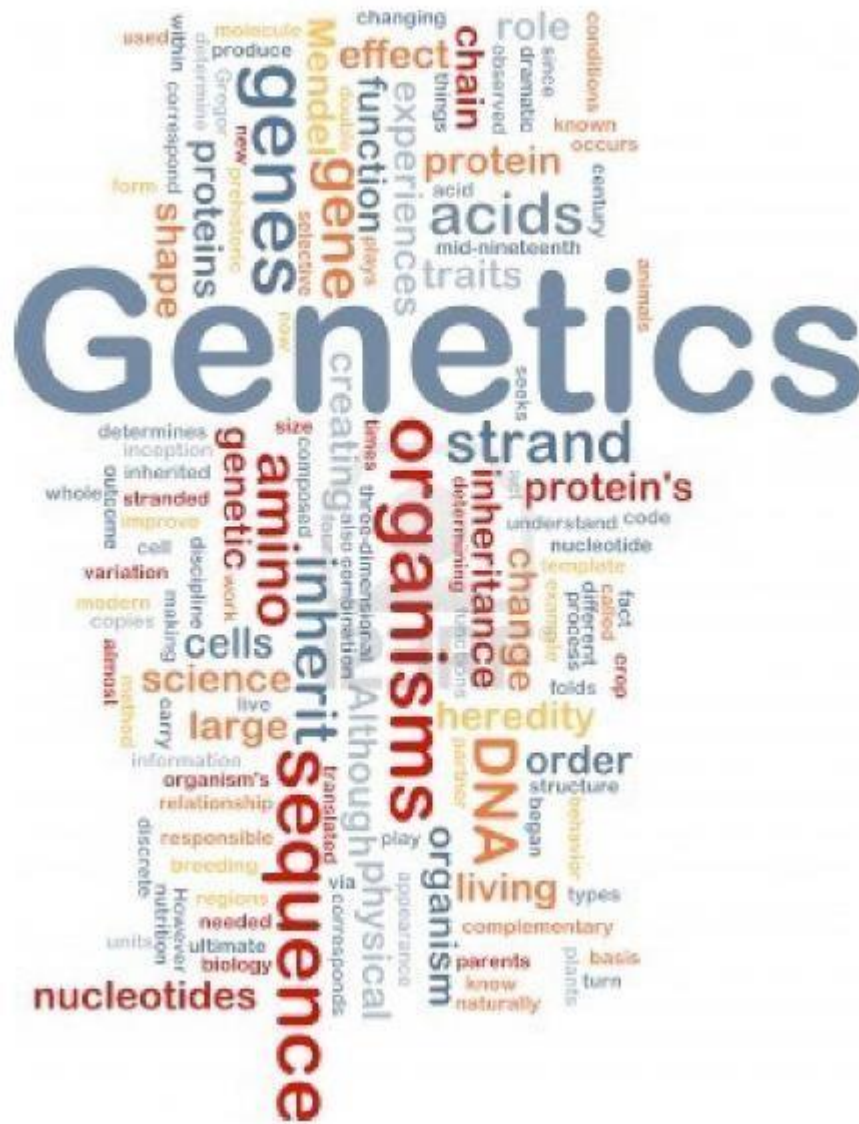


PANDUAN PRAKTIKUM DASAR-DASAR GENETIKA



LABORATORIUM PEMULIAAN TANAMAN DAN GENETIKA
JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA

Tata Tertib Praktikum

- 1. Praktikan wajib hadir 10 menit sebelum acara dimulai**
- 2. Mengenakan pakaian sopan, berkerah dan bersepatu, PDL diperbolehkan asal dikancing**
- 3. Kartu praktikum sebagai SYARAT MASUK LABORATORIUM**
- 4. Minggu ke-1 harap membawa foto berwarna 3x4 untuk kartu praktikum**
- 5. Inhal diperbolehkan hanya sekali dengan alasan yang logis dan disertai surat keterangan dan diurus maksimal 1 hari sebelum pelaksanaan inhal.**
- 6. Nilai pre-test di bawah 60, nilai laporan akan dipotong 5% akumulasi dari acara yang mendapat nilai di bawah 60.**
- 7. Bagi praktikan yang melakukan kecurangan saat mengerjakan soal didiskon 100%.**
- 8. Keterlambatan lebih dari 15 menit tidak diperbolehkan memasuki lab (inhal ke gol lain)**
- 9. Setiap praktikan wajib membawa ringkasan yang berisi penjelasan dari poin kisi-kisi (lengkap dengan sitasi dan referensi) yang diberikan pada minggu sebelumnya, untuk bahan referensi saat pembuatan laporan.**
- 10. Praktikan diwajibkan membuat laporan untuk setiap acara praktikum pada buku kerja secara individual yang langsung dikumpulkan pada akhir praktikum, kecuali acara Persilangan Jagung.**
- 11. Laporan acara praktikum Persilangan Jagung dikumpulkan satu minggu setelah pengamatan terakhir beserta video persilangan.**
- 12. Sesudah melakukan acara praktikum, praktikan diwajibkan membersihkan dan mengembalikan alat-alat yang dipakai pada tempatnya.**
- 13. Praktikan yang menghilangkan atau merusakkan alat diwajibkan mengganti dengan barang yang sama.**
- 14. Responsi akan diselenggarakan satu minggu setelah berakhirnya seluruh acara praktikum.**
- 15. Nilai akhir praktikum adalah kombinasi proporsional dari nilai pre-test, laporan, dan responsi.**
- 16. Hal-hal yang belum tercantum dalam tata tertib ini akan diatur kemudian.**

Proporsi Penilaian Laporan	Nilai Akhir Praktikum
Hasil Pengamatan : 30	Responsi 40 %
Pembahasan : 50	Pre test 25%
Kesimpulan : 15	Laporan 25 %
Daftar Pustaka : 5	Keaktifan 10 %

Jadwal Pelaksanaan Praktikum

Acara	Golongan A	Golongan B
Mitosis dan Siklus Sel	22-26 Agustus 2016	10-14 Oktober 2016
Simulasi Hukum Mendel	29 Agustus 2016 – 2 September 2016	17-21 Oktober 2016
Analisis Pedigree	5-9 September 2016	24-28 Oktober 2016
Pemetaan Gen	12-16 September 2016	31 Oktober 2016 – 4 November 2016
Persilangan Jagung	Mandiri	Mandiri
Ekstraksi DNA	19-23 September 2016	7-11 November 2016

Acara I

Mitosis dan Siklus Sel

Tujuan:

1. Mengamati fase pembelahan mitosis pada tanaman.
2. Mempelajari siklus sel.
3. Mempelajari struktur, bentuk kromosom, dan menghitung jumlah kromosom pada suatu jenis tanaman.

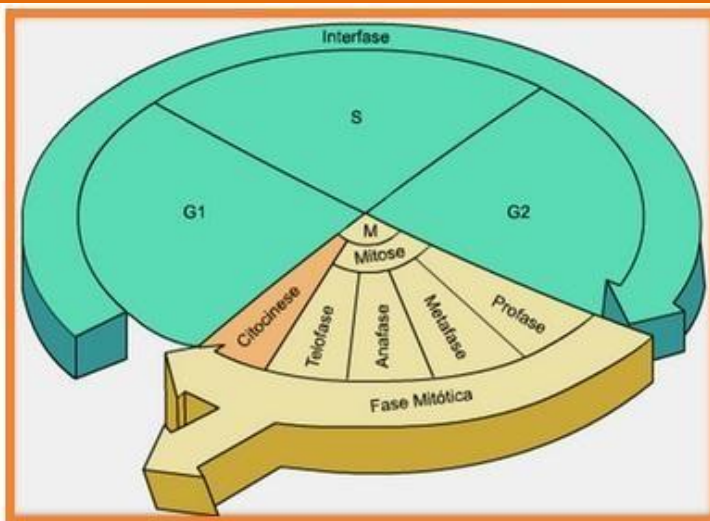
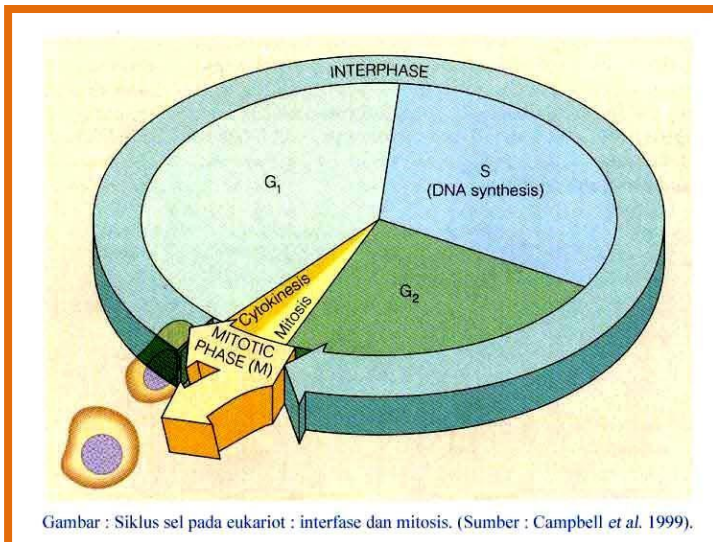
Kata Kunci:

Walther Flemming; mitosis; meiosis; gametogenesis; *Allium cepa*; siklus sel; jumlah, bentuk, dan bagian kromosom; embryo sac mother cell, EMC; pollen mother cell, PMC

Latar Belakang

Kromosom memiliki peranan yang sangat penting bagi keberlangsungan suatu makhluk hidup, karena kromosom merupakan alat pengangkutan bagi gen – gen yang akan dipindahkan dari suatu sel induk ke sel anaknya, dari generasi yang satu ke generasi yang lainnya. Pengamatan terhadap perilaku kromosom sama pentingnya dengan mempelajari struktur kromosom. Perilaku atau aktivitas kromosom dapat terlihat dalam siklus sel, termasuk didalamnya adalah pembelahan sel (mitosis atau meiosis). Mitosis merupakan dasar dalam pembiakan vegetatif tanaman, sedangkan meiosis merupakan dasar munculnya keragaman. Oleh karena itu, penting bagi para pemulia untuk mempelajari pembelahan sel baik mitosis maupun meiosis, agar dapat mendukung program pemuliaan tanaman.

Mitosis adalah pembelahan inti yang berhubungan dengan pembelahan sel somatik, dimana terdapat beberapa tahap didalamnya, yaitu: interfase, profase, metafase, anafase, dan telofase (Satosumarjo, 2006). Pada praktikum ini, digunakan ujung akar bawang merah (*Allium cepa*). Bawang merah sangat menolong dalam mempelajari analisis mitosis karena memiliki kromosom yang besar, jumlah kromosom yang tidak terlalu banyak, mudah didapatkan, dan mudah dilakukan (Stack, 1979).



Berikut ini adalah tahapan siklus sel (Ritonga dan Wulansari, 2011):

A. Interfase

Interfase atau stadium istirahat dalam siklus sel termasuk fase yang berlangsung lama karena pada tahap ini berlangsung fungsi metabolisme dan pembentukan dan sintesis DNA. Interfase dibedakan lagi menjadi tiga fase, yaitu:

1. Fase gap satu (G1)

Pada fase ini terjadi beberapa kegiatan yang mendukung tahap – tahap berikutnya, yaitu:

- a. Transkripsi RNA
- b. Sintesis protein yang bermanfaat untuk memacu pembelahan nukleus
- c. Enzim yang diperlukan untuk replikasi DNA
- d. Tubulin dan protein yang akan membentuk benang spindel

Periode untuk fase G1 membutuhkan waktu yang berbeda – beda antar individu.

2. Fase Sintesis (S)

Pada fase ini terjadi replikasi DNA dan replikasi kromosom, sehingga pada akhir dari fase ini terbentuk sister chromatids yang memiliki sentromer bersama.

3. Fase Gap dua (G2)

Pada fase ini terjadi sintesis protein – protein yang dibutuhkan pada fase mitosis, seperti sub unit benang gelendong, pertumbuhan organel – organel dan makromolekul lainnya (mitokondria, plastid, ribosom, plastid, dan lain – lain).

B. Metafase

Pada fase ini, setiap individu kromosom yang telah menjadi dua kromatid bergerak menuju bidang equator. Benang – benang gelendong melekat pada sentromer setiap kromosom. Terjadi kondensasi dan penebalan yang maksimal pada fase ini. Sehingga kromosom terlihat lebih pendek dan tebal dibandingkan pada fase lainnya. Selain itu, kromosom juga terlihat sejajar di tengah – tengah equator.

C. Anafase

Fase ini dimulai ketika setiap pasang kromatid dari tiap – tiap pasang kromosom berpisah, masing – masing kromatid bergerak menuju ke kutub yang berlawanan. Pemisahan ini dimulai dari membelahnya sentromer. Sentromer yang telah membelah kemudian ditarik oleh benang gelendong ke kutub yang berlawanan bersama dengan kromatidnya.

D. Telofase

Pada fase ini, membran nukleus terbentuk kembali, kromosom mulai mengendur dan nukleolus terlihat kembali. Sel membelah menjadi dua yang diikuti oleh terbentuknya dinding sel baru yang berasal dari bahan dinding sel yang lama, retikulum endoplasma, atau bahan baru yang lainnya. Pembelahan ini juga membagi sitoplasma menjadi dua. Pada akhir dari fase ini, terbentuk dua sel anakan yang identik dan memiliki jumlah kromosom yang sama dengan tetuanya.

Percobaan 1. Pengamatan Fase Mitosis A.

Bahan dan alat:

1. Ujung akar bawang merah (*Allium cepa* L.)
2. Larutan fiksatif Carnoy
3. Zat pewarna (aceto orceolin atau aceto carmine)
4. Mikroskop binokular
5. Deglass, object glass, tusuk gigi, silet, dan bunsen

kerja:

1. Fiksasi
 - a. *Allium cepa* ditumbuhkan dalam media air selama 3–4 hari.
 - b. Akar yang muncul dipotong ujungnya sepanjang + 3 mm.
 - c. Pemotongan ujung akar dilakukan pada pagi hari (pukul 09.00–10.00) saat sel sedang giat membelah.

- d.** Potongan ujung akar dimasukkan ke dalam larutan fiksatif Carnoy (campuran alkohol absolut dengan asam asetat glasial sebesar 3:1).
- e.** Lamanya fiksasi untuk ujung akar, kuncup daun, kuncup bunga, EMC, dan PMC memerlukan waktu 15–20 menit, sedang pada tanaman keras waktunya lebih lama.

2. Pengecetan kromosom

- a.** Aceto carmine (Belling): 0,5 g carmine dilarutkan dalam 45% asam asetat glasial (45 cc asam asetat glasial + 55 cc aquadest).
- b.** Aceto orceolin (La Cour): 1,0 g orceolin dilarutkan dalam 45% asam asetat glasial.

Pengecetan dilakukan dengan cara:

- Potongan ujung akar yang telah difiksasi direndam ke dalam pewarna aceto carmine 0,5%.
- Larutan dipanaskan di atas bunsen agar pewarna segera meresap dalam jaringan ujung akar.
- Hentikan pemanasan bila larutan sudah mulai mendidih dan potongan ujung akar mulai terlihat bergerak.

3. Pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan menggunakan metode squeeze.

- a.** Preparat ujung akar diambil menggunakan pinset kemudian diletakkan di atas object glass.
- b.** Potong preparat sebesar + 1 mm dari ujung, lalu ditutup dengan deglass.
- c.** Deglass ditekan menggunakan jarum preparat/ujung jari hingga preparat menjadi satu lapisan sel.
- d.** Amati preparat di bawah mikroskop diawali dengan perbesaran lemah sampai perbesaran kuat.
- e.** Amati semua fase pembelahan, fase pembelahan dini dapat diamati pada sel di bagian ujung, sedang fase pembelahan yang lebih lanjut diamati pada sel-sel di bagian pangkal.

Percobaan 2. Pengamatan Bentuk dan Jumlah Kromosom A. Cara kerja:

- 1.** Amati bentuk kromosom dan coba dihitung jumlahnya.
- 2.** Ambil gambar preparat dengan menggunakan OptiLab.

Daftar Pustaka

Campbell. 1999. Biologi Jilid 1 Edisi Kelima. Erlangga, Jakarta.

Ritonga, A. W. dan A. Wulansari. 2011. Analisis Mitosis. Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Departemen AGH, FAPERTA, IPB, Bogor.

Sastrosumarjo, S. 2006. Panduan laboratorium, hal. 38 - 63. dalam S. Sastrosumarjo (Ed.) Sitogenetika Tanaman. IPB Press, Bogor.

Stack S. M., and D. E. Comings. 1979. The cromosomes and DNA of *Allium cepa*. Chromosoma 70: 161–181.

Acara II

Simulasi Hukum Mendel

Tujuan :

1. Memahami segregasi Mendel
2. Melakukan simulasi persilangan monohibrid dan dihibrid untuk membuktikan hukum segregasi Mendel
3. Menghitung perbandingan dua warna bulir jagung sebagai tanaman model untuk persilangan monohibrid

Gregor Mendel (1822-1884) merupakan orang pertama yang mengadakan percobaan perkawinan silang. Percobaan-percobaannya dengan tanaman ercis (*Pisum sativum*) telah meletakkan dasar untuk ilmu Genetika (Suryo, 2005). Dari percobaannya lahirlah Hukum Mendel I dan Hukum Mendel II.

Tanaman jagung termasuk dalam kelompok tanaman berpenyerbukan silang. Dengan demikian, tingkat keragaman jagung menjadi tinggi, apalagi jika tersedia dalam populasi yang heterogen. Tingginya tingkat heterozigositas populasi maka komposisi genetik hasil persilanganpun menjadi sangat beragam. Komposisi genetik populasi jagung hasil persilangan dapat diketahui dengan memanfaatkan informasi genetik dari gen-gen pengendali warna bulir untuk memprediksi komposisi harapan pada generasi hasil persilangannya (Pamandungan, et.al). Pewarisan informasi genetik dapat dipelajari lewat Hukum Mendel yang menyatakan bahwa alel akan memisah (segregasi) satu dengan yang lainnya selama pembentukan gamet dan diwariskan secara rambang ke dalam gamet-gamet dengan jumlah yang sama.

Bahan dan alat :

- Empat macam warna kancing masing-masing 200 buah dengan ukuran yang sama
- Empat buah kantung plastik
- Lima tongkol jagung

Cara kerja :

Untuk persilangan monohibrid

1. Disiapkan dua kantung plastik
2. Isilah masing-masing plastik dengan dua warna kancing yang terdiri dari kancing X dan kancing Y, jumlah kancing Y sama dengan kancing X.
3. Ambil satu buah kancing secara acak dari masing-masing kantung.
4. Catat hasil yang didapat, kemudian kembalikan kancing ke kantung plastik
5. Kocok kantung plastik setiap selesai mengambil satu kancing
6. Lakukan pengambilan sebanyak kriteria yang saudara peroleh (80, 100, 120)
7. Uji seluruh data dengan menggunakan chi-square
8. Jelaskan dan simpulkan simulasi yang telah dilakukan

Percobaan 1. Uji Hukum Mendel melalui simulasi monohybrid dengan rasio F₂ 3:1

Tabel 1. Analisis persilangan monohybrid, rasio fenotipe F₂ (3:1) untuk 80/100/120 kali pengambilan

Kelas	Observed (O)	Expected (E)	(O-E) ²	(O-E) ² /E
AA ; Aa		60		
Aa		20		
Total		80		

Ket : Kancing x untuk alel A, kancing Y untuk alel a.

Hitung
$$X^2 = \sum \left\{ \frac{(O-E)^2}{E} \right\}$$

 $X^2_{\text{tabel}} (0,05 ; 1) = 3,841$

Penarikan kesimpulan : $X^2_{\text{hitung}} > X^2_{\text{tabel}}$, maka rasio yang diperoleh menyimpang dari Hukum Mendel.

Percobaan 2. Uji Hukum Mendel melalui simulasi monohybrid dengan rasio F₂ 1: 2 : 1

Tabel 2. Analisis persilangan monohybrid, rasio fenotipe F₂ (1 : 2 : 1) untuk 80/100/120 kali pengambilan

Kelas	Observed (O)	Expected (E)	(O-E) ²	(O-E) ² /E
AA		20		
Aa		40		
Aa		20		
Total		80		

Ket : Kancing x untuk alel A, kancing Y untuk alel a.

Hitung
$$X^2 = \sum \left\{ \frac{(O-E)^2}{E} \right\}$$

 $X^2_{\text{tabel}} (0,05 ; 2) = 5,991$

Penarikan kesimpulan : $X^2_{\text{hitung}} > X^2_{\text{tabel}}$, maka rasio yang diperoleh menyimpang dari Hukum Mendel.

Percobaan 3. Uji Hukum Mendel melalui simulasi dihybrid dengan rasio F₂ 9:3:3:1

Untuk persilangan dihibrid

1. Digunakan empat kantung dan empat macam warna kancing. Dua kantung masing-masing berisi kancing X dan Y. Dua kantung lagi berisi kancing P dan Q.

2. Lakukan pengamilan sebanyak 80 atau 100 kali sesuai kriteria yang Saudara peroleh
3. Uji seluruh data dengan menggunakan chi-square
4. Jelaskan dan simpulkan simulasi yang telah dilakukan

Tabel 3. Analisis persilangan dihybrid, rasio fenotipe F₂ (9:3:3:1) untuk 80/100/120 kali pengambilan

Kelas	Observed (O)	Expected (E)	(O-E) ²	(O-E) ² /E
A_B_		45		
A_bb		15		
aaB_		15		
aabb		5		
Total		80		

Ket : Kancing x untuk alel A, kancing Y untuk alel a.
Kancing P untuk alel B, kancing Q untuk alel b.

Hitung
$$X^2 = \sum \left\{ \frac{(O-E)^2}{E} \right\}$$

 $X^2_{\text{tabel}} (0,05 ; 3) = 7,815$

Penarikan kesimpulan : $X^2_{\text{hitung}} > X^2_{\text{tabel}}$, maka rasio yang diperoleh menyimpang dari Hukum Mendel.

Percobaan 4. Pengamatan Bulir Jagung sebagai Tanaman Model Persilangan Monohibrida

Untuk pengamatan bulir jagung

1. Setiap kelompok akan menerima lima tongkol jagung
2. Hitung warna bulir ungu dan kuning pada masing-masing tongkol tersebut □ Isilah tabel pada lembar kerja untuk uji chi-square.
3. Jelaskan dan simpulkan hasil yang didapat.

Daftar Pustaka

Pamandungan, Y., A. Purwantoro, P. Basunanda. 2012. Prediksi genotipe tetua jagung berbulir ungu berdasarkan kesesuaian nisbah harapan pada bulir S1 dan S2. Eugenia 18 (3):221—229.

Suryo. 2005. Genetika. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.

ACARA III ANALISIS PETA SILSILAH (PEDIGREE)

Tujuan :

1. Mempelajari tindak gen dari suatu sifat manusia berdasarkan silsilah.

Dasar Teori :

Mempelajari pola pewarisan sifat pada manusia terutama tentang penyakit menurun mempunyai kendala tersendiri salah satunya karena tidak dapat dilakukan percobaan-percobaan dengan manusia. Untuk mempelajari pola pewarisan sifat terutama kelainan dan penyakit bawaan sering kali dilakukan dengan cara analisis peta silsilah (pedigree). Peta silsilah ini diharapkan mampu memberikan gambaran dan jawaban terhadap sejumlah persoalan yang diakibatkan oleh kelainan atau penyakit menurun. Dalam analisis peta silsilah, terdapat simbol-simbol silsilah keluarga, seperti:

	Male	Female	Sex unknown or unspecified
Unaffected person	□	○	◇
Person affected with trait	■	●	◆
Obligate carrier (carries the gene but does not have the trait)	◻	◉	◊
Asymptomatic carrier (unaffected at this time but may later exhibit trait)	◻	◉	◊
Multiple persons (5)	◻	○	◇
Deceased person	◻	○	◇
Proband (first affected family member coming to attention of geneticist)	■	●	◆
Family history of person unknown	◻	○	◇

Seperti diketahui kromosom ada dua jenis yaitu AUTOSOM dan GONOSOM, jadi penyakit genetik pada manusia juga ada dua sebab yaitu :

I. Penyakit Menurun Autosom

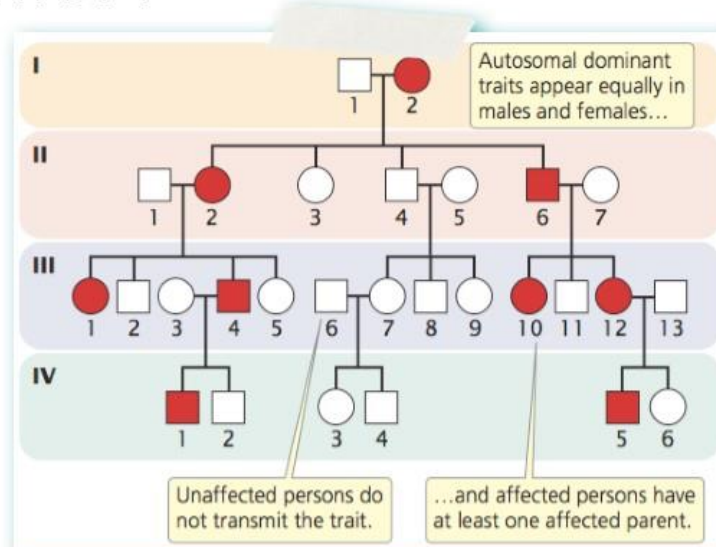
Kelainan autosom dibagi lagi menjadi dua jenis yaitu :

A. Autosomal Dominan

Dalam ilmu genetika, dominan adalah pengaruh dari gen tertentu terhadap penampilan atau disebut fenotipe suatu organisme. Autosomal dominan ditemukan oleh Gregor Mendel yang memperkenalkan huruf besar (mis : A) untuk alele dominan dan huruf kecil (mis : a) untuk alele resesif. Penyakit menurun yang disebabkan oleh kelainan autosomal dominan tidak memperhatikan jenis kelamin. Penyakit tersebut akan terekspresikan setiap generasi oleh seseorang yang terdapat alel dominan (AA / Aa).

Berikut bagan penyakit autosomal dominan :

Autosomal dominan



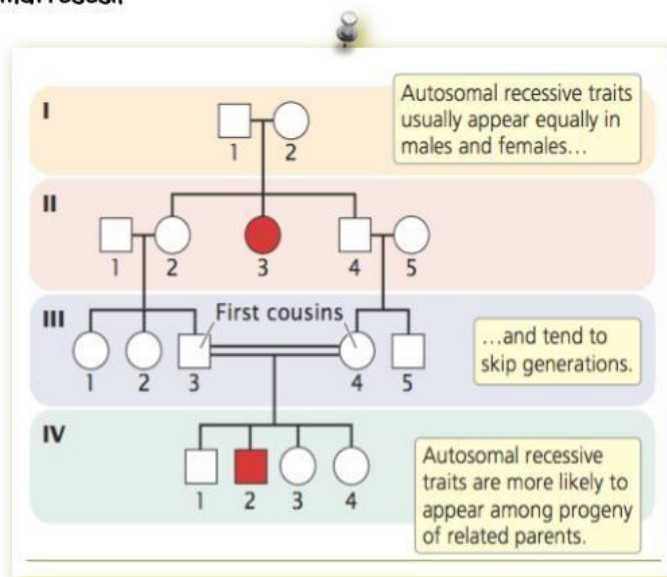
Contoh penyakit genetik oleh autosomal dominan : Thalasemia.

B. Autosomal Resesif

Penyakit menurun yang disebabkan oleh autosomal resesif tidak memperhatikan jenis kelamin. Penyakit tersebut tidak disetiap generasi terekspresi karena hanya seseorang yang terdapat alel resesif (aa) saja yang terkena penyakit tersebut.

Berikut bagan penyakit autosomal resesif :

Autosomal resesif



Contoh penyakit genetik autosomal resesif : Sickel cell anemia

II. Penyakit Menurun Gonosom

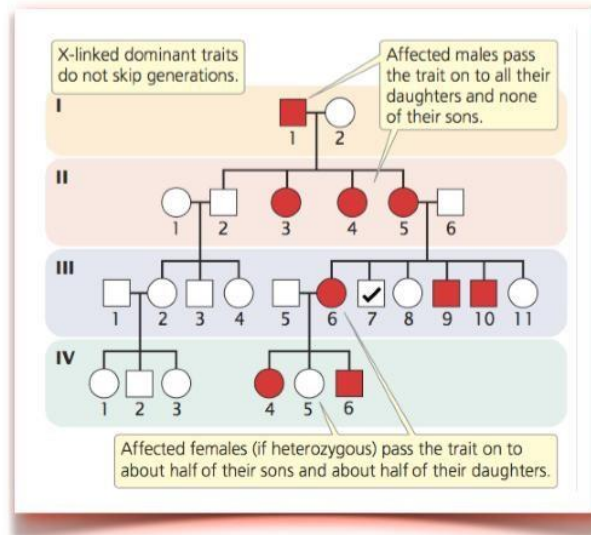
Penyakit genetik yang diturunkan melalui gonosom dibagi lagi menjadi tiga jenis yaitu :

a. X-linked dominan

Kelainan kromosom X dapat bersifat dominan (X^H) maupun resesif (X^h) yang disebabkan oleh mutasi genetik pada kromosom X. Kromosom X membawa gen pasangan basa yang berjumlah ribuan, tetapi kromosom X ini tidak mencari terhadap jenis kelamin, karena baik pria maupun wanita mempunyai kromosom ini. Penyakit genetik yang tertaut oleh kromosom X dan bersifat dominan (X^H), maka anak laki laki maupun perempuan akan terkena penyakit genetik tertentu.

Berikut bagan penyakit X-linked dominan :

X-linked dominan



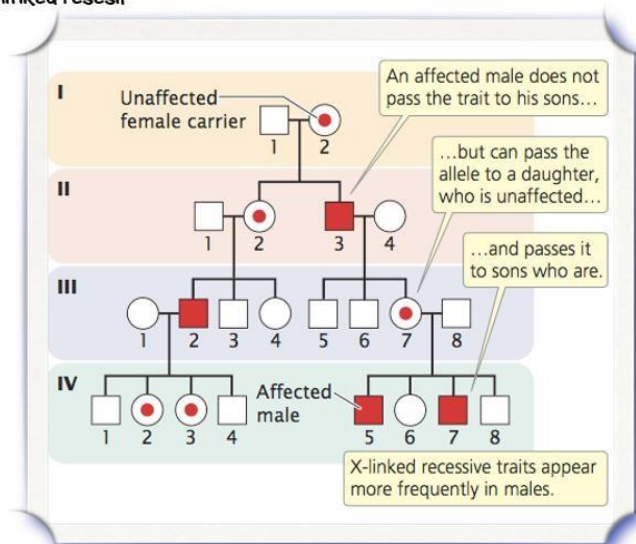
Contoh penyakit genetik X-link dominan: hypophosphatemia

b. X-linked resesif

Penyakit genetik yang tertaut oleh kromosom X dan bersifat resesif (X^h), maka anak laki laki (XY) akan terkena penyakit genetik tertentu karena kromosom X hanya satu, namun anak perempuan (XX) belum tentu terkena penyakit genetik tertentu karena gen yang tertaut kromosom X dan bersifat resesif akan tertutupi.

Berikut bagan penyakit X-linked resesif :

X-linked resesif

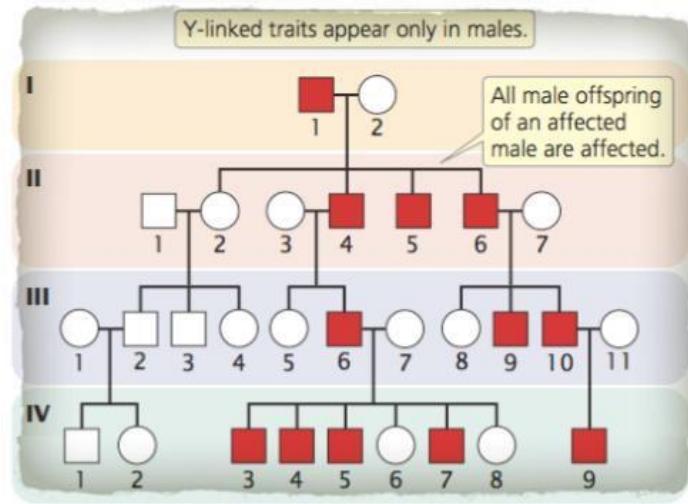


Contoh penyakit genetik X-link resesif: Hemophilia

c. Y-linked

Kelainan kromosom Y hanya anak laki yang menderita karena anak perempuan tidak mempunyai kromosom Y. Kelainan kromosom Y yang sering dijumpai adalah pada individu masih mempunyai kromosom Y tapi tidak berfungsi sehingga individu tersebut berpenampilan seperti wanita (female phenotype), waktu lahir anak tersebut alat kelaminnya seperti wanita. Berikut bagan penyakit Y-linked :

Y-linked



Contoh penyakit genetik Y-linked : Hypertrichosis

Cara Kerja :

1. Tentukan macam gen yang muncul dalam setiap pelemparan koin, misalnya koin seratus rupiah : kakak tua = A, garuda = a (tergantung kesepakatan)
2. Lengkapi genotipe keturunan pada diagram dengan cara melempar koin untuk mengetahui macam gen yang diwariskan oleh tetua heterozygot
3. Pelemparan koin tidak perlu dilakukan bila kedua tetua homozigot karena gen yang diwariskan sudah jelas. Misal : tetua suatu individu adalah AA dan aa, maka keturunannya akan seluruhnya Aa sehingga tidak perlu diundi.
4. Berdasarkan diagram yang telah dibuat, lengkapi fenotipnya berdasarkan tindak gen sifat tersebut.
5. Buat pembahasan dan kesimpulan untuk diagram yang telah dibuat.

ACARA IV PEMETAAN GEN

A. Tujuan

1. Melatih mahasiswa untuk melakukan pemetaan gen berdasarkan pindah silang.

B. Dasar Teori

Meiosis merupakan proses pembelahan sel pada gametogenesis. Hal mendasar yang membedakan antara mitosis dan meiosis adalah ploidi sel anakan dan adanya peristiwa pindah silang (Crossing over). Mitosis memiliki hasil berupa sel yang identic dengan sel induknya. Adapun hasil meiosis merupakan hasil segregasi dengan adanya crossing over antar kromosom homolog.

Dasar teori pemetaan genetik diberikan oleh Alfred H. Sturtevant yang merupakan salah seorang murid Thomas Hunt Morgan. Morgan dikenal sebagai orang yang banyak mengembangkan genetika pada masa awal dengan berbagai eksperimen menggunakan lalat buah *Drosophila* sp. Pada persilangan dihibrid (warna mata dan panjang sayap lalat *Drosophila* sp.) yang dilakukan, terjadi penyimpangan hasil yang signifikan yang selalu terulang. Perbandingan hasil menurut hukum Mendel adalah 1:1:1:1 sedangkan hasil pengamatan menunjukkan perbandingan 3:3:20:20. Hal serupa terjadi pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh William Bateson dan R. C. Punnet, yaitu persilangan dihibrid Sweetpea. Perbandingan menurut Mendel adalah 9:3:3:1 sedangkan hasil yang didapatkan adalah 25:2:2:7. Hal ini menunjukkan adanya Coupling allels yaitu kecenderungan suatu alel untuk saling berpasangan pada proses meiosis. Maka Morgan merumuskan "Ketika kromosom homolog berpasangan pada tahap meiosis, akan ada bagian (segmen) yang bertukar tempat yang disebut Crossing over"

Pada masa awal, pemetaan genetik dilakukan dengan memanfaatkan gejala pindah silang, yang teramati apabila orang memperhatikan dua gen yang saling berpaut (linked) karena terletak pada jarak yang relatif dekat pada satu kromosom. Setelah teknik sekuensing DNA ditemukan, pemetaan dapat dilakukan dengan bantuan penanda dan jarak absolut antara dua gen yang berpaut dapat ditentukan. Cara yang terakhir ini lebih dikenal sebagai pemetaan fisik. Praktikum ini akan mempelajari cara pemetaan genetik klasik.

Pemetaan gen dalam genetika memiliki kegunaan yang luas, sebagai dasar berbagai penelitian genetik, khususnya yang memerlukan bantuan penanda genetik. Perbaikan suatu sifat dapat dilakukan lebih cepat apabila orang menggunakan penanda yang berpaut atau terletak pada suatu gen yang bertanggung jawab untuk sifat yang diminati. Percobaan-percobaan yang melibatkan mutasi juga dapat terbantu oleh peta genetik. Dengan melihat pautan suatu ekspresi mutasi dengan sifat lain yang lokus pengaturannya diketahui, orang dapat mengetahui lokasi terjadinya mutasi.

Penghitungan pemetaan genetik memanfaatkan prinsip bahwa pindah silang terjadi untuk lokus-lokus berbagai macam sifat yang berpautan dan frekuensinya stabil. Namun demikian, frekuensi ini berbeda-beda untuk setiap pasangan lokus yang terlibat. Ini menunjukkan bahwa setiap gen mempunyai lokus yang khas dan tertentu tempatnya pada kromosom. Besarnya pautan dapat dipakai untuk menunjukkan urutan tertentu lokus-lokus

yang berpaut tersebut pada sebuah kromosom dan akan menjadi dasar untuk pemetaan jarak.

Hasil dari persilangan yang melibatkan lokus-lokus yang berpaut tidak dapat digunakan sepenuhnya untuk mengukur jarak antara gen-gen dalam secara linear. Namun demikian, kromosom dapat dipetakan secara efektif dalam bentuk persentase pindah silang di antara dua sifat yang diatur oleh dua lokus terpaut yang didapat dari percobaan. Persentase pindah silang dikenal pula sebagai frekuensi rekombinasi (biasa diberi simbol r atau θ), yaitu besarnya probabilitas terjadinya rekombinasi di antara dua lokus yang berpaut. Frekuensi rekombinasi dihitung berdasarkan banyaknya individu dengan tipe genetik rekombinan, dibagi dengan total individu yang diamati. Dengan demikian, kisaran nilai θ adalah 0 sampai 0,5. Nilai θ dapat dikonversi dalam bentuk satuan pemetaan (map unit, dilambangkan dengan c) oleh suatu formula yang diperkenalkan oleh Haldane, dengan hubungan

$$\theta = \frac{1 - \exp(-\frac{2c}{100})}{2}$$

Dalam bentuk satuan pemetaan, nilai c bersifat linear semu dan memiliki satuan centimorgan, disingkat cM. Sampai dengan nilai $\theta = 0,14$, hubungan r dan c kira-kira linear; jadi, $\theta = 0,01$ atau 1% dapat dianggap 1 cM. Untuk nilai $\theta > 0,14$, nilai c akan mulai memuai dan $\theta = 0,5$ setara dengan $c = \theta$.

Pemetaan genetik dengan pindah silang dapat dengan mudah dilakukan untuk dua atau tiga lokus yang saling berpaut, seperti yang akan dilakukan dalam praktikum ini. Pada praktikum ini akan disimulasikan pemetaan untuk tiga lokus gen yang terletak pada lengan pendek kromosom nomor 9 (lengan 9S) dari jagung.

Ketiga lokus itu adalah untuk sifat warna endospermium (lokus C), warna lapisan aleuron (lokus Bz), dan permukaan bulir (lokus Sh). Pada lokus C, alel C memberi warna endospermium (kuning) dan dominan terhadap warna putih dari alel c . Pada lokus Bz, alel Bz memberi warna ungu bersifat dominan terhadap bz yang memberikan warna merah perunggu pada aleuron. Lokus Sh ditempati oleh alel Sh yang dominan terhadap alel sh yang memberi fenotipe bulir jagung keriput.

Contoh:

Three-point cross yang melibatkan mutan berikut ini: Testcross:

$$\frac{Abc}{aBC} \times \frac{abc}{abc}$$

Fenotipe keturunan	Frekuensi
aBC	2538
Abc	2708
ABc	116
abC	113
aBc	601
AbC	626
ABC	4
Abc	2
Total	6708

Menentukan urutan lokus:

Tentukan parental dan tipe pindah silang ganda (double crossover/DCO)

Parental/tetua :

$$aBC = 2538 \quad ; \quad Abc = 2708$$

Double crossover/Pindah silang ganda :

$$ABC = 4 \quad ; \quad abc = 2$$

Jika tetua dan PSG telah ditentukan, urutan lokus pada kromosom dapat disimpulkan berdasarkan pada efek PSG. PSG mempunyai efek perubahan asosiasi pada anggota pasangan alel tengah. Dengan demikian, pada kasus tidak diketahuinya urutan lokus – jika memperhatikan pada data 3-point testcross yang pasangan alelnya ditranspos, urutannya diubah untuk membuat PSG dari kromosom tipe parental – pasangan alel tersebut akan terdapat di antara dua yang lain.

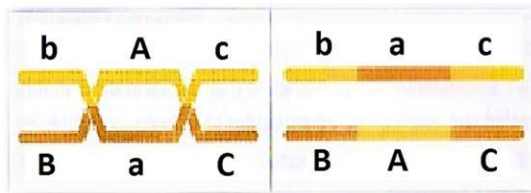
Tetua : aBC dan Abc

PSG : ABC dan abc

Dapat dilihat di atas bahwa a dan A diubah urutannya, pindah silang ganda dapat diperoleh dari tetua. Oleh karena itu, urutan linear seharusnya a di antara b dan c. Susunan lokus untuk heterosigot adalah:

$$\frac{BaC}{bAc}$$

Ilustrasi pindah silang ganda (PSG) dan gamet yang dihasilkan adalah sebagai berikut:



Klasifikasi keturunan testcross adalah sebagai berikut: BaC = 2508 (Parental/tetua) bAc = 2708 (Parental/tetua)

BAC = 4 (DCO/pindah silang ganda) bac = 2 (DCO/pindah silang ganda)

BaC = 116 (single crossover region I/pindah silang tunggal 1) (B dengan A) baC = 113 (single crossover region I/pindah silang tunggal 1) (b dengan a)

Bac = 601 (single crossover region II/pindah silang tunggal 2) (a dengan c) bAC = 626 (single crossover region II/pindah silang tunggal 2) (A dengan C) Perhitungan jarak pautan genetik adalah sebagai berikut:

$$\text{Region I} = \frac{116 + 113 + 4 + 2}{6708} \times 100\% = 3,5\% = 0,035$$

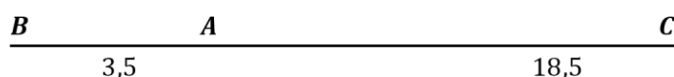
$$\text{Region II} = \frac{601 + 626 + 4 + 2}{6708} \times 100\% = 18,5\% = 0,185$$

$$\text{PSG teramati} = \frac{4 + 2}{6708} \times 100\% = 0,089\%$$

$$\text{PSG harapan} = \text{Region I} \times \text{Region II} = 0,035 \times 0,185 = 0,006475$$

Jarak antara B dan C adalah 22 unit map atau centimorgans (cM).

Map tautan adalah sebagai berikut:



Menghitung Interferensi dan Koefisien Koinsidensi/Coefficient of Coincidence
Seringkali frekuensi yang teramati dari pindah silang ganda tidak sama dengan frekuensi yang diduga. Perbedaan frekuensi bergantung pada kedekatan lokus-lokus yang terlibat, i.e., lokus yang lebih dekat, lebih besar perbedaannya, dan lebih jauh jarak di antara lokus-lokus tersebut, lebih kecil perbedaannya. Hubungan ini terjadi karena terjadinya pindah silang pada satu wilayah cenderung mencegah atau menginterfer dengan formasi dari pindah silang lain yang

berada di dekatnya. Kekuatan interferensi dapat diukur dengan coefficient of coincidence (C.C.):

$$C.C. = \frac{PSG \text{ teramati}}{PSG \text{ harapan}}$$

Pada contoh di atas, maka dapat dihitung sebagai berikut:

$$PSG \text{ teramati} = \frac{4 + 2}{6708} \times 100 \% = 0,089 \% \text{ (actual d.c.o.)}$$

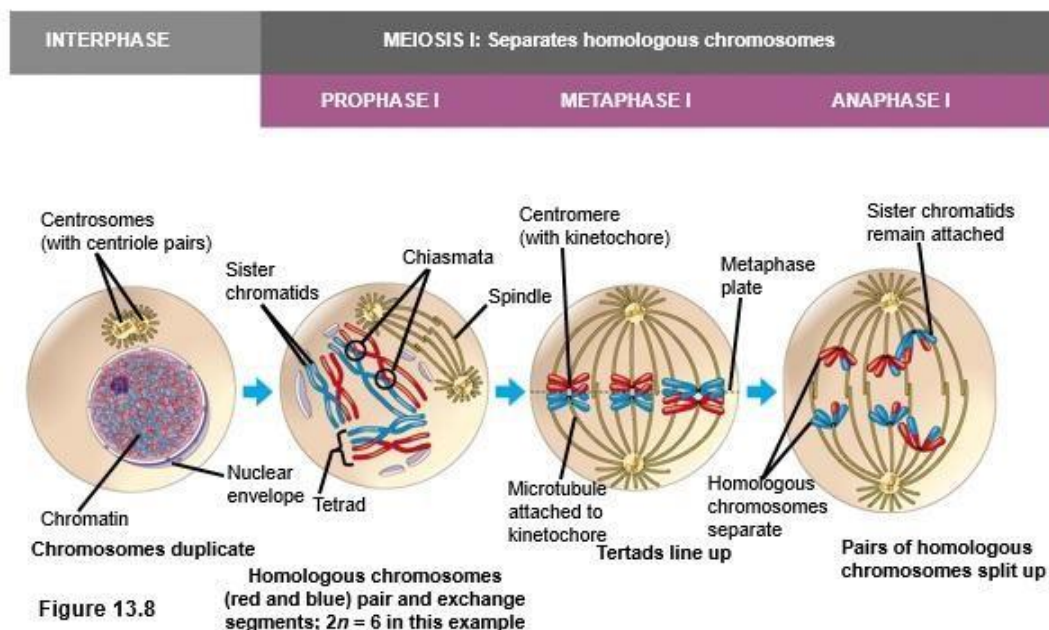
$$PSG \text{ harapan} = Region I \times Region II = 0,035 \times 0,185 = 0,006475$$

$$C.C. = \frac{0,00089}{0,006475} = 0,14 \text{ (expected d.c.o.)}$$

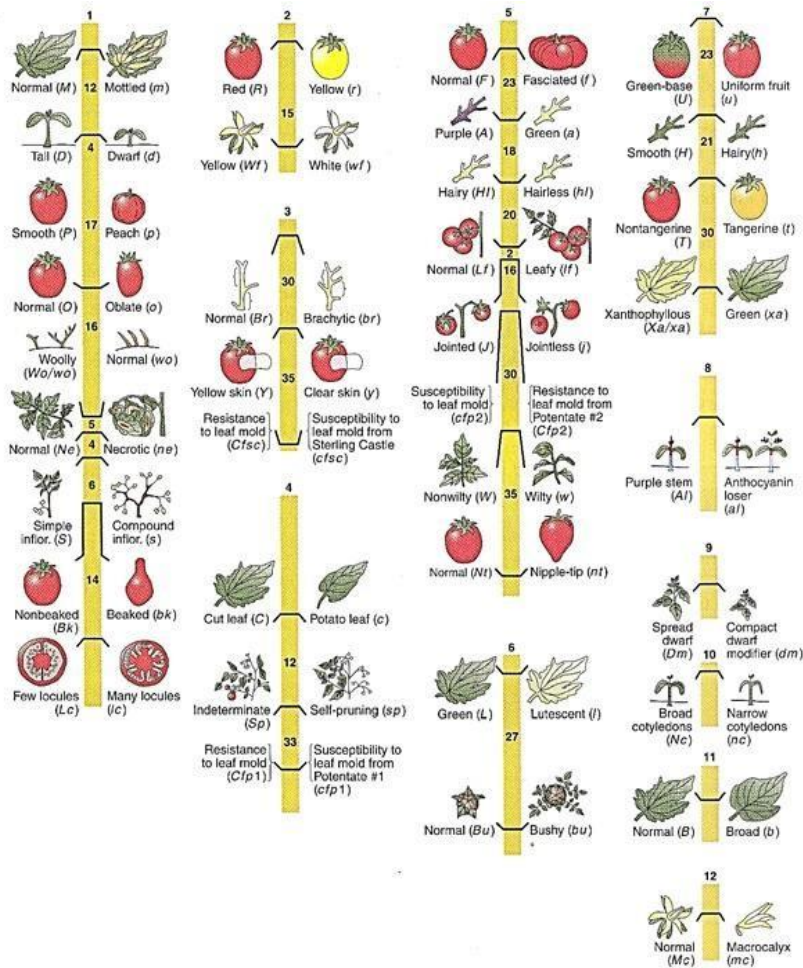
Ini menunjukkan bahwa hanya 14% dari PSG harapan/expected d.c.o. terjadi. Koefisien Koinidensi 1,0 mengindikasikan tidak ada interferensi, sedangkan C.C. = 0 menunjukkan interferensi komplit. Oleh karena itu, interferensi dapat diformulasikan sebagai berikut:

$$Interferensi = 1 - C.C. = 1 - 0,14 = 0,86$$

Interferensi merupakan sebuah ukuran derajat gangguan ketika pindah silang di satu wilayah mempengaruhi probabilitas pindah silang kedua di wilayah sebelahnya (interferensi positif menunjukkan pindah silang di satu wilayah menurunkan probabilitas pindah silang kedua, interferensi negatif menunjukkan pindah silang di satu wilayah meningkatkan probabilitas pindah silang kedua).



Gambar 4.1. Mekanisme Crossing over pada Meiosis



Gambar 4.2. Pemetaan Gen pada Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum* L.)

Cara Kerja :

Pada praktikum ini, praktikan akan melakukan simulasi di atas dengan kartu yang berisi gambar bulir/kernel dari jagung beserta genotipnya. Praktikan akan diberikan populasi pada masing-masing tipe kartu dan mencari urutan lokus serta jarak lokus.

Daftar Pustaka

Griffiths, A.J.F., J. H. Miller, D.T. Suzuki, R.C. Lewontin, and W.M. Gelbart. 2002. An Introduction to Genetic Analysis. W.H. Freeman and Company, New York.

Crowder, L.V. 1993. Plant Genetics (Genetika Tumbuhan, alih bahasa: Lilik Kusdiarti). Gajah Mada University Press, Yogyakarta.

Suryo. 1995. Sitogenetika. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.

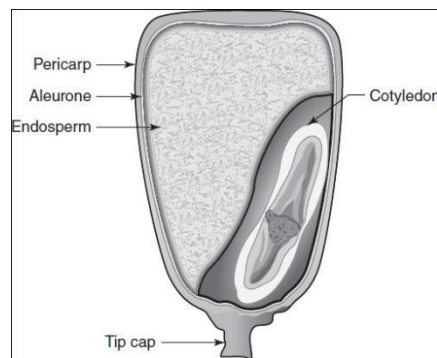
ACARA V PERSILANGAN JAGUNG

A. Tujuan

Melatih mahasiswa untuk melakukan persilangan jagung sebagai tanaman model dalam genetika dan mempelajari hasilnya.

- Dasar Teori

Jagung (*Zea mays* L.) merupakan tanaman berpernyebuk silang (cross pollinated crop) yang memiliki variasi genetik yang luas. Tanaman jagung merupakan tanaman monoecious atau berumah satu dimana organ generatif jantan dan betina terpisah tetapi masih dalam satu tanaman. Organ tersebut terpisah secara jelas dan juga berukuran besar sehingga memudahkan dalam melakukan persilangan. Genom jagung relatif sedikit ($2n=2x=20$), hal ini memudahkan orang melakukan kajian di tingkat kromosom. Hal tersebut menyebabkan jagung merupakan model yang banyak digunakan dalam perkembangan genetika.



Gambar 1. Struktur bulir jagung

(Sumber : <http://www.crackact.com/>)

Bulir jagung memiliki beberapa bagian jaringan, sebagian besar jaringan yang memberikan pengaruh terhadap fenotipe adalah endosperm termasuk lapisan luarnya (aleurone). Hal tersebut dikarenakan endosperma merupakan % dari kandungan bulir sehingga sifatnya akan mendominasi kenampakan dari bulir tersebut. Endosperma (sering disebut sebagai saudara kembar dari embrio) merupakan hasil dari pembuahan ganda yang dihasilkan dari proses penyerbukan. Dengan demikian, sifat dari bulir tersebut dapat dijadikan sebagai penanda keberhasilan persilangan.

Seperti yang kita ketahui bahwa kenampakan dari bulir jagung sangat beragam. Pada umumnya sifat yang sangat terlihat adalah warna serta kandungan gula dalam endosperma. Kandungan dalam endosperma tersebut akan menghasilkan kenampakan yang berbeda. Kandungan tersebut dipengaruhi pula oleh beberapa alel misal alel Su dan Sh. Alel su (sugary) dan sh (shrunken) diyakini mempengaruhi kadar manis dalam bulir jagung. Alel su dalam keadaan homozigot resesif memberikan fenotipe berupa bulir keriput dan tembus pandang. Sedangkan alel sh memberikan fenotipe bulir gembung, bening, rasa yang manis dan akan berubah menjadi bersudut

dan getis saat kering (Syukur dan Rifianto, 2013). Keberadaan Su dominan akan menghasilkan jagung yang normal (tidak mengkerut).

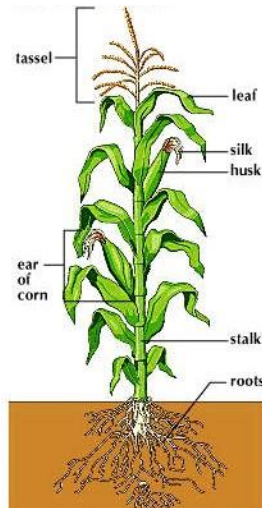
Untuk warna, 3 jaringan yang sering berkontribusi adalah jaringan perikarp, aleuron dan endosperma. Jaringan perikarp pada umumnya transparan tetapi kadang dapat memberikan warna kusam terhadap bulir. Jaringan endosperma pada umumnya akan berwarna putih hingga kuning. Hal ini dijelaskan oleh peneliti terdahulu bahwa gen *y* homozigot resesif (*yyy*) memberikan warna putih dan keberadaan alel *Y* dominan memberikan warna kuning pada bulir, semakin banyak alel *Y* dominan maka intensitas warna kuningnya semakin tinggi. Warna kuning tersebut dihasilkan dari akumulasi karotenoid dalam endosperma. Diyakini bahwa proses metabolisme karotenoid tersebut diatur oleh keberadaan alel *Y* (Poneleit, 2001). Beda halnya dengan aleuron, terdapat beberapa alel yang mempengaruhi warna pada aleuron. Para peneliti mengatakan bahwa pembentukan warna pada aleuron terjadi apabila alel *A*, *C*, dan *R* ditemukan dalam kondisi dominan. Keberadaan alel bersifat homozigot resesif menyebabkan aleuron transparan. Ketika *pr pr* homozigot resesif hadir bersama *A C* dan *R* maka aleuron berwarna merah, dan aleuron akan berwarna ungu apabila *Pr* dominan muncul. Warna tersebut muncul dari akumulasi antosianin pada lapisan aleuron. Di beberapa varietas jagung, gen *I* (Inhibitor) berlaku sebagai faktor penghambat dimana bentuk dominannya akan mencegah pembentukan warna pada aleuron. Selain 5 gen tersebut, masih banyak alel yang mengatur warna dari aleuron jagung seperti *Bz* dan *In* (Faris, 1955). Pembentukan warna pada aleuron biasanya akan menutupi kenampakan warna dari endosperma. Dengan demikian apabila aleuron membentuk warna dengan endosperma berwarna kuning atau putih maka warna yang akan muncul adalah warna aleuron. Dengan demikian dominasi warnanya adalah Ungu > Merah > Kuning > Putih.

Untuk melakukan penyerbukan buatan, maka perlu diperhatikan aspek biologi tanaman jagung serta kontaminasi dari serbuk sari lain. Aspek biologi mencakupi organ reproduksi pada jagung. Seperti yang kita ketahui bahwa jagung merupakan tanaman berumah satu, sehingga organ generatif jantan dan betina terpisah.

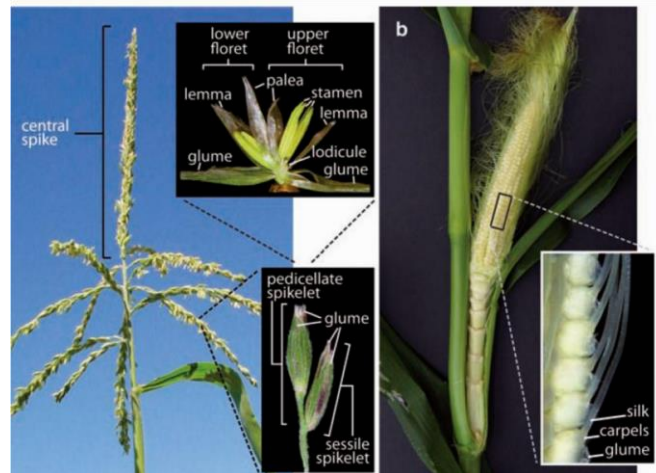


Gambar 2. Ragam warna dalam bulir jagung
(Sumber: <http://www.crackact.com/>)

Organ generatif jantan disebut sebagai malai (tassel) merupakan organ yang berada di ujung atas batang utama. Sedangkan organ generatif betina disebut sebagai tongkol (ear) merupakan kumpulan dari sel telur yang tumbuh dari axil batang utama. Pada ujung tongkol terdapat jaringan seperti rambut yang merupakan stili dan stigma dari organ generatif betina atau bunga betina jagung. Setiap rambut tersebut terhubung dengan satu sel telur yang siap dibuahi menjadi satu bulir jagung (Acquaah, 2012).



Gambar 3. Bagian Organ generatif pada jagung
(Sumber: <http://media.web.britannica.com/>)



Gambar 4. Organ generatif pada Jagung
(Dari buku Handbook of Maize Vol 1)

Pada umumnya tanaman jagung adalah tanaman protandri dimana organ generatif jantan lebih awal matang dibanding organ generatif betina. Dalam tanaman yang sama, biasanya polen akan lepas 1-3 hari sebelum rambut tongkol keluar. Rambut tongkol yang keluar bersifat reseptif selama ± 10 hari (optimum hari ke-3 sampai hari ke-5). Sifat reseptif dari rambut tongkol dipengaruhi oleh temperatur dan kelembaban. Polen jagung umumnya disebarkan oleh angin, sehingga 95% tanaman jagung akan melakukan persilangan. Penyebaran/ pelepasan polen dari malai dipicu oleh suhu hangat dan kelembaban yang rendah. Suhu yang tinggi ($>35^{\circ}\text{C}$) menyebabkan polen tidak viabel (Acquaah, 2012).

- Alat dan Bahan
 - ✓ Populasi jagung berwarna ungu dan kuning/putih.
 - ✓ Perlengkapan penyerbukan (kantong kertas, gunting, label, klip kertas, spidol permanen).
- Cara Kerja

Persilangan yang dilakukan pada praktikum ini adalah

 - ✓ Persilangan antara jagung ungu dan jagung kuning/putih
 - a. ♀ jagung ungu x ♂ jagung kuning/putih

- b. ♀ jagung kuning/putih x ♂ jagung ungu
- ✓ Penyerbukan sendiri antar varietas jagung
 - a. ♀ jagung ungu x ♂ jagung ungu
 - b. ♀ jagung kuning/putih x ♂ jagung kuning/putih

Ada 3 cara persilangan buatan pada jagung

1. Metode kantung (Tassel bag method)

Pada metode ini baik bunga jantan maupun bunga betina dibungkus sebelum mekar menggunakan kantong kertas minyak. Hal ini dilakukan untuk menghindari kontaminasi dari serbuk sari lainnya, selain itu pembungkusan pada bunga jantan dilakukan untuk menjaga polen yang diinginkan karena adanya resiko terbawa oleh angin. Bunga jantan dikerodong saat pucuk malai keluar dari pucuk tanaman, sedangkan bungan betina dikerodong sebelum rambut jagung keluar. Hari berikutnya tongkol diperiksa untuk melihat laju keluarnya rambut jagung. Penyerbukan harus dilakukan dalam 3 hari setelah tongkol ditutup atau rambut tongkol harus dipotong agar tidak keluar kantong (menghindari kontaminasi). Pemotongan rambut jagung pun biasa dilakukan sehari sebelum proses penyerbukan sepanjang 1-2 cm di atas permukaan ujung klobot.

Untuk selfing, polen dari malai bisa diambil langsung dan dimasukkan/ ditaburkan pada rambut jagung. Pada persilangan, polen bisa diambil di suatu kantong dengan menggoyangkan malai dan menaburkan pada tongkol. Waktu yang optimal untuk melakukan penyerbukan dipengaruhi oleh suhu dan kelembaban tapi umumnya 3 jam setelah matahari terbit. Kantong penutup tongkol harus dipasang kembali agar terhindar dari kontaminasi. Namun perlu diperhatikan pula bahwa menutup tongkol terlalu lama dapat menyebabkan busuk pada ujung tongkol. Informasi mengenai penyerbukan berupa tetua, tanggal penyerbukan perlu dicatat di kantong (Acquaah, 2012).

2. Metode botol (Bottle Method)

Metode ini merupakan metode modifikasi dari metode pertama. Pada metode ini, malai bunga jantan yang telah keluar dipotong menggunakan gunting kemudian dimasukkan ke dalam larutan bisulfit (1:2000) agar tidak mengalami pembusukan (mencegah kekeringan dan pembusukan oleh bakteri). Apabila malai sudah mekar (serbuk sari menghambur), maka malai dibungkus bersama-sama dengan tongkol dalam satu kerodong/kantong.

3. Metode pengaturan tanggal tanam (Overall Method)

Pada metode ini tanaman yang akan disilangkan ditanam berdekatan atau di dalam pot. Saat penanaman diatur sedemikian rupa dengan memperhatikan umur berbunga masing-masing tetua sehingga keluarnya tongkol tetua betina bersamaan dengan keluarnya malai tetua jantan. Tanaman tetua betina dan

jantan yang siap melakukan penyerbukan kemudian didekatkan dan dibungkus dalam satu kerodong.

- Pengamatan/ Perhitungan
Amati hasil yang Saudara dapatkan. Apa yang terjadi pada bulir yang Saudara dapat. Bahas hasil yang Saudara dapatkan dan hubungkan dengan hukum Mendel.

- Pertanyaan/tugas
 1. Endospermium dapat dianggap sebagai “saudara kembar” bagi lembaga (embrio), tetapi keduanya secara genetik berbeda. Jelaskan
 2. Serbuk sari hanya berusia beberapa jam pada kondisi normal, sebelum kemudian mati. Carilah informasi mengenai usaha-usaha untuk memperpanjang usia hidup serbuk sari, terutama pada jagung.

DAFTAR PUSTAKA

- Acquaah, G. 2012. Breeding Corn in Principles of Plant Genetics and Breeding, Second Edition. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Faris, D. G. 1955. The Physiology and Genetics of the Kernel Color of Barley. Division of Plant Science. The University of British Columbia. Thesis.
- Poneleit, C. G. 2001. Breeding White Endosperm Corn in Specialty Corns, Second Edition (Ed: A.R. Hallauer). CRC Press, USA.
- Syukur, M dan A. Rifianto. 2013. Jagung Manis. Penebar Swadaya, Jakarta.

ACARA VI EKSTRAKSI DNA

Sejarah Singkat DNA

Pembicaraan mengenai sejarah DNA seringkali dimulai pada tahun 1944, ketika Avery, MacLeod, dan McCarty memaparkan bahwa DNA sebagai materi pewarisan melalui penelitian terhadap tikus yang diinfeksi bakteri letal. Sepuluh tahun berselang, J.D. Watson dan Francis Crick melaporkan model struktur DNA berdasarkan foto difraksi sinar-X melalui molekul DNA yang dibuat Rosalind Franklin. Namun demikian, kisah DNA sebenarnya dimulai pada tahun 1869 oleh seorang fisikawan muda dari Swiss, Friedrich Miescher.

J. Friedrich Miescher lahir pada tanggal 13 Agustus 1844 di Basel, Swiss, dari lingkungan keluarga ilmuwan. Setelah menyelesaikan pendidikannya sebagai fisikawan, Miescher pindah ke Tübingen (Jerman) untuk bekerja di laboratorium milik biokimiawan, Felix Hoppe-Seyler. Tujuan penelitian Miescher adalah menjelaskan unit-unit penyusun kehidupan.

Miescher memilih leukosit sebagai materi penelitiannya dan memeriksa protein pada sel darah putih tersebut. Pada saat memeriksa protein tersebut, Miescher menemukan unsur fosfor yang bukanlah penyusun protein—protein tersusun atas karbon, hidrogen, oksigen, dan nitrogen. Miescher sebenarnya telah memperoleh pemurnian DNA melalui penelitiannya itu, walaupun masih mentah. Miescher memeriksa karakteristik dan komposisi substansi asing tersebut dan menunjukkan bahwa secara mendasar substansi ini berbeda dari protein. Miescher kemudian memberikan istilah substansi tersebut nuclein karena ditemukan pada inti sel. Umur Miescher baru 25 tahun saat berhasil mengisolasi DNA. Ia merupakan orang yang pertama kali mengisolasi DNA.

Pada tahun 1889, Richard Altmann mengubah istilah nuclein menjadi asam nukleat (bahasa Jerman: nucleinsäure) karena diketahui nuclein berperilaku seperti asam. Istilah inilah yang digunakan sampai sekarang.

Sejarah Perkembangan DNA

1865	Gregor Mendel melalui percobaan pemuliaan menggunakan kacang polong menemukan bahwa sifat-sifat yang diwariskan mengikuti pola tertentu (kemudian disebut Hukum Mendel).
1869	Friedrich Miescher mengisolasi DNA untuk pertama kalinya.
1871	Publikasi pertama menggambarkan DNA (“nuclein”) oleh Friedrich Miescher, Felix Hoppe- Seyler, dan P. Plósz dicetak.
1882	Walther Flemming mengemukakan kromosom dan meneliti perilakunya selama pembelahan sel.
1889	Richard Altmann mengganti nama “nuclein” ke “nucleic acid”.

1900	Carl Correns, Hugo de Vries, dan Erich von Tschermak menemukan kembali Hukum Mendel.
1902	Theodor Boveri dan Walter Sutton mengeluarkan postulat bahwa unit hereditas terletak pada kromosom.
1909	Wilhelm Johannsen menggunakan istilah "gene" kata untuk menggambarkan unit hereditas.
1910	Thomas Hunt Morgan, menggunakan lalat buah (<i>Drosophila</i>) sebagai model untuk mempelajari hereditas dan menemukan mutan pertama (putih) dengan warna mata putih.
1913	Alfred Sturtevant dan Thomas Hunt Morgan, menghasilkan peta pertama tautan genetik (untuk lalat buah <i>Drosophila</i>).
1928	Frederick Griffith mendalilkan bahwa "transforming principle" memungkinkan sifat dari satu jenis bakteri (virulen <i>Streptococcus pneumoniae</i> dilemahkan dengan panas) dapat ditransfer ke jenis yang lain (non virulen <i>Streptococcus pneumoniae</i> yang hidup).
1929	Phoebus Levene mengidentifikasi penyusun DNA, termasuk empat basa adenin (A), sitosin (C), guanin (G), dan timin (T).
1941	George Beadle dan Edward Tatum menunjukkan bahwa setiap gen bertanggung jawab untuk produksi enzim (satu gen satu enzim).
1944	Oswald T. Avery, Colin MacLeod, dan McCarty Maclyn menunjukkan bahwa "transforming principle" yang dikemukakan Griffith adalah bukan protein, tetapi DNA, menunjukkan bahwa DNA yang berfungsi sebagai materi genetik.
1949– 1950	Erwin Chargaff menemukan bahwa komposisi basa DNA bervariasi antara spesies, tetapi dalam suatu spesies basa DNA selalu dalam rasio tetap: jumlah A sama dengan T dan jumlah C sama dengan G.
1952	Alfred Hershey dan Martha Chase menggunakan virus (bakteriofag T2) untuk mengkonfirmasi DNA sebagai materi genetik dengan menunjukkan bahwa selama infeksi, viral DNA
	memasuki bakteri, sedangkan protein viral tidak dan DNA ini dapat ditemukan pada partikel anakan virus.

1953	Rosalind Franklin dan Maurice Wilkins menggunakan analisis X-ray untuk menunjukkan bahwa DNA memiliki struktur heliks berulang secara teratur.
1953	James Watson dan Francis Crick menemukan struktur molekul DNA, heliks ganda dengan A selalu berpasangan dengan T, dan C selalu dengan G.

Ekstraksi atau isolasi DNA merupakan suatu kegiatan yang bertujuan untuk memurnikan atau mendapatkan untaian DNA dari suatu sel. Isolasi DNA merupakan prosedur pertama yang harus dilakukan untuk mempelajari suatu sekuen DNA dari populasi DNA kompleks, serta dalam analisis struktur genom dan ekspresi gen. Dalam kegiatan tersebut, hasil yang didapatkan nantinya akan sangat dipengaruhi oleh kualitas, kuantitas, dan integritas DNA yang didapatkan dari proses isolasi. Apabila kualitas DNA yang didapatkan bagus dan tidak terkontaminasi, maka hasil dari PCR akan menunjukkan pola pita yang jelas. Hal ini merupakan tahap awal yang sangat menentukan dalam kegiatan penelitian biologi molekuler.

Berbagai teknik atau metode dapat dilakukan untuk mengisolasi DNA tanaman, tergantung dari jenis, organ atau jaringan tanaman yang digunakan. Namun, pada dasarnya ada tiga faktor penentu dalam ekstraksi dan purifikasi DNA secara optimal, yaitu: 1) Penghomogenan jaringan tanaman, 2) Komposisi penambahan larutan buffer pada saat penggerusan daun/jaringan tanaman sampel, dan 3) Penghilangan enzim penghambat polisakarida khususnya untuk tanaman tahunan.

Menurut Clark (1997), Secara umum prosedur ekstraksi untuk isolasi DNA yang baik harus memenuhi empat kriteria utama, yaitu:

1. Harus bisa menghasilkan DNA yang murni

Hal ini dimaksudkan agar DNA dapat dianalisis atau digunakan untuk proses selanjutnya. Misalnya untuk analisa RFLP, harus digunakan DNA yang cukup murni untuk bisa dipotong oleh restriction endonuclease dan ditransfer ke membrane untuk analisis Southern. Untuk analisis polymerase chain reaction (PCR) ekstrak DNA harus tidak mengandung kontaminan DNA yang dapat mengganggu PCR.

2. DNA harus utuh untuk memberikan pola migrasi yang akurat pada gel electrophoresis.

3. DNA yang dihasilkan harus mencukupi.

4. Prosedur yang digunakan harus cepat, sederhana dan murah, dan jika memungkinkan bisa dihindari penggunaan bahan kimia yang berbahaya.

Ada tiga langkah utama dalam ekstraksi DNA, yaitu perusakan dinding sel (lisis), pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein, serta pemurnian DNA.

a. Lisis

Lisis dapat dilakukan secara mekanik misalnya dengan penggerusan atau penumbukan maupun secara kimiawi misalnya dengan penambahan senyawa buffer kationik seperti detergen. Larutan deterjen berfungsi menurunkan tegangan permukaan cairan dan melarutkan lipid sehingga membrane sel mengalami degradasi, dan organel-organel di dalamnya dapat keluar dari sel.

b. Pemisahan DNA dari pengotor

DNA yang tercampur dengan polisakarida, protein, dan pengotor lainnya perlu dibersihkan. Pembersihan DNA dilakukan dengan ekstraksi menggunakan larutan CI (dalam praktikum ini menggunakan garam) dan sentrifugasi. Larutan kloroform dapat menghilangkan kontaminasi akibat polisakarida sedangkan sentrifugasi akan memisahkan molekul-molekul berdasarkan bobot molekulnya. Larutan CI yang merupakan pelarut organik dapat menghancurkan dan mengendapkan protein.

c. Pemurnian DNA

Pemurnian DNA biasanya dilakukan dengan alkohol (etanol dan isopropanol). Larutan-larutan tersebut dapat mengendapkan DNA sedangkan kontaminan yang lain akan tetap larut.

Sifat fisika dan kimiawi DNA

- Stabilitas asam nukleat: Penentu stabilitas asam nukleat terletak pada interaksi penempatan antara pasangan-pasangan basa.
- Pengaruh asam: Asam nukleat akan mengalami hidrolisis sempurna apabila berada dalam asam pekat dan suhu tinggi.
- Pengaruh alkali: Pengaruh alkali terhadap asam nukleat mengakibatkan terjadinya perubahan status tautomerik basa
- Denaturasi kimia: Sejumlah bahan kimia diketahui dapat menyebabkan denaturasi asam nukleat ada pH netral.
- Absorpsi UV: Asam nukleat dapat mengabsorpsi sinar UV karena adanya basa nitrogen yang bersifat aromatik.
- Denaturasi termal dan renaturasi: Denaturasi dapat terjadi salah satunya karena suhu tinggi. DNA yang mengalami denaturasi termal dapat dipulihkan (direnaturasi) dengan cara didinginkan

Bahan dan Cara Kerja :

Bahan:

1. Buah stroberi, pisang, atau pepaya (secukupnya).
2. 1/2 sendok teh garam dapur (sebaiknya tidak beryodium)
3. Alkohol (etanol atau isopropanol)
4. 2 sendok teh sabun cuci piring
5. 100 mL aquades

6. Plastik dengan klem
7. Gelas beker
8. Kertas saring Cara Kerja:
 1. Masukkan masing-masing buah secukupnya (buah dingin lebih baik) ke dalam plastik berklem. Haluskan buah dengan cara memukul plastik. Hati-hati jangan sampai menyobek plastik.
 2. Buat larutan lisis dari dua sendok teh sabun cuci piring dan satu sendok teh garam yang dilarutkan dalam 100 mL aquadest.
 3. Masukkan larutan lisis yang sudah dibuat ke dalam plastik berisi buah yang sudah dihaluskan. Kemudian permukaan plastik ditekan merata agar larutan lisis bercampur rata dengan buah yang sudah dihaluskan. Jangan sampai larutan dalam kantung plastik berbusa.
 4. Tuangkan isi plastik tersebut ke gelas beker yang telah dilapisi dengan kertas saring. Hati-hati jangan sampai kotoran ikut masuk ke dalam gelas beker.
 5. Tuangkan alkohol dingin ke dalam gelas beker secukupnya sampai terlihat terjadi pemisahan materi dalam gelas beker.
 6. Jika berhasil, maka DNA akan menggumpal/mengendap di atas permukaan gelas beker.



Buah stroberi Plastik kemudian diberi Setelah diberi alkohol, dihancurkan dalam larutan lisis DNA akan menggumpal plastic (bagian atas berwarna agak putih).

EKSTRAKSI DNA MENGGUNAKAN CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) (DOYLE & DOYLE, 1990 yang dimodifikasi)

Sample:

Daun yang digunakan sebagai sampel dicuci dengan air mengalir sampai bersih dan dikeringkan dengan tissue. Sampel yang belum akan digunakan disimpan dalam CaCl_2 . Sampel yang digunakan sebanyak 0,1 g sampel segar atau sampel kering.

Metode:

1. Panaskan buffer ekstraksi CTAB (yang sudah ditambahkan 1% Mercaptoethanol) sesuai kebutuhan sampel (1500 μl per sampel) pada waterbath pada suhu 65°C selama 30 menit.

Buffer ekstraksi CTAB terdiri atas :

1. 2 % CTAB
2. 1,4 M NaCl
3. 20 mM EDTA pH 8
4. 100 mM Tris-HCl pH 8
5. 1% PVP
6. 1% Mercaptoethanol
7. Aquabidest

PVP dalam buffer CTAB berfungsi untuk mendegradasi komponen phenolik, Mercaptoethanol berfungsi untuk mendegradasi polisakarida.

2. Gerus sampel daun menggunakan mortar hingga lembut, tambahkan larutan buffer dan campur hingga rata, kemudian dimasukkan kedalam microtube.

Apabila sampel berupa sampel kering maka sampel didiamkan selama 0.5 - 1 jam dalam larutan buffer di suhu ruang baru kemudian digerus.

3. Inkubasi campuran hasil gerusan dan buffer tersebut pada suhu 65°C selama 60 menit dan setiap 10 menit dibolak balik.

Tahap ini adalah mengefektifkan lisis sel dan me-nonaktifkan DNase yang dapat merusak DNA, serta menghancurkan protein, komponen phenol dan polisakarida.

4. Setelah 60 menit campuran diambil dari waterbath dan didiamkan selama 2 menit kemudian ditambahkan pada setiap sampel 500 μl campuran 24 chloroform : 1 isoamil alkohol (CIAA). Tinggi cairan hrs seimbang, apabila tidak seimbang bisa ditambah CIAA. Campur dengan baik kemudian divortex selama 5 menit.

Tahap ini adalah mengekstrak dan mengendapkan protein, komponen phenolik, polisakarida, dll di dalam campuran untuk dipisahkan dari larutan DNA dengan sentrifugasi.

5. Campuran disentrifuse 15 menit pada 12.000 rpm.
6. Supernatan yang terbentuk diambil dengan hati-hati dan dipindahkan ke mikrotube yang baru, catat volumenya.
7. Tambahkan sodium asetat 3M sebanyak 1/10 dari volume supernatan tersebut dan dicampur dengan baik.

8. Setelah itu tambahkan isopropanol dingin sebanyak 2/3 volume total (supernatan + sodium asetat), campur dengan baik dengan membolak-balik tabung. Campuran didiamkan dalam freezer selama 1 - 24 jam.

Tahap 7 & 8 berfungsi mengendapkan DNA (presipitasi). DNA akan mengendap oleh keberadaan garam, isopropanol dan suhu dingin.

9. Sentrifuse 12.000 rpm selama 10 menit.
10. Buang cairan dan cuci endapan DNA dengan menambahkan 500 µl etanol 70%, bolak-balik mikrotube.

Tahap ini adalah untuk mencuci endapan DNA supaya bersih dari sisa-sisa garam yang mengkontaminasinya (garam akan terlarut di dalam phase air yang ada pada larutan 70% ethanol).

11. Sentrifuse 5 menit pada 12.000 rpm. Buang cairan dan endapan DNA dikering-anginkan
12. Setelah kering, endapan DNA dilarutkan kembali dengan 50-100 µl TE buffer + 1% RNase, inkubasi pada waterbath pada suhu 37°C selama 60 menit.

RNase berfungsi mendegradasi RNA yang terbawa bersama DNA.

13. Larutan DNA disimpan pada suhu 4°C.

VISUALISASI DNA GENOM DENGAN ELEKTROFORESIS

I. Pembuatan gel agarose

Konsentrasi gel yang digunakan tergantung pada ukuran DNA . Semakin kecil ukuran DNA maka konsentrasi gel sebaiknya lebih tinggi. Konsentrasi yang umum digunakan adalah 1% - 2%.

Prosedurnya pembuatan gel (Biorad) adalah sebagai berikut :

1. Ukur volume buffer TBE 1x sebanyak 30 ml, tuang ke dalam erlenmeyer.
2. Timbang agarose sesuai dengan konsentrasi yang akan digunakan.

Misal untuk konsentrasi 1.5% maka dibutuhkan agarose : $1.5/100 \times 30 \text{ ml} = 0.45 \text{ g}$

3. Tuang agarose ke dalam erlenmeyer, tutup dengan clingwrap, kemudian dilubangi.
4. Panaskan erlenmeyer berisi agarose dengan microwave selama 1 menit, keluarkan dan gojog perlahan.
5. Ulangi langkah 4 sebanyak 3-4x hingga agarose benar-benar larut dan larutan homogen. Pada pemanasan terakhir larutan digojog dengan hati-hati agar tidak terbentuk gelembung udara pada larutan.
6. Diamkan sebentar agar larutan agarose hangat, kemudian tambahkan 4 µl *fluorosave DNA stain* yang akan memendarkan DNA di bawah sinar UV.
7. Tuang larutan agarose ke dalam cetakan, kemudian letakkan sisir pada posisinya. Diamkan selama ± 45 menit hingga agarose mengeras.
8. Cabut sisir dengan hati-hati agar gel tidak rusak, gel siap digunakan.

II. Prosedur elektroforesis

1. Tuang buffer TBE 1x ke dalam tangki elektroforesis hingga setengahnya.
2. Letakkan gel ke dalam tangki dengan posisi sumuran pada kutub negatif tangki (ujung berwarna hitam), tambahkan buffer TBE 1x sehingga gel tenggelam dalam buffer.

DNA bermuatan negatif sehingga diletakkan pada kutub negatif dan pada saat dialiri arus listrik akan bergerak menuju kutub positif.

3. Ambil loading dye (6x blue dye) dengan volume sesuai sampel DNA yang akan dielektroforesis, yaitu 1 μ l loading dye untuk 5 μ l DNA, kemudian campur dengan sampel DNA.
4. Masukkan campuran loading dye dan DNA ke dalam sumuran gel dengan hati-hati agar tidak menusuk gel dan tepat pada lubang sumuran sampel untuk menghindari kontaminasi sampel yang satu dengan lainnya.
5. Masukkan DNA marker pada sumuran tepi kanan dan kiri gel.
6. Tutup tangki elektroforesis. Sambungkan alat ke listrik dan setting alat sesuai voltase dan waktu yang digunakan.

Semakin tinggi voltase maka semakin cepat waktunya. Pita yang dihasilkan lebih baik pada voltase rendah dan waktu yang lebih lama. Konsentrasi gel juga mempengaruhi jalannya DNA karena fragmen DNA lebih sulit bergerak pada pori-pori gel yang lebih rapat. Oleh karena itu pada konsentrasi gel yang lebih tinggi dapat digunakan voltase yang lebih tinggi.

7. Proses ini dilakukan sampai loading dye bergerak mendekati 1/3 ujung bawah gel. Jangan sampai loading dye keluar dari gel (hanyut) karena ada kemungkinan DNA hilang.
8. Matikan alat dan angkat gel untuk diamati di bawah sinar UV. Fragmen DNA akan tampak sebagai pita berwarna merah jingga.

KUANTIFIKASI KONSENTRASI DAN KEMURNIAN DNA GENOM DENGAN SPEKTROFOTOMETER

Spektrofotometri sinar UV digunakan untuk mengukur tingkat kemurnian dan konsentrasi DNA hasil isolasi. Larutan blanko yang digunakan adalah ddH₂O. Absorbansi panjang gelombang 260 nm digunakan untuk mendeteksi komponen asam nukleotida (DNA/RNA), sedangkan untuk mendeteksi komponen protein menggunakan absorbansi panjang gelombang UV dengan panjang gelombang 280 nm. Sedangkan absorbansi panjang gelombang 320 nm digunakan untuk mendeteksi komponen lain. Nilai kemurnian DNA ditentukan dengan rasio λ 260/280. DNA murni yang bebas kontaminasi protein akan mempunyai nilai ratio λ 260/280 mendekati 1,8. Jika terdapat kontaminasi fenol atau protein maka nilai ratio λ 260/280 akan lebih kecil dari 1,8 sedangkan jika DNA terkontaminasi RNA maka nilai ratio λ 260/280 akan lebih besar dari 1,8. Konsentrasi DNA dihitung dengan mengalikan hasil absorbansi λ 260 dengan factor dilusi. Alat yang digunakan untuk kuantifikasi DNA adalah GeneQuant 1300. Hitung kuantitas dan kemurnian DNA hasil isolasi sesuai dengan petunjuk penggunaan alat.

Pembahasan

1. Deskripsikan DNA yang Saudara dapat.
2. Jelaskan langkah-langkah utama dalam mengekstraksi DNA?
3. Mana yang lebih mudah, mengekstraksi DNA dari sel hewan atau sel tanaman?
4. Mengapa dibutuhkan sabun cuci, garam dapur, dan alkohol untuk mengekstraksi DNA? Jelaskan fungsinya!
5. Apakah ada perbedaan hasil ekstraksi DNA dari materi yang berbeda?

Daftar Pustaka

- Syafaruddin dan T. J. Santoso. 2011. Optimasi teknik isolasi dan purifikasi DNA yang efisien dan efektif pada kemiri sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco)). *Jurnal Littri* 17 (1) :11 – 17.
- Yulianti, E. 2006. Pengembangan-pengembangan teknik isolasi DNA tumbuhan menggunakan detergen komersial. Seminar Nasional MIPA 2006, FMIPA UNY.

Glosarium

- Alel** : Bentuk alternatif dari gen yang terdapat pada lokus tunggal.
- Asentrik** : Kromosom yang tidak memiliki sentromer.
- Autosom** : Kromosom yang bukan merupakan kromosom kelamin
- Bivalen** : Sebuah struktur dua pasangan homolog sister chromatid yang bersinapsis satu dengan yang lain
- Dihybrid** : Dua lokus yang pada masing-masing lokusnya heterozigot; keturunan dari persilangan antara dua dua galur murni atau homozigot yang secara genetik berbeda pada dua lokus.
- Dominan** : Alel yang menentukan fenotipe pada keadaan genotipe yang heterosigot.
- Epigenetik** : Keadaan fungsi gen yang tidak dikodekan dalam urutan DNA, tapi masih diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya. Hal ini dapat dicapai dan dipertahankan melalui modifikasi kimia DNA seperti metilasi.
- Epistasis** : Pola pewarisan satu gen dapat mempengaruhi efek fenotipe dari gen lain; Ekspresi fenotipik yang diakibatkan genotipe pada satu lokus tergantung pada genotipe di lokus lain.
- Gamet** : Sel reproduksi (umumnya haploid) yang dapat bergabung dengan sel reproduktif lain untuk menghasilkan zigot. Sel sperma dan sel telur merupakan gamet.
- Gametogenesis**: Suatu proses yang menghasilkan gamet
- Gen** : Unit pewarisan yang mempengaruhi kenampakan sifat organisme. Pada level molekuler, sebuah gen mengandung informasi untuk membuat produk fungsional seperti RNA ataupun protein.
- Genotipe** : Komposisi genetik suatu individu, terutama dalam hal alel untuk gen-gen tertentu.
- Haploid** : Penjelasan bahwa gamet mengandung separuh materi genetik pada sel somatik. Untuk spesies yang diploid, gamet haploid mengandung hanya satu set kromosom.
- Heterozigot** : Suatu individu diploid yang memiliki dua alel berbeda pada satu lokus.
- Kariotipe** : Gambar set kromosom lengkap dari suatu individu. Gambar diambil pada saat metafase.
- Kodominan** : Pola pewarisan dua alel terekspresi seluruhnya pada kondisi heterosigot. Contohnya golongan darah AB pada manusia memiliki genotipe IA IB.

- Kromosom : Suatu struktur pada suatu sel yang mengandung materi genetik. Secara biokimia, kromosom mengandung segmen DNA yang panjang yang merupakan materi genetik.
- Lokus : Lokasi fisik gen pada kromosom
- Meiosis : Pembelahan inti dua kali berturut-turut (dengan pembelahan sel yang sesuai) yang menghasilkan gamet (pada hewan) atau spora seksual (pada tumbuhan dan jamur) yang memiliki setengah dari materi genetik dari sel mula-mula.
- Mitosis : Pembelahan inti (terjadi pada pembelahan sel) yang menghasilkan dua anakan inti yang identik dengan tetuanya
- Monohibrid : Genotipe yang heterozigot untuk satu pasang alel; keturunan dari persilangan antara dua galur murni atau homozigot yang secara genetik berbeda pada satu lokus.
- Pleiotropi : Satu gen/satu genotipe yang mempengaruhi banyak sifat.