

**Introduksi Konstruksi Gen *CsNitr1-L* dengan Promotor *Ubiquitin* melalui *Agrobacterium tumefaciens* dan Deteksi Molekulernya pada Padi Kultivar Nipponbare
(The Introduction of *CsNitr1-L* Gene Construction with *Ubiquitin* promoter using *Agrobacterium tumefaciens* and Its Molecular Detection on Rice Cultivar Nipponbare)**

Wening Enggarini^{1*}, Aqwin Polosoro¹, Sustiprijatno¹, & Kurniawan Rudi Trijatkiko¹

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar no. 3A Bogor 16111, Jawa Barat

*E-mail: whening@yahoo.com

Memasukkan: Februari 2017, **Diterima:** Agustus 2017

ABSTRACT

Nitrogen based fertilizers such as urea and NPK are primary needs for rice farmers. To get significant improvement of crop yield, the more quantity of fertilizers are applied. It make negative impact for surrounding environment. Based on that, the efforts should be done to suppress the demand of fertilizers such as by developing Nitrogen Use Efficiency crops. *CsNitr1-L* is one of gene that related to Nitrogen Use Efficiency trait in plant. The objectives of this research are to develop the construction of *CsNitr1-L* gene candidate in pCAMBIA1300-Ubi1 promoter and to obtain the transformants of rice cultivar Nipponbare which contain the construction of *CsNitr1-L* gene candidate. The construction of pCAMBIA1300::Ubi1::*CsNitr1-L* has successfully assembled and was transformed to immature embryo of rice cultivar Nipponbare using *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. It was obtained 146 lines of T0 Nipponbare. PCR analysis of T0 Nipponbare lines showed that 66 of them was identified as positive T0 lines contained *hptII* and *CsNitr1-L* genes. Transformation efficiency obtained was 11,9%. The result of analysis copy number using Southern Hybridization in positive PCR of T0 lines randomly indicated that 4 lines have a single copy of transgene. Based on these results, it can be concluded that *CsNitr1-L* gene construct was successfully introduced into the genome of the rice plant cultivar Nipponbare and the positive PCR of T0 lines containing the gene of *hptII* and *CsNitr1-L*, also a single copy of the transgene was obtained.

Keywords: Nitrogen use efficiency trait, gene construction, rice kultivar Nipponbare

ABSTRAK

Pupuk berbahan dasar Nitrogen seperti urea dan NPK merupakan kebutuhan pokok petani padi. Untuk mengejar peningkatan hasil tanaman, pupuk yang diaplikasikan sering melebihi takaran pupuk yang dianjurkan oleh pemerintah. Hal ini memberikan dampak yang buruk bagi lingkungan sekitarnya. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan upaya untuk menekan kebutuhan pupuk yaitu dengan merakit tanaman pertanian yang lebih efisien dalam penggunaan N (*Nitrogen use efficiency*=NUE). Gen *CsNitr1-L* merupakan salah satu gen terkait efisiensi penggunaan Nitrogen di tanaman. Tujuan penelitian ini adalah untuk merakit konstruksi kandidat gen *CsNitr1-L* pada plasmid pCAMBIA1300-promotor Ubi1 dan memperoleh padi kultivar Nipponbare hasil transformasi yang telah mengandung konstruk kandidat gen *CsNitr1-L*. Konstruk pCAMBIA-1300::Ubi1::*CsNitr1-L* telah berhasil dirakit dan ditransformasikan ke dalam embrio muda tanaman padi kultivar Nipponbare melalui bantuan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Proses transformasi menghasilkan 146 galur independen generasi T0 Nipponbare. Analisis PCR pada galur-galur T0 menunjukkan 66 diantaranya positif mengandung gen *hptII* dan *CsNitr1-L*. Efisiensi transformasi yang diperoleh adalah sebesar 11,9%. Hasil analisis jumlah salinan transgen menggunakan *Southern Hybridization* pada beberapa galur T0 positif PCR secara acak menunjukkan sebanyak 4 galur T0 memiliki salinan tunggal transgen. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa konstruk gen *CsNitr1-L* telah berhasil diintroduksi ke dalam genom tanaman padi kultivar Nipponbare dan telah diperoleh galur-galur T0 yang positif PCR mengandung gen *hptII* dan *CsNitr1-L* serta kopi tunggal transgen.

Kata Kunci: sifat efisiensi penggunaan Nitrogen, *CsNitr1-L*, konstruksi gen, padi kultivar Nipponbare

PENDAHULUAN

Kebutuhan tanaman terhadap unsur Nitrogen (N) lebih tinggi dibandingkan dengan unsur hara lainnya. Kekurangan unsur N dapat menyebabkan tumbuhan tidak tumbuh secara optimal. Hal ini menjadikan N sebagai faktor pembatas bagi produktivitas tanaman. Tanaman jenis sereal, seperti padi, jagung dan gandum telah diketahui memiliki kemampuan penggunaan unsur N yang rendah yaitu hanya sekitar 33%. Oleh karena itu peningkatan produksi pangan sereal secara langsung juga meningkatkan penggunaan pupuk N dalam jumlah yang besar (Good & Beatty 2011).

Dalam kurun waktu 40 tahun terakhir, jumlah pemberian pupuk N ke tanaman meningkat tajam, dari 12 juta ton per tahun menjadi 104 juta ton per tahun di dunia. Selain berpengaruh pada peningkatan hasil tanaman pertanian, hal ini juga memberikan dampak merugikan bagi lingkungan. Unsur N di tanah yang tidak dimanfaatkan oleh tanaman dapat segera tercuci oleh air sehingga menyebabkan terjadinya eutrofikasi (penumpukan bahan organik dalam ekosistem perairan) dan pencemaran lingkungan. Sebagian unsur N tervolatilasi menjadi gas rumah kaca seperti N₂O yang menyebabkan pemanasan global (Mulvaney *et al.* 2009). Di Indonesia, petani seringkali memberikan pupuk dengan dosis tinggi mencapai 300 sampai 475 kg urea/ha (Wasito *et al.* 2010). Angka ini di atas rekomendasi pemberian pupuk dari pemerintah sebesar 250 sampai 275 kg urea/ha (Badan Litbang Pertanian 2007).

Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan upaya untuk menekan kebutuhan pupuk seminimal mungkin. Salah satunya dengan merakit tanaman pertanian yang lebih efisien dalam penggunaan N (*Nitrogen use efficiency* = NUE). Efisiensi penggunaan N selama pertumbuhan dan perkembangan tanaman terbagi dalam dua fasa yang saling berkaitan yaitu 1) saat pengambilan (*uptake*) dan asimilasi N, dan 2) saat remobilisasi asimilat N selama pembentukan dan pengisian biji. Kedua proses tersebut menentukan efisiensi pemulihan N (*recovery efficiency*) dan efisiensi fisiologi (*physiological efficiency*) (McAlister *et al.*

2012).

Nitrat dan amonium merupakan senyawa nitrogen anorganik di tanah yang diserap oleh tanaman melalui transporter spesifik. Di dalam sel tanaman, nitrat (NO₃⁻) direduksi menjadi nitrit (NO₂⁻) dengan bantuan enzim nitrat reduktase. Nitrit yang berada di sitosol bersifat sangat reaktif dan berpotensi sebagai racun sehingga nitrit segera ditransportasikan ke dalam kloroplas dan plastida (Masclaux-Daubresse *et al.* 2010).

Penelitian gen-gen yang terkait dengan mekanisme pengambilan dan penggunaan nitrogen pada tanaman telah banyak dilakukan. Takahashi *et al.* (1998) telah melakukan studi terhadap transportasi nitrit pada tanaman. Pengamatan influx nitrit ke dalam stroma pada kloroplas yang diisolasi dari tanaman kubis menunjukkan adanya transporter nitrit pada dinding stroma. Ekspresi transporter nitrit tersebut pada kotiledon dipengaruhi oleh cahaya.

Sugiura *et al.* (2007) telah mengisolasi gen transporter nitrit, *CsNitr1-L* dari tanaman mentimun. Ekspresi gen *CsNitr1-L* pada tanaman mentimun dipengaruhi oleh level nitrat yang terdapat di lingkungannya. Gen tersebut mengekspresikan protein transporter nitrit yang berperan sebagai gerbang masuk ion nitrit dari sitoplasma ke kloroplas atau plastida. Keseimbangan antara jumlah amonium/nitrat yang masuk ke dalam sel dan nitrit yang masuk ke kloroplas/plastida mempengaruhi efisiensi tanaman dalam menggunakan Nitrogen di lingkungannya. Adanya pengaruh cahaya terhadap ekspresi *CsNitr1-L* menunjukkan bahwa gen tersebut terkait dengan proses fotosintesis pada tanaman.

Gen *CsNitr1-L* dengan promotor *CaMV35S* telah diintroduksi oleh Sustiprijatno *et al.* (2006) ke dalam padi Nipponbare. Aktivitas gen *CsNitr1-L* meningkat pada padi Nipponbare transgenik dibandingkan dengan kontrol non-transgenik. Hal ini dapat terlihat pada kandungan nitrit pada padi Nipponbare transgenik generasi T0 nyata lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Selain itu, padi Nipponbare transgenik menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan kontrol pada media nutrisi dengan nitrit sebagai sumber nitrogennya.

Padi Nipponbare-CsNitr1-L transgenik digunakan pada penelitian lanjutan sebagai tetua yang disilangkan dengan Ciherang. Turunan BC3 hasil

persilangan tersebut lalu diamati produktivitasnya di lahan terbatas. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa produktivitas beberapa tanaman BC3 cenderung lebih tinggi dibandingkan dengan tetua Ciharang namun tidak berbeda nyata (tidak dipublikasikan). Berdasarkan hasil tersebut maka pada penelitian ini dilakukan konstruksi gen *CsNitr1-L* dengan promotor yang digunakan berbeda dengan penelitian sebelumnya yaitu menggunakan promotor ubiquitin. Modifikasi promotor ini dilakukan untuk meningkatkan ekspresi gen *CsNitr1-L* agar terjadi peningkatan produktivitas yang signifikan pada tanaman padi. Oleh karena itu tujuan dari penelitian adalah untuk merakit konstruk gen *CsNitr1-L* pada plasmid pCAMBIA 1300-promotor Ubi dan memperoleh padi kultivar Nipponbare hasil transformasi yang positif mengandung konstruk gen *CsNitr1-L*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Gen *CsNitr1-L* yang digunakan diisolasi dari tanaman mentimun (*Cucumis sativus* L.) kultivar Jibai. Biji mentimun disterilisasi dengan alkohol 70% dan Bayclin, lalu dibilas menggunakan akuades steril. Biji-biji tersebut direndam dalam akuades steril selama 24 jam. Selanjutnya biji-biji tersebut diberikan perlakuan gelap sesuai dengan prosedur pada penelitian Sugiura *et al.* (2007) untuk meningkatkan ekspresi gen *CsNitr1-L*.

Isolasi RNA total tanaman mentimun kultivar Jibai yang diberi perlakuan gelap dilakukan dengan menggunakan kit Rneasy (Qiagen). RNA total hasil isolasi lalu diubah menjadi cDNA dengan menggunakan cDNA *transcriptor* (Roche). Fragmen gen *CsNitr1-L* diperoleh dari hasil amplifikasi 2 - 5 μ L cDNA tanaman mentimun dengan menggunakan Hifi Taq DNA polimerase (KAPA) serta primer *Forward* 5'-GCGGATCCGCAAAGAGGTAAATAAGAATGG-3' dan primer *Reverse* 5'-GCCCGGGTTAAGCTATCTTAATTGTGTC-3'. Total volume reaksi sebesar 20 μ L. Urutan basa primer mengandung situs enzim restriksi *Bam*HI (*forward*) dan *Xma*I (*reverse*) yang masing masing ditandai dengan garis bawah serta menempel pada 0 pb dan 1828 pb pada urutan basa gen *CsNitr1-L*. Proses amplifikasi

dilakukan menggunakan mesin PCR (MJ Research) dengan program sebagai berikut: tahap inisiasi denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 98°C selama 20 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 55 detik, dan pemanjangan DNA pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahapan program PCR diulang sebanyak 35 siklus dan diakhiri oleh proses pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 2 menit.

Fragmen cDNA hasil amplifikasi dipotong dari gel dan dimurnikan menggunakan *gel purification* kit (QIAGEN). Fragmen yang diperoleh kemudian disambungkan pada vektor pJet1.2 dengan menggunakan enzim *T4 DNA ligase* (Roche). Hasil ligasi ditransformasikan ke bakteri *Escherichia coli* strain *DH5 α* menggunakan teknik *heat shock*. Hasil transformasi diseleksi dengan menumbuhkannya pada media LB yang mengandung ampisilin. Koloni yang tumbuh kemudian diisolasi plasmidnya untuk proses validasi.

Plasmid divalidasi menggunakan enzim *Bam*HI dan *Xma*I. Proses ini akan memotong fragmen tepat pada bagian ujungnya sehingga menghasilkan fragmen *CsNitr1-L* sebesar 1848 bp dan plasmid *pJET1.2* sebesar 2974 bp. Fragmen *CsNitr1-L* kemudian dipotong dari gel dan dimurnikan menggunakan *gel purification kit* (QIAGEN) untuk selanjutnya diligasikan dengan plasmid *pCAMBIA 1300*.

Plasmid *pCAMBIA 1300* dipotong menggunakan enzim *Bam*HI dan *Xma*I lalu fragmen yang diperoleh diisolasi. Fragmen *pCAMBIA 1300* dan *CsNitr1-L* disambung menggunakan enzim *T4 DNA Ligase* (Roche), kemudian ditransformasikan ke bakteri *E. coli* strain *DH5 α* menggunakan teknik *heat shock*. Hasil transformasi diseleksi menggunakan media LB yang mengandung kanamisin (50 mg/L). Koloni hasil transformasi yang tumbuh pada media seleksi dipindahkan ke media LB cair yang mengandung kanamisin serta diisolasi plasmidnya. Selanjutnya plasmid yang diperoleh divalidasi kembali dengan memotongnya menggunakan enzim *Bam*HI dan *Xma*I.

DNA rekombinan ditransformasikan ke bakteri *A. tumefaciens* strain LBA4404 menggunakan metode *freeze-thaw* (Sambrook *et al.*, 1989). Koloni bakteri yang tumbuh pada media YEP diisolasi DNA plasmidnya lalu diverifikasi

menggunakan enzim restriksi dan disekuensing untuk menyakinkan bahwa *A. tumefaciens* telah membawa plasmid rekombinan yang tepat.

Konstruksi kandidat gen *CsNitr1-L* ditransformasikan ke genom tanaman padi menggunakan prosedur dan media pertumbuhan yang diuraikan Slamet-Loedin *et al.* (2014). Embrio muda diambil dari malai padi cv. Nipponbare yang berumur 14 hari setelah polinasi (masa bunting). Transformasi dilakukan dengan meneteskan suspensi *A. tumefaciens* yang mengandung konstruksi kandidat gen *CsNitr1-L* dan asetosiringon di atas embrio muda yang ditempatkan pada media ko-kultivasi.

Embrio yang diinfeksi diinkubasi selama 7 hari pada suhu 25°C dalam kondisi gelap. Setelah ko-kultivasi, tunas yang memanjang dari embrio dibuang dengan menggunakan skalpel, kemudian embrio dipindahkan ke media resting selama 5 hari. Selanjutnya embrio dipindahkan ke media seleksi yang mengandung antibiotik Hygromisin (50 mg/L) selama 3 minggu. Kalus-kalus tahan Hygromisin lalu dipindahkan ke media seleksi yang baru selama 10 hari.

Kalus-kalus yang tahan Hygromisin dan menunjukkan tanda-tanda embriogenik dipindahkan ke media pre-regenerasi dan diinkubasi selama 10 hari. Kalus yang berproliferasi dan mempunyai spot-spot hijau lalu dipindahkan ke media regenerasi. Setelah dua minggu plantlet yang beregenerasi dipindahkan ke media perakaran. Plantlet diaklimatisasi pada suhu ruang selama seminggu, selanjutnya dipindahkan ke ember yang diisi media tanam dan dipelihara di rumah kaca sampai dewasa hingga menghasilkan biji. Kegiatan transformasi dilakukan sebanyak 3 kali.

Isolasi DNA genom daun galur T0 Nipponbare dilakukan dengan menggunakan metode Delaporta *et al.* (1983). Keberadaan gen *CsNitr1-L* dan *hptII* dideteksi dengan teknik PCR menggunakan 2 pasang primer yaitu *CsNitr1-L forward* 5'-CTGCCTCCAACA TTCTACCAACT-3 dan *reverse* 5'-ATCCG GACTTGTTATGACTGCAGC-3 (menempel pada 253 pb dan 954 pb pada urutan basa gen *CsNitr1-L*) serta *HPT forward* 5'-GATTCCT TGCGGTCCGAATG dan *reverse* 5'-TCCGA CCTGATGCAGCTCTC-3, 100 ng DNA cetakan dan Taq Hotstart mix (KAPA). Total

volume reaksi sebesar 10 µL. Reaksi PCR dilakukan dengan siklus sebagai berikut: tahap inisiasi denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik, dan pemanjangan DNA pada suhu 72°C selama 40 detik serta diulang sebanyak 35 siklus. Pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 1 menit.

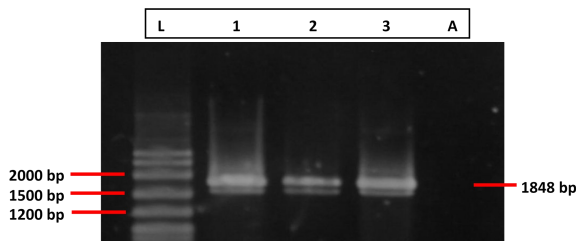
Analisis *Southern Hybridization* dilakukan menggunakan teknik DIG *chemiluminescent* (Trijatniko *et al.* 2011). Sintesis probe dilakukan dengan amplifikasi PCR dan menggunakan komposisi reaksi sesuai dengan prosedur *Enzyme expand high fidelity* (Roche). Sebanyak 15 µg DNA dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *EcoRI* lalu dielektroforesis pada 0,8% agarosa dan ditransfer pada membran nilon. Membran dilabel menggunakan DIG, kemudian dideteksi dengan DIG luminasi.

HASIL

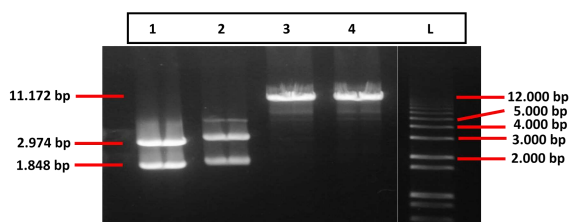
Isolasi kandidat gen *CsNitr1-L* dari tanaman mentimun dan konstruksi pCAMBIA1300::*CsNitr1-L*

Amplifikasi cDNA mentimun menggunakan primer spesifik menunjukkan hasil positif pada ketiga sampel berupa produk PCR sebesar 1848 bp. Produk PCR tersebut merupakan fragmen utuh *CsNitr1-L* yang mendapat tambahan situs enzim restriksi *BamHI* dan *XmaI* masing-masing pada ujung *forward* dan *reverse* (Gambar 1). Situs enzim restriksi ini digunakan untuk mengintegrasikan fragmen hasil kloning ke dalam vektor biner.

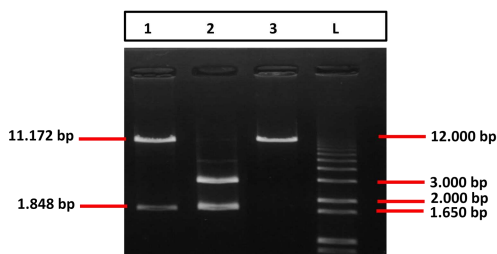
Verifikasi dilakukan pada koloni-koloni yang mengandung hasil ligasi fragmen utuh *CsNitr1-L* dengan plasmid *pJet1.2* yang tumbuh di media seleksi menggunakan enzim restriksi *BamHI* dan *XmaI*. Hasil pemotongan pada dua sampel koloni (no. 1 dan 2) menunjukkan adanya koloni positif (sampel no. 2) yang memiliki ukuran fragmen yang sesuai yaitu fragmen *CsNitr1-L* berukuran 1848 bp dan plasmid *pJet1.2* berukuran 2974 bp (Gambar 2). Plasmid pCAMBIA1300 yang mengandung promotor *Ubiquitin1* dan terminator Nos juga dipotong menggunakan *BamHI* dan *XmaI* untuk



Gambar 1. Amplifikasi cDNA mentimun kultivar Jibai menggunakan primer spesifik *CsNitr1-L*. L, 100 bp plus DNA ladder; 1 -3, sampel cDNA mentimun kultivar Jibai; A, air (kontrol negatif).



Gambar 2. Verifikasi koloni *E. coli* yang mengandung pJet1.2 dengan cDNA *CsNitr1-L* dan pemotongan pCAMBIA1300 menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Xma*I. No. 1 - 2, pJet1.2 koloni 1 dan 2; 3 - 4, pCAMBIA1300 koloni 1 dan 2; L, 1 kb plus DNA ladder



Gambar 3. Verifikasi koloni *E. coli* yang mengandung plasmid rekombinan pCambia1300::*CsNitr1-L* menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Xma*I. No. 1. koloni no 3.1; 2 dan 3: pJet1.2-*CsNitr1-L* dan pCambia1300 (plasmid kontrol), L, 1 kb plus DNA ladder.

diisolasi fragmennya. Hasil pemotongan pada dua sampel plasmid (no. 3 dan 4) diperoleh fragmen pCAMBIA 1300 (beserta promotor *Ubiquitin1* dan terminator Nos) dengan ukuran yang sesuai yaitu 11172 bp (Gambar 2) yang selanjutnya diligasasi dengan fragmen utuh *CsNitr1-L*.

Plasmid rekombinan pCAMBIA1300 dan fragmen *CsNitr1-L* hasil konstruksi diverifikasi

menggunakan enzim restriksi *Bam*HI dan *Xma*I. Hasil pemotongan pada beberapa sampel koloni *E. coli* diperoleh satu koloni positif (sampel no. 3.1) yang mengandung plasmid rekombinan hasil konstruksi. Koloni positif tersebut memiliki ukuran fragmen yang sesuai yaitu fragmen *CsNitr1-L* yang berukuran 1848 bp dan fragmen pCAMBIA1300 yang berukuran 11172 bp (Gambar 3). Selain itu, plasmid rekombinan pCAMBIA1300::*CsNitr1-L* juga diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik daerah promotor *Ubiquitin1* dan terminator Nos. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa plasmid rekombinan tersebut positif merupakan konstruksi pCAMBIA 1300: *CsNitr1-L* (data tidak ditampilkan). Konstruksi pCAMBIA1300::*CsNitr1-L* selanjutnya ditransformasikan ke dalam *A. tumefaciens* strain LBA4404.

Introduksi konstruk pCAMBIA1300::*CsNitr1-L* melalui transformasi genetik dengan bantuan *A. tumefaciens*

Konstruk pCAMBIA1300::*CsNitr1-L* diintroduksi melalui transformasi dengan bantuan *A. tumefaciens* strain LBA4404 ke 370 embrio muda (*immature embryo*) tanaman padi kultivar Nipponbare. Hasil transformasi diperoleh sebanyak 192 kalus yang tahan dan tumbuh di media seleksi yang mengandung antibiotik Higramisin. Kalus-kalus yang tahan tersebut selanjutnya diinduksi tunas dan akhirnya di media induksi yang mengandung Higramisin. Terdapat kalus yang mati dan tidak berkembang di media induksi sehingga diperoleh 146 plantlet T0 Nippobare. Tahapan seleksi kultur kalus embrio muda hasil transformasi padi kultivar Nipponbare pada media pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar 4.

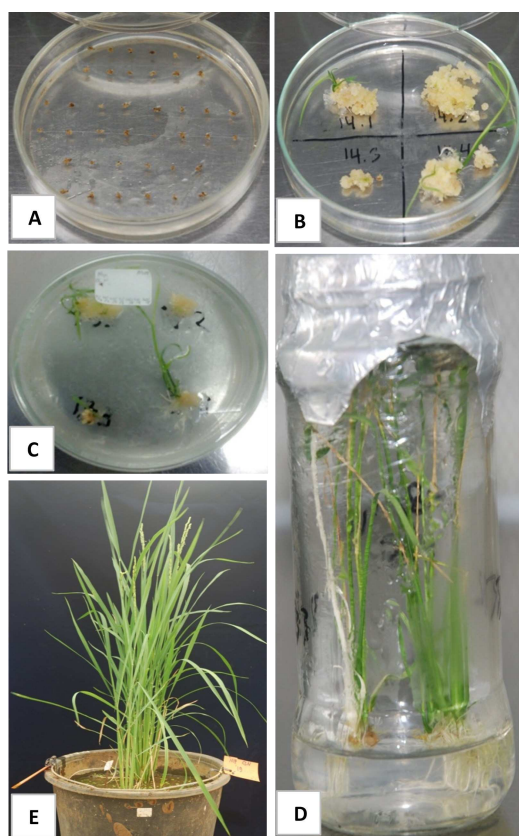
Analisis molekuler galur-galur Nipponbare transforman yang mengandung gen *CsNitr1-L*

Analisis PCR pada 146 galur T0 Nipponbare dilakukan menggunakan primer gen *hptII* dan primer spesifik gen *CsNitr1-L*. Tujuannya adalah untuk mendeteksi keberadaan gen *hptII* yang merupakan gen penanda ketahanan terhadap antibiotik higramisin yang digunakan pada konstruk gen *CsNitr1-L* dan fragmen utuh gen *CsNitr1-L*. Sebanyak 83 galur T0 Nipponbare positif mengandung gen *hptII*, antara lain adalah

galur T0 Nipponbare no 1 dan 2 positif mengandung gen *hptII* dengan adanya pita DNA berukuran 547 bp (Gambar 5).

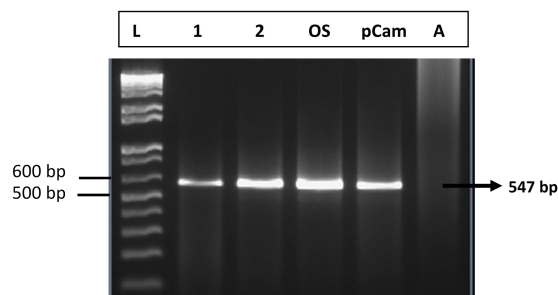
Galur-galur T0 Nipponbare yang positif mengandung gen *hptII* lalu dianalisis PCR menggunakan primer spesifik *CsNitr1-L*. Dari 83 galur T0 yang dianalisis, terdapat 66 galur T0 Nipponbare yang positif mengandung gen *CsNitr1-L*. Hasil analisis PCR dapat dilihat pada Gambar 6 yang menunjukkan dari 15 sampel galur T0 Nipponbare, terdapat 14 sampel positif mengandung gen *CsNitr1-L*. Sampel tanaman T0 yang positif menghasilkan pita DNA berukuran 725 bp (Gambar 6).

Analisis jumlah salinan trasgen pada

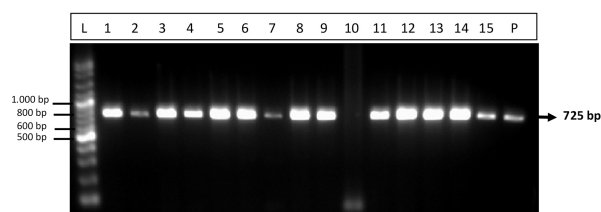


Gambar 4. Tahapan regenerasi dan seleksi kultur kalus padi cv. Nipponbare hasil transformasi gen *CsNitr1-L*. (A) Kultur kalus yang telah dipisahkan dari eksplan embrio hasil transformasi; (B) Kultur kalus yang terinduksi pertumbuhan tunasnya; (C) Pemanjangan tunas; (D) Pemanjangan akar; dan (E) Tanaman T0 padi cv. Nipponbare hasil transformasi di rumah kaca. Tahapan (A) sampai (D) pada media seleksi yang mengandung antibiotik Higromisin.

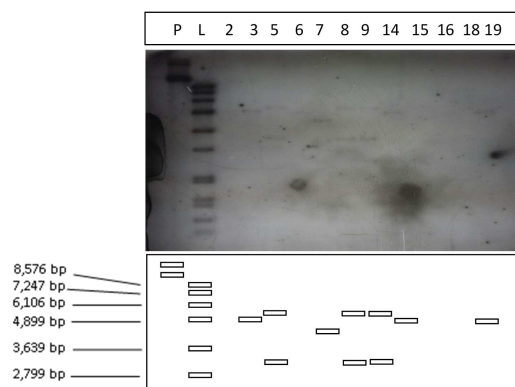
beberapa tanaman T0 positif PCR gen *hptII* dan *CsNitr1-L* dilakukan menggunakan *Southern hybridization*. Pada Gambar 7 dapat dilihat bahwa dari 12 galur T0 yang dianalisis terdapat



Gambar 5. Amplifikasi DNA tanaman T0 Nipponbare hasil transformasi menggunakan primer gen *hptII*. No. L, DNA ladder 100 bp; no. 1 – 2; tanaman T0 Nipponbare-*CsNitr1-L*; OS, tanaman T0 Nipponbare-OspCCK; pCam, pCAMBIA 1300::prUbi1::*CsNitr1-L*::tNOS (kontrol positif); A, air (kontrol negatif).



Gambar 6. Amplifikasi DNA tanaman T0 Nipponbare hasil transformasi menggunakan primer spesifik gen *CsNitr1-L*. No. 10. L, DNA ladder 100 bp; no. 1-15, tanaman T0 Nipponbare-*CsNitr1-L*; P, pCAMBIA1300:: prUbi1:: *CsNitr1-L*:: tNOS (kontrol positif).



Gambar 7. Analisis jumlah salinan trasgen pada tanaman T0 menggunakan *Southern hybridization* terhadap 12 sampel tanaman T0. P, pCAMBIA 1300 ::prUbi1::*CsNitr1-L*::tNOS; L, DNA Molecular Weight Marker VII-DIG labelled; galur T0 no. 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 18, 19.

4 galur T0 yang memiliki salinan tunggal (*single copy*) yaitu T0 no 3, 7, 14 dan 19. Selain itu terdapat 3 galur T0 yang memiliki dua salinan yaitu T0 no. 5, 8 dan 9, sedangkan lima galur T0 yang lain tidak terdapat hasil hibridisasinya.

PEMBAHASAN

Sebelum dimasukkan ke dalam vektor kloning, fragmen utuh *CsNitr1-L* diverifikasi menggunakan sekuensing untuk mengetahui ada tidaknya mutasi nukleotida. Hasil analisis sekuensing menggunakan ClustalW 2.1 menunjukkan bahwa sekuen fragmen cDNA *CsNitr1-L* yang diperoleh memiliki kesamaan nukleotida sebesar 100% dengan sekuen mRNA transporter nitrit mentimun (no. aksesori Z69370.2) di Genbank (Gambar 8). Sekuen aksesori Z69370.2 adalah fragmen cDNA pada penelitian Sugiura *et al.* (2007) yang dirujuk pada penelitian ini.

Konstruk gen *CsNitr1-L* di dalam vektor

backbone yang diekspresikan oleh promotor konstitutif *Ubiquitin1* (pCAMBIA1300::pUbi::*CsNitr1-L::tNOS*) telah berhasil dirakit (Gambar 9). Promotor *Ubiquitin1* memiliki efisiensi kinerja yang lebih baik pada tanaman monokotil dibandingkan dengan CaMV35S (Christensen & Quail 1996, Bassie *et al.* 2000, Farre *et al.* 2012). Promotor 35S-CaMV lebih aktif pada tanaman dikotil dan tidak aktif pada beberapa tipe sel tertentu, seperti pada polen (Li *et al.* 1997).

Persentase efisiensi transformasi yang diperoleh berdasarkan jumlah galur T0 yang positif mengandung gen *hptII* dan *CsNitr1-L* sebesar 11,9% (Tabel 1). Persentase efisiensi transformasi ini lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian Rahmawati *et al.* (2010) yang melakukan transformasi pada eksplan embrio muda padi kultivar Nipponbare menggunakan bakteri *Agrobacterium* dengan strain yang berbeda yaitu *A. tumefaciens* strain LBA288 diperoleh efisiensi transformasi sebesar 1,14%. Duan *et al.* (2012) melakukan transformasi

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
Z69370.2      CCTGTTGTTGGTGTACTTCTGCGAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCAAAGAGGTAATAA
cdNA CsNitr1-L  --TGTTGTTGGTGTACTTCTGCGAGGTCGACTCTAGAGGATCCGCAAAGAGGTAATAA
*****
Z69370.2      GAATGGAGATTGAGTCCCTCAGAGTGAGTGTGATGAGAAGGTTCTGAAAGATGAAGAGA
cdNA CsNitr1-L  GAATGGAGATTGAGTCCCTCAGAGTGAGTGTGATGAGAAGGTTCTGAAAGATGAAGAGA
*****
Z69370.2      AAAATGAGAAAGAAGAAATGAAGATGAAGATGAAGATGAAGAGAAAGCTTGGTGGTGTCA
cdNA CsNitr1-L  AAAATGAGAAAGAAGAAATGAAGATGAAGATGAAGATGAAGAGAAAGCTTGGTGGTGTCA
*****
Z69370.2      AGACAATGCCTTTTCATTCTTGGAATGAAGTGTGCGATAGATTTGCAAGCTCAGGGTTTC
cdNA CsNitr1-L  AGACAATGCCTTTTCATTCTTGGAATGAAGTGTGCGATAGATTTGCAAGCTCAGGGTTTC
*****
Z69370.2      ATTCCAACATTATAACATATTTGACACAAGATCTTAACATGCCTCTTGTTCTGCCTCCA
cdNA CsNitr1-L  ATTCCAACATTATAACATATTTGACACAAGATCTTAACATGCCTCTTGTTCTGCCTCCA
*****
Z69370.2      ACATTCTCACCAACTTTGCTGCAACTTCTAGCTTCACTTCCCTTATCGGCGCTCTCATTG
cdNA CsNitr1-L  ACATTCTCACCAACTTTGCTGCAACTTCTAGCTTCACTTCCCTTATCGGCGCTCTCATTG
*****
Z69370.2      CCGATTCCCTTGCTGGTTCGCTTCTGGACCATCACCATCGCCTCCATCATCTATGAGCTCG
cdNA CsNitr1-L  CCGATTCCCTTGCTGGTTCGCTTCTGGACCATCACCATCGCCTCCATCATCTATGAGCTCG
*****
Z69370.2      GAATGGTTACCATCACCATTTTCAGCTATACTCCCATCGCTCCACCCGCCACCTTGCCCCA
cdNA CsNitr1-L  GAATGGTTACCATCACCATTTTCAGCTATACTCCCATCGCTCCACCCGCCACCTTGCCCCA
*****
Z69370.2      CCCAAATCAATTGCACGCAAGCATCCGGCAGCAACTAATGATCCTTTATCTCGCCCTAC
cdNA CsNitr1-L  CCCAAATCAATTGCACGCAAGCATCCGGCAGCAACTAATGATCCTTTATCTCGCCCTAC
*****
Z69370.2      TCCTCACATCTCTGGCGCAGGCGGTATTCGACCTGTGTTGTTGCATTTGCCGCCGACC
cdNA CsNitr1-L  TCCTCACATCTCTGGCGCAGGCGGTATTCGACCTGTGTTGTTGCATTTGCCGCCGACC
*****
Z69370.2      AATTCGACATGACGAAGGTCGGTATTGCAGGGCGAACGTGGAACCTTCTCAATTGGTACT
cdNA CsNitr1-L  AATTCGACATGACGAAGGTCGGTATTGCAGGGCGAACGTGGAACCTTCTCAATTGGTACT
*****
Z69370.2      ATTTTGCATGGGAATGGCGACTCTCACAGCCCTGACCGTGGTGGTGTATATTCAAGACA
cdNA CsNitr1-L  ATTTTGCATGGGAATGGCGACTCTCACAGCCCTGACCGTGGTGGTGTATATTCAAGACA
*****
    
```

Gambar 8. Analisis kesamaan nukleotida menggunakan ClustalW 2.1 (Sekuen acuan adalah *Sequence ID*. Z69370.2).

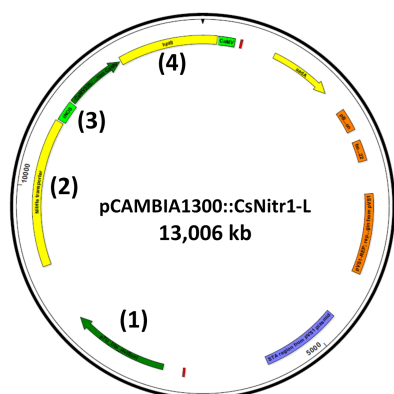
Enggarini dkk.

```

Z69370.2      ACGTGGGGTGGGGTGGGGTTCGGCCTTCCGACCATAGCCATGGCCTTGTCTGTTGTGG
cDNA CsNitr1-L ACGTGGGGTGGGGTGGGGTTCGGCCTTCCGACCATAGCCATGGCCTTGTCTGTTGTGG
*****
Z69370.2      CATTTGTTGTGGGCTCGCCACTTTACAACAACTCAAGCCAAGTGGGAGCCCTTTGGTTC
cDNA CsNitr1-L CATTTGTTGTGGGCTCGCCACTTTACAACAACTCAAGCCAAGTGGGAGCCCTTTGGTTC
*****
Z69370.2      GATTGGCTCAGGTTGTGGTTGCGGCCCTCAAGAACCAGAAAGGCTGTTTTGCCTGATGACT
cDNA CsNitr1-L GATTGGCTCAGGTTGTGGTTGCGGCCCTCAAGAACCAGAAAGGCTGTTTTGCCTGATGACT
*****
Z69370.2      CTAAGCTTTTGTATAGGAACCATGAGCTTGATGCTGCCATTGCTATTCAAGGAAGGCTTG
cDNA CsNitr1-L CTAAGCTTTTGTATAGGAACCATGAGCTTGATGCTGCCATTGCTATTCAAGGAAGGCTTG
*****
Z69370.2      TCCACACTGATCAGTTCAAGTGGTTGGACAAGGCTGCAGTCATAACAAGTCCGGATTCAA
cDNA CsNitr1-L TCCACACTGATCAGTTCAAGTGGTTGGACAAGGCTGCAGTCATAACAAGTCCGGATTCAA
*****
Z69370.2      CAGCCAATCCACCGAATCTGTGGCGGCTGGCCACCGTGCACAGAGTCGAAGAGCTAAAAAT
cDNA CsNitr1-L CAGCCAATCCACCGAATCTGTGGCGGCTGGCCACCGTGCACAGAGTCGAAGAGCTAAAAAT
*****
Z69370.2      CCATCATTAGAATGCTTCCAATATGGGCGGCCGAATCCTCCTAGTGACAGCCTCATCTC
cDNA CsNitr1-L CCATCATTAGAATGCTTCCAATATGGGCGGCCGAATCCTCCTAGTGACAGCCTCATCTC
*****
Z69370.2      ATCAACACAGCTTCACAATCCAACAAGCTAGAACAATGAACCGTCATCTAACACCCACCT
cDNA CsNitr1-L ATCAACACAGCTTCACAATCCAACAAGCTAGAACAATGAACCGTCATCTAACACCCACCT
*****
Z69370.2      TCCAAATTCACCCGCCACCCTCTCCATCTTCGGCATCCTATCGATGCTCACCGGCCTCG
cDNA CsNitr1-L TCCAAATTCACCCGCCACCCTCTCCATCTTCGGCATCCTATCGATGCTCACCGGCCTCG
*****
Z69370.2      TTCTCTACGACCGTCTCCTCGTCCCCTTCGCCAAAAAGCTCACCCACAACCCCTCGGGCA
cDNA CsNitr1-L TTCTCTACGACCGTCTCCTCGTCCCCTTCGCCAAAAAGCTCACCCACAACCCCTCGGGCA
*****
Z69370.2      TCACTTGCCCTCAACGAATGGGTGTAGGTTTCGCCATCAACATCCTCGCCACCCCTAGTCT
cDNA CsNitr1-L TCACTTGCCCTCAACGAATGGGTGTAGGTTTCGCCATCAACATCCTCGCCACCCCTAGTCT
*****
Z69370.2      CATCCATTGTTGAAATCAAACGAAAAAAGTGCCTGCAAACCATGGTTTGCTCGACAATC
cDNA CsNitr1-L CATCCATTGTTGAAATCAAACGAAAAAAGTGCCTGCAAACCATGGTTTGCTCGACAATC
*****
Z69370.2      CAACCGCAACAATTCCATTTAGCGTGTGGTGGTACCACAGTTTTGGCTTCATGGGA
cDNA CsNitr1-L CAACCGCAACAATTCCATTTAGCGTGTGGTGGTACCACAGTTTTGGCTTCATGGGA
*****
Z69370.2      TCGCGGAGGTGTTTCATGTCGGTTGGGCATTTGGAGTTCATGTACGACCAGTCGCGGGAGA
cDNA CsNitr1-L TCGCGGAGGTGTTTCATGTCGGTTGGGCATTTGGAGTTCATGTACGACCAGTCGCGGGAGA
*****
Z69370.2      GCTTGAGGAGTACAGCAACGGCGTGTATTGGCTCGCAATATCGGTGGGAAATTATATAG
cDNA CsNitr1-L GCTTGAGGAGTACAGCAACGGCGTGTATTGGCTCGCAATATCGGTGGGAAATTATATAG
*****
Z69370.2      GGACATTGATGGTTTATCTTGTGCATAAGTATACTGGGGAAGAGCATAATTGGTTGCCCTG
cDNA CsNitr1-L GGACATTGATGGTTTATCTTGTGCATAAGTATACTGGGGAAGAGCATAATTGGTTGCCCTG
*****
Z69370.2      ATAGGAATTTGAATAGAGGAAGATTGGAGTATTATTATGGTTAGTGAGTGGGATTCAAG
cDNA CsNitr1-L ATAGGAATTTGAATAGAGGAAGATTGGAGTATTATTATGGTTAGTGAGTGGGATTCAAG
*****
Z69370.2      TTATGAATCTTGTGATTATGTGATTTGTGCTTGGTTTTATACTTATAAGCCTTTGGAAG
cDNA CsNitr1-L TTATGAATCTTGTGATTATGTGATTTGTGCTTGGTTTTATACTTATAAGCCTTTGGAAG
*****
Z69370.2      AGGAGAAGATTAACATAGAGAACAAGATGGTGTCAAGAGTGGGAGAGGTGTGAAGACA
cDNA CsNitr1-L AGGAGAAGATTAACATAGAGAACAAGATGGTGTCAAGAGTGGGAGAGGTGTGAAGACA
*****
Z69370.2      CAATTAAGATAGCTTAACCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTG
cDNA CsNitr1-L CAATTAAGATAGCTTAACCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCCCGATCGTTCAAACATTTG
*****

```

Gambar 8 . Lanjutan.



Gambar 9. Peta konstruk pCambia1300::pUbi::CsNitr1-L. (1) promotor Ubiquitin (1,232 bp); (2) gen *CsNitr1-L* (1,845 bp); (3) terminator *nopaline synthase* (254 bp); dan (4) gen *hptII* (*Hygromisin fosfotransferase*) (1,244 bp) yang merupakan penanda seleksi.

Tabel 1. Hasil transformasi embrio muda padi kultivar Nipponbare dengan konstruk pCambia1300::CsNitr1-L melalui *A. tumefaciens* strain LBA4404.

Transfor masi ke	Jumlah embrio muda	Jumlah kalus tahan seleksi Higromisin	Jumlah tanaman	Jumlah tanaman positif PCR <i>hptII</i> dan <i>CsNitr1-L</i>
1	278	128	24	10
2	184	96	108	46
3	92	48	14	10
Total	554	272	146	66 (11,9%)

dengan bantuan *Agrobacterium* yang berbeda yaitu *A. tumefaciens* strain EHA105 dan menggunakan eksplan yang berbeda yaitu kalus padi kultivar Nipponbare, diperoleh efisiensi transformasi yang lebih tinggi sebesar 47,5%. Berdasarkan hal tersebut maka efisiensi transformasi dengan menggunakan eksplan embrio muda dapat ditingkatkan dengan cara memanen malai pada umur yang optimal untuk transformasi yaitu 8-12 hari setelah bunga padi mekar (Slamet-Loedin *et al.* 2014) dan menggunakan strain *A. tumefaciens* yang lebih responsif untuk transformasi sebagai contoh *A. tumefaciens* strain EHA105 (Vikrant *et al.* 2012).

Dari hasil analisis *Southern hybridization* terdapat lima galur T0 yang tidak terdapat hasil hibridisasinya. Hal ini kemungkinan disebabkan konsentrasi DNA yang digunakan terlalu kecil, karena saat dianalisis PCR menggunakan

primer gen *hptII*, kelima galur T0 tersebut positif mengandung gen *hptII* dengan diperoleh pita DNA dengan ukuran yang sesuai. Berdasarkan hasil tersebut maka perlu dilakukan kembali analisis *Southern hybridization* terhadap lima galur T0 yang negatif dan galur-galur T0 yang lain.

Peningkatan ekspresi gen *CsNitr1-L* diketahui berpengaruh terhadap regulasi pengaturan dalam penyerapan nitrat dan nitrit dengan cara mempercepat transport nitrit dari sitoplasma ke plastid. Kombinasi gen-gen yang mempercepat transportasi nitrit di dalam tanaman diharapkan dapat menekan penggunaan pupuk N. Oleh karena itu galur-galur T0 Nipponbare yang positif PCR mengandung gen *hptII* dan *CsNitr1-L* serta salinan tunggal transgen akan dianalisis lebih lanjut tingkat ekspresi gen *CsNitr1-L* dan keragaan agronomis di media perlakuan dengan kandungan Nitrogen rendah pada generasi selanjutnya.

KESIMPULAN

Kandidat gen *CsNitr1-L* telah berhasil dikonstruksi pada vektor biner pCambia1300-promotor *Ubiquitin1*-terminator NOS yang juga mengandung gen *hptII* sebagai penanda antibiotik. Introduksi konstruk pCambia1300:: CsNitr1-L dengan bantuan *A. tumefaciens* strain LBA4404 ke dalam padi kultivar Nipponbare menghasilkan 66 galur independen T0 Nipponbare yang positif mengandung gen *hptII* dan *CsNitr1-L* dengan efisiensi transformasi sebesar 11,9%. Empat galur T0 diantaranya yaitu no. 3, 7, 14 dan 19 memiliki salinan tunggal transgen yang dapat dilanjutkan untuk pengujian tingkat ekspresi gen *CsNitr1-L* dan fenotipik di rumah kaca.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada semua pihak yang telah membantu penelitian ini khususnya kepada Ika Atifah Zahroh, S.Si., Nur Aeny, S.Si., Rizqi Ammar Abdussalam, S.Si., Bapak Heri Hersusatio dan Ibu Nuryati. Penelitian ini didanai oleh APBN BB BIOGEN No. Register 1.798.011.001.015.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Litbang Pertanian. 2007. Petunjuk Teknis Lapang: Pengelolaan tanaman terpadu padi sawah irigasi. Badan Litbang Pertanian Press.
- Bassie L., M. Noury, O. Lepri, T. Lahaye, P. Christou & T. Capell. 2000. Promoter strength influences polyamine metabolism and morphogenic capacity in transgenic rice tissues expressing the oat *adc* cDNA constitutively. *Transgenic Research* 9: 33-42.
- Christensen AH & Quail PH. 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research* 5:213-218.
- Farre G, D. Sudhakar, S. Naqvi, G. Sandmann, P. Christou, T. Capell & C. Zhu. 2012. Transgenic rice grains expressing a heterologous *q*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase shift tocopherol synthesis from the *c* to the *a* isoform without increasing absolute tocopherol levels. *Transgenic Research* 21: 1093-1097.
- Good A. G. & P. H. Beatty. 2011. Fertilizing nature: a tragedy of excess in the commons. *Plos Biology* 9 (8): 1-9.
- Li, Z., NM. Upadhyaya, S. Meena, AJ. Gibbs & PM. Waterhouse. 1997. Comparison of promoters and selectable marker genes for use in *Indica* rice transformation. *Molecular Breeding* 3:1-14.
- Masclaux-Daubresse C., F. Daniel-Vedele, J. Dechorgnat, F. Chardon, L. Gaufichon & A. Suzuki. 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105: 1141-1157.
- McAllister, CH., PH. Beatty & AG. Good. 2012. Engineering nitrogen use efficient crop plants: the current status. *Plant Biotechnology Journal* 10: 1011-1025.
- Mulvaney, R.L., SA. Khan & TR. Ellsworth. 2009. Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production. *Journal of Environment Quality* 38: 2295-2314.
- Rahmawati S., OA. Jefferson. D. Sopandie, Suharsono & IH. Slamet-Loedin. 2010. Comparative analysis of rice transformation using *Agrobacterium tumefaciens* dan *Rhizobium leguminosarum*. *Indonesian Journal of Biotechnology* 15(1): 37-45.
- Slamet-Loedin IH., P. Chadha-Mohanty & L. Torrizo. 2014. *Agrobacterium*-mediated transformation: Rice transformation. Ed. Henry R. J., Furtado A. *Cereal Genomics: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology 1099: 261-271.
- Sugiura M & M. Takahashi. 2001. Isolation of a cDNA coding for nitrite transporter of chloroplast envelope membranes of cucumber. Unpublished.
- Sugiura M., MN. Georgescu & M. Takahashi. 2007. A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 48(7): 1022-1035.
- Sustiprijatno, M. Sugiura, K. Ogawa & M. Takahashi. 2006. Improvement of nitrate- and nitrite-dependent growth of rice by the introduction of a constitutively expressing chloroplastic nitrite transporter. *Plant Biotechnology* 23: 47-54.
- Trijatmiko, KR., N. Oliva, IH. Slamet-Loedin & A. Kohli. 2011. Molecular analyses of transgenic plants. Ed. Twyman RM, Christou P. *Methods in Molecular Biology: Multigene Engineering in Plants*. Springer NY.
- Vikrant, R., Maragathamani & P. Khurana. 2012. Somatic embryogenesis from mature caryopsis culture under abiotic stress and optimization of *Agrobacterium*-mediated transient GUS gene expression in embryogenic callus of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Phytology* 4 (5): 16-25
- Wasito, M. Sarwani & EE. Ananto. 2010. Persepsi dan adopsi petani terhadap teknologi pemupukan berimbang pada tanaman padi dengan indeks pertanaman 300. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 29(3): 157-165.