

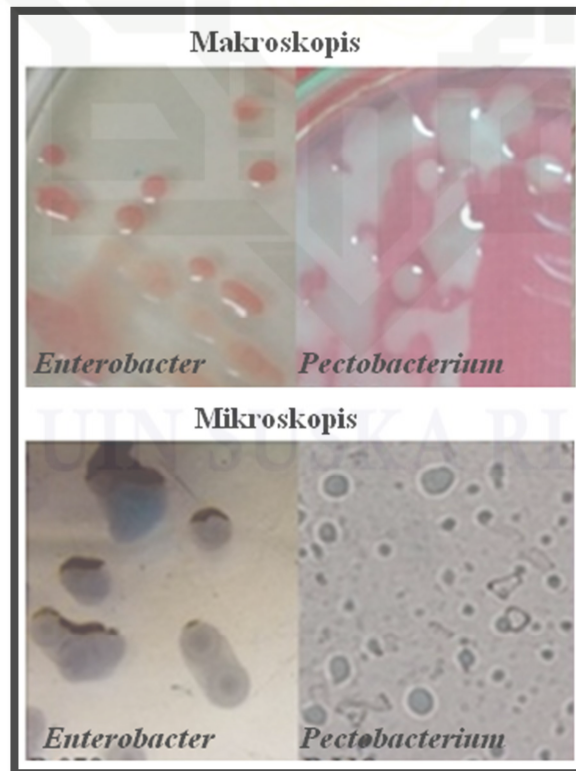
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

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 UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

I. TINJAUAN PUSTAKA

1.1. Bakteri Endofit

Bakteri endofit adalah mikroorganisme menguntungkan yang berinteraksi dengan tanaman inang serta sebagian atau seluruh dari siklus hidupnya tinggal di dalam jaringan tanaman tanpa menyebabkan gangguan, kerusakan, gejala penyakit bagi tanaman inang (Purwanto *et al.*, 2014). Pada umumnya sel bakteri memiliki ukuran yang sangat kecil dan baru dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 1000 kali atau lebih. Sel pada bakteri memiliki ciri-ciri morfologi yang unik dibandingkan dengan sel jasad hidup lainnya. Satuan ukuran tubuh bakteri adalah micrometer atau micron. Satu mikron sama dengan 1/1.000.000 milimeter. Lebar tubuh bakteri umumnya antara 1 sampai 2 mikron, sedangkan panjangnya antara 2-5 mikron (Waluyo, 2007). Bentuk morfologi bakteri uji ditampilkan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1. Model morfologi bakteri *Enterobacter* dan *Pectobacterium*.

- 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 UIN Suska Riau.
 2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

©Tabel 2.1. Karakteristik morfologi makroskopis dan mikroskopis bakteri *Enterobacter* dan *Pectobacterium*

Karakter Morfologi	Bakteri	
	<i>Enterobacter</i>	<i>Pectobacterium</i>
Makroskopis		
Bentuk	Bulat	Bulat
Elevansi	Cembung	Cembung
Tepian	Licin	Licin
Permukaan	Licin	Licin
Warna	Orange	Putih kemerahan
Mikroskopis		
Bentuk	Diplococcus	Monococcus
Struktur dalam	Bergranul	Bergranul
Reaksi gram	Negatif	Negatif

Karakteristik morfologi bakteri *Enterobacter* dan *Pectobacterium* secara makroskopi meliputi bentuk koloni, bentuk tepian koloni, warna koloni, permukaan koloni, elevansi koloni. Bakteri *Enterobacter* dan *Pectobacterium* berbentuk bulat, elevansi yang cembung, permukaan dan tepian isolat bakteri uji memiliki bentuk yang licin. Isolat bakteri *EEnterobacter* berwarna orange dan *Pectobacterium* berwarna putih kemerahan (Gambar 2.1 dan Tabel 2.1).

Bentuk mikroskopis bakteri uji jika dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali, maka *Enterobacter* berbentuk diplokokus (*diplococcus*) yaitu berbentuk bola bergandeng dua, sedangkan *Pectobacterium* berbentuk monokokus (*monococcus*) yaitu bakteri yang berbentuk bola tunggal. Struktur dalam *Enterobacter* berbentuk gulungan sedangkan *Pectobacterium* berbentuk granul. Reaksi gram pada kedua bakteri uji menunjukkan kedalam bakteri gram negatif (Tabel 2.1).

Bakteri gram negatif memiliki titik hubung antara membran luar dan dalam yang disebut daerah perlekatan atau *bayer junctions*. *Bayer junctions* secara fisiologis, pada bagian luar merupakan tempat masuknya DNA, pada bagian dalam memperlihatkan zona pertumbuhan, tempat translokasi protein dan lipopolisakarida. Mikroba endofit dapat melindungi tumbuhan inang dari serangan patogen dengan senyawa yang dihasilkan berupa metabolit sekunder yang merupakan senyawa bioaktif dan dapat berfungsi untuk membunuh patogen



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 UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

(Bandara *et al.*, 2006). Mikroba endofit mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, terpen, steroid, flavonoid, kuinon dan fenol (Tan & Zou, 2001). Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenol yang mempunyai kecenderungan untuk mengikat protein, sehingga mengganggu proses metabolisme bakteri, selain itu flavonoid juga berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri (Prasetyo dan Sasongko, 2014)

Menurut Quadt-Hallmann *et al* (1997) mekanisme invasi bakteri endofitik ke dalam jaringan tanaman dapat dilakukan dengan beberapa cara, antara lain masuk melalui stomata, lentisel, luka alami, *trachoma* yang rusak, titik tumbuh akar lateral, radikula yang sedang tumbuh, jaringan akar meristematik yang tidak terdiferensiasi, serangan pada dinding sel rambut akar, melalui enzimatik degradasi ikatan polisakarida dinding sel. Jalan alternatif lainnya bakteri masuk melalui penyerapan unsur hara tanaman secara pasif akibat transpirasi tanaman. Bakteri endofit yang telah masuk ke dalam tanaman dapat tumbuh hanya di satu titik tertentu atau menyebar ke seluruh tanaman.

Mekanisme interaksi simbiosis antara tanaman dengan bakteri endofitik adalah terjadinya pertukaran nutrisi dimana tanaman mentransferkan karbon atau gula dan asam amino, jenis gula terutama sukrosa dan glukosa untuk bakteri endofitik (Usuki dan Narisawa, 2007), bakteri memfiksasi N₂ menjadi tersedia bagi tanaman dalam bentuk NH₃ serta menghasilkan fitohormon berupa GA₃, Sitokinin dan IAA (Gusmaini *et al.*, 2013). IAA (*Indole Acetic Acid*) atau yang lebih dikenal dengan sebutan auksin. Auksin berperan sebagai hormon pemacu tumbuh pada tanaman dan biasanya ditemukan pada jaringan meristem, dengan begitu tanaman mendapatkan nutrisi dan senyawa aktif yang diperlukan selama hidupnya (Simarmata *et al.*, 2007).

Berdasarkan struktur kimianya, senyawa anti bakteri atau antibiotik dibagi menjadi 3 grup yaitu antibiotik yang disintesis dari gugus gula, gugus asam amino dan gugus asetat atau propionat. Antibiotik yang berasal dari gugus gula diantaranya adalah streptomisin, neomisin, paranomisin. Gugus asam amino diantaranya adalah kloramfenikol, penisilin (Indrayadi, 2011). Gugus asetat atau propionat adalah tetrasiklin, eritromisin, puromisin. Berdasarkan bentuk kimia

- 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 UIN Suska Riau.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

antibiotik menjadi 5 grup yaitu β laktam (diantaranya penicillin), tetrasiklin, aminoglikosida (streptomisin), makrolid (eritromisin) dan quinol (kloramfenikol) (Guifoile, 2007).

Ketahanan terhadap bakterisida diketahui dengan melakukan uji terhadap streptomisin, penisilin, kloramfenikol dan tetrasiklin (Zinniel, 2002). Beragam sifat yang mencirikan suatu bakteri dapat diketahui melalui uji fisiologi dan biokimia. Uji fisiologi dan biokimia tersebut diantaranya adalah uji gram, uji oksidatif, uji hidrolisis pati (Denny and Hayward, 2001) dan uji antibiotik. Mekanisme resistensi antibiotik pada bakteri dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Mekanisme resistensi antibiotik (Neu dan Gootz, 2001)

Mekanisme Resistensi Antibiotik Pada Bakteri
Perubahan target Modifikasi menjadi insentif Penurunan fungsi fisiologik dari target Sintesis enzim
Pencegahan mencapai antibiotik Kegagalan <i>ampicillin</i> memasuki sel
Inaktivasi antibiotik Modifikasi <i>ampicillin</i> sehingga gagal berikatan dengan target

Dari Tabel 2.2 dapat diketahui bahwa, mekanisme resistensi antibiotik meliputi perubahan target dengan cara memodifikasi sel bakteri menjadi insentif, penurunan fungsi fisiologik dari sel bakteri dan sintesis enzim, pencegahan mencapai antibiotik dengan kegagalan *ampicillin* memasuki sel bakteri dan inaktivasi antibiotik dengan modifikasi *ampicillin* sehingga gagal berikatan dengan sel bakteri (tabel 2.2).

Keragaman bakteri endofit dalam suatu tanaman dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan tanaman, khususnya kondisi tanah. Pada beberapa kasus, tanaman dengan jenis atau spesies yang sama memiliki bakteri endofit yang tidak selalu sama. Pada beberapa tanaman terdapat bakteri endofit yang spesifik dan khas menghuni tanaman tersebut (Purwanto *et al.*, 2014). Lebih dari 300.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi yang ada didunia dan masing-masing individu adalah



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 UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

inang dari satu atau lebih dari mikroba endofit (Indrayadi, 2011). Keragaman bakteri endofit memiliki beberapa keuntungan yaitu mikroba endofit akan tetap ada atau bertahan selama perkembangan tanaman dan terus memberikan perlindungan bagi tanaman serta mempunyai potensi untuk membantu dalam meningkatkan ketahanan tanaman dengan menghasilkan fitohormon serta meningkatkan produktivitas tanaman dengan memfiksasi nitrogen di udara. Bakteri endofit yang digunakan sebagai pengendali penyakit layu bakteri diantaranya *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* (Handini dan Nawangsih, 2014). Mikroba endofit juga berfungsi sebagai kontrol patogen pada jaringan akar (Schulz, 2006).

Isolat bakteri endofit mampu mereduksi beberapa gula kelompok disakarida yaitu sukrosa, laktosa dan maltosa. Isolat yang dikarakterisasi mampu mereduksi gula-gula tersebut. Gula jenis disakarida akan diubah menjadi senyawa yang lebih sederhana. Menurut Salisbury dan Ross (1992), gula-gula jenis disakarida akan mengalami hidrolisis menjadi komponen yang lebih sederhana. Enzim β -galaktosidase akan memecah laktosa menjadi galaktosa dan glukosa, enzim invertase yang memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa dan enzim maltase akan memecah maltosa menjadi glukosa. Gula yang mengalami hidrolisis menjadi sederhana kemudian mengalami fermentasi membentuk asam, gas dan produk akhir lainnya. Glukosa merupakan gula kelompok monosakarida. Isolat yang dikarakterisasi mampu mereduksi glukosa menjadi komponen yang lebih sederhana. Glukosa akan direduksi melalui tahapan glikolisis membentuk asam piruvat. Asam piruvat kemudian akan difermentasi oleh bakteri menjadi beberapa asam dan gas (Salisbury dan Ross, 1992).

Bakteri pada kondisi tertentu akan menghasilkan hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida merupakan racun yang dapat merusak sistem metabolisme bakteri. Bakteri akan mengalami kematian apabila tidak dapat memecah hidrogen peroksida menjadi senyawa lain yang tidak berbahaya. Pemecahan tersebut dapat dilakukan apabila terdapat enzim katalase. Menurut Hadioetomo (1993), enzim katalase akan mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen sehingga tidak berbahaya.

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 UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

Menurut Khan dan Doty (2009), bakteri endofit juga mampu memfiksasi nitrogen. Fiksasi nitrogen ini dapat diketahui dengan adanya kemampuan bakteri endofit untuk mereduksi nitrat menjadi nitrit. Menurut Schmidt (1994), reduksi nitrat menjadi nitrit disebabkan oleh adanya kerja dari enzim *nitrate reduktase*.

1.2. Transformasi

Transformasi adalah salah satu teknik dalam bidang molekuler untuk menyisipkan fragmen DNA ke inang yang sesuai. Fragmen DNA yang telah dikloning disisipkan ke dalam vektor lain, kemudian diintroduksi ke dalam sel inang sehingga terbentuk DNA rekombinan. DNA tersebut dapat digunakan untuk memperbanyak dan mempelajari kerja ekspresi gen yang terkandung di dalam DNA rekombinan (Sharma *et al.*, 2005).

Proses transformasi dapat digunakan dengan berbagai cara tergantung kepada jenis inang dan objek yang akan ditransformasi. Mekanisme penyisipan gen (DNA) dalam proses transformasi adalah (1) DNA yang ingin disisipkan, diisolasi dan dipotong oleh enzim restriksi endonuklease, pada tempat urutan nukleotida yang spesifik. (2) Plasmid bakteri, diisolasi dan dipotong oleh enzim yang sama (Plasmid sebagai vektor pengklon). (3) Fragmen DNA kemudian disisipkan ke dalam vektor dan disatukan oleh enzim ligase. (4) Transformasi DNA plasmid ke dalam sel bakteri sehingga mengekspresikan gen yang diinginkan. Transformasi genetik pada tumbuhan banyak dilakukan. Metode transfer gen pada tumbuhan secara garis besar dibagi menjadi dua sistem, yaitu transformasi langsung dan sistem transformasi tidak langsung. Transformasi langsung meliputi kejutan panas (*heat shock*), *particle bombardment*, transfer dengan *polyethylen glycol* (PEG), *freezer thawing* dan elektroporasi, sedangkan transformasi tidak langsung dapat dilakukan dengan menggunakan perantara berupa bakteri misalnya bakteri *A. tumefaciens* (Sharma *et al.*, 2005).

Metode transformasi pertama kali dikembangkan untuk memindahkan sifat-sifat genetika dan untuk mentransfer plasmid-plasmid kecil dari satu galur bakteri ke galur lainnya. Penelitian Frederick Griffith pada tahun 1928 yang mempelajari *Streptococcus pneumoniae* penyebab penyakit *pneumonia* dengan mengambil dua strain yang berbeda yaitu patogenik dan non patogenik. Frederick Griffith

menemukan bahwa ketika membunuh bakteri patogenik dengan panas kemudian mencampurkan sisa-sisa sel tersebut dengan bakteri *Streptococcus pneumonia* non patogenik, beberapa dari sel hidup tersebut berubah menjadi patogenik (Campbell *et al.*, 1974).

Transformasi terjadi ketika sel non patogenik hidup mengambil potongan DNA yang kebetulan mengandung alel untuk patogenisitas (gen untuk suatu lapisan sel yang melindungi bakteri dari sistem imun inang). Alel asing tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kromosom bakteri menggantikan alel aslinya. Proses ini merupakan rekombinasi genetik atau pertukaran segmen DNA dengan cara pindah silang (*crossing over*). Sel yang ditransformasikan memiliki satu kromosom yang mengandung DNA yang berasal dari dua sel yang berbeda. Transformasi juga dapat digunakan untuk mengungkap keterkaitan gen, urutan gen, serta jarak peta (Campbell *et al.*, 2006).

Jenis-jenis metode transformasi yaitu:

1. Kejutkan panas

Teknik transformasi kejutkan panas (*heat shock*) dilakukan dengan cara pemberian CaCl_2 pada sel bakteri sehingga sel bakteri menjadi kompeten. Garam CaCl_2 akan mempengaruhi porositas membran sel sehingga pada saat terjadi lonjakan suhu membran menjadi tidak selektif terhadap molekul asing dan produk ligasi dapat masuk ke dalam sel. Sel bakteri yang telah kompeten akan mudah dimasukkan DNA rekombinan setelah diberi kejutkan panas (Wong, 2005). Kejutkan panas yang diberikan dengan suhu 42°C selama kurang lebih 30 detik dan dilanjutkan dengan inkubasi dengan suhu dingin selama kurang lebih 15 menit untuk meningkatkan efisiensi dari transformasi (Mangunwardoyo, 2002).

2. Elektroporasi

Elektroporasi merupakan salah satu cara melakukan transformasi dengan menggunakan aliran listrik. Elektroporasi berperan untuk meningkatkan efisiensi integrasi DNA pada sel inang. Aliran listrik yang digunakan dalam elektroporasi akan menyebabkan membran sel mengalami kerusakan dengan sementara. Kerusakan pada membran sel karena terbentuknya pori sementara pada lapisan hidrofobik sekitar 2 nm yang membuat struktur membran sel menjadi permeabel

Untuk proses integrasi DNA menuju sitoplasma dalam sel. Aplikasi transformasi dengan menggunakan elektroporasi dapat dilakukan dengan fungi, khamir, sel tumbuhan, beberapa pada bakteri dan sel hewan (Wideani, 2011).

3. *Particle bombardment (biolistic)*

Particle bombardment disebut juga *biolistic* merupakan metode transfer gen yang digunakan untuk melakukan transformasi terhadap sel secara in-situ. DNA target akan diletakkan diatas permukaan emas sekitar 0,5 – 1,5. DNA tersebut kemudian akan dilakukan penembakan dengan alat yang disebut gene gun. *Gene gun* akan menembak dengan adanya tekanan yang tinggi. DNA yang sudah terlapis dengan emas akan masuk ke dalam jaringan tumbuhan dan melakukan integrasi ke dalam DNA kromosom secara acak. Jaringan tumbuhan tersebut akan diregenerasi dengan kultur jaringan hingga menjadi planlet (Wideani, 2011).

4. *Freezer thawing*

Freezer thawing merupakan salah satu metode yang dinilai efektif untuk mendapatkan protein rekombinan dari dalam sitoplasma sel bakteri maupun sel mamalia. Metode tersebut dilakukan dengan pembekuan suspensi sel kemudian mencairkannya kembali. Pembekuan sel tersebut menyebabkan sel tersebut membengkak kemudian berubah menjadi bentuk kristal es, sedangkan proses pencairannya menyebabkan sel berkontraksi. Metode transfer gen dengan *Freezer thawing* dengan bantuan nitrogen cair (-196°C) pada proses pembekuan dan air panas (37°C) pada proses peleburannya. *Freezer thawing* pada tahap kompeten sel juga menggunakan CaCl_2 dengan konsentrasi 0,05 M dan pada transformasi ditambahkan 0,5-1,0 μg plasmid DNA (Hofgen dan Willmitzer, 1988).

5. *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens merupakan transformasi secara tidak langsung dan merupakan bakteri tanah gram positif yang bersifat fitopatogen pada tanaman dikotil. *Agrobacterium tumefaciens* secara alami mempunyai kemampuan untuk mentransfer potongan DNA yang kemudian dikenal dengan T-DNA (transfer DNA) ke dalam genom tanaman dan menyebabkan terbentuknya tumor (*crown*

- 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 UIN Suska Riau.
 2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

gall). Tumor tersebut merupakan mesin penghasil makanan atau sumber karbon bagi *Agrobacterium tumefaciens*. Terdapat tiga komponen genetik penting yang terlibat dalam proses pembentukan tumor. Pertama, gen virulen kromosom (*chromosomal virulence* disingkat *chv*), yang terdapat pada kromosom *Agrobacterium tumefaciens* dan berfungsi dalam pelekatan bakteri dengan sel tanaman. Kedua, sekelompok gen virulen (*vir*) yang terdapat dalam plasmid Ti yang berukuran besar (~200 kb) yang berperan dalam meninduksikan transfer dan integrasi T-DNA. Komponen ketiga adalah daerah T-DNA yang juga terletak pada plasmid Ti. Daerah T-DNA, dibatasi oleh LB (*left border*) dan RB (*right border*), mengandung gen penting bagi *Agrobacterium tumefaciens* (Sharma *et al.*, 2005).

Bakteri melakukan integrasi ke dalam jaringan tanaman melalui luka, jaringan tanaman dikotil yang terluka menghasilkan senyawa fenolik (asetosiringon) dan monosakarida (glukosa, galaktosa) yang menginduksi transkripsi sejumlah gen *vir* kemudian dilakukan penyisipan gen-gen yang ada pada daerah T-DNA. T-DNA tersebut diinfeksi ke jaringan tanaman berupa eksplan atau organ tanaman lain dan hasilnya diseleksi menggunakan antibiotik. Keunggulan transformasi secara tidak langsung adalah tidak membutuhkan peralatan khusus, dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium yang sederhana dan sisipan gen tunggal berpeluang tinggi dibandingkan transformasi secara langsung (Sharma *et al.*, 2005).

1.3. Green Fluorescent Protein

Green fluorescent protein (GFP) atau protein yang berpendar hijau adalah fluorescent protein spontan yang diisolasi dari organisme laut yaitu ubur-ubur *Aequorea victoria* yang ditemukan oleh ilmuwan Jepang Osamu Shimomura pada tahun 1960-an (Shimomura, 1962). Plasmid biasanya digunakan dalam teknologi DNA rekombinan sebagai *host*, sehingga dalam rekayasa genetik plasmid sering digunakan sebagai vektor untuk membawa gen-gen tertentu yang diinginkan ke dalam suatu sel inang. DNA vektor yang biasa digunakan adalah plasmid yang berukuran antara 1-250 kb (Brown, 2010). Selain itu plasmid juga banyak digunakan untuk memperbanyak jumlah DNA tertentu sehingga bisa

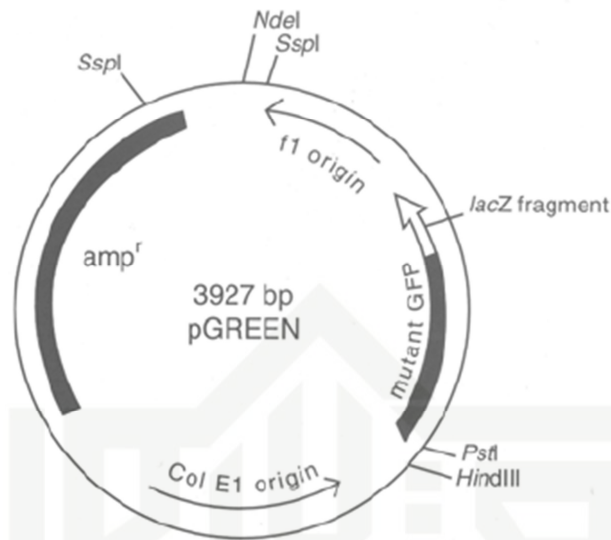
mengekspresikan gen tertentu. Alasan utama penggunaan plasmid adalah karena plasmid memiliki peta restriksi, adanya marker sehingga dapat diketahui gen masuk kedalam sel inang, memiliki *copy number* yang besar dan mudah dimodifikasi (Widyajyantie, 2011). Berdasarkan jumlah plasmid di dalam sel, plasmid dapat dibedakan menjadi dua bagian yaitu, (1) *Low copy number* plasmid, dimana plasmid memiliki kemampuan replikasi rendah sehingga dalam satu sel hanya mengandung satu atau beberapa plasmid yang sama. (2) *High copy number* plasmid, dimana plasmid memiliki kemampuan replikasi tinggi sehingga satu sel mengandung banyak plasmid yang sama hingga ribuan. Keberadaan *green fluorescent protein* didalam sel inang dalam dilihat pada gambar 2.2.



Gambar 2.2. Plasmid di dalam sel bakteri.

Penggunaan plasmid dalam DNA rekombinan dilakukan karena plasmid memiliki tiga bagian yang berperan penting untuk DNA kloning yaitu, *replication origin*, *marker* yang memungkinkan adanya seleksi (biasanya gen resisten antibiotik) dan *region* yang mampu disisipi oleh DNA dari luar. Plasmid hanya memberikan sifat istimewa yang dimiliki oleh bakteri tersebut misalnya resisten terhadap antibiotik. Beberapa karakteristik dari plasmid antara lain, dapat ditransfer ke dalam bakteri lain dan memiliki *ori* (*Origin of Replication*) sehingga mampu mereplikasi diri tanpa pengaturan dari DNA kromosom. Replikasi dimulai dari titik *ori* hingga semua plasmid (Widyajyantie, 2011). Sifat dinamis dari GFP dapat menyatu ke antibodi rantai tunggal yang diajukan terhadap lipo polisakarida dinding sel luar bakteri gram negatif dan satu-satunya gen GFP yang telah dikloning (Tiens, 1998). Peta plasmid *pGREEN* dapat dilihat pada gambar 2.2.

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 UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengemukakan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.



Gambar 2.3. Peta plasmid pGREEN.

Keberhasilan kloning tersebut dilanjutkan dengan aplikasi GFP pada 2 sistem organisme prokariotik dan eukariotik. Organisme prokariotik yang digunakan adalah *E. coli* dengan metode transformasi kejut panas (*heat shock*), sedangkan organisme eukariotik adalah cacing dari filum nematoda yaitu *Caenorhabditis elegans*. Penelitian tersebut diperoleh hasil yang memuaskan yaitu, ekspresi GFP cukup stabil pada kedua sistem tersebut serta pasmid *green fluorescent protein* juga memiliki resistensi terhadap antibiotik ampicillin. *Green fluorescent protein* termasuk ke dalam DNA ekstrakromosomal yang berbeda karakternya dengan DNA kromosomal. DNA ekstrakromosomal seperti plasmid dapat bereplikasi secara autonom dan dapat ditemukan pada sel hidup. Di dalam satu sel, dapat ditemukan lebih dari satu plasmid dengan ukuran yang bervariasi antara 1 sampai 200 kb tetapi pada umumnya lebih kecil dari ukuran bahan genetik utama sel prokariotik (Widyajayantie, 2011).

Bahan genetik utama jasad prokariotik diketahui terikat pada membran sel sebelah dalam diduga berperan dalam proses pemisahan DNA pada waktu terjadi pembelahan sel. Genom jasad prokariotik tersusun atas banyak unit gen. secara umum struktur lengkap gen pada bakteri terdiri atas 3 bagian utama yaitu, promoter, bagian strktural (*coding region*) dan terminator. Promoter adalah bagian gen yang berfungsi sebagai pengatur proses ekspresi genetik (transkripsi) bagian



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 UIN Suska Riau.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin UIN Suska Riau.

struktural. Bagian struktural yang pertama kali yang dikenal oleh RNA polymerase dan protein regulator sebelum proses transkripsi (sintesis RNA) dimulai. Bagian struktural adalah bagian gen yang terletak di sebelah hilir (*downstream*) dari promotor serta membawa kode-kode genetik yang akan ditranskripsi dan kemudian ditranslasi atau hanya ditranskripsi saja. Bagian terminator adalah bagian gen yang terletak di sebelah hilir dari bagian struktural dan berperan dalam proses penghentian transkripsi (Yuwono, 2005).

Ekspresi dari GFP dapat dengan mudah divisualisasikan di bawah sinar ultraviolet atau sinar biru tanpa memerlukan substrat sehingga tidak bersifat toksik terhadap sel hidup dan stabil dalam berbagai varietas tanaman, sehingga aplikasinya telah banyak digunakan untuk memonitoring suatu gen. Sejak adanya laporan pertama yang menyatakan kesesuaian GFP sebagai penanda selektif untuk tanaman berbagai aplikasi GFP terhadap berbagai tanaman telah dilakukan misalnya untuk menghasilkan tanaman transgenik seperti gandum (Jordan, 2000) dan tebu (Elliot *et al.*, 1999).