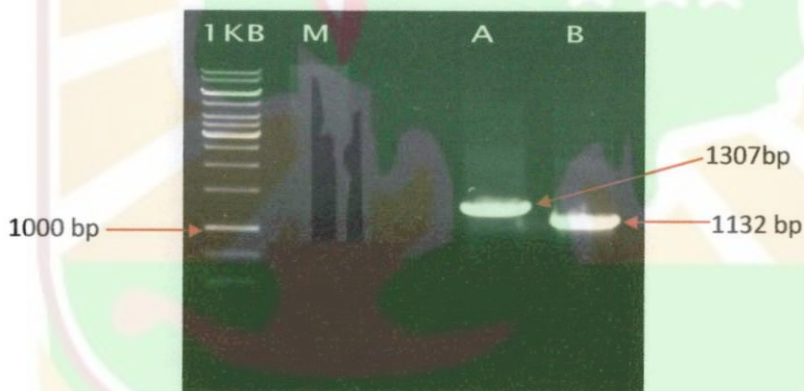
Gambar 27. Hasil isolasi plasmid. PR: Plasmid Rekombinan (*pGem-T easy vector* rekombinan), 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA* 50 ng/µL

Gambar 27. memperlihatkan bahwa isolasi DNA plasmid yang dilakukan berhasil dan konsentrasinya terlihat tinggi bila dibandingkan dengan lambda DNA. Ukuran panjangnya hingga melebihi 10 kb, menunjukkan adanya

kemungkinan bahwa dari kegiatan isolasi plasmid yang dilakukan, tidak hanya plasmid rekombinan yang berhasil diisolasi tetapi juga DNA kromosom vektor. Untuk memastikan apakah plasmid rekombinan yang diinginkan berhasil diisolasi atau tidak, dapat dilakukan dengan kegiatan restriksi. Namun, kegiatan restriksi plasmid rekombinan tersebut tidak dilakukan dalam penelitian ini. Restriksi dilakukan pada DNA rekombinan hasil amplifikasi dengan primer T7/SP6.

4.8.2 Verifikasi Gen C1 dengan Metode PCR pada DNA Plasmid Rekombinan

Untuk memastikan bahwa plasmid transforman tersebut mengandung gen C1 Geminivirus, maka hasil isolasi DNA plasmid (konsentrasi 20 ng/ μ L) diamplifikasi dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT dan primer T7/SP6 menggunakan RTG. Pembuktian hasilnya menggunakan teknik elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 28.



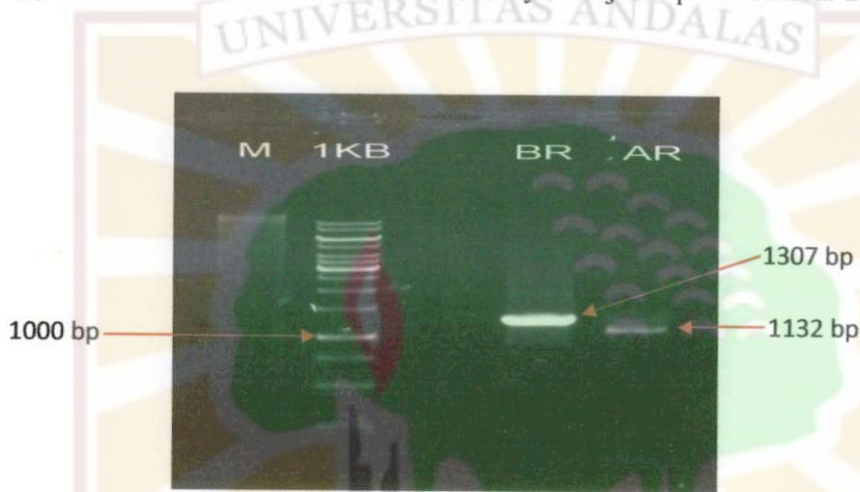
Gambar 28. Hasil amplifikasi plasmid rekombinan dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT dan primer T7/SP6. A: hasil amplifikasi dengan primer T7/SP6, B: hasil amplifikasi dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT, 1KB: *marker DNA ladder*; M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Berdasarkan Gambar 28. dapat diketahui bahwa amplifikasi yang dilakukan pada plasmid transforman tersebut berhasil membentuk produk DNA baik dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT maupun dengan primer T7/SP6. Hal ini dapat

dilihat dari ukuran panjang produk DNA masing-masing yang dihasilkan sesuai harapan dengan konsentrasi yang cukup tinggi.

4.8.3 Restriksi Hasil Amplifikasi Plasmid Transforman dengan Enzim *Sma*I dan *Bam*HI

Untuk memastikan bahwa gen tersebut adalah gen C1 Geminivirus dan dapat direstriksi dengan enzim *Sma*I dan *Bam*HI dari *pGem-T easy*, maka dilakukan restriksi terhadap produk DNA hasil PCR tersebut dengan menggunakan enzim *Sma*I dan *Bam*HI. Hasilnya disajikan pada Gambar 29.



Gambar 29. Hasil restriksi plasmid transforman dengan enzim *Sma*I dan *Bam*HI. BR (*Before Restriction*): sebelum restriksi, AR (*After Restriction*): setelah restriksi, 1KB: *marker DNA ladder*, M: *marker λ DNA 50 ng/ μ L*

Gambar 29. memperlihatkan bahwa restriksi yang dilakukan telah berhasil. Keberhasilan tersebut dapat dilihat dari perbandingan panjang produk DNA hasil setelah restriksi dengan hasil sebelum restriksi. Kedua fragmen memperlihatkan ukuran panjang produk DNA yang berbeda, yaitu 1307 bp sebelum restriksi dan 1132 bp setelah direstriksi yang diindikasikan sebagai gen C1 Geminivirus. Pengurangan sekitar 175 bp diperkirakan berasal dari fragmen vektor (sekuens T7-SP6). Namun, fragmen vektor tersebut tidak dapat terlihat dengan jelas pada Gambar 27. Hal ini dikarenakan ukuran panjangnya yang terlalu kecil dan konsentrasinya yang terlalu tipis.

4.8.4 Analisis Sekuensing Parsial Gen C1

Untuk lebih memastikan gen yang berhasil dikloning tersebut adalah benar gen C1 Geminivirus spesifik Pesisir Selatan, maka dilakukan kegiatan sekuensing terhadap hasil amplifikasi DNA plasmid transforman yang telah berhasil diisolasi tersebut dengan primer T7/SP6. Sekuensing dilakukan dari dua arah pembacaan (*two read direction*) menggunakan primer T7/SP6. Hasil yang diperoleh dari Laboratorium Sentral berupa grafik elektroforegram dengan peak-peak yang berwarna-warni untuk membedakan jenis basa nitrogen (nukleotida) yang dicirikannya. Nukleotida A berwarna hijau, nukleotida G berwarna hitam, nukleotida C berwarna biru, dan nukleotida T berwarna merah. Pola warna sekuens yang sama juga disampaikan oleh Ratnayani *et al.* (2007).

Hasil data sekuensing yang diperoleh dari sampel, diedit menggunakan bantuan *software* dan dikontrol secara manual. Setelah hasil sekuensing tersebut dianalisis, ternyata kualitas sekuens yang diperoleh kurang baik. Hal ini ditandai dengan terjadinya *overlapping peak* nukleotid satu dengan yang lain sehingga lambang nukleotidnya menjadi N. Lambang N merupakan lambang untuk simbol nukleotid A, C, G, dan T. Kontrol lambang nukleotid dilakukan dengan memperhatikan pola-pola *peak* apa yang menempati puncak tertinggi dari jenis *peak* lainnya. Jika terdapat keraguan maka penentuan jenis nukleotidnya difokuskan dengan memperkecil terjadinya variasi dari runutan nukleotid dengan sampel yang lainnya.

Selain itu, setelah dilakukan pengeditan terhadap kedua hasil pembacaan tersebut antara hasil sekuensing dengan T7 dan SP6, keduanya tidak membentuk *over lapping* sama sekali, sehingga tidak dapat di-*contig*. Oleh karena itu, untuk analisis selanjutnya, hanya dipilih dari satu pembacaan saja yaitu berdasarkan data hasil sekuensing dengan primer SP6. Hal dikarenakan data hasil sekuensing dengan primer SP6 lebih baik daripada data hasil sekuensing dengan primer T7. Pada data hasil sekuensing dengan primer T7, banyak peak-peak yang tidak memiliki puncak yang tegas, sehingga sangat menyulitkan untuk dilakukan pengeditan.

Berdasarkan data sekuens yang telah dilakukan pengeditan pada hasil sekuensing dengan primer SP6, diperoleh panjang sekuens 923 bp. Untuk

memisahkan fragmen vektor dengan sekuens C1 Geminivirus, maka dilakukan analisis secara *in silico*. Kegiatan ini dilakukan secara online pada website NCBI (*National Centre of Biotechnology Information*): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen> menggunakan program *VecScreen*. Dengan cara tersebut dapat disisihkan sekuens-sekuens yang berasal dari plasmid (vektor) yang digunakan dalam transformasi genetik.

Hasil *VecScreen* memisahkan sekuens sepanjang 848 bp yang menunjukkan bahwa fragmen yang berhasil ditransformasikan cukup panjang dibandingkan dengan fragmen awal (*original sequence*) yaitu 923 bp. Selanjutnya dilakukan pengecekan terhadap keberadaan basa primer dan titik potong enzim pada urutan-urutan basa hasil *VecScreen* tersebut. Hal ini bertujuan untuk memastikan bahwa benar hasil *VecScreen* yang diperoleh mengandung sekuens primer C1-TD21-SmaI-NT dan titik potong pengenalan enzim *SmaI*. Adapun hasil pengecekan yang dilakukan menunjukkan bahwa benar sekuens primer C1-TD21-SmaI-NT terdapat pada hasil *VecScreen* tersebut, begitu juga dengan titik potong enzim *SmaI*. Berikut urutan basa hasil *VecScreen* yang telah ditandai sekuens primer dan titik potong pengenalan enzimnya dengan pewarnaan.

CTAATCCCGGGTACGTCCTCGGAATTAGTTTCTTCTTCGCAATTTGGTGCAGTATCTTCTGTGGAACCTGAG
TAGAGTGGCCCGTTGATGGTGACGAAGGTCGATTTTCTACGGCCCAAGATTCAATGCATTATTTTGCC
ACGTCAAGGTATGCTTTATATGACGAGGTAGGACCAGGATTGCAGAGGAAGATAGTGGGAATTCGCCTTA
ATTTGAAITGGCTTTCCGTACTTAGTGTGCTTTGCCAGTTCGCTGGGCCCCATAAACTCTTTAAAGTGCTT
TAGATAGTGGGGTTCGACGTCATCGATGACGTGGTACCAGGCGTCGATTGTTGTATACTTGGGGTCAAGT
CAAGATGTCCGCAGAGATAAATTATGGGGGCCAATGACCTAGCCACATAGTTTGGCCGTACGACTCTCAC
CTTCTATGACAAATGCTAATGGGCCTCCATGGCCGCGCAGCGGCATCCATCACATTTTCAGCAGCCCATTGTG
TAGTCCCTCTGGGAAGTGGGTCACACGACGACGACGGATATGGTGAACAAGTGTATCTACAGGTGTAGCAAT
TATGCTTATCGAAATGAGCAGGTAATACTGGTGGTACTGGTATAGCATAGCTCTTTACGGAAGCCAGGCTC
CATTGAGTCAAGTCGAAAGAGGCATTTCGGAACCTTACGTGCGCACGAAGTCCAGGGGGCCTGCGGCGTTA
AAAATTCGGTTTACGTGCGTTGCGGGACAAGCGTGGTGCAGATCGGACACTATCTGCAAGTCATACCATACG
GTGGTATCACGTCTTAGTATGTACGCAGAACAATCGGAAACCTGAGTTTA

Gambar 30. Hasil *VecScreen* yang telah ditandai sekuens primer *SmaI*. **CTAATCCCGGGTACGTCCTCGGA** merupakan sekuens primer C1-TD21-SmaI-NT dan nukleotid yang berlatar hijau adalah titik potong pengenalan enzim *SmaI*

Setelah diperoleh urutan sekuens C1 Geminivirus yang telah dipisahkan dari vektor, maka dilakukan analisis sekuens lanjut dengan menggunakan analisis BLAST. Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan data

sekuens yang dimiliki dengan sekuens-sekuens DNA dari berbagai penjuru dunia dan tanaman yang didepositkan pada database (gen bank) sekuens publik. Untuk keperluan tersebut maka analisis BLAST dilakukan pada website NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Untuk mengidentifikasi sekuens C1 Geminivirus hasil sekuensing, maka pengujian dilakukan dengan menggunakan program BLASTn pada situs di atas. Hasil yang diperoleh ditampilkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil analisis BLAST

Akresi	Deskripsi	Akurasi data (<i>Query coverage</i>)	Max ident
AB267834.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus DNA, segment DNA-A, complete genome	97%	87%
AB267838.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus-[<i>Ageratum</i>] DNA, segment DNA-A, complete genome	98%	85%
DQ083765.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus isolate Bogor tomato, complete genome	95%	85%
DQ083764.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus isolate Bogor, complete genome	95%	85%
AB267836.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus-[Tomato1] DNA, segment DNA-A, complete genome	97%	85%

Tabel 6. memperlihatkan bahwa sampel yang dimiliki menunjukkan kesamaan sekuens C1 Geminivirus pada tanaman cabai dari daerah lainnya di Indonesia, maupun pada tanaman lainnya yang berbeda spesies yaitu babandotan (*Ageratum conyzoides*) dan tomat (*Lycopersicum esculentum*). Untuk mengetahui daerah terkonservasi (melihat besar persentase basa yang sama antara sekuens insert yang diperoleh dalam penelitian ini dengan sekuens dari aksesori AB267834.1 seperti yang terdapat pada Tabel 5.), maka selanjutnya dilakukan analisis penjajaran dengan program Clustal-W2. Analisis ini dilakukan pada website Clustal-W2: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

Aksesi AB267834.1 dipilih sebagai pembanding dengan pertimbangan memiliki nilai *maximum identity* yang lebih tinggi daripada keempat aksesi lainnya. Selain itu, aksesi AB267834.1 merupakan aksesi dari tanaman cabai sehingga dapat digunakan sebagai pembanding yang lebih sesuai daripada keempat aksesi lainnya yang berasal dari tanaman *ageratum* dan tomat. Walaupun aksesi DQ083764.1 juga berasal dari tanaman cabai, tetapi aksesi ini tidak dipilih sebagai pembanding karena nilai *maximum identity*-nya lebih rendah daripada aksesi AB267834.1. Untuk melihat besar variasi basa pada sekuens C1 Geminivirus yang diperoleh dari hasil penelitian ini dengan C1-TD21 dan C1-PSS14 dari hasil penelitian Jamsari *et al.* (2009), maka analisis penjajaran juga dilakukan terhadap kedua sekuens tersebut. Sehingga, total pembandingnya menjadi 3 sekuens. Adapun hasil penjajaran sekuens-sekuens tersebut sebagai berikut.



```

C1-ID21          -----ATGCCCTCCACCAGTCGTTTTAA-----GTTACAGAGTAAAACATATTTCTTA 48
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  -----ATGCCCTCGGTATATTCATTTCA-----AGTAAAAGCCAAAACATATTTCTT 48
TCAATACGCTCTCCGCGGATATTTCTTCTTCGCAATTTGGTGCAGTATCTTCTGTGGA 60

C1-ID21          ACATATCCCACTGTTCCTACACCAAGAGAGGACACTCGAACAATTAARATCCATCCAC 108
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  ACATATCCCAAGTCCCTATTCCTCAAGAGAGAGGACACTTGAAGTCTTAAAATATACAG 108
ACTTGAGTAGAGTGGCCCGTTGATGGTGCAGGAGG--TCGCATTTTTAGTCCCAAGA- 117

C1-ID21          ACTCTCTGCAACAAGCTGTTTGTCAAGATCTGTAGAGAACTTCCAGAGATGGGAGCCCT 168
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  -----TTTCAATGCAITATTTTT-----GTCC-----TCGTCAAGATAT-TCITTA 168
-----TTTCAATGCAITATTTTT-----GTCC-----TCGTCAAGATAT-TCITTA 168

C1-ID21          CACTCCCATGTGCTCATACAATTCGAAAGGAAATAGCTTCGCACGAAACACAGATTTTC 228
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  CACTCCCATGTGCTCATACAATTCGAAAGGAAAGCCGATTCAGAAATATGCACTTTC 228
TATACCGAGTATGAGCCAGGATTCGAGAGGAG--ATAGTGGAAATTC 204

C1-ID21          GACCITGGTATCCCAACCCAGGTACAGCACATTTCCATCCGAACATTCAGGGAGCTAAATCA 288
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  -----AGGT-----
GATCTTACACACCCCAACCTCCACACAATTCATCCIAACTCCAGGGAGCTAAGTCC 288
GCCTTT-----AAT-----TGAATG 221

C1-ID21          AGTTCGATGTCAAGGCGTACATGGACAA-----AGACGGTATACCACCGATGGGG 341
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  -----TTCCGATGTTCTG-CGTACATG-ACTA-----AGACG-IGATACCACCGCTATGTA 59
AGTCCGATGTCAAGGCGTACATGGACAA-----GGACGGTATACCCTGCTATGGGG 341
GCTTCCGATGTTTTGTTGTTGCTTTGCCAATTCCTTCGGGCCCCCAATAA-ACTCTTAAAG 280

C1-ID21          AGAATTCAGATAGATGCGCCGATTCGACAGG--IGTCCGCA-CGCA-GTAAAC--GA 395
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  IGACTTGCAGATAG-IGTCCGATTCGACAGCGGTTGTCGCGCAACCGCAGCTAACCAGAA 118
TGATTTTCAAGTCCAGCGGAGATCTGTAGAGG--IGTCCAGCA-GACA-GCTAAC--GA 395
TG--CTTTAGATAG-TGGG-GGTC-----GACG-TCATCAATGACGT--TGTACCAG 326

C1-ID21          TGTITTA-CGC-GC--AGGCCCT-----AAAT-----TGTGGAAGTAAAG-TCCGA-IGCT--C 439
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  TTTTAAACCGCCG--AGGCCCTTGGAACTTCGTGCGCAGCTAAGGTTCCGAAATGCCCT 176
TG--CA--GCTGTGAGGCTTT-----GAACCGAGG--TTCGA-AGACAGT 434
CGT-CRTTGTGT--ATACCTG-----GGGCTCAG--TCTAGATGTCCAC 368

C1-ID21          TTCGA-TTGA--TTAA-AGAGCTTG--CTCCG-AAAGA-CIA-----TGTCTTAC-A 482
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  TTCGATTTGAATCAATGGAGCCCTGGCTTCGTAAGAGGCTA-----TGTCTTACCA 228
AGCAA--TAA--TAA--TAA--TAA--TAA--TAA--TAA--TAA--TAA--TAA--TAA--TAA 482
AGAGA--TAA--TTTGGAGG-----CCCAATGCTAGCCCAATGTTTTGGCT 415

C1-ID21          GTAC--C--ACAAT-TTAAAGTAAATTCGATAAA-----ATATTTGCTAAC--CT 528
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  GTAC--CCACGATATACGTGCTCATTTTCGATAAAGC-----ATATTTGCTAAC--CT 278
GTAC--C--ACAAT-TTAAAGTAAATTCGATAAA-----ATATTTGCTAAC--CT 528
GTACGCTCTCACCITTAACAC-ATACTAAATGGCCCTCCATGGCCGAGGCGCATC 474

C1-ID21          GTAGATACATTTGTTTCCCAATCCGTCGTCGTCGTTTGAACAGTTCG-AGAGGAACT 587
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  GTAGAGTTTTTGTTTGGCTTTTCACTTCTTCAATTTGATCAAGTTC-AGRAGACT 587
CTTCACTTTTCACTAGCCCATTTCTGTAGTTCCTTCGGAAGTGGTC-----AAAGC 527

C1-ID21          ACGCAATGGGC-TGCTGAA--ATGTG--ATGGATCCCGCTCCGCGCCCAAGGAGC 640
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  ACGCAATGGGC-TGCTGAA--ATGTG--ATGGATCCCGCTCCGCGCCCAAGGAGC 640
ACGACAGTGGGC-TGCTGAA--ATGTG--ATGGATCCCGCTCCGCGCCCAAGGAGC 640
ACGACAGTGGGC-TGCTGAA--ATGTG--ATGGATCCCGCTCCGCGCCCAAGGAGC 587

C1-ID21          C--CAITAGCATTTGCTATA--GAAGGTGAGAGTCTGTACGGCCAAACAAATGTTGGGCTAGG 696
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  C--CAITAGCATTTGCTATA--GAAGGTGAGAGTCTGTACGGCCAAACAAATGTTGGGCTAGG 696
C--CAITAGCATTTGCTATA--GAAGGTGAGAGTCTGTACGGCCAAACAAATGTTGGGCTAGG 696
TACATTTAAATTTGCTGTACTGTAAAGGCTATCTTTGGAGCACTCTTAA--TCAA 645

C1-ID21          TCATTTGGGCCCCCAATTAATTCCTCTGCGGACATCTTGA-CTTGAAGCCCAAGGTATACAA 755
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  TCATTTGGGCCCCCAATTAATTCCTCTGCGGACATCTTGA-CTTGAAGCCCAAGGTATACAA 508
TCATTTGGGCCCCCAATTAATTCCTCTGCGGACATCTTGA-CTTGAAGCCCAAGGTATACAA 755
TGAAGAGCATC-GGACTTACTTCCACA-----AATAGGSCCTCGCATAAACATCGTGA 701

C1-ID21          CAA-----CGAC-SCCTGGTACAA--CGTCACTGAT--GACGTCGACCCCACTATCTA 804
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  CAAT-----CGAC-SCCTGGTACAA--CGTCACTGAT--GACGTCGACCCCACTATCTA 804
CAA-----TQAC-SCCTGGTACAA--CGTCACTGAT--GACGTCGACCCCACTATCTA 804
CGGTGTGTGACCACTCTGTCGAGATCTGCCAICTATCTGAATTCCTCCCAATCGAATG 761

C1-ID21          AAGCAT-----TTTAAAGATTTATGGGGGCC-----CAGCGGAACT-GCCCAAGCACCCT 888
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  AAGCAT-----TTTAAAGATTTATGGGGGCC-----CAGCGGAACT-GCCCAAGCACCCT 888
AAGCAT-----TTTAAAGATTTATGGGGGCC-----CAGCGGAACT-GCCCAAGCACCCT 888
AATCAGCGCTTT-----GTCCATGTACGCCCTTGACATCGGAACTTGAATTTAGCT-CCCT 818

C1-ID21          AAGT-----ACGGAA-GC-CAATTCAAATTAAGGCGG-AAITCCCACTATCT-TCCT 905
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  AAGT-----ACGGAA-GC-CAATTCAAATTAAGGCGG-AAITCCCACTATCT-TCCT 905
AAGT-----ACGGAA-GC-CAATTCAAATTAAGGCGG-AAITCCCACTATCT-TCCT 905
GAATGTTCCGATGAAATGTCTCCCTTGGTTGAGGATAGCAGGTCGAGAAATCTGTGT 875

C1-ID21          C--TGCAATCTGTCTTACTCG--TCATATAAGATACCTTGTAGCGGACAAAAT- 960
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  C--TGCAATCTGTCTTACTCG--TCATATAAGATACCTTGTAGCGGACAAAAT- 711
C--TGCAATCTGTCTTACTCG--TCATATAAGATACCTTGTAGCGGACAAAAT- 960
TGGTGCAGAGCTA-TTTCCTTGGATTTATGA-GCACATGGAGATGAGGGCTCCCATC 933

C1-ID21          -----ATGCAATG-AAATCTTGG--GCAGT-----A-AAAATGC-----GACCT 997
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  -----ATGCAATG-AAATCTTGG--GCAGT-----A-AAAATGC-----GACCT 997
TTGGGAAATGCTTCTACAGTCTGACAAACAGCTTTGTCAGCGGAGTGTAAAGATTT 993

C1-ID21          TCGTCCATCAACGCGGCCA-CTCTACTCAAGTCCACAGAGACTGCTCCCAAT- 1083
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  TCGTCCATCAACGCGGCCA-CTCTACTCAAGTCCACAGAGACTGCTCCCAAT- 808
TCGTCCATCAACGCGGCCA-CTCTACTCAAGTCCACAGAGACTGCTCCCAAT- 1083
TAAATGTT-CGAGTCTTCTTCTTTTATAGAGAAAGTGTGGATATGTTAAGAAATAG 1082

C1-ID21          ---TGGGAAGAG---AAATAATCCCGAGGAGACTAATGA 1089
C1-PSS3
C1-PSS14
C1-AB267834.1  ---TGGGAAGAG---AAATAATCCCGAGGAGACTAATGA 837
---TGGGAAGAG---AAATAATCCCGAGGAGACTAATGA 1089
TTTTGCTCTGCAACTTAAACGAGCTGGTGGAGGCAAT----- 1089

```

Gambar 31. Hasil penjarangan sekuens C1 Geminivirus menggunakan Clustal-W2. C1-PSS3=sekuens C1 yang diperoleh dari hasil penelitian ini, C1-TD21 dan C1-PSS14=sekuens C1 dari penelitian Jamsari *et al.* (2009), C1-AB267834.1=sekuens C1 dari database (gen bank)

Gambar 31. menunjukkan bahwa sekuens C1 Geminivirus Pesisir Selatan (C1-PSS3) dari hasil penelitian ini memiliki kesamaan yang cukup tinggi dengan sekuens C1 Geminivirus dari isolat TD21 milik Jamsari *et al.* (2009). Hal ini dapat dibuktikan dengan besarnya jumlah basa homologi yang diperoleh dari pensejajaran keduanya yaitu sebesar 748 basa. Sehingga, persentase homologinya dapat diketahui yaitu sebesar $748/837 \times 100\% = 89,37\%$. Nilai persentase sebesar 89,37% menunjukkan bahwa variasi basa pada sekuens C1 Geminivirus dari hasil penelitian ini cukup rendah dibandingkan sekuens C1 Geminivirus Jamsari *et al.* (2009). Hal ini yang dapat menyebabkan sekuens C1-PSS3 mampu diamplifikasi oleh primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT yaitu primer yang dirancang spesifik untuk sekuens gen C1 Geminivirus dari Tanah Datar. Tapi nyatanya, primer tersebut juga mampu mengamplifikasi gen C1 Geminivirus Pesisir Selatan.

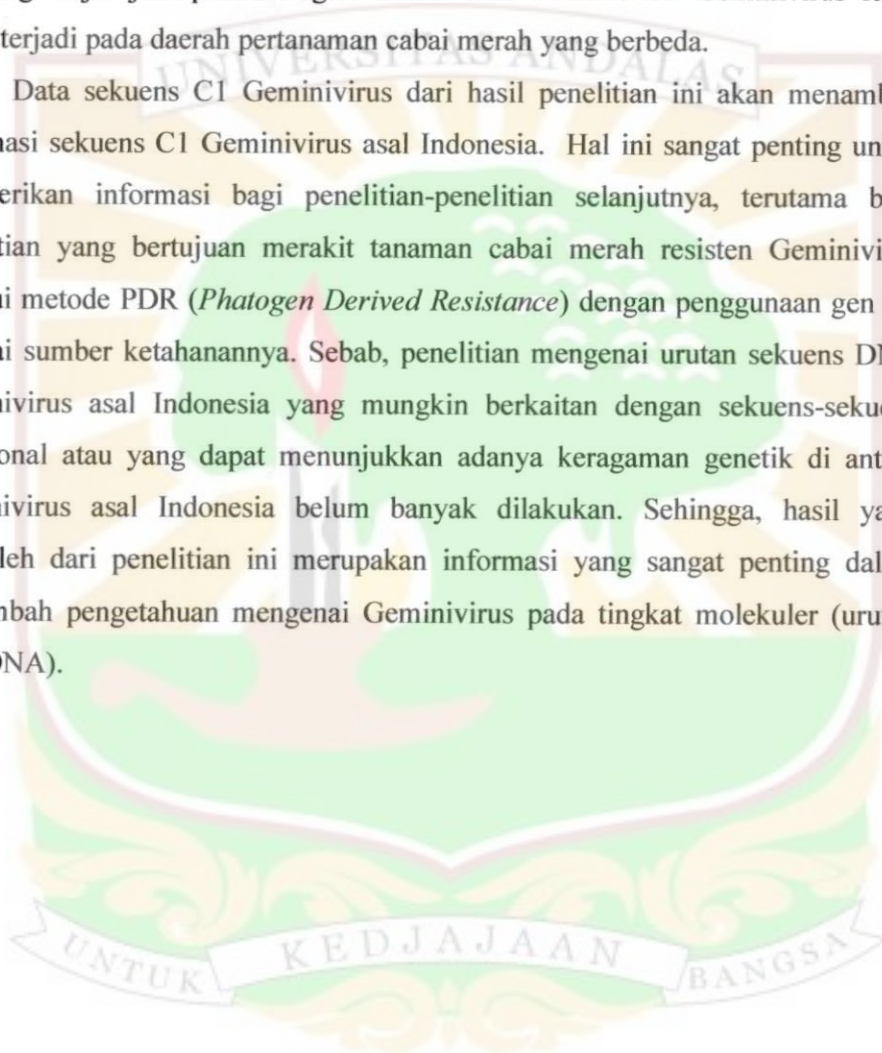
Perbandingan antara sekuens C1-PSS3 dengan C1-PSS14 turut menunjukkan variasi basa pada sekuens C1-PSS3 tidak terlalu tinggi. Hal ini dapat dilihat dari jumlah basa homologi dari perbandingan keduanya yaitu sebanyak 695 basa. Sehingga, persentase homologinya sekitar $695/837 \times 100\% = 83,03\%$. Perbedaan variasi basa sekitar 53 basa atau 6,34% antara C1-TD21 dan C1-PSS14 terhadap C1-PSS3 menunjukkan ketiga sekuens tersebut memiliki tingkat kekerabatan yang cukup tinggi. Namun, variasi yang sedikit lebih tinggi pada sekuens C1-PSS3 jika dibandingkan dengan C1-PSS14 dapat terjadi karena agresivitas Geminivirus dari isolat PSS14 tersebut sangat tinggi sehingga sekuensnya lebih kompleks dibandingkan isolat TD21. Ternyata, persamaan daerah asal isolat PSS3 dan PSS14 tidak dapat menjadi petunjuk pasti bahwa kedua isolat tersebut memiliki gen C1 Geminivirus yang 100% identik.

Hasil di atas menunjukkan bahwa dalam satu daerah pertanaman cabai merah, terdapat variasi Geminivirus yang menyerang daerah pertanaman cabai merah tersebut. Seperti yang telah diungkapkan oleh Wahyuni (2005), material genetik virus mudah berubah. Hal ini yang menyebabkan terjadinya variasi antara Geminivirus dari satu daerah yang sama. Lebih lanjut Wahyuni (2005) menyatakan bahwa dalam kehidupannya, virus terus membentuk varian baru melalui suatu perubahan susunan nukleotida dalam asam nukleatnya dan

perubahan ini terjadi sebagai akibat dari cekaman oleh faktor lingkungan, vektor, dan tumbuhan inang.

Sedangkan perbandingan antara sekuens C1-PSS3 dengan C1-AB267834.1, menunjukkan variasi basa yang sangat tinggi. Persentase homologinya sekitar $470/837 \times 100\% = 56,15\%$. Hasil ini merupakan hal yang normal, mengingat dalam satu daerah pertanaman cabai merah yang sama saja, telah cukup banyak terjadi variasi basa sekuens C1 Geminivirus. Sehingga, suatu hal yang wajar jika perbandingan variasi basa sekuens C1 Geminivirus lebih tinggi terjadi pada daerah pertanaman cabai merah yang berbeda.

Data sekuens C1 Geminivirus dari hasil penelitian ini akan menambah informasi sekuens C1 Geminivirus asal Indonesia. Hal ini sangat penting untuk memberikan informasi bagi penelitian-penelitian selanjutnya, terutama bagi penelitian yang bertujuan merakit tanaman cabai merah resisten Geminivirus melalui metode PDR (*Phatogen Derived Resistance*) dengan penggunaan gen C1 sebagai sumber ketahanannya. Sebab, penelitian mengenai urutan sekuens DNA Geminivirus asal Indonesia yang mungkin berkaitan dengan sekuens-sekuens fungsional atau yang dapat menunjukkan adanya keragaman genetik di antara Geminivirus asal Indonesia belum banyak dilakukan. Sehingga, hasil yang diperoleh dari penelitian ini merupakan informasi yang sangat penting dalam menambah pengetahuan mengenai Geminivirus pada tingkat molekuler (urutan basa DNA).



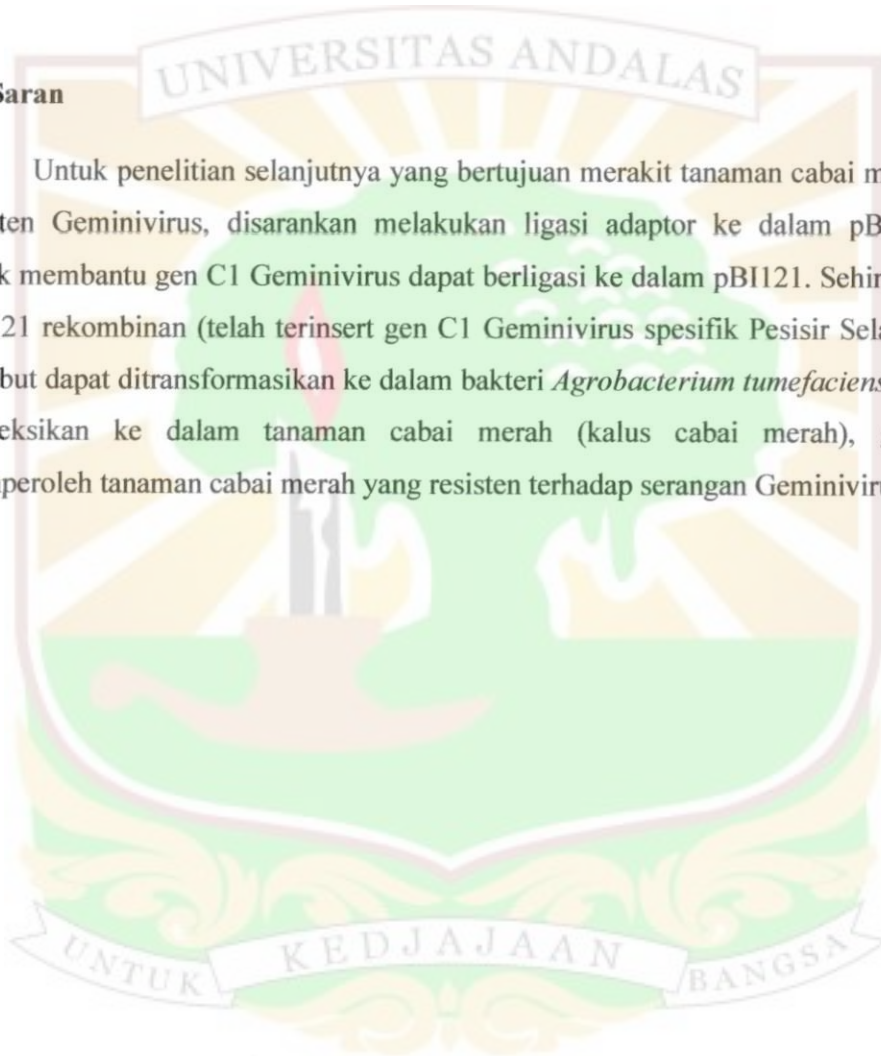
V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa gen C1 Geminivirus spesifik Pesisir Selatan pada tanaman cabai merah telah berhasil dikloning ke dalam *E. coli* BL21 dan diperoleh plasmid serta bakteri *E. coli* BL21 rekombinan.

5.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya yang bertujuan merakit tanaman cabai merah resisten Geminivirus, disarankan melakukan ligasi adaptor ke dalam pBI121 untuk membantu gen C1 Geminivirus dapat berligasi ke dalam pBI121. Sehingga, pBI121 rekombinan (telah terinsert gen C1 Geminivirus spesifik Pesisir Selatan) tersebut dapat ditransformasikan ke dalam bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dan diinjeksikan ke dalam tanaman cabai merah (kalus cabai merah), guna memperoleh tanaman cabai merah yang resisten terhadap serangan Geminivirus.



DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G. N., 1997. *Plant Pathology (fourth ed)*. Elsevier Academic Press : San Diego.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and JD. Watson. 1994. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc: New York.
- Arneti, I. Ferita, R. Mayerni, dan J. Trisno. 2009. *Penerapan Penggunaan Insektisida Biorasional untuk Mengendalikan Hama Kutu Kebul, Bemisia tabaci Penyebab Penyakit Virus Kuning Keriting Cabai di Nagari Batu Tagak Kecamatan Lubuk Basung, Kabupaten Agam, Sumatera Barat*. Universitas Andalas. Padang.
- Balai Besar Pengkajian Dan Pengembangan Teknologi Pertanian (BBPPTP). 2008. *Teknologi Budidaya Cabai Merah*. Seri buku inovasi : TH/D5/2008. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Lampung. Lampung.
- Biotek Tanaman. 2009. *Map Vektor pGem-T Easy*. [<http://biotektanaman.wordpress.com/2009/06/24/map-vektor-pgem-t-easy/>] diakses 27 April 2011: 16.23 Wib.
- Bos, L. 1994. *Pengantar Virologi Tumbuhan, Penerjemah Triharso*. Gadjah Mada University press. Yogyakarta.
- Braun CJ dan CL. Hemenway. 1992. *Expression of amino-terminal portions of full-length viral replicase genes in transgenic plants confer resistance to potato virus X infection*. Plant Cell 4: 735-744.
- Brown, TA. 1991. *Pengantar Kloning Gena Penerjemah Muhammad, SA. dan Praseno*. Yayasan Essentia Medica. Yogyakarta.
- Clontech Inc. 1996a. *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] diakses 15 Februari 2012 : 15.38 Wib.
- _____. 1996b. *Peta sisi kloning plasmid pBII21 (Catalogue)*. Di dalam website: Plant Tissue Culture. [<http://plant-tc.cfans.umn.edu/listserv/2002/log0202/msg00093.html>] diakses 15 Februari 2012 : 17.04 Wib.

- Hidayat SH., ES. Rusli, dan Nooraidawati. 1999. *Penggunaan Primer Universal dalam Polymerase Chain Reaction untuk Mendeteksi Virusgeminini pada Cabe*. Di dalam: Prosiding Seminar Ilmiah dan Kongres Nasional PFI XV; Purwokerto, 6-18 Sep 1999. Hlm 355-359.
- Hull, R. 2002. *Mathews' Plant Virology*. Fourth Ed. San Diego: Academic Press.
- Jamsari, I. Suliansyah, I. Manti, Nasrun, J. Trisno. 2007a. *Keragaman Geminivirus Pada Cabai, Serangga Vektor (Bemisia tabaci) (Hemiptera: Aleyrodidae) dan Inang Alternatifnya*. Laporan Penelitian KKP3T tahun 2007.
- _____. 2007b. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Pekanbaru. Unri Press.
- _____. I. Suliansyah, I. Manti, dan Nasrun. 2009. *Gen-Gen Penentu Virulensi Virus Gemini dan Transformasi Genetik untuk Menghasilkan Tanaman Cabai Merah Tahan Penyakit Virus Kuning Keriting (tahun I-2009)*. Laporan Hasil Penelitian. Universitas Andalas; bekerjasama dengan Sekretariat Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian : Padang.
- Koonin, E. V. and T. V. Ilyina. 1992. *Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins*. J. Gen. Virol. 73: 2763-2766.
- Laufs, J., S. Schumacher, N. Geisler, I. Jupin, and B. Gronenborn. 1995. *Identification of the nicking tyrosine of geminivirus rep protein*. FEBS Lett. 377: 258-262.
- Lawson EC., JD. Weiss, PE. Thomas, and WK. Kaniewski. 2001. *NewLeaf Plus® Russet Burbank Potatoes: replicase-mediated resistance to potato leafroll virus*. Molecular Breeding 7: 1-12.
- Maftuchah. 2005. *Transformasi Anggrek Dendrobium dengan Gen gus-A Melalui Perantaraan Agrobacterium tumefaciens*. Laporan Program Penelitian Unggulan (P2U). Universitas Muhammadiyah Malang.
- Margareta, M. 2004. *Transgenic resistance to pathogens and pests*. Doctoral diss. Dept. Of Crop Science, SLU. Acta Universitatis Agriculturae Suecia. Agraria.
- Meliansyah, Rika. 2010. *Peranan Gulma Sebagai Inang Alternatif Geminivirus di Pertanian Cabai di Jawa*. Tesis. Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Microbiologybytes. 2009. *Plant Viruses*. [<http://www.microbiologybytes.com/virology/3035pics/gemini.jpg>] diakses tanggal 14 Mei 2012 : 11. 59 Wib.

- Mujaddad, Malik. 2004. *RNAi Mediated Resistance Against Geminivirus*. Quaidi-Azam University. Islamabad.
- Nasution, Budi S. 2010. *Transformasi Genetik Fragmen Spesifik Padi (Oryza sativa L.) Hasil RAPD Terkait Toleransi Gulma Echinochloa crus-galli L.(Beauv)*. Universitas Andalas. Padang.
- Nellen, Wolfgang. 2011. *Molecular Biology Module 1*. Kassel University. Germany.
- Palukaitis P. dan M. Zaitlin. 1997. *Replicase-mediated resistance to plant virus disease*. *Advances in Virus research* 48: 349-377.
- Pico, B., M. J. Diez, dan F. Nuez. 1996. *Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crop II. The tomato yellow leaf curl virus*. *Areview. Science Horticulture* 67:151-196.
- Polston, J. E., and P. K. Anderson. 1997. *The Emergence of Whitefly-Transmitted Geminivirus in Tomato in Western Hemisphere*. 1356-1369.
- Promega. 1999. *pGem®-Tand pGem®-T Easy Vector Systems (Technical Manual No.042)*. Wisconsin, Promega.
- Ratnayani, K., I. N. Wirajana dan A. A. I. A. M. Laksmiwati. 2001. *Analisis Variasi Nukleotida Daerah D-loop DNA Mitokondria pada Suatu Individu Suku Bali Normal*. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Udayana Bukit Jimbaran. Bali.
- Rojas, Aldo. 2004. *A Complex of Begomoviruses Affecting Tomato Crops in Nicaragua*. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala.
- Rusli E.S., S.H. Hidayat, R. Suseno, B. Tjahjono. 1999. *Virus Gemini Pada Cabai : Variasi Gejala dan Studi Cara Penularan*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sanford, J. C. and S. A. Johnston. 1985. *The concept of parasite derived resistance – Deriving resistance genes from the parasite's own genome*. *J. Theor. Biol.* 113: 395-405.
- Sciencebiotech. 2012. *Bermain dengan Gunting dan Lem DNA*. [<http://sciencebiotech.net/tag/cloning/>] di akses 8 Maret 2012 : 16.30 Wib.
- Smith RH. and EE. Hood. 1995. *Agrobacterium tumefaciens transformation of monocotyledons, Transgenic Research*, 2:301-309.
- Snyder, L. and W. Champness. 1997. *Molecular Genetics of Bacteria, 2nd Edition*. ASM Press, Washington.

- Stansfield, W. D., J. S. Colome, and J. C. Raul. 2006. *Biologi Molekuler dan Sel*. Erlangga. Jakarta.
- Stenger, D. C., J. E. Duffus, and B. Villalo. 1990. *Biological and genomic properties of geminivirus isolated from pepper*. *Phytopathology* 80: 704-709.
- Sulandari, S., R. Suseno, S. H. Hidayat, J. Harjosudarmo, dan S. Sosromarsono. 2006. *Deteksi dan Kajian Kisaran Inang Virus Penyebab Daun Keriting Kuning Cabai*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sudiono, N. Y., S. H. Hidayat, dan P. Hidayat. 2005. *Penyebaran Dan Deteksi Molekuler Virus Gemini Penyebab Penyakit Kuning Pada Tanaman Cabai Di Sumatera*. Vol. 6, No. 2 : 113-121. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- _____ dan Purnomo. 2008. *Hubungan Dinamika Populasi Kutu Kebul dan Penyakit Kuning pada Cabai di Lampung Barat*. Universitas Lampung. Lampung.
- Sugiarmarman. 2000. *Evaluasi Ketahanan Beberapa Varietas Tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill.) Terhadap Infeksi Virus Gemini*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Susanto, AH. 2008. *Bab XI Polymerase Chain Reaction (PCR)*. [<http://biomol.wordpress.com/bahan-ajar/pcr/>] diakses 11 April 2011: 16.46 Wib.
- Syaiful. 2005. *Masalah penyakit virus kuning pada tanaman cabai di Sumatera Barat*. Makalah dalam Workshop penanganan virus kuning dan vektornya di Balai diklat Pertanian Bandar Buat Sumatera Barat. 7-8 April 2005. 15 hal.
- Taufik, M., S.H. Hidayat, S. Sujiprihati, G. Suastika, dan S.M. Sumaraw. 2007. *Ketahanan Beberapa Kultivar Cabai Terhadap Cucumber Mosaic Virus dan Chilli Veinal Mottle Virus*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wahyuni, WS. 2005. *Dasar-Dasar Virologi Tumbuhan*. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Wientermantel WM. and M. Zaitlin. 2000. *Transgene translatability increase effectiveness of replicase-mediated resistance to Cucumber mosaic virus*. *Journal of General Virology* 81: 587-595.
- Yepyhardi. 2009. *Mengenal Teknik DNA Sequencing*. [<http://sciencebiotech.net/mengenal-teknik-dna-sequencing/>] diakses 19 April 2011: 11.12 Wib.

Lampiran 1. Jadwal Kegiatan Penelitian

No.	Kegiatan	September				Oktober				November				Desember				Januari				Februari			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1.	Persiapan alat dan bahan	■	■																						
2.	Pengambilan sampel ke lapangan			■																					
3.	Isolasi DNA geminivirus dari sampel tanaman cabai				■	■	■	■	■																
4.	Amplifikasi genom geminivirus dengan primer WS-PYLCV-387F/R, TD21-PYLCV-455F/R dan PSS14-PYLCV-353F/R)				■	■	■	■	■																
5.	Optimasi primer spesifik C1-TD21-WS-F/R dan C1-PSS14-WS-F/R serta primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT				■	■	■	■	■																
6.	Amplifikasi fragmen gen C1 geminivirus isolat PSS dengan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT													■	■	■	■								
7.	Persiapan sel kompeten																								
8.	Ligasi fragmen gen C1 geminivirus ke dalam plasmid																								
9.	Transformasi plasmid rekombinan ke dalam bakteri <i>E.coli</i> BL21 dan <i>plating</i>																								
10.	Isolasi plasmid																								
11.	Amplifikasi hasil isolasi plasmid dengan primer T7/SP6 dan primer C1-TD21BamHI/SmaI-NT																	■	■	■	■				
12.	Analisis sekuensing																								
13.	Penulisan laporan																								

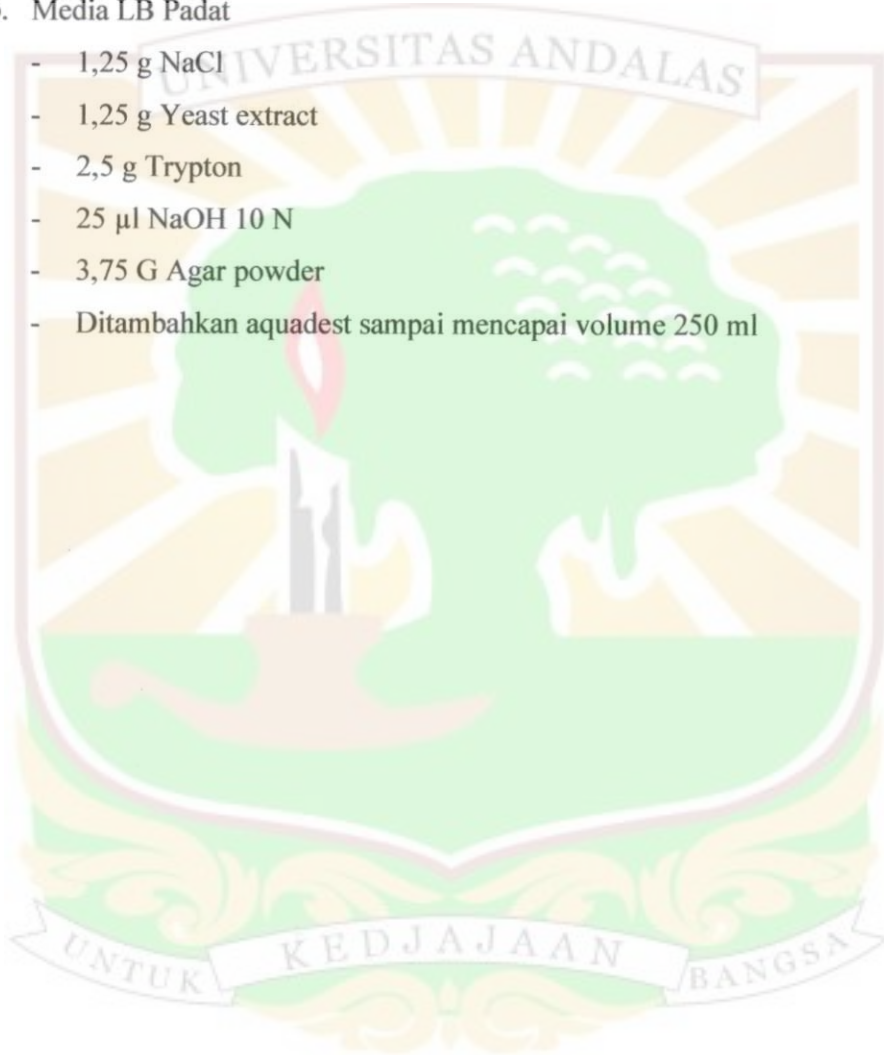
Lampiran 2. Komposisi Media

a. Media LB (Luria Bertani) Cair (250 ml)

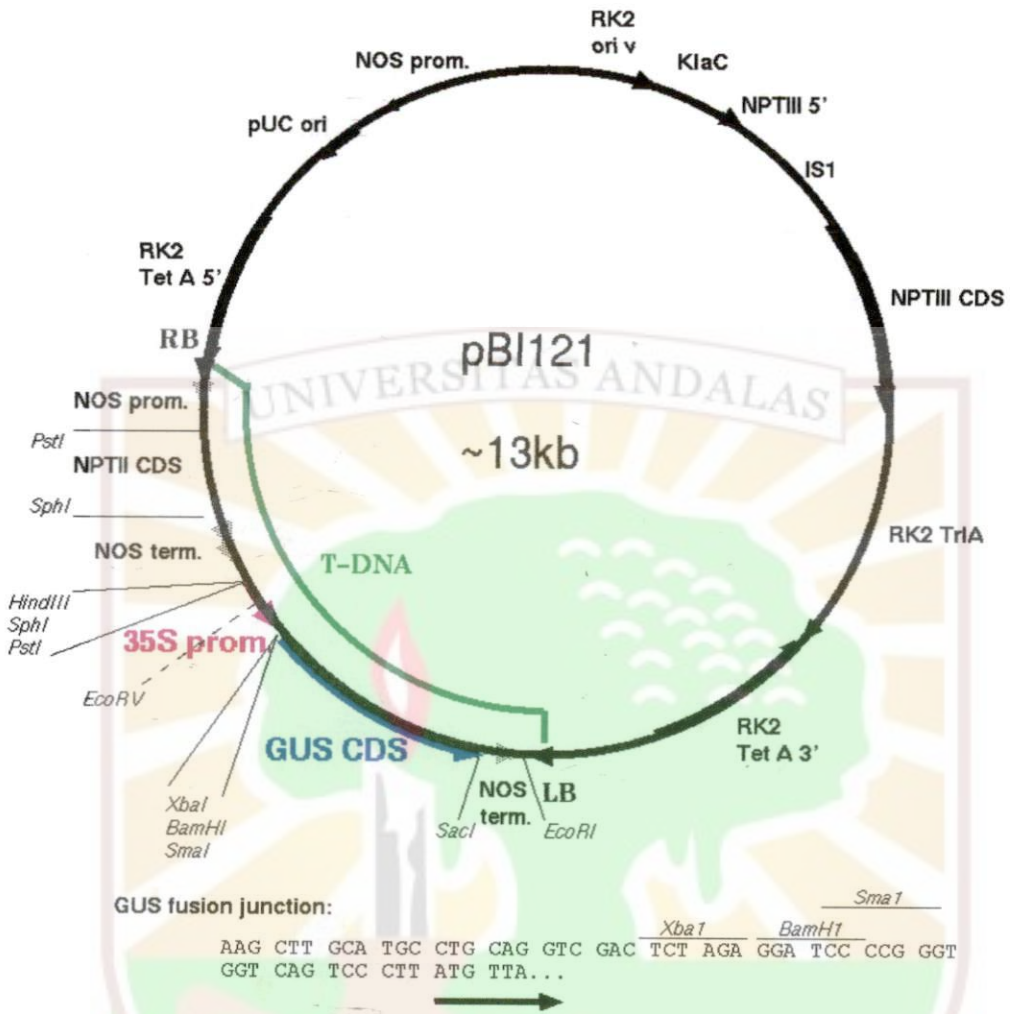
- 1,25 g NaCl
- 1,25 g Yeast extract
- 2,5 g Trypton
- 25 μ l NaOH 10 N
- Ditambahkan aquades sampai mencapai volume 250 ml

b. Media LB Padat

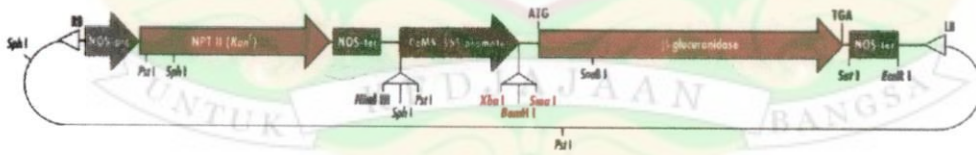
- 1,25 g NaCl
- 1,25 g Yeast extract
- 2,5 g Trypton
- 25 μ l NaOH 10 N
- 3,75 G Agar powder
- Ditambahkan aquadest sampai mencapai volume 250 ml



Lampiran 3. Gambar peta plasmid pBI121



Peta sirkular pBI121 (Clontech Inc, 1996)

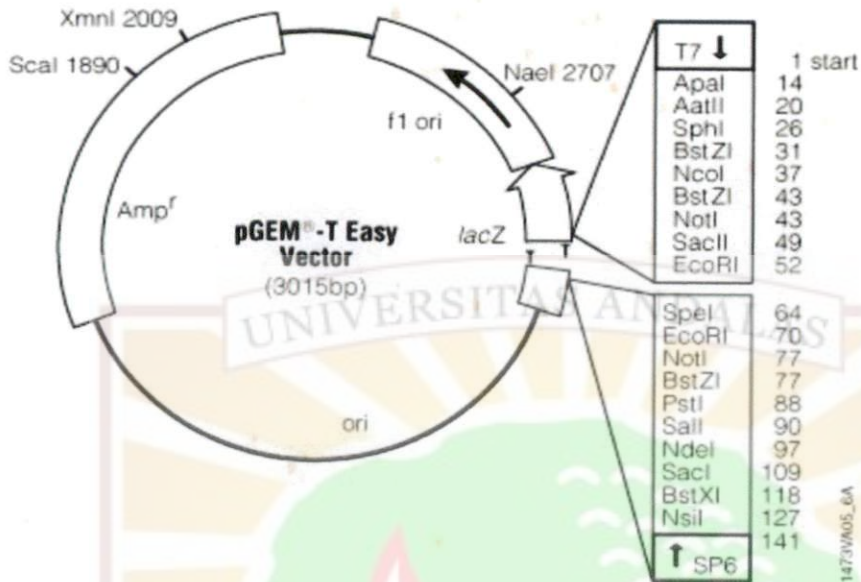


pBI121

..... Sma I
TCT AGA GGA TCC CCG GGT GGT CAG TCC CTT ATG
Xba I BamHI

from Clontech
 catalogue 1996 / 97

Peta sisi kloning plasmid pBI121 (Clontech Inc. catalogue, 1996)

Lampiran 4. Gambar plasmid *pGem-T-easy* vectorPeta *pGem-T easy* vector (Biotek Tanaman, 2009)