

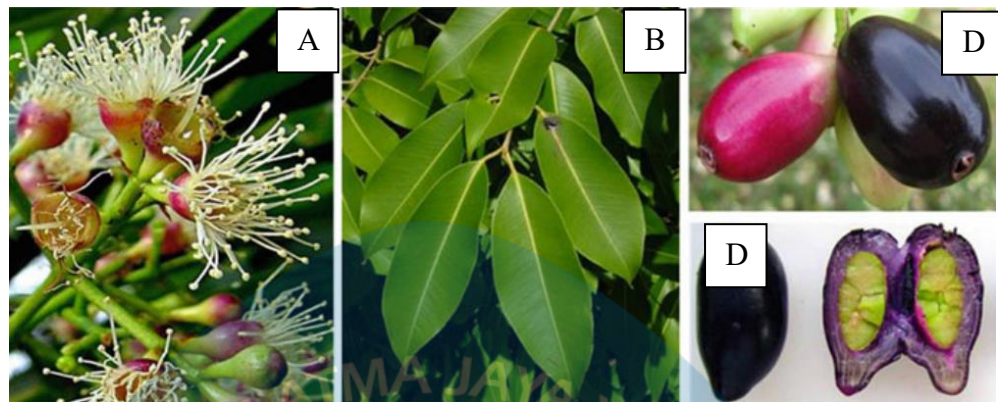
II. TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

A. Tanaman dan Kalus Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.))

Tanaman jamblang dengan nama latin *S. cumini* merupakan tanaman pada famili *Myrtaceae* yang juga dikenal sebagai Jambolan atau *java plum*. Jamblang merupakan tanaman asli subkontingen India mencakup negara India, Pakistan, Bangladesh, Nepal, dan Sri Lanka; semenanjung malay mencakup negara Burma, Malaysia, Singapura dan Thailand; serta Indonesia. Tanaman jamblang merupakan pohon hijau abadi dengan tinggi dapat mencapai 30 m dengan buah lonjong hingga elips berwarna ungu tua hampir hitam (Asif dkk., 2013). *S. cumini* memiliki daun berbentuk elips atau elips-lanset dengan pelepah menonjol diabaksial dan muka berketur di muka adaksial (Malik dkk., 2017). Taksonomi dari tanaman *S. cumini* adalah sebagai berikut (Sambamurty, 2013):

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Myrtales
Famili	: <i>Myrtaceae</i>
Marga	: <i>Syzygium</i>
Spesies	: <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels

Bagian tanaman jamblang banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat. Bagian daun dan bunga dari tanaman jamblang banyak digunakan sebagai obat diuretik. Selain itu pada pengobatan tradisional bagian buah, biji dan daun dari tanaman jamblang digunakan dalam pengobatan diabetes (Asif dkk., 2013). Bagian dari tanaman jamblang dapat dilihat pada Gambar 1.



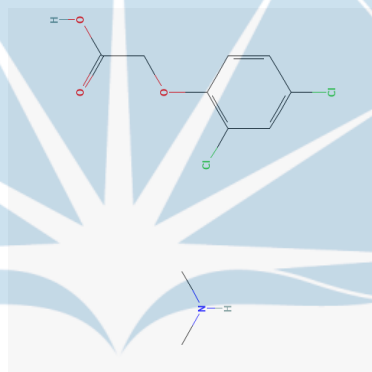
Gambar 1. Bagian Tanaman Jamblang (A) Bunga; (B) Daun; (C) Buah; dan (D) Biji (Malik dkk., 2017).

Bagian tumbuhan jamblang memiliki berbagai metabolit sekunder yang terdiri dari golongan senyawa terpen dan senyawa fenolik yang yang terdiri dari asam fenolik, flavonoid dan tanin. Bagian daun dari jamblang memiliki tingkat flavonoid yang tinggi, terutama senyawa turunan *quercetin* dan *myricetin*, serta senyawa fenol sederhana seperti asam ferulat dan asam galat. Senyawa flavonoid berupa *quercetin* pada tanaman jamblang memiliki efek dalam menurunkan kadar glukosa dalam darah (Malik dkk., 2017).

B. Hormon 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)

Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan zat tambahan yang ditambahkan dalam medium kultur jaringan yang mempengaruhi proses fisiologi tanaman. Zat pengatur tumbuh dapat digunakan dalam menghambat ataupun mendorong suatu proses fisiologi pada tanaman. Penambahan ZPT pada medium kultur memerlukan konsentrasi yang tepat. Penambahan konsentrasi ZPT yang terlalu tinggi atau terlalu rendah dapat menyebabkan perumbuhan terhambat (Mahmudah dkk., 2018)

Hormon *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid* (2,4-D) merupakan zat pengatur tumbuh jenis auksin yang dapat memicu pertumbuhan kalus dari eksplan. Hormon 2,4-D bekerja dengan melepaskan ikatan hidrogen pada dinding sel sehingga terjadi pelonggaran pada dinding sel (Kumianjani dkk., 2016). Hormon 2,4-D meningkatkan permeabilitas sel terhadap air serta meningkatkan tekanan osmotik sehingga terjadi penurunan tekanan pada dinding sel dan meningkatkan sintesis protein (Mahadi dkk., 2016). Struktur kimia dari hormon 2,4-D dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Kimia Hormon 2,4-D (National Center for Biotechnology Information, 2022)

C. Pembentukan Kalus Embrionik sebagai Target Transforman

Kalus embrionik somatik merupakan kalus yang terbentuk dari sel-sel somatik yang memiliki sifat embrionik. Kalus embrionik memiliki ukuran sel yang kecil, inti sel yang besar, sitoplasma padat, vakuola berukuran kecil dan mengandung butiran pati. Sel embrio somatik kemudian mengalami dediferensiasi dan kemudian dilakukan induksi sehingga gen-gen yang bertanggung jawab terhadap sifat totipotensi aktif sehingga memicu terjadinya pembelahan sel yang terkendali. Kalus embrionik somatik kemudian dapat berkembang dan membentuk tumbuhan utuh. (Rusdianto dan Indrianto, 2012).

Kalus embrionik dapat terbentuk dengan melakukan induksi dengan menggunakan hormon auksin. Embrio somatik dapat terbentuk melalui dua jalur yaitu langsung maupun tidak langsung (melewati fase kalus). Kalus embrionik somatik berhasil terbentuk ketika kalus yang dihasilkan memiliki ciri sel yang berukuran kecil, sitoplasma padat, inti besar, vakuola kecil-kecil dan mengandung butir pati (Rusdianto dan Indrianto, 2012).

Kalus yang diinduksi dari daun jambang menggunakan hormon 2,4-D menunjukkan formasi kalus remah hingga kompak. Penggunaan hormon 2,4-D dengan konsentrasi 2.5 mg/L dan 3 mg/L menunjukkan adanya formasi kalus dengan bentuk intermediet dengan ciri memiliki nukleus yang besar, vakuola transparan dengan ukuran yang lebih kecil dari nukleus dan plastid yang transparan. Kalus embrionik yang dihasilkan dari induksi dengan kombinasi hormon 2,4-D 2 mg/L dan BAP 1 mg/L memiliki tekstur kalus yang paling baik dalam pembentukan kalus embrionik serta memiliki waktu pertumbuhan kalus paling cepat (Ummah dkk., 2020).

D. Transformasi Genetik dengan perantara *A. tumefaciens*

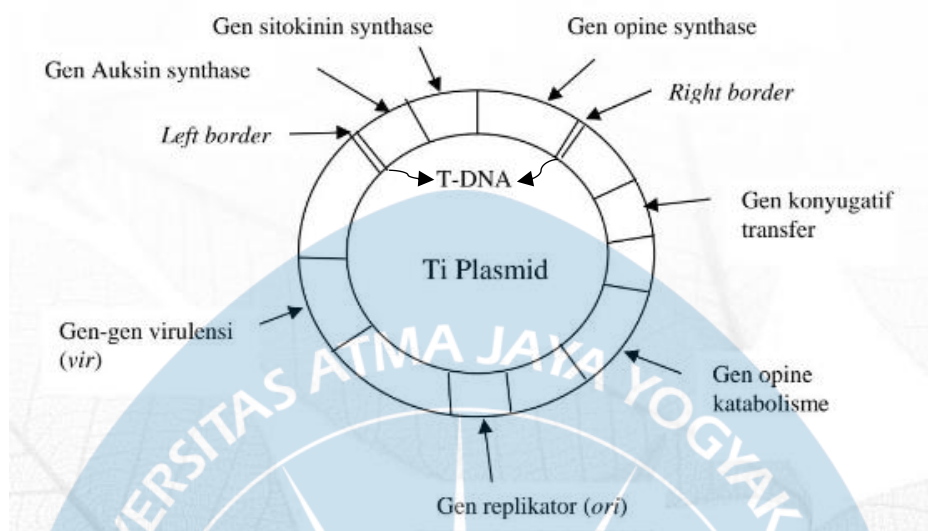
Transformasi genetik merupakan teknik rekayasa genetik yang dilakukan dengan memasukan gen-gen tertentu yang diinginkan ke dalam makhluk hidup yang diinginkan terutama pada tanaman. Transformasi genetik bermanfaat dalam mempelajari sifat genetik dan juga dalam mengetahui fungsi gen (Mulyaningsih dkk., 2017).

Agrobacterium merupakan bakteri gram negatif yang hidup optimum pada suhu 28-30°C, tidak membentuk spora dan dapat menyebabkan infeksi

penyakit pada tanaman. *A. tumefaciens* memiliki sifat patogen dan dapat menyebabkan penyakit tumor (*crown gall*). *A. tumefaciens* umum digunakan sebagai perantara dalam transfer gen (Handayani, 2013).

A. tumefaciens berinteraksi dengan sel tanaman melalui fenomena transfer T-DNA dari *Agrobacterium wild type* ke dalam inti sel tanaman. Bagian dari molekul DNAnyang yang disebut T-DNA terintegrasi pada DNA kromosom tanaman ketika *Agrobacterium* menginfeksi tanaman. Penggunaan *A. tumefaciens* dalam transformasi gen memiliki keuntungan antara lain relatif lebih murah, jumlah salinan gen sedikit dan teknik pengulangan percobaan memberikan hasil serupa (Handayani, 2013).

Transformasi genetik memiliki prinsip yaitu memanfaatkan kemampuan bagian Ti-plasmid yang dapat ditransfer keluar dari sel. Bagian Ti-plasmid yang ditransfer ialah bagian T-DNA yang terintegrasi ke dalam genom inang. Ti-plasmid memiliki gen virulensi yang berfungsi dalam mentransfer T-DNA ke dalam sel inang (Poerwanto, 2011). Tahapan transformasi gen ke dalam sel tanaman ke *A. tumefaciens* adalah pembentukan kolonisasi bakteri pada sel tanaman yang terluka, terjadi induksi sistem virulensi oleh gen vir pada Ti-plasmid, kompleks T-DNA yang ditransfer terbentuk, transfer T-DNA dan T-DNA terintegrasi ke genom sel tanaman (Mursyanti, 2017). Peta Ti plasmid dapat dilihat pada Gambar 3.

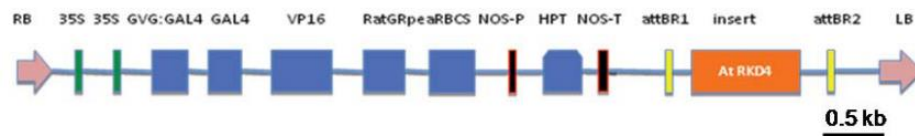


Gambar 3. Peta Ti Plasmid pada bakteri *A. tumefaciens* (Poerwanto, 2011)

E. Gen target *AtRKD4* dan Gen penanda *HPT*

AtRKD4 merupakan gen yang berfungsi dalam menginduksi pembentukan embrio somatik. *AtRKD4* mengkode sekuens yang menghasilkan protein dengan motif RWP-RK yang terdiri dari asam amino arginin (R), triptofan (W), prolin (P), arginin (R) dan lisin (K) (Zulwanis dkk., 2020). *AtRKD4* memiliki panjang 380 bp. Ekspresi *AtRKD4* secara singkat dapat menginduksi *RKD4* untuk memicu terjadinya perkembangan awal embrio (Mursyanti, 2017)

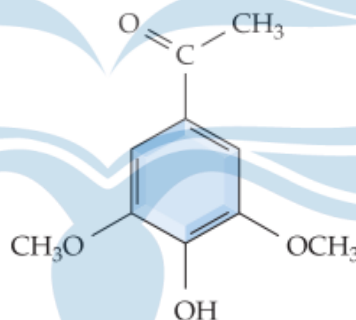
HPT (*Hygromycin phosphotransferase*) merupakan gen yang menyebabkan resistensi terhadap higromisin. Ekspresi *HPT* dimanfaatkan dalam sistem antibiotik selektif yang digunakan sebagai gen penanda pada *AtRKD4* (Mursyanti dkk., 2015). Struktur dari *AtRKD4* dalam plasmid pTA7002/EHA 105 dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. T-DNA pembawa 35S::GAL4::*AtRKD4*::GR dalam pTA7002/EHA 105 (Mursyanti dkk., 2015)

F. Asetosiringon dan *Optical Density*

Asetosiringon merupakan senyawa fenolik yang disekresikan oleh tanaman yang mengalami perlukaan. Asetosiringon berperan dalam menginduksi gen virulensi yang dibawa oleh TI-plasmid. Penambahan senyawa asetosiringon dalam proses transformasi genetik dengan perantara *A. tumefaciens* dapat meningkatkan efektifitas transformasi (Rashid dkk., 2010). Struktur kimia dari senyawa asetosiringon dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur molekul asetosiringon (Glick dkk., 2010).

Asetosiringon ditambahkan dalam media kokultivasi untuk menginduksi gen *vir* pada *Agrobacterium* sehingga T-DNA dapat berpindah ke dalam tanaman target. Penambahan asetosiringon dengan konsentrasi atau kadar yang tepat dapat meningkatkan efisiensi transformasi. Konsentrasi asetosiringon yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terjadinya nekrosis pada jaringan tanaman target sehingga efisiensi transformasi juga dapat menurun

(Sisharmini dkk., 2019). Transformasi gen *AtRKD4* pada *Phalaenopsis* “Sogo Vivien” telah berhasil dilakukan dengan konsentrasi asetosiringon sebesar 25 mg/L (Mursyanti dkk., 2015).

Optical density atau densitas optik (OD) memiliki keterkaitan terhadap kerapatan pertumbuhan bakteri (Glick dkk., 2010). OD dapat diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang tertentu untuk mendapatkan nilai absorbansi larutan (Seniati dkk., 2019). *Optical density* dari kultur *A. tumefaciens* diukur dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai densitas kultur *A. tumefaciens* yang terlalu kecil dapat menyebabkan tidak terjadinya transformasi genetik, sedangkan nilai densitas kultur *A. tumefaciens* yang terlalu besar dapat menyebabkan kematian eksplan (Rashid dkk., 2010). Nilai OD₆₀₀ yang efektif dalam meningkatkan efektifitas transformasi genetik adalah 0,3 (Jyothishwaran dkk., 2007).

G. Amplifikasi dengan Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik molekuler yang digunakan untuk menggand potongan DNA dengan cepat hingga berjuta kali lipat, yang disertai dengan penggunaan enzim dan sepasang primer yang bersifat spesifik terhadap DNA target (Joko dkk., 2011). Teknik PCR memiliki prinsip, memperbanyak bagian DNA spesifik dengan enzim DNA polimerase yang diinisiasi oleh pelekatan primer yang kemudian di hubungkan dengan dNTP (deoksiribonukleotida trifosfat) dalam reaksi termal (Yustinadewi dkk., 2018). Metode PCR memiliki kelebihan yaitu dapat digunakan secara luas dalam diagnosis berbasis molekuler, sifat target spesifik karena hanya memiliki

hanya satu pasang primer *forward* dan *reverse* untuk menempel pada gen target. Metode PCR memiliki kekurangan yaitu preparasi sampel dari PCR rumit, reagen yang digunakan cukup mahal, memerlukan mesin pengatur suhu dan hasil PCR tidak dapat dilihat secara langsung karena harus diproses kembali dengan elektroforesis (Nurwidayati, 2016).

Proses PCR terdiri dari beberapa siklus berulang antara lain, tahapan denaturasi, pemisahan untai DNA pada temperatur tinggi (90- 97 °C) yang biasanya mencapai titik optimum pada suhu 95°C selama 30 detik; tahapan *annealing*, terjadi penempelan primer pada pita DNA target pada suhu 55-60°C selama 30 detik; serta tahapan ekstensi oleh DNA polimerase dengan suhu 72°C dan dengan lama waktu yang disesuaikan dengan ukuran DNA target, biasanya 2-3 menit (Feranisa, 2016). Primer merupakan oligonukleotida sintesis yang terdiri dari 12 hingga 20 basa, yang memiliki urutan sekuens yang berbeda-beda dan komplementer dengan yang berlawanan dengan cet DNA. Primer berfungsi sebagai prekursor sintesis DNA dari cet DNA (Yustinadewi dkk., 2018). Terdapat 2 jenis primer yaitu *forward* primer dan *reverse* primer, *forward* primer adalah primer dengan orientasi kedepan atau, sintesis dimulai dari arah 5' ke 3' sedangkan *reverse* primer merupakan primer dengan urutan DNA pendek yang berfungsi untuk mensintesis untai komplementer dan berorientasi kebelakang atau arah 3' ke 5' (Sasmito dkk., 2014).

H. Elektroforesis

Elektroforesis DNA merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan sampel DNA berdasarkan ukuran berat molekul. Elektroforesis

bekerja dengan prinsip molekul DNA bermuatan negatif didalam medan listrik melakukan migrasi melalui matriks gel menuju kutub positif (Artati, 2016). Keberhasilan proses elektroforesis dipengaruhi oleh ukuran molekul DNA, konsentrasi gel, konformasi DNA, voltase, keberadaan pewarna DNA dan komposisi *buffer* elektroforesis (Fahlevi dkk., 2017). Waktu elektroforesis memiliki pengaruh terhadap laju dan jauh migrasi dari sampel, namun tidak menunjukkan pengaruh terhadap pembentukan pita DNA (Yahya dkk., 2016).

Gel documentation system merupakan suatu alat atau sistem yang digunakan dalam visualisasi pita-pita DNA pada elektroforesis. Gel doc bekerja dengan memancarkan sinar UV yang memedarkan pewarna yang menempel pada DNA sehingga visualisasi pada DNA dapat terlihat (Carsono dkk., 2014). *trnL* merupakan bagian dari genom kloroplas tanaman yang tidak mengkode protein fungsional (Roslim dan Herman, 2017).

I. Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka dan tujuan penelitian maka didapatkan beberapa hipotesis sebagai berikut,

1. Morfologi kalus embrionik daun jambang berupa kalus kompak dengan warna hijau terang sebagai target transformasi.
2. Nilai OD_{600} kultur bakteri *A. tumefaciens* yang menghasilkan frekuensi transformasi *AtRKD4* tertinggi adalah nilai OD_{600} 0,6.
3. Konsentrasi asetosiringon yang menghasilkan frekuensi transformasi *AtRKD4* tertinggi adalah 25 mg/L.