

Keragaman Jumlah Salinan Transgen Galur T₀ Padi Kultivar Nipponbare Berdasarkan Analisis qPCR dengan Penanda Gen *hptII*

(Diversity of Transgene Copy Number on T₀ Rice Lines of Nipponbare Based on qPCR Analysis Using *hptII* Gene Marker)

Aqwin Polosoro* dan Wening Enggarini

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: aqwin@pertanian.go.id

Diajukan: 20 Juli 2016; Direvisi: 6 September 2016; Diterima: 18 November 2016

ABSTRACT

The development of transgenic crop using *Agrobacterium tumefaciens* produces different inserted transgenes, whether copy numbers or location in the plant genome. The research was performed to detect chimeric phenomena based on the transgene quantity analysis in tillers of a clump and of some clumps which were derived from the same calli. *CsNitr1-L* gene and *hptII* gene as a marker on a binary plasmid pCAMBIA1300 was transformed into the Nipponbare rice genome using *A. tumefaciens* strain LBA 4404. Molecular analysis was carried out on three tillers of each four clumps of Nipponbare transgenic T₀ generation (events number 1, 2, 3, and 4) and four groups of T₀ clump derived from one callus. Three T₀ clump samples were collected from each of the four groups of T₀ clumps. The results of qPCR analysis showed that the transgene copy numbers of tillers which were derived from one T₀ clump were the same. qPCR analysis also discovered that not all plants from one callus demonstrated the same transgene copy numbers. This implies that each T₀ rice clump which grows from the transformed calli was needed to be split in the acclimatization step so that the uniform T₁ seeds would be obtained.

Keywords: Copy number, qPCR, *Agrobacterium tumefaciens*, Nipponbare.

ABSTRAK

Perakitan tanaman transgenik dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* menghasilkan penyisipan transgen yang berbeda, baik dalam jumlah salinan maupun letak transgen dalam genom tanaman. Penelitian ini bertujuan mendeteksi keberadaan kimera berdasarkan analisis jumlah salinan transgen pada tiap anakan dalam satu rumpun dan beberapa rumpun padi Nipponbare transforman T₀ yang berasal dari kalus yang sama. Gen *CsNitr1-L* dan *hptII* sebagai penanda pada plasmid biner pCAMBIA1300 ditransformasikan ke dalam genom tanaman padi kultivar Nipponbare dengan bantuan *A. tumefaciens* strain LBA 4404. Analisis molekuler dilakukan terhadap tiga anakan masing-masing dari empat rumpun tanaman Nipponbare transgenik generasi T₀ (*event* 1, 2, 3, dan 4) dan empat kelompok rumpun tanaman T₀ yang berasal dari kalus yang sama. Dari setiap kelompok tersebut diambil tiga rumpun T₀. Hasil analisis qPCR menunjukkan bahwa anakan yang berasal dari rumpun tanaman T₀ yang sama memiliki jumlah salinan transgen yang seragam. Selain itu, hasil analisis qPCR juga menunjukkan bahwa tidak semua tanaman yang berasal dari kalus yang sama memiliki jumlah salinan transgen yang seragam. Implikasi hasil penelitian ini adalah setiap rumpun padi T₀ yang tumbuh dari kalus hasil transformasi perlu dipisahkan saat aklimatisasi agar benih T₁ yang dihasilkan seragam.

Kata kunci: Jumlah salinan, qPCR, *Agrobacterium tumefaciens*, Nipponbare.

PENDAHULUAN

Perakitan tanaman transgenik menggunakan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* memungkinkan terjadinya penyisipan transgen yang berbeda, baik dalam jumlah salinan maupun letak transgen dalam genom tanaman. Jumlah salinan transgen lebih dari satu dapat mengubah pola penyisipan transgen di dalam genom tanaman target di wilayah tempat penyisipan maupun secara keseluruhan. Perubahan pola tersebut meliputi adanya pemotongan gen, inversi, delesi, penyusunan ulang kromosom, dan metilasi DNA (Tenea dan Cucu, 2006).

Keberhasilan transformasi dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu genotipe tanaman, jenis vektor biner, strain *A. tumefaciens*, senyawa penginduksi gen *vir*, media kultur, dan suhu lingkungan (Opabode, 2006). Jumlah salinan transgen pada tanaman bergantung pada jenis vektor biner dan virulensi strain *A. tumefaciens*. Vektor biner memiliki bagian replikasi yang mengatur fungsi replikasi vektor di dalam *A. tumefaciens* dan *Escherichia coli*. Semakin banyak jumlah salinan vektor biner, semakin banyak T-DNA yang ditransfer, mengakibatkan meningkatnya jumlah salinan transgen dalam genom tanaman (Wang, 2006).

Selama tahapan kultur jaringan dalam proses pengembangan tanaman transgenik, terdapat beberapa kendala yang dihadapi, antara lain terjadinya kimera. Kimera adalah jaringan yang terdiri atas campuran sel transgenik dan nontransgenik yang disebabkan oleh integrasi transgen dan variasi ekspresi transgen pada jaringan tanaman putatif transgenik (Costa *et al.*, 2014). Regenerasi tunas yang bersifat kimera mengakibatkan tunas memiliki jaringan heterogen yang terdiri atas sel-sel yang memiliki integrasi transgen berbeda-beda (Li *et al.*, 2009). Selain itu, kimera dapat juga dipengaruhi oleh penyisipan transgen yang bersifat acak dalam genom tanaman. Transgen dapat terintegrasi tunggal atau lebih dari satu salinan dalam genom tanaman (Anami *et al.*, 2013).

Real-time PCR (RT-PCR) atau dikenal juga dengan *quantitative* PCR (qPCR) adalah metode analisis kuantitatif terkini yang dinilai akurat dalam deteksi kimera pada jaringan transforman. Hal ini penting dilakukan untuk menyeleksi kimera sebelum pengembangan generasi transforman lanjut. Dalam reaksi qPCR diperlukan senyawa pelapor (*reporter*) yang berperan dalam memberikan sinyal untuk mengetahui jumlah ampikon yang terbentuk. Kuantitas sinyal bergantung pada beberapa komponen utama, seperti jumlah DNA sampel, marka, pelapor, dNTPs,

dan jumlah enzim Taq DNA polimerase (Kubista *et al.*, 2001). Dengan mengetahui jumlah ampikon, dapat diketahui besaran konsentrasi sampel yang dianalisis, baik menggunakan kurva standar (kuantifikasi absolut) maupun kuantifikasi relatif (Livac dan Schmittgen, 2001). Analisis qPCR dapat juga diaplikasikan untuk penentuan konsentrasi DNA, deteksi gen yang memiliki konsentrasi sangat rendah dalam sampel, analisis tingkat ekspresi gen, dan penentuan jumlah salinan gen dalam genom.

Beberapa hasil penelitian menunjukkan aplikasi qPCR dalam perakitan tanaman transgenik. Hasil penelitian Faize *et al.* (2010) menggunakan analisis qPCR terhadap tembakau transgenik menunjukkan adanya perbedaan kuantitas DNA transgen pada tunas bagian atas dengan tunas bagian bawah. Hal ini memperlihatkan adanya kimera pada jaringan tembakau transgenik. Costa *et al.* (2014) menggabungkan analisis qPCR dan *Southern blot* untuk mendeteksi kimera pada *Vitis vinifera* transgenik, diperoleh hasil dari sembilan galur transforman terdapat satu galur yang bersifat kimera karena memiliki kuantitas DNA dan ekspresi transgen yang sangat rendah.

Gen *CsNitr1-L* adalah gen yang mengekspresikan protein pentranspor nitrit (*nitrite transporter*) pada membran plastid atau kloroplas, diisolasi dari *Cucumis sativus* L. cv. Jibai. Gen ini berfungsi meningkatkan efisiensi penyerapan nitrogen pada tanaman (Sugiura *et al.*, 2007; Sustiprijatno *et al.*, 2006). Dalam penelitian ini digunakan galur-galur transforman T₀ padi Nipponbare yang mengandung transgen *CsNitr1-L* sebagai materi genetiknya. Sampai saat ini, telah diperoleh 97 galur T₀ yang telah dianalisis PCR positif mengandung gen *CsNitr1-L* dan gen penanda higromisin fosfotransferase (*hptII*). Tujuan penelitian adalah mendeteksi kimera secara kuantitatif pada tiap anakan dalam satu rumpun dan beberapa kelompok rumpun padi Nipponbare yang mengandung transgen *CsNitr1-L* yang berasal dari satu kalus.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah galur-galur putatif transforman T₀ padi kultivar Nipponbare yang mengandung T-DNA dengan sisipan gen target *CsNitr1-L* dan gen penanda *hptII* (Gambar 1). Analisis keragaman transgen dilakukan terhadap dua jenis bahan tanaman, yaitu (1) anakan dalam satu rumpun galur transforman T₀ dan (2) beberapa kelompok rumpun galur transforman T₀ yang berasal dari satu kalus saat seleksi pada media regenerasi. Kedua jenis bahan tanaman tersebut berasal dari *event* transformasi yang sama.

Isolasi DNA Galur T₀ Transforman Putatif Nipponbare *CsNitr1-L*

Untuk analisis keragaman transgen pada anakan dari satu rumpun digunakan empat nomor rumpun galur T₀ transforman, yaitu nomor 1, 2, 3, dan 4. Dari setiap rumpun galur T₀ diambil tiga anakan untuk diisolasi DNA-nya sehingga terdapat dua belas sampel, yaitu 1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, dan 4C.

Analisis keragaman transgen terhadap beberapa kelompok rumpun galur T₀ transforman yang berasal dari satu kalus dilakukan dengan memilih empat kelompok rumpun yang masing-masing berasal dari empat kalus transforman (T₀) yang berbeda, yaitu nomor 26, 27, 28, dan 31. Dari tiap kalus diambil tiga rumpun untuk diisolasi DNA-nya sehingga terdapat dua belas sampel, yaitu nomor 26.3, 26.4, 26.5, 27.3, 27.4, 27.5, 28.4, 28.5, 28.6, 31.1, 31.2, dan 31.3. Isolasi DNA genom dari daun padi T₀ dilakukan menggunakan metode Dellaporta *et al.* (1983).

Analisis PCR DNA Galur T₀ Transforman Putatif Nipponbare *CsNitr1-L*

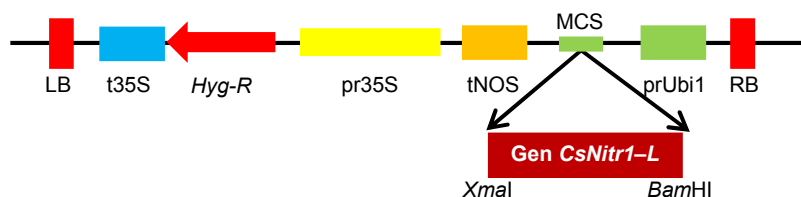
Analisis molekuler dengan PCR bertujuan memastikan seluruh sampel galur T₀ transforman adalah transgenik putatif yang mengandung sisipan gen target *CsNitr1-L* dan gen penanda *hptII*. Amplifikasi gen target dilakukan dengan marka spesifik gen *CsNitr1-L*, yaitu F-5'-CTGCCTCC-AACATTCTCACCAACT-3' dan R-5'-ATCCGGACT-TGTTATGACTGCA-GC-3', untuk gen *hptII* dilakukan dengan marka F-5'-GATTCCTT-GCGGTCC-GAATG-3' dan R-5'-TCCGACCTGATG-CAGCTCTC-3'. Komponen reaksi PCR terdiri atas 100 ng DNA, 1 unit enzim Taq

DNA polimerase, 1 µl masing-masing marka *forward* dan *reverse* (5 mM), bufer PCR 1×, serta ddH₂O dengan total volume reaksi 10 µl. Reaksi PCR dilakukan di dalam mesin PCR dengan program, yaitu denaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan marka pada suhu 60°C selama 30 detik, dan pemanjangan marka pada suhu 72°C selama 45 detik. Sebanyak 5 µl produk PCR diseparasi dengan menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1% dengan larutan bufer TBE 0,5×, diwarnai dengan pewarnaan GelRed™ dan divisualisasikan dengan sinar UV menggunakan instrumen *gel doc*.

Hasil PCR dengan marka spesifik gen *CsNitr1-L* lalu dikonfirmasi ulang dengan sekuensing menggunakan enam marka. Keenam marka tersebut berada di dalam sekuen transgen *CsNitr1-L* dan digunakan untuk memeriksa ada tidaknya mutasi kodon pada sekuen transgen. Hasil sekuensing lalu dianalisis dengan program *DNA STAR Sequence Manager*. Sekuen dan lokasi penempelan marka di dalam sekuen transgen *CsNitr1-L* ditampilkan pada Tabel 1.

Kuantifikasi DNA Galur T₀ Transforman Putatif Nipponbare *CsNitr1-L*

DNA genomik galur transforman T₀ yang positif mengandung gen *CsNitr1-L* dikuantifikasi dengan fluorometer. Hasil kuantifikasi digunakan sebagai dasar untuk menyeragamkan konsentrasi DNA sebelum dianalisis menggunakan qPCR. Pengenceran dilakukan dengan air hingga konsentrasi DNA sampel 5 ng/µl.



Gambar 1. Diagram skematis kaset T-DNA gen *CsNitr1-L* (Santoso *et al.*, 2015).

Tabel 1. Sekuen dan lokasi penempelan marka yang digunakan untuk sekuensing gen *CsNitr1-L*.

Nama primer	Sekuen primer (5'→3')	Tempat penempelan primer (bp)*
7 (Forward)	GCCCTGCCTTCATACGCTAT	61
8 (Forward)	ATTCGACCCTGTGTTGTTGC	697
9 (Forward)	ATCCTATCGATGCTCACCGG	1376
10 (Reverse)	TTCGTTGGAGGCAAGTGATG	1369
12 (Reverse)	TAATCATCGCAAGACCGGCA	1991
22 (Reverse)	TGCAATACCGACCTTCGTC	650

*Tempat penempelan marka pada urutan basa gen *CsNitr1-L*.

Analisis Jumlah Salinan Transgen pada Galur T₀ Transforman Putatif Nipponbare *CsNitr1-L*

Untuk penentuan jumlah salinan T-DNA pada galur T₀ transforman padi Nipponbare, digunakan sampel DNA padi yang telah dikuantifikasi sebelumnya dan tiap sampel DNA terdiri atas tiga ulangan. Komponen reaksi yang digunakan terdiri atas 5 µl *mastermix* KAPA SYBR® FAST yang mengandung SYBR® Green dan ROX *reference dye*, 0,2 µl masing-masing marka *forward* dan *reverse* (10 mM), 1 µl DNA cetakan, serta ddH₂O dengan total volume reaksi 10 µl. Sekuen marka gen *hptII*, yaitu F-5'-CGAAATTGCCGTCAACCAAGC-3' dan R-5'-CTGGAGCGAGGCGATGTTC-3' (Montesinos, 2014). Sebagai gen kontrol intraseluler (*housekeeping gene*) digunakan gen aktin/*rice actin 1 (Act1)* dengan sekuen marka F-5'-CCTCTTCCA-GCCTTCCTTCATA-3' dan R-5'-GCAATGCCAGGG-AACATAGTG-3' (Campo *et al.*, 2008). Mesin qPCR yang digunakan adalah ABI PRISM® 7000 dengan program *Absolute Quantification*.

Data yang diperoleh adalah nilai Ct yang kemudian dianalisis dengan metode Livac (Livac dan Schmittgen, 2001) sehingga diperoleh jumlah salinan relatif terhadap sampel terkecil. Metode tersebut menjelaskan persamaan sebagai berikut.

$$\text{Jumlah target} = 2^{\Delta\Delta CT} \quad (1)$$

dengan

$$-\Delta\Delta CT = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb}) \quad (2)$$

Pada persamaan (1), ΔC_T adalah selisih dari C_T gen target (*hptII*) dengan C_T gen referensi (aktin). $\Delta C_{T,q}$ menunjukkan nilai ΔC_T sampel ke-n dan $\Delta C_{T,cb}$ menunjukkan nilai terkecil sampel (sebagai kalibrator). Selain menggunakan metode tersebut, analisis statistik juga dilakukan dengan menghitung simpangan deviasi pada tiap sampel.

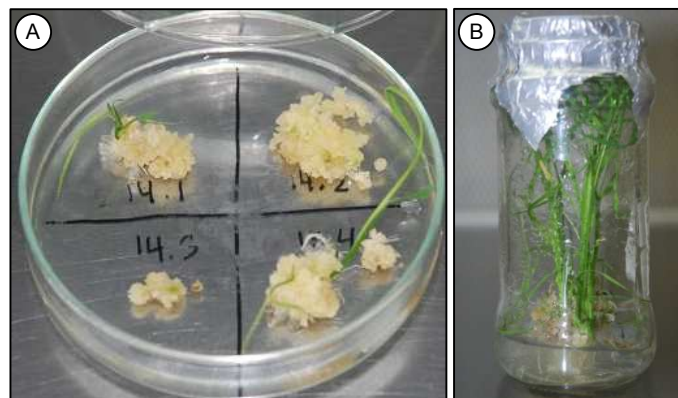
Validasi qPCR

Eksperimen qPCR memerlukan proses validasi. Validasi eksperimen qPCR dilakukan dengan dua langkah. Langkah pertama adalah mengamati kurva disosiasi yang menunjukkan titik leleh produk PCR yang dihasilkan. Apabila puncak kurva disosiasi yang dihasilkan lebih dari satu, hal ini berarti reaksi PCR menghasilkan lebih dari satu produk, sedangkan apabila puncak kurva disosiasi menunjukkan nilai yang berbeda, berarti produk PCR yang dihasilkan berbeda satu sama lain. Langkah kedua adalah penentuan nilai ambang atau *Ct threshold*. Nilai ambang adalah nilai delta Rn dengan kurva amplifikasi berada pada posisi linear. Penentuan nilai ambang dapat dilakukan dengan menggeser garis horizontal pada kurva amplifikasi sehingga didapatkan posisi saat kurva amplifikasi dalam kondisi linear. Jika nilai ambang sudah ditetapkan, maka nilai C_T setiap sampel dapat ditentukan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Galur Transforman T₀ Nipponbare *CsNitr1-L*

Gen *CsNitr1-L* telah berhasil ditransformasikan ke dalam genom padi Nipponbare dengan bantuan *A. tumefaciens* dan terbukti beberapa kalus tahan di media seleksi higromisin. Kalus-kalus yang tahan dapat tumbuh dan berkembang menjadi tunas pada media seleksi regenerasi. Dari satu kalus dapat diperoleh beberapa tunas yang selanjutnya setiap tunas dapat dipisahkan dan ditumbuhkan menjadi rumpun tanaman. Terlihat pada Gambar 2, kalus nomor 14.1 dan 14.4 adalah kalus yang masing-masing menghasilkan tunas dan menjadi kelompok rumpun, sedangkan kalus nomor 14.2 dan 14.3 tidak menghasilkan tunas. Tunas-tunas yang telah meman-



Gambar 2. Penampilan kalus dan planlet Nipponbare transgenik. A = kalus transforman putatif Nipponbare transgenik generasi T₀ pada media seleksi regenerasi (kelompok rumpun nomor 14.1 dan 14.4 masing-masing berasal dari satu kalus), B = planlet padi Nipponbare transgenik generasi T₀ pada media seleksi perakaran.

yang kemudian ditumbuhkan pada media perakaran dan diaklimatisasi. Secara umum, kalus dapat berkembang pada media seleksi higromisin karena memiliki sisipan gen *hptII* pada T-DNA yang terintegrasi pada genomnya. Akan tetapi, tetap terdapat peluang kalus yang tidak tersisipi T-DNA dapat bertahan pada media seleksi. Untuk memastikan keberadaan gen *hptII* dan *CsNitr1-L* pada T-DNA, dilakukan analisis molekuler menggunakan teknik PCR.

Analisis Molekuler Tanaman Transgenik Putatif

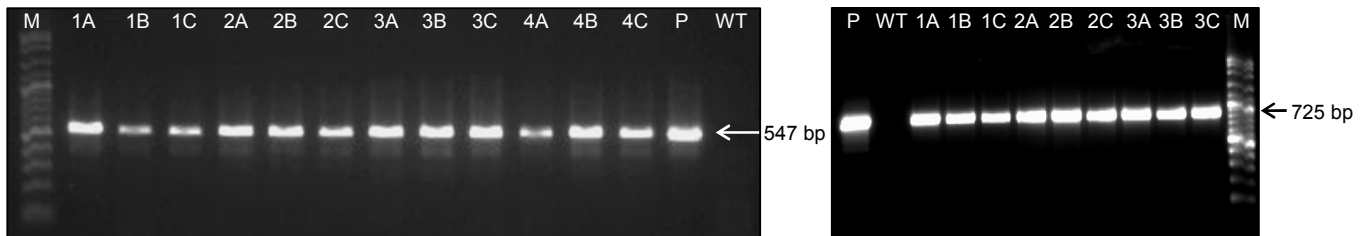
Analisis molekuler dengan marka gen *hptII* menunjukkan bahwa seluruh sampel yang digunakan mengandung T-DNA dengan sisipan gen *hptII*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pita DNA berukuran 547 bp pada seluruh sampel transgenik dan plasmid pBiogen016 sebagai kontrol positif (Gambar 3A). Plasmid pBiogen016 adalah konstruk gen *CsNitr1-L* dengan promotor *Ubiquitin1* dan terminator *Nos* (Santoso *et al.*, 2015). Analisis molekuler dilakukan juga dengan marka spesifik gen *CsNitr1-L*. Hasil analisis menunjukkan bahwa seluruh sampel tanaman yang digunakan memiliki sisipan gen *CsNitr1-L*. Hal ini ditunjukkan dengan munculnya pita DNA

berukuran 725 bp pada seluruh sampel transgenik dan kontrol positif (Gambar 3B).

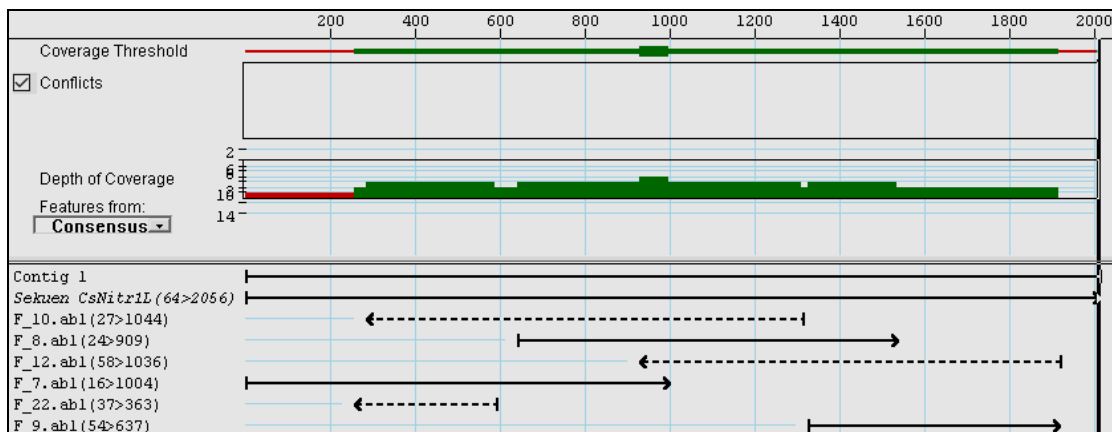
Setelah hasil PCR gen *CsNitr1-L* diperoleh, konfirmasi hasil PCR dilakukan dengan sekuensing. Analisis sekuensing menggunakan enam marka yang menjangkau seluruh bagian sekuen gen *CsNitr1-L*. Posisi keenam primer pada gen *CsNitr1-L* dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil analisis penyejajaran sekuen dengan analisis BLAST menunjukkan bahwa pita elektrogram hasil PCR memiliki sekuen yang identik dengan gen *CsNitr1-L*. Selain itu, hasil analisis dengan program *Sequence Manager* juga memperlihatkan bahwa tidak ada perubahan sekuen pada sisipan transgen *CsNitr1-L* di dalam genom padi transgenik T₀ (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa gen *CsNitr1-L* telah tersisipkan secara utuh ke dalam genom tanaman padi Nipponbare.

Validasi Eksperimen qPCR

Hasil pengamatan kurva disosiasi menunjukkan bahwa hanya ada satu puncak yang terbentuk, baik untuk produk PCR menggunakan marka gen *hptII* (Gambar 5A) maupun gen *Rac1* (Gambar 5B). Hal ini menunjukkan bahwa kedua marka yang digunakan



Gambar 3. Hasil analisis molekuler galur-galur transforman padi Nipponbare transgenik generasi T₀. A = marka gen *hptII*, B = gen spesifik *CsNitr1-L*. Pita dengan ukuran 547 bp merupakan ukuran fragmen gen *hptII* dan 725 bp merupakan ukuran fragmen gen *CsNitr1-L*. M = 100 bp DNA *ladder*, WT = Nipponbare nontransgenik, P = plasmid pBiogen-016, 1A–4C = galur-galur transforman padi Nipponbare generasi T₀.



Gambar 4. Hasil analisis sekuensing dengan program *Sequence Manager*. Bagian yang berwarna hijau menunjukkan bahwa gen *CsNitr1-L* di genom padi T₀ telah dikonfirmasi oleh dua atau lebih hasil sekuensing dan tidak adanya tanda garis pada kolom *conflicts* menunjukkan bahwa sekuen 100% identik dengan rujukan.

dapat mengamplifikasi produk PCR yang spesifik sehingga sinyal yang diperoleh dapat dikatakan murni berasal dari gen yang ditargetkan, yaitu *hptII* dan *Rac1*. Untuk validasi eksperimen qPCR, analisis titik leleh ini cukup efektif dan akurat (Al-Habeeb, 2013).

Hasil pengamatan kurva amplifikasi pada Gambar 5C menunjukkan bahwa produk PCR yang menggunakan marka gen *hptII* dan gen *Rac1* memiliki nilai C_T yang saling berdekatan. Hal ini menunjukkan bahwa secara kuantitatif konsentrasi sampel DNA yang digunakan untuk kedua marka relatif sama. Efisiensi reaksi qPCR sangat dipengaruhi oleh konsentrasi sampel DNA. Oleh karena itu, penentuan kuantitas DNA awal sangat diperlukan. Konsentrasi sampel DNA yang seragam akan mengurangi simpangan data. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa eksperimen qPCR yang dilakukan valid untuk analisis jumlah salinan transgen pada padi Nipponbare generasi T_0 .

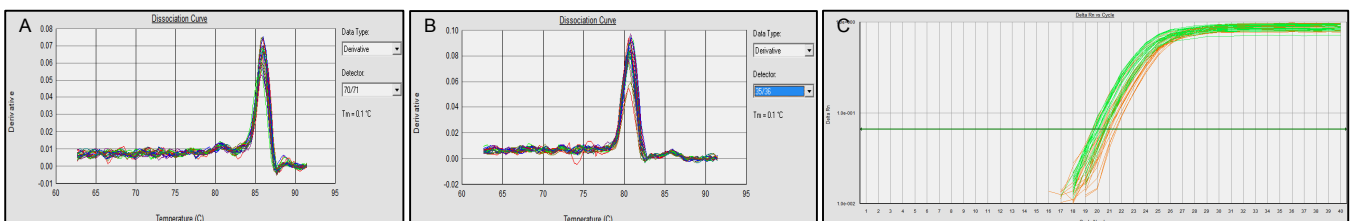
Analisis Jumlah Salinan Transgen pada Anakan dalam Satu Rumpun Padi Nipponbare Transgenik Generasi T_0

Hasil analisis jumlah salinan transgen menunjukkan bahwa anakan dalam satu rumpun tanaman memiliki perbandingan jumlah salinan transgen relatif yang sama. Hal ini terjadi pada keempat rumpun padi yang dianalisis, seperti dapat dilihat pada Gambar 6. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa sisipan transgen pada tiap anakan identik satu dengan yang lain dalam satu rumpun tanaman dan tidak terdeteksi

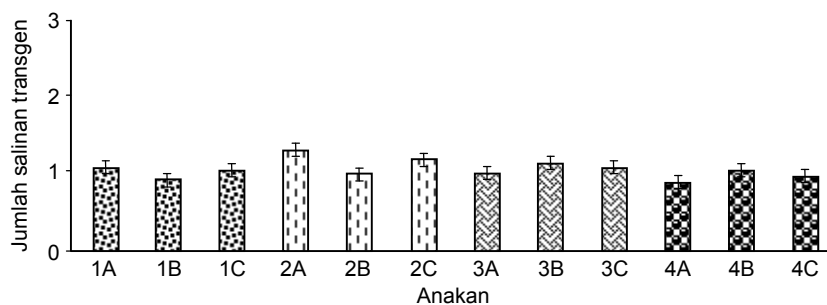
adanya kimera pada anakan dalam satu rumpun tanaman padi Nipponbare transgenik generasi T_0 .

Penggunaan plasmid pCAMBIA sebagai vektor biner dalam transformasi tanaman dapat menghasilkan galur-galur transforman dengan jumlah salinan transgen yang bervariasi. Rahmawati *et al.* (2010) melaporkan dari transformasi padi menggunakan pCAMBIA 5106 dan *A. tumefaciens* LBA 288 diperoleh sebanyak 70% tanaman transgenik mengandung sisipan tunggal. Plasmid pCAMBIA memiliki daerah pVS1, yaitu *replication region* yang berfungsi untuk mengatur replikasi vektor biner dalam *A. tumefaciens* yang dikenal moderat dalam replikasi. Artinya, satu sel *A. tumefaciens* dapat mengandung beberapa salinan vektor pCAMBIA. Hal ini yang menyebabkan terjadinya penyisipan salinan transgen lebih dari satu pada tanaman hasil transformasi. Faktor ini yang dimanfaatkan untuk melihat variasi sisipan gen yang bertujuan mendeteksi keberadaan kimera pada tanaman hasil transformasi (Wang, 2006).

Dalam penelitian ini, analisis data C_T hasil qPCR dilakukan dengan metode Livac (Livac dan Schmittgen, 2001). Dengan metode ini, pengukuran kuantitas sampel tidak perlu dilakukan secara mutlak karena setiap sampel dinormalisasi dengan keberadaan gen *housekeeping*, yaitu *Rac1*. Selanjutnya, setiap sampel dibandingkan secara relatif sehingga dengan metode ini hasil yang diperoleh memiliki tingkat kesalahan yang lebih rendah dibanding dengan metode kuantifikasi absolut.



Gambar 5. Kurva disosiasi reaksi PCR beberapa gen. A = marka gen *hpt*, B = marka gen aktin, C = marka *hpt* (garis berwarna jingga) dan marka aktin (garis berwarna hijau).



Gambar 6. Hasil analisis jumlah salinan transgen pada anakan dalam satu rumpun padi Nipponbare transgenik generasi T_0 . Nilai jumlah salinan transgen pada diagram batang diperlihatkan dengan batang galat (\pm standard error).

Dalam beberapa penelitian qPCR yang menggunakan metode kuantifikasi absolut, nilai jumlah salinan gen dihasilkan dengan cara menghubungkan sinyal amplifikasi dengan input jumlah salinan dalam sebuah kurva standar sehingga jumlah salinan diperoleh dengan cara memasukkan besarnya sinyal ke dalam persamaan kurva standar. Metode ini memiliki kelemahan, yaitu seluruh sampel harus diukur konsentrasinya secara mutlak agar diperoleh hasil yang akurat. Kuantifikasi sampel DNA secara mutlak cukup sulit dilakukan sehingga dalam hal ini metode kuantifikasi relatif yang digunakan dalam penelitian ini dianggap lebih unggul.

Analisis Jumlah Salinan Transgen Beberapa Rumpun Padi Nipponbare Transgenik T₀ yang Berasal dari Kalus yang Sama

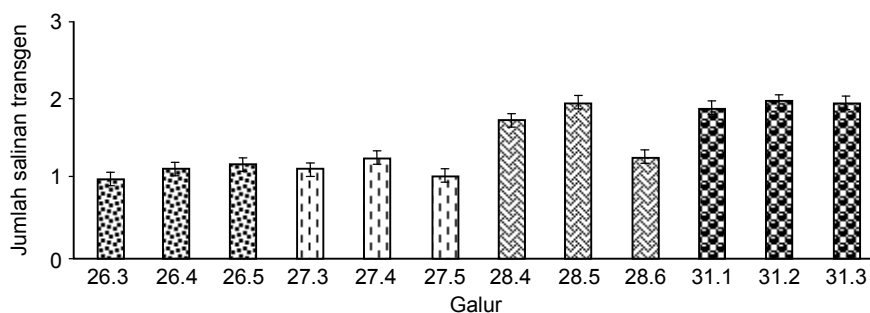
Hasil analisis jumlah salinan transgen pada beberapa rumpun padi yang berasal dari satu kalus menunjukkan adanya variasi perbandingan relatif, yaitu rumpun yang berasal dari kalus nomor 26 dan 27 memiliki perbandingan relatif yang berbeda dengan yang berasal dari kalus nomor 28 dan 31 (Gambar 7). Jumlah salinan transgen dalam genom tanaman bergantung pada jenis vektor biner dan virulensi strain *A. tumefaciens* yang digunakan. Vektor biner memiliki bagian replikasi yang mengatur fungsi replikasi vektor, baik di dalam *A. tumefaciens* dan *E. coli*. Oleh karena itu, semakin banyak jumlah salinan vektor dalam *A. tumefaciens*, semakin banyak T-DNA yang ditransfer ke dalam genom tanaman. Hal ini mengakibatkan meningkatnya jumlah salinan transgen dalam genom tanaman (Wang, 2006).

Tanaman transgenik diperoleh dari pertumbuhan embrio nonzigotik yang didapatkan dari kultur organ yang dikaluskan. Embrio nonzigotik berasal dari satu sel, hanya saja tunas yang dihasilkan berasal dari banyak sel. Dalam hal ini, efisiensi transformasi sel embriogenik secara nyata memengaruhi proses terbentuknya tanaman kimera (Trigiano dan Gray,

2000). Domínguez *et al.* (2004) juga menemukan bahwa tingkat terbentuknya kimera pada proses pembentukan jeruk transgenik dengan bantuan *A. tumefaciens* sangat tinggi, yaitu 12% dari total tanaman yang dihasilkan. Pembentukan kimera ini juga teramati pada kentang (Rakosy-Tican *et al.*, 2007), apel (Flachowsky *et al.*, 2008), dan anggur (Costa *et al.*, 2009). Fenomena tersebut juga terlihat dalam penelitian ini, walaupun pada pengujian anakan tidak ditemukan perbedaan jumlah salinan T-DNA. Namun, ternyata variasi T-DNA teramati pada tanaman yang berasal dari kalus yang sama, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7, terlihat rumpun nomor 28.6 memiliki jumlah salinan transgen yang berbeda dengan rumpun nomor 28.4 dan 28.5. Hal ini diduga karena kalus-kalus yang muncul kemungkinan tumbuh dari dua sel hasil transformasi yang saling berdekatan sehingga tunas-tunas yang dihasilkan memiliki sisipan transgen yang berbeda juga, bergantung pada arah titik tumbuh kalus. Hal ini berimplikasi bahwa tiap individu yang mengandung transgen harus dianggap sebagai lini tersendiri, walaupun berasal dari kalus yang sama.

Penentuan jumlah salinan transgen umumnya dilakukan dengan *Southern blot*. Saat ini, metode qPCR dapat juga digunakan untuk menentukan jumlah salinan transgen. Metode ini memiliki keuntungan, yaitu analisis jauh lebih cepat dan murah dibanding dengan *Southern blot*, namun kelemahannya tidak dapat membedakan antara lini-lini yang memiliki jumlah salinan transgen yang sama. Transgen yang memiliki jumlah salinan yang sama dapat berbeda dalam hal sekuen dan panjang basa transgen.

Melalui hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa metode qPCR dapat mendeteksi adanya kimera pada tanaman hasil transformasi melalui perbandingan jumlah salinan transgen relatif yang diperoleh. Dengan demikian, metode qPCR dapat digunakan sebagai alat penyeleksi untuk membantu



Gambar 7. Hasil analisis jumlah salinan transgen pada empat kelompok rumpun padi Nipponbare transgenik generasi T₀. Nilai jumlah salinan transgen pada diagram batang diperlihatkan dengan batang galat (\pm standard error).

memperkecil jumlah sampel sebelum dianalisis lebih lanjut menggunakan *Southern blot*.

KESIMPULAN

Melalui analisis qPCR dapat diketahui bahwa anakan dalam satu rumpun padi Nipponbare hasil transformasi generasi T_0 memiliki perbandingan jumlah sisipan transgen yang sama, sedangkan rumpun yang berasal dari satu kalus dapat menghasilkan individu tanaman yang memiliki jumlah sisipan transgen berbeda. Analisis qPCR bermanfaat dalam penentuan jumlah salinan transgen pada generasi awal tanaman transgenik. Selain itu, perlu dilakukan pemisahan terhadap rumpun yang tumbuh dari satu kalus pada saat aklimatisasi sehingga setiap rumpun dapat dianggap sebagai lini yang berbeda. Hal ini dilakukan dengan tujuan menjaga keseragaman sisipan transgen pada generasi selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Habeeb, M.A., M.H.A. Mohamed, and S. Sharawi. 2013. Detection and characterization of Newcastle disease virus in clinical samples using real time RT-PCR and melting curve analysis based on matrix and fusion genes amplification. *Vet. World* 6(5):239–243.
- Anami, S., E. Njuguna, G. Coussens, S. Aesaert, and M. Van Lijsebettens. 2013. Higher plant transformation: Principles and molecular tools. *Int. J. Dev. Biol.* 57:483–494.
- Campo, S., S. Manrique, J. Garcia-Martinez, and B.S. Segundo. 2008. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression. *Plant Biotechnol. J.* 6:585–608.
- Costa, L.D., A.L. Pinto-Sintra, M. Campa, V. Poletti, L. Martinelli, and M. Malnoy. 2014. Development of analytical tools for evaluating the effect of T-DNA chimeric integration on transgene expression in vegetatively propagated plants. *Plant Cell Tiss. Org.* 118:471–484.
- Costa, L.D., I. Vaccari, M. Mandolini, and L. Martinelli. 2009. Elaboration of a reliable strategy based on real-time PCR to characterize genetically modified plantlets and to evaluate the efficiency of a marker gene removal in grape (*Vitis* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 57(7):2668–2677.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19–21.
- Domínguez, A., M. Cervera, R.M. Pérez, J. Romero, C. Fagoaga, J. Cubero, M.M. López, J.A. Juárez, L. Navarro, and L. Pena. 2004. Characterization of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Mol. Breed.* 14:171–183.
- Faize, M., L. Faize, and L. Burgos. 2010. Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC Biotechnol.* 10(1):53–60.
- Flachowsky, H., M. Riedel, S. Reim, and M.V. Hanke. 2008. Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. *Plant Biotechnol.* 11(1):1–10.
- Kubista, M., A. Stahlberg, and T. Bar. 2001. Light-up probe based real-time Q-PCR. *Genomics and Proteomics Technologies. Proceedings of SPIE* 4264:53–58.
- Li, B., C. Xie, and H. Qiu. 2009. Production of selectable marker-free transgenic tobacco plants using a non selection approach: chimerism or escape, transgene inheritance, and efficiency. *Plant Cell Rep.* 28:373–386.
- Livac, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402–408.
- Montesinos, L. 2014. Rice seeds as biofactories for the production of antimicrobial peptides. Ph.D. Dissertation, Universitat de Girona, Spain. <http://hdl.handle.net/10803/135054> (accessed January 15, 2016).
- Opabode, J.T. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of plant: Emerging factors that influence efficiency. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 1(1):12–20.
- Rahmawati, S., O.A. Jefferson, D. Sopandie, Suharsono, and I.H. Slamet-Loedin. 2010. Comparative analysis of rice transformation using *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *IJBioTech.* 15(1):37–45.
- Rakosy-Tican, E., C.M. Aurori, C. Dijkstra, R. Thieme, A. Aurori, and M.R. Davey. 2007. The usefulness of the *gfp* reporter gene for monitoring *Agrobacterium*-mediated transformation of potato dihaploid and tetraploid genotypes. *Plant Cell Rep.* 26:661–671.
- Santoso, T.J., K.R. Trijatmiko, A. Apriana, A. Sisharmini, W. Enggarini, A. Polosoro, Sutrisno, dan K. Mulya. 2015. Deskripsi konstruk gen dalam vektor transformasi tanaman hasil penelitian BB Biogen periode 2006–2013. IAARD Press, Jakarta.
- Sugiura M., M.N. Georgescu, and M. Takahashi. 2007. A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 48:1022–1035.
- Sustiprijatno, M. Sugiura, K. Ogawa, and M. Takahashi. 2006. Improvement of nitrate- and nitrite-dependent growth of rice by the introduction of a constitutively expressing chloroplastic nitrite transporter. *Plant Biotechnol.* 23:47–54.
- Trigiano, R.N. and D.J. Gray. 2000. *Plant Tissue culture concepts and laboratory exercises*. 2nd Ed. CRC Press, New York, NY, USA.
- Tenea, G. and N. Cucu. 2006. The influence of T-DNA copy numbers on gene expression in primary transformants *Atropa belladonna* plants. *Rom. Biotech. Lett.* 11(2):2661–2667.
- Wang, K. 2006. *Methods in molecular biology: Agrobacterium protocols*. Vol. 2. Humana Press, Totowa, NJ, USA.