

# Penyisipan Gen Inhibitor $\alpha$ -amilase pada Plasmid Biner *pCambia 1301*

Edy Listanto, Sutrisno, Saptowo J. Pardal, dan M. Herman

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

## ABSTRACT

**The Insertion of  $\alpha$ -amylase Inhibitor Gene into the Binary Plasmid *pCambia1301*. Edy Listanto, Sutrisno, S.J. Pardal, and M. Herman.** The experiment was conducted at the Molecular Biology Laboratory of the Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development, Bogor. The objective was to construct *-ai* gene on a binary plasmid *pCambia 1301*. This experiment was carried out using construction method by ligation process between fragments of  *$\alpha$ -ai* gene from *pTA<sub>3</sub>* plasmid and *pCambia 1301* on *HindIII* site. The result of ligant transformation into *E. coli* DH5 $\alpha$  was 182 surviving colonies on YEP medium containing kanamycin. DNA samples were obtained from 60 randomly selected colonies. The restriction pattern was tested by digesting each DNA sample using *HindIII* showed colonies containing two fragments expected of sizes which are 11.837 and 4.887 kb. Two colonies are predicted containing of  *$\alpha$ -ai* gene on its the binary plasmid. Advanced tests using restriction enzymes *BamHI* and *XbaI* showed two directions (right and left) of  *$\alpha$ -ai* gene. The right direction was shown by *pCambia- $\alpha$ -ai1* from colony number 43. This plasmid showed expected fragments of sizes 13.485 and 3.219 kb when digested with *BamHI* and two fragments of sizes 15.421 and 1.303 kb when digested with *XbaI*. The left direction was shown *pCambia- $\alpha$ -ai2* from colony number 58. This plasmid also demonstrated expected fragments of sizes 15.026 and 1.698 kb when digested with *BamHI* and two fragments of sizes 13.082 and 3.642 kb when digested with *XbaI*. Both *pCambia- $\alpha$ -ai1* and *pCambia- $\alpha$ -ai2* were transformed into *A. tumefaciens* LBA4404.

**Key words:**  *$\alpha$ -amylase inhibitor gene, pCambia 1301, E. coli DH5 $\alpha$ , A. tumefaciens LBA4404*

## PENDAHULUAN

Salah satu upaya untuk merakit tanaman dengan sifat tertentu adalah dengan menggunakan teknik rekayasa genetik. Teknik ini dapat digunakan untuk menyisipkan gen yang berasal dari tanaman, bakteri, virus atau hewan. Pemanfaatan gen yang berasal dari organisme lain dilakukan apabila tidak ada sumber gen yang diperlukan dari plasma nutfah tanaman.

Salah satu contoh gen kandidat adalah gen inhibitor  $\alpha$ -amilase (gen  *$\alpha$ -ai*). Gen ini telah berhasil diisolasi dari kacang buncis (*Phaseolus vulgaris*) oleh

Chrispeels dan Raikhel (1991). Berdasarkan penelitian, protein yang dihasilkan oleh gen tersebut bersifat racun terhadap serangga dari kelompok *Callosobruchus*, tetapi tidak beracun terhadap mamalia. Ishimoto dan Kitamura (1989) serta Huesing *et al.* (1991) melaporkan bahwa pakan buatan dari tepung *adzuki bean* dan tepung kacang tunggak yang telah dibubuhi  *$\alpha$ -ai* dapat menghambat pertumbuhan hama gudang.

Salah satu faktor yang diduga menentukan keberhasilan transfer gen ke tanaman adalah teknik transfer gen. Transfer gen asing melalui *Agrobacterium* dapat terjadi apabila bakteri ini membawa plasmid biner yang mengandung struktur DNA khusus (T-DNA). Fragment DNA (gen tertentu) yang disisipkan ke dalam T-DNA akan ditransfer ke dalam genom tanaman secara efisien dan akan dipertahankan kestabilannya (Smith dan Hood 1995; An *et al.* 1988). Saat ini, efisiensi transformasi melalui *Agrobacterium* terjadi pada tanaman dikotil dengan stabilitas integrasi pada kromosom, ekspresi dan pewarisan yang mantap. Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan transformasi gen  *$\alpha$ -ai* ke dalam tanaman inang hama gudang.

Berdasarkan faktor-faktor di atas maka perlu dilakukan penyisipan gen  *$\alpha$ -ai* pada plasmid biner yang mempunyai T-DNA dan mampu berintegrasi ke dalam genom tanaman. Pada penelitian ini dilakukan perakitan plasmid biner yang mengandung gen  *$\alpha$ -ai*, sehingga dengan mentransfer T-DNA yang sudah mengandung gen  *$\alpha$ -ai* diharapkan dapat terintegrasi pada genom tanaman.

Damak dan Bullock (1993) menyebutkan bahwa terdapat dua tahap penting dalam proses penyisipan fragmen DNA (gen interes) ke plasmid vektor, yaitu ligasi antara DNA sisipan dan vektor, dan ligasi kembali vektor tanpa sisipan (*self-ligation*). Ullrich *et al.* (1977) melaporkan bahwa adanya proses defosforilasi dapat menurunkan terjadinya *self-ligation*. Listanto dan Wang (1996) berhasil menyisipkan gen *cad* ke dalam vektor *pUb-* dengan persentase keberhasilan 30%. Keberhasilan penyisipan gen  *$\alpha$ -ai* pada plasmid biner *pCambia 1301* belum pernah diteliti.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konstruksi gen  *$\alpha$ -ai* pada plasmid biner *pCambia 1301*. Konstruksi yang diperoleh pada penelitian ini dapat di-

gunakan untuk transfer gen  $\alpha$ -ai ke dalam genom tanaman melalui *A. tumefaciens* untuk mendapatkan sifat tahan terhadap hama gudang.

**BAHAN DAN METODE**

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor.

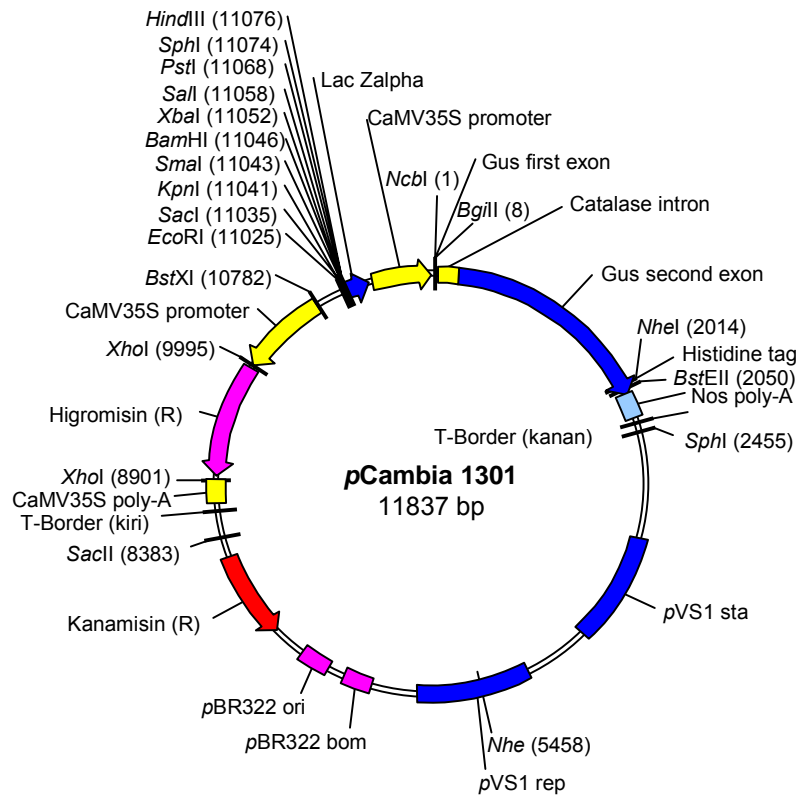
Penelitian menggunakan plasmid biner *pCambia* 1301 yang terdapat di dalam strain *A. tumefaciens* EHA105 (sumber dari Cambia Co. Australia) (Gambar 1), gen  $\alpha$ -ai (sumber dari Dr. T.J. Higgins, CSIRO Australia) merupakan cDNA yang berasal dari *P. vulgaris* yang disisipkan pada plasmid *pTA*<sub>3</sub> (7,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) dengan promoter khusus berekspreasi pada biji (Gambar 2), bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  dan *A. tumefaciens* LBA4404. Media pertumbuhan bakteri yang digunakan adalah media YEP (*bacto yeast extract* 5 g.L<sup>-1</sup>, *bacto peptone* 10 g.L<sup>-1</sup>, NaCl 5 g.L<sup>-1</sup>, *bacto agar* 15 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,8) dan media Luria-Bertani (LB) (*bacto tryptone* 10 g.L<sup>-1</sup>; *bacto yeast extract* 5 g.L<sup>-1</sup>, NaCl 10 g.L<sup>-1</sup>, *bacto agar* 15 g.L<sup>-1</sup>) dilengkapi dengan larutan CaCl<sub>2</sub>, larutan ampisilin, larutan kanamisin, dan larutan rifampisin. Enzim

restriksi yang digunakan *Hind*III, *Bam*HI, *Xba*I. Bufer (larutan penyangga) TBE 5X konsentrasi, larutan penyangga TE, larutan NaCl 5 N, larutan SDS 10%, larutan potasium asetat, isopropanol, alkohol absolut, glassmilk, agarose, dan film Polaroid 667.

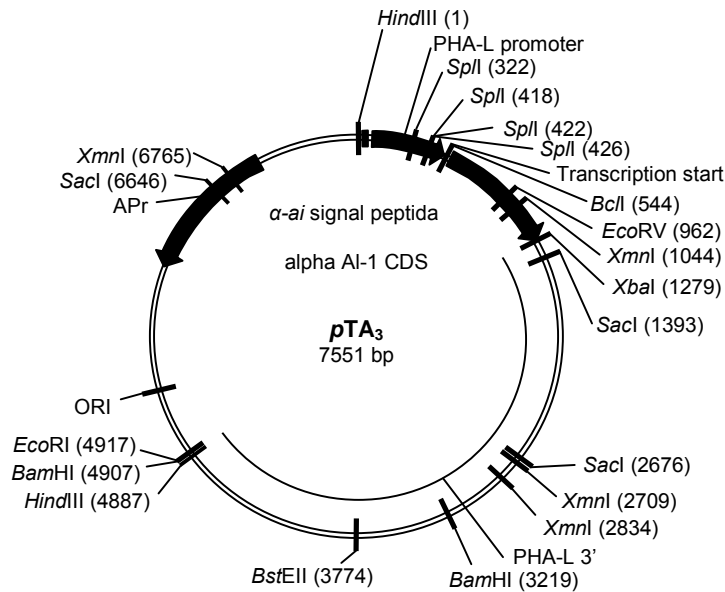
Proses konstruksi plasmid biner dilakukan berdasarkan metode Listanto dan Wang (1996). Plasmid biner baru dimodifikasi dengan menyisipkan fragmen gen  $\alpha$ -ai dari plasmid *pTA*<sub>3</sub> ke dalam plasmid *pCambia* 1301 berdasarkan metode kejutan panas dari Sambrook *et al.* (1989) dan mentransformasikan ke dalam *A. tumefaciens* LBA4404. Metode penyisipan tersebut meliputi lima tahap, yaitu (1) deteksi pola restriksi dan isolasi fragmen DNA dari gel agarose, (2) defosforilasi fragmen DNA dan proses ligasi, (3) transformasi dan isolasi DNA plasmid biner modifikasi, (4) deteksi untuk menghitung persentase keberhasilan penyisipan gen  $\alpha$ -ai, dan (5) transformasi plasmid modifikasi ke dalam *A. tumefaciens* (Sambrook *et al.* 1989).

**Deteksi Pola Restriksi dan Isolasi Fragmen DNA dari Gel Agarose**

Mula-mula, DNA plasmid *pCambia* 1301 diisolasi dari kultur *A. tumefaciens* EHA105 dan plasmid *pTA*<sub>3</sub> dari kultur *E. coli*. Deteksi pola restriksi dilakukan de-



**Gambar 1.** Peta plasmid biner *pCambia* 1301.



Gambar 2. Peta plasmid  $pTA_3$ .

ngan memotong DNA plasmid  $pTA_3$  (7,551 kb) dan  $pCambia$  1301 (11,837 kb) dengan enzim restriksi *Hind*III. Seluruh reaksi restriksi plasmid  $pTA_3$  dan plasmid  $pCambia$  1301 digunakan untuk proses elektroforesis pada gel agarose 0,8%. Selesai elektroforesis, dilakukan pengambilan gambar dengan film Polaroid 667 dan pemotongan gel yang mengandung fragmen gen  $\alpha$ -*ai* dari plasmid  $pTA_3$ . Fragmen gen  $\alpha$ -*ai* berukuran 4,887 kb sedangkan fragmen  $pCambia$  1301 berukuran 11,837 kb. Isolasi fragmen DNA dari agarose dilakukan berdasarkan metode Boehringer Mannheim (brosur produk).

#### Defosforilasi Fragmen DNA dan Proses Ligasi

Reaksi defosforilasi dibuat terhadap vektor  $pCambia$  1301, tetapi tidak dilakukan terhadap fragmen gen  $\alpha$ -*ai*. Reaksi ligasi dibuat berdasarkan metode dari GibcoBRL (brosur produk) dengan perbandingan vektor : sisipan = 1 : 1, yaitu  $pCambia$  :  $\alpha$ -*ai* = 1 volume : 1 volume. Ligasi dilakukan pada suhu 4°C selama satu malam dan hasil ligasi digunakan untuk proses transformasi. Plasmid biner yang terbentuk akan berukuran 16.724 kilo basa (kb).

#### Transformasi dan Isolasi DNA Plasmid Biner Modifikasi

Proses transformasi dilakukan dengan metode (Sambrook *et al.* 1989). Sel kompeten (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) sebanyak 200  $\mu$ l dengan kerapatan sel  $0,6 \times 10^8$  dicampur merata dalam tabung 1,5 ml dan diinkubasi di dalam es selama 30 menit. Tahap selanjutnya dilaku-

kan kejutan panas selama 90 detik pada suhu 42°C dan kejutan dingin selama 2 menit di dalam es. Setelah tahap tersebut, media YEP cair sebanyak 800  $\mu$ l ditambahkan dan digoyang pada kecepatan 150 rpm dengan suhu 37°C selama 1 jam. Penyebaran hasil transformasi dilakukan pada media YEP agar yang mengandung kanamisin 50 mg L<sup>-1</sup> dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Sebanyak 10% dari jumlah koloni yang tumbuh dipindahkan pada media YEP baru yang mengandung kanamisin sebagai replika. Setiap koloni dari replika ditumbuhkan pada media LB cair yang mengandung kanamisin untuk uji pola restriksi. Isolasi DNA plasmid dilakukan dari tiap kultur cair dengan metode lisis alkali (Sambrook *et al.* 1989).

#### Deteksi untuk Menghitung Persentase Keberhasilan Penyisipan Gen $\alpha$ -*ai*

Deteksi untuk mengetahui keberhasilan penyisipan gen  $\alpha$ -*ai* dilakukan dengan uji pola restriksi. Uji pola restriksi dilakukan dengan memotong DNA plasmid biner modifikasi menggunakan enzim restriksi *Hind*III, *Xba*I, dan *Bam*HI. Inkubasi uji restriksi dilakukan pada suhu 37°C selama 2-4 jam atau satu malam. Elektroforesis menggunakan gel agarose 1% dalam larutan penyangga TBE 0,5X konsentrasi diikuti dengan pengambilan gambar menggunakan kamera Polaroid. Pola restriksi dengan enzim *Hind*III akan menunjukkan dua fragmen berukuran 11,837 dan 4,887 kb, sedangkan dengan menggunakan enzim *Xba*I dan *Bam*HI akan menunjukkan dua arah gen  $\alpha$ -*ai* (ke kanan dan ke kiri). Pola restriksi dengan enzim *Xba*I akan menunjuk-

kan dua fragmen berukuran 15,421 dan 1,303 kb untuk arah ke kanan, sedangkan arah ke kiri akan menunjukkan dua fragmen berukuran 13,082 dan 3,642 kb. Pola restriksi dengan enzim *Bam*HI akan menunjukkan dua fragmen berukuran 13,485 dan 3,219 kb untuk arah ke kanan, sedangkan arah ke kiri akan menunjukkan dua fragmen berukuran 15,026 dan 1,698 kb.

### Transformasi Plasmid Modifikasi ke dalam *A. tumefaciens*

Transformasi plasmid modifikasi (arah ke kanan dan ke kiri) ke dalam *A. tumefaciens* LBA4404 dilakukan berdasarkan metode kejutan dingin dari An *et al.* (1988). Sel kompeten *A. tumefaciens* LBA4404 sebanyak 200  $\mu$ l ditambah dengan 10  $\mu$ l plasmid biner baru, kemudian dicelup ke dalam nitrogen cair selama beberapa detik, dan dibiarkan mencair pada suhu 37°C selama 5 menit. Tahap berikutnya ditambah dengan media YEP cair sebanyak 800  $\mu$ l dan digoyang pada suhu 28°C dengan kecepatan 150 rpm selama 2-4 jam. Kultur disentrifugasi selama 30 detik pada kecepatan 12.000 rpm dan endapan dilarutkan dengan media YEP cair sebanyak 200  $\mu$ l. Penyebaran bakteri dilakukan pada media YEP agar yang mengandung kanamisin 50 mg L<sup>-1</sup> dan rifampisin 10 mg L<sup>-1</sup> lalu diinkubasi pada suhu 28°C selama 2-3 hari. Koloni bakteri yang tumbuh pada media YEP siap digunakan untuk transformasi ke dalam tanaman.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Deteksi Pola Restriksi dan Isolasi Fragmen DNA dari Gel Agarose

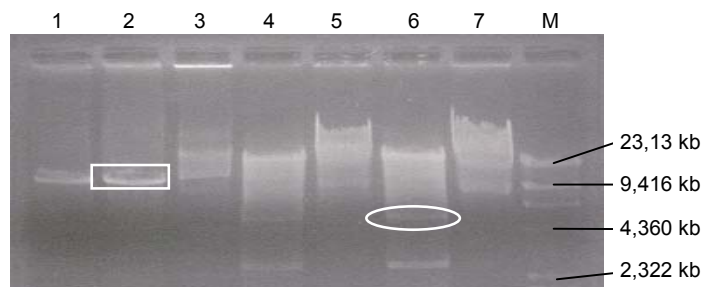
Uji pola restriksi dilakukan terhadap plasmid *pCambia* 1301 dan *pTA*<sub>3</sub> dengan menggunakan enzim restriksi *Hind*III. Penggunaan enzim restriksi tersebut dilakukan berdasarkan peta restriksi plasmid *pTA*<sub>3</sub> yang menunjukkan bahwa fragmen gen  $\alpha$ -*ai* lengkap dengan promoter dan terminator berada di antara dua sisi enzim restriksi *Hind*III berukuran 4,887 kb. Peta

restriksi plasmid *pCambia* 1301 memiliki *multiple cloning site* yang mengandung sisi *Hind*III. Hasil restriksi menggunakan enzim *Hind*III terhadap plasmid *pCambia* 1301 diperoleh satu fragmen berukuran 11,837 kb dan pada plasmid *pTA*<sub>3</sub> diperoleh 2 fragmen berukuran 4,887 kb (sebagai fragmen gen  $\alpha$ -*ai*) dan 2,664 kb (Gambar 3).

Isolasi fragmen DNA dari gel agarose hanya dilakukan terhadap fragmen gen  $\alpha$ -*ai* yang berukuran 4,887 kb. Hal ini dilakukan karena pada pemotongan plasmid *pTA*<sub>3</sub> dengan enzim restriksi diperoleh 2 fragmen DNA yang berukuran 4,887 kb (gen  $\alpha$ -*ai*) dan 2,664 kb, sedangkan yang diperlukan pada percobaan ini fragmen berukuran 4,887 kb. Hasil isolasi fragmen DNA tersebut sangat kecil, tidak dapat terdeteksi melalui elektroforesis maupun diukur konsentrasinya, sehingga pada tahap selanjutnya proses isolasi fragmen DNA gen  $\alpha$ -*ai* tidak dilakukan dan langsung bersamaan dengan fragmen lainnya dilakukan proses defosforilasi. Sebetulnya, jumlah fragmen gen tersebut berkisar 72,8  $\mu$ g dari total plasmid *pTA*<sub>3</sub>. Penyebab tidak terdeteksinya fragmen tersebut adalah hilangnya fragmen DNA dalam proses isolasi dari gel agarose. Karena plasmid *pCambia* 1301 hanya mempunyai satu fragmen DNA berukuran 11,837 kb setelah dipotong dengan enzim *Hind*III maka tidak perlu dilakukan isolasi fragmen dari gel agarose.

### Defosforilasi Fragmen DNA dan Proses Ligasi

Defosforilasi merupakan tahapan penting dalam proses ligasi. Ullrich *et al.* (1977) dalam Damak dan Bullock (1993) menyatakan bahwa proses defosforilasi dapat mengurangi terbentuknya hasil ligasi sendiri. Umumnya, proses defosforilasi menggunakan enzim alkaline fosfatase seperti *calf intestinal phosphatase* (CIP) yang merupakan suatu dimerik glikoprotein yang berfungsi untuk memindahkan ikatan grup 5'-phosphate dari DNA linear (Sambrook *et al.* 1989). Proses defosforilasi dilakukan terhadap fragmen gen  $\alpha$ -*ai* untuk mencegah tersambungnyanya kembali fragmen terse-



**Gambar 3.** Pola restriksi *pCambia* 1301 dan *pTA*<sub>3</sub>. 1 dan 2 = *pCambia* 1301 + *Hind*III, 3 = *pCambia* 1301 utuh, 4 dan 6 = *pTA*<sub>3</sub> + *Hind*III, 5 dan 7 = *pTA*<sub>3</sub> utuh, M = marker (DNA /*Hind*III), □ = fragmen *pCambia* 1301 ukuran 11,837 kb, ○ = fragmen gen  $\alpha$ -*ai* ukuran 4,887 kb (oval).

but pada vektornya, sedangkan defosforilasi pada fragmen *pCambia* 1301 ditujukan untuk mencegah tersambungannya kembali fragmen tersebut yang dapat menghambat penyisipan gen  $\alpha$ -*ai* pada plasmid biner.

Tahapan selanjutnya untuk mendapatkan plasmid biner modifikasi dengan melakukan ligasi antara gen  $\alpha$ -*ai* dan fragmen *pCambia* 1301. Pada percobaan ini telah dilakukan penyambungan (ligasi) fragmen gen  $\alpha$ -*ai* pada fragmen *pCambia* 1301 yang masing-masing dapat didefosforilasi. Reaksi ligasi dibuat berdasarkan metode perbandingan vektor : sisipan = 1 : 1, yaitu *pCambia* :  $\alpha$ -*ai* = 1 volume : 1 volume. Perbandingan fragmen *pCambia* 1301 : fragmen gen  $\alpha$ -*ai* = 1 : 1 tersebut dilakukan untuk menghasilkan plasmid rekombinasi baru secara efisien. Sambrook *et al.* (1989) menyatakan bahwa efisiensi ligasi tidak hanya dipengaruhi oleh konsentrasi absolut, tetapi juga oleh konsentrasi relatif antara DNA plasmid dan DNA yang akan disisipkan. Perbandingan yang tepat akan menghasilkan rekombinasi yang maksimum. Hasil maksimum sangat dipengaruhi konsentrasi optimal dan rasio DNA vektor : DNA sisipan. Rasio optimum akan dapat menghasilkan rekombinasi optimum bila rasio DNA plasmid : DNA sisipan  $\leq 1$ , sehingga bila jumlah DNA sisipan lebih kecil dari DNA plasmid maka hasil ligasi akan sangat kecil. Plasmid biner baru yang diharapkan berukuran 16,724 kb.

#### Transformasi dan Isolasi DNA Plasmid Biner Modifikasi

Hasil pertumbuhan bakteri yang diduga mengandung plasmid biner modifikasi diamati setelah satu malam dalam suhu 37°C. Jumlah koloni *E. coli* DH5 $\alpha$  yang tumbuh pada media yang mengandung kanamisin dihitung dan dibandingkan antara hasil transformasi dengan plasmid hasil ligasi, plasmid *pCambia* 1301 ligasi sendiri, dan *E. coli* tanpa plasmid sebagai kontrol. Jumlah koloni yang tumbuh terdiri atas 182 koloni dengan plasmid hasil ligasi, 140 koloni dengan plasmid *pCambia* 1301 hasil ligasi sendiri, dan tidak ada koloni tumbuh tanpa plasmid (kontrol negatif). Hasil tersebut masih menunjukkan tingginya plasmid *pCambia* 1301 yang berligasi sendiri sebesar 140 koloni. Hal ini berarti bahwa proses defosforilasi tidak berjalan dengan sempurna. Akan tetapi jumlah koloni yang diduga mengandung *pCambia* +  $\alpha$ -*ai* lebih tinggi, yaitu 182. Pada kontrol negatif tidak menunjukkan adanya koloni yang tumbuh pada media yang mengandung kanamisin.

Enam puluh koloni dari replika diharapkan mengandung plasmid *pCambia* 1301 yang telah tersisipi oleh fragmen gen  $\alpha$ -*ai*. Bukti awal telah masuknya plasmid hasil ligasi tersebut ditunjukkan dengan kemampuan untuk dapat hidup dari koloni bakteri *E. coli*

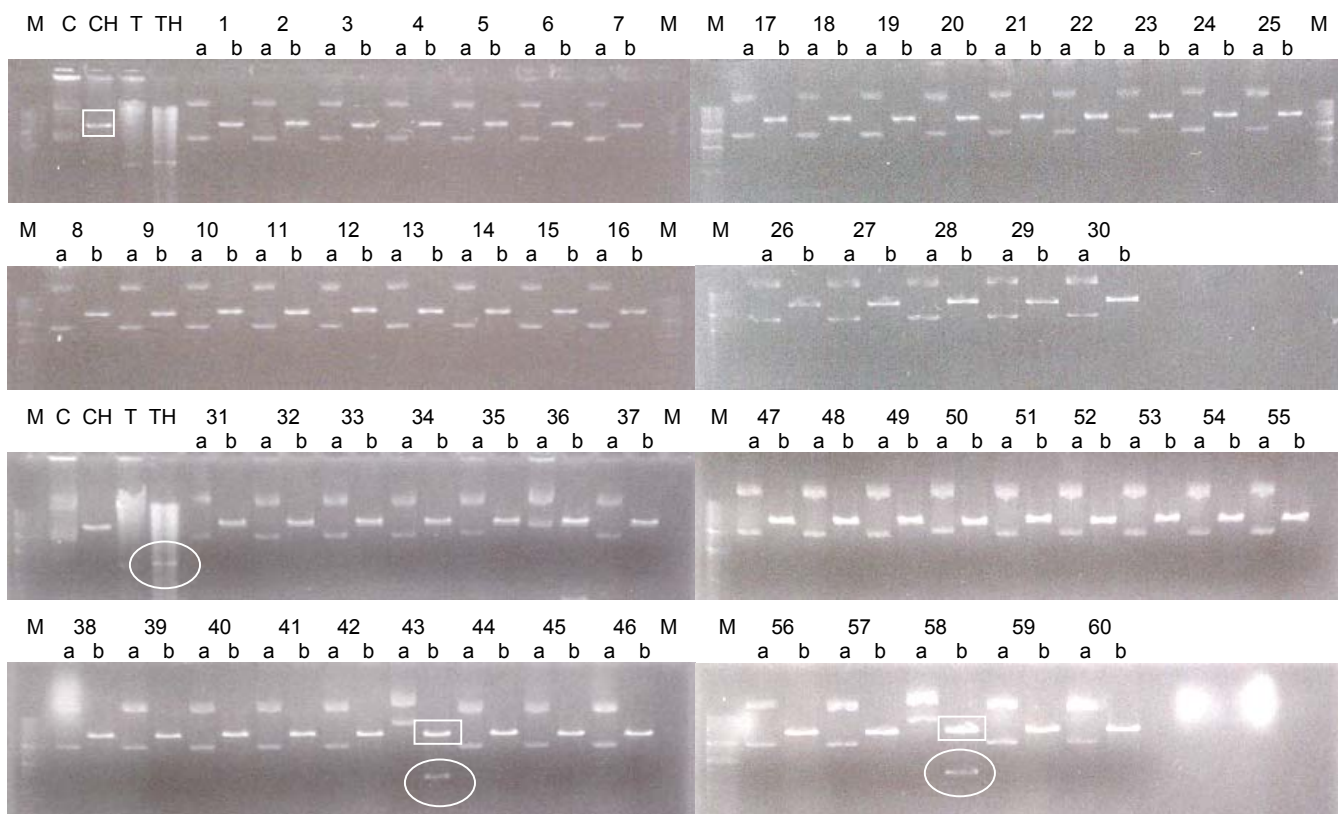
tersebut pada media YEP yang mengandung kanamisin. Plasmid *pCambia* 1301 merupakan vektor yang mengandung gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin, sehingga bakteri yang mengandung plasmid tersebut akan mampu tumbuh pada media yang mengandung kanamisin. *E. coli* yang tidak ditransformasi dengan hasil ligasi tidak mampu tumbuh pada media YEP yang mengandung kanamisin. Hasil replika dari koloni-koloni tersebut juga menunjukkan kemampuan koloni tumbuh pada media yang mengandung kanamisin. Masing-masing koloni dari 60 puluh koloni tersebut ditumbuhkan pada media LB cair yang mengandung kanamisin pada suhu 37°C untuk dilakukan isolasi DNA plasmidnya guna analisis pola restriksinya.

#### Deteksi untuk Menghitung Persentase Keberhasilan Penyisipan Gen $\alpha$ -*ai*

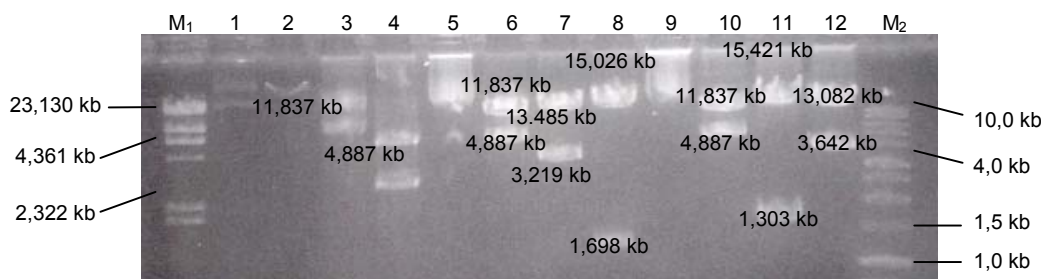
Uji lain yang dilakukan untuk membuktikan bahwa *E. coli* telah mengandung plasmid biner modifikasi (*pCambia* 1301 yang mengandung fragmen gen  $\alpha$ -*ai*), adalah uji pola restriksi dengan enzim restriksi. Uji awal deteksi menggunakan enzim restriksi *Hind*III. Hasil restriksi tersebut menunjukkan bahwa *pCambia* 1301 terpotong menjadi satu fragmen berukuran 11,837 kb dan *pTA*<sub>3</sub> terpotong menjadi 2 fragmen berukuran 4,887 kb (fragmen gen  $\alpha$ -*ai*) dan 2,664 kb (Gambar 3). Plasmid biner hasil modifikasi akan berukuran 16,724 kb dan dengan enzim restriksi *Hind*III terpotong menjadi dua fragmen berukuran 11,837 kb (*pCambia* 1301) dan 4,887 kb (fragmen gen  $\alpha$ -*ai*).

Enam puluh sampel DNA plasmid dari koloni replika dipotong dengan enzim restriksi *Hind*III dan dipisah melalui elektroforesis untuk menentukan pola restriksi seperti yang diharapkan (Gambar 4). Berdasarkan Gambar 4 diperoleh informasi yang menunjukkan adanya fragmen berukuran 11,837 kb dan 4,887 kb pada koloni nomor 43 dan 58. Dugaan awal dari kedua DNA plasmid tersebut menunjukkan bahwa *pCambia* 1301 telah tersisipi fragmen gen  $\alpha$ -*ai*.

Uji selanjutnya, DNA plasmid 43 dan 58 dipotong dengan enzim lain, yaitu enzim *Bam*HI dan *Xba*I. Hasil uji pola restriksi dengan menggunakan enzim *Bam*HI menunjukkan dua arah gen  $\alpha$ -*ai* (ke kanan dan ke kiri). Arah ke kanan sebagai *pCambia*- $\alpha$ -*ai*1 yang menunjukkan dua fragmen berukuran 13,485 dan 3,219 kb, sedangkan arah ke kiri sebagai *pCambia*- $\alpha$ -*ai*2 yang menunjukkan dua fragmen berukuran 15,026 dan 1,698 kb (Gambar 5). Pola restriksi dengan menggunakan enzim *Xba*I menunjukkan dua arah gen  $\alpha$ -*ai* (ke kanan dan ke kiri). Plasmid *pCambia*- $\alpha$ -*ai*1 menunjukkan dua fragmen berukuran 15,421 dan 1,303 kb, sedangkan plasmid *pCambia*- $\alpha$ -*ai*2 menunjukkan dua fragmen berukuran 13,082 dan 3,642 kb (Gambar 5).



**Gambar 4.** Pola restriksi plasmid modifikasi + *Hind*III. □ = fragmen *pCambia* 1301 11,837 kb, ○ = fragmen gen  $\alpha$ -*ai* 4,887 kb, M = marker, 1 s/d 60 = koloni nomer 1 s/d 60, a = DNA utuh, b = DNA + *Hind*III, C = *pCambia* 1301 utuh, CH = *pCambia* 1301 + *Hind*III, T = *pTA*<sub>3</sub> utuh, TH = *pTA*<sub>3</sub> + *Hind*III, koloni 43 dan 58 mengandung gen  $\alpha$ -*ai*.

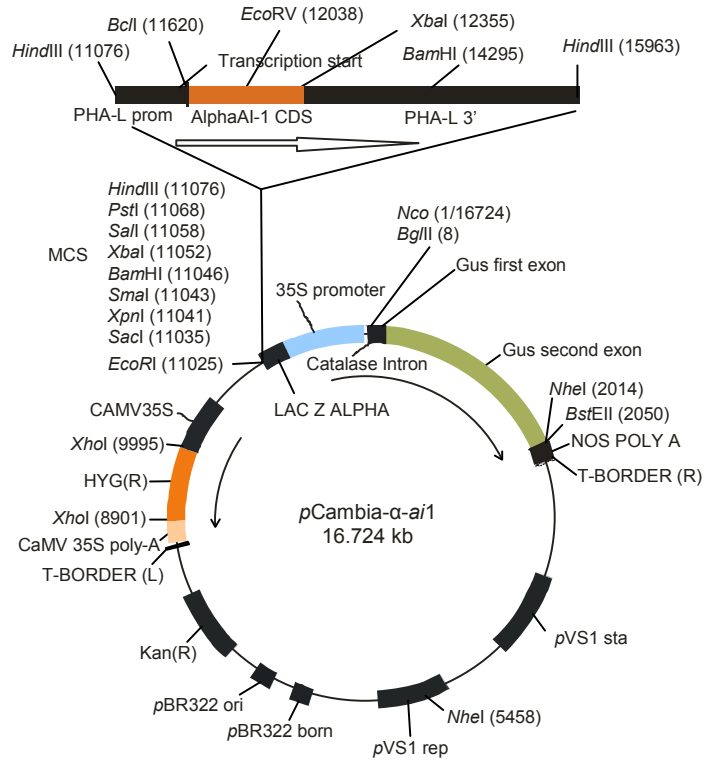


**Gambar 5.** Typeblot. M<sub>1</sub> = DNA /*Hind*III, 1 = *pCambia* 1301 utuh, 2 = *pCambia* + *Hind*III, 3 = *pTA*<sub>3</sub> utuh, 4 = *pTA*<sub>3</sub> + *Hind*III, 5 = DNA 43 utuh, 6 = DNA 43 + *Hind*III, 7 = DNA 43 + *Bam*HI, 8 = DNA 43 + *Xba*I, 9 = DNA 58 utuh, 10 = DNA 58 + *Hind*III, 11 = DNA 58 + *Bam*HI, 12 = DNA 43 + *Xba*I, M<sub>2</sub> = 1 kb DNA Ladder.

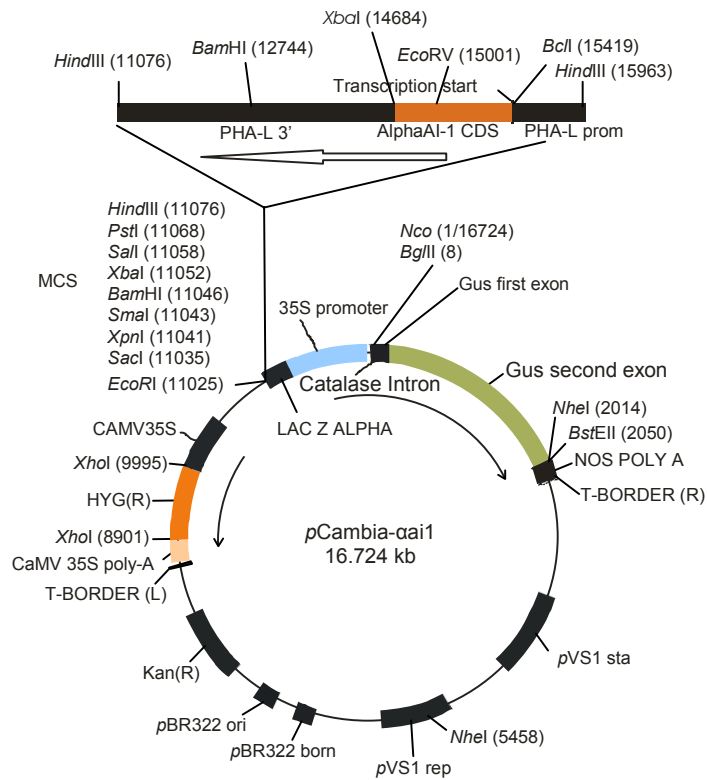
Berdasarkan pola-pola restriksi tersebut membuktikan bahwa plasmid *pCambia- $\alpha$ -ai1* (Gambar 6) dan *pCambia- $\alpha$ -ai2* (Gambar 7) memiliki pola restriksi seperti yang diharapkan. Berdasarkan jumlah koloni yang mengandung plasmid *pCambia- $\alpha$ -ai1* dan *pCambia- $\alpha$ -ai2*, maka keberhasilan hasil penyisipan gen  $\alpha$ -*ai* pada kedua plasmid *pCambia* 1301 sebesar 3,3% dengan masing masing plasmid sebesar 1,665%.

Kedua plasmid modifikasi selanjutnya ditransformasikan ke dalam *A. tumefaciens* LBA4404 dengan

metode kejutan dingin. Koloni *A. tumefaciens* LBA4404 yang mengandung plasmid modifikasi dapat digunakan untuk melakukan transformasi gen  $\alpha$ -*ai* ke dalam genom tanaman guna mendapatkan ketahanan terhadap hama gudang (terutama pada kacang hijau atau kacang-kacangan lain, atau hama lain dari golongan Coleoptera).



Gambar 6. Peta plasmid *pCambia- $\alpha$ -ai1*.



Gambar 7. Peta plasmid *pCambia- $\alpha$ -ai2*.

### KESIMPULAN

Ligasi dan transformasi fragmen gen  $\alpha$ -ai dan fragmen pCambia 1301 ke dalam *E. coli* DH5 $\alpha$  menghasilkan dua koloni yang mengandung plasmid modifikasi, yaitu pCambia- $\alpha$ -ai1 dan pCambia- $\alpha$ -ai2. Plasmid-plasmid modifikasi tersebut berdasarkan uji pola restriksi dengan enzim restriksi *Hind*III mengandung fragmen pCambia 1301 berukuran 11,837 kb dan fragmen gen  $\alpha$ -ai berukuran 4,887 kb. Restriksi plasmid modifikasi dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Xba*I memperoleh dua arah (kanan dan kiri). Arah ke kanan adalah pCambia- $\alpha$ -ai1 dari koloni nomor 43 yang menunjukkan dua fragmen, menggunakan enzim restriksi *Bam*HI diperoleh fragmen berukuran sampai dengan yang diharapkan, yaitu 13,485 dan 3,219 kb, sedangkan dengan enzim restriksi *Xba*I diperoleh fragmen berukuran 15,421 dan 1,303 kb. Arah ke kiri adalah pCambia- $\alpha$ -ai2 dari koloni nomor 58 yang juga menunjukkan dua fragmen, dengan enzim restriksi *Bam*HI diperoleh fragmen berukuran 15,026 dan 1,698 kb, sedangkan dengan enzim restriksi *Xba*I diperoleh fragmen berukuran 13,082 dan 3,642 kb. Kedua tipe plasmid modifikasi telah ditransformasi ke dalam sel *A. tumefaciens* LBA4404.

Pembuktian plasmid modifikasi dapat terekspresi di tanaman memerlukan penelitian lebih lanjut, yaitu transfer gen  $\alpha$ -ai ke dalam genom tanaman untuk mendapatkan sifat tahan terhadap hama.

### DAFTAR PUSTAKA

- An, G., P.R. Ebert, A. Mitra, and S.B. Ha. 1988. Binary vectors. *Plant Mol. Biol. Manual* A3:1-19.
- Chrispeels, M.J. 1997. Transfer of bruchid resistance from the common bean to other starchy grain legumes by genetic engineering with the  $\alpha$ -amylase inhibitor. *Advances in Insect Control*. p. 139-156.
- Chrispeels, M.J. and N.V. Raikhel. 1991. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. *Plant Cell* 3:1-19.
- Damak, S. and D.W. Bullock. 1993. A simple two-step method for efficient blunt-end ligation of DNA fragments. *Biotechniques* 15(3):448-452.
- Huesing, J.E., R.E. Shade, M.J. Chrispeels, and L.L. Murdock. 1991.  $\alpha$ -amylase inhibitor, not phytohemagglutinin explains the resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiol.* 96:993-996.
- Ishimoto, M. and K. Kitamura. 1989. Growth inhibitory effects of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of Bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Appl. Ent. Zool.* 24(3):281-286.
- Listanto, E. and K. Wang. 1996. Cloning and construction of pUb-cad plasmid. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 1(1):12-21.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*<sup>2nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1, 2, dan 3.
- Smith, R.H. and E.E. Hood. 1995. Review and interpretation, *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Sci.* 35:301-309.
- Ullrich, A., J. Shine, J. Chingwin, R. Pictet, E. Tischer, W.J. Rutter, and H.M. Goodman. 1977. Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196:1313-1319.
-