

**KONSTRUKSI VEKTOR BINER GEN  $\kappa$ -CARRAGEENASE  
DAN TRANSFORMASI KE *Agrobacterium tumefaciens* SEBAGAI MEDIA  
UNTUK PEMBUATAN RUMPUT LAUT TRANSGENIK**

***BINARY VECTOR CONSTRUCTION OF  $\kappa$ -CARRAGEENASE GENE  
AND TRANSFORMATION TO *Agrobacterium tumefaciens* AS MEDIATOR  
FOR SEAWEED TRANSGENIC GENERATION***

**Muh Alias L.Rajamuddin<sup>1</sup>, Alimuddin<sup>2\*</sup>, Utut Widyastuti<sup>3</sup>, Enang Harris<sup>2</sup>, dan  
Emma Suryati<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Jurusan Budidaya Perikanan, Politeknik Pertanian Negeri Pangkep, Pangkep

<sup>1</sup>Program Studi Ilmu Akuakultur, Sekolah Pascasarjana, IPB, Bogor

<sup>2</sup>Departemen Budidaya Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>3</sup>Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>4</sup>Balai Riset dan Pengembangan Budidaya Air Payau, Maros

\*E-mail: alimuddin\_alsani@yahoo.com

**ABSTRACT**

*Increasing of kappa ( $\kappa$ )-carrageenan content in *Kappaphycus alvarezii* seaweed is potentially be achieved by applying transgenesis technology. This study was performed to obtain a construction of  $\kappa$ -Carrageenase gene and *Agrobacterium tumefaciens* to carry those construction genes. The  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ -Car) gene was involved in  $\kappa$ -carrageenan biosynthesis. The  $\kappa$ -Car gene sequence was ligated between the 35S CaMV promoter and tNos terminator sequences to generate pMSH/ $\kappa$ -Car expression vector. Transformation of pMSH/ $\kappa$ -Car plasmid to *Escherichia coli* was performed by heat-shock method, and to *Agrobacterium tumefaciens* by tri-parental mating method. The results showed that several colonies of *E. coli* and *A. tumefaciens* grew in the selective culture mediums containing antibiotic. PCR analysis using primers 35S-Forward and tNos-Reverse with DNA template from those bacterial colonies resulted DNA fragment of about 2,000 bp, the same as the total length of 35S CaMV promoter,  $\kappa$ -Car gene and tNos terminator sequences. Therefore, the construction of pMSH/ $\kappa$ -Car gene was succeeded and a colony of *A. tumefaciens* transformant carrying pMSH/ $\kappa$ -Car plasmid was successfully produced.*

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens*, kappa( $\kappa$ )-Carrageenase gene, transgenesis, vector

**ABSTRAK**

Peningkatan kandungan kappa( $\kappa$ )-karagenan pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii* berpotensi dicapai melalui aplikasi teknologi transgenesis. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan konstruksi gen  $\kappa$ -Carrageenase, dan *Agrobacterium tumefaciens* membawa konstruksi gen tersebut. Gen penyandi enzim  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ -Car) berperan dalam biosintesis  $\kappa$ -karagenan. Sekuen gen  $\kappa$ -Car diligasi antara sekuen promotor 35S CaMV dan terminator Nos untuk menghasilkan vektor ekspresi pMSH/ $\kappa$ -Car. Ekspresi gen  $\kappa$ -Car pada plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car diatur oleh promotor 35S CaMV dan terminator Nos. Transformasi plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car ke bakteri *Escherichia coli* dilakukan menggunakan metode *heat-shock*, sedangkan ke *Agrobacterium tumefaciens* menggunakan metode *tri-parental mating*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa beberapa koloni bakteri *E. coli* dan *A. tumefaciens* tumbuh pada media selektif yang mengandung antibiotik. Analisis PCR dengan templat DNA dari koloni bakteri *E. coli* dan *A. tumefaciens* tersebut menggunakan primer 35S-Forward dan tNos-Reverse menghasilkan fragmen DNA berukuran sekitar 2.000 bp, sama dengan total ukuran sekuen promotor 35S CaMV, gen  $\kappa$ -Car, dan terminator tNos. Hal tersebut menunjukkan bahwa konstruksi pMSH/ $\kappa$ -Car telah berhasil dibuat, dan koloni *A. tumefaciens* transforman positif membawa plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car telah dihasilkan.

**Kata kunci:** *Agrobacterium tumefaciens*, gen kappa( $\kappa$ )-Carrageenase, transgenesis, vektor

## I. PENDAHULUAN

Peningkatan kandungan karagenan pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii* merupakan salah satu target rekayasa gen (transgenesis) yang sangat potensial untuk dilakukan. Hal tersebut dapat dicapai dengan menyisipkan gen penyandi enzim  $\kappa$ -Carrageenase yang terlibat dalam biosintesis karagenan.

Aplikasi transgenesis pada rumput laut (alga) memperlihatkan potensi besar di masa mendatang (Walker *et al.*, 2005; Hallmann, 2007; Potvin & Zhang, 2010). Beberapa penelitian transgenik pada alga yang telah berhasil dilakukan, antara lain: pengujian ekspresi gen  $\beta$ -glucuronidase (GUS) pada *Laminaria japonica* (Li *et al.*, 2009), gen *LacZ* pada *Gracilaria* (Huddy *et al.*, 2012), gen *Sitrat sintase* pada *K. alvarezii* (Daud *et al.*, 2013), gen *green fluorescent protein* (GFP) pada *K. alvarezii* (Rajamuddin *et al.*, 2014), gen *Lizosim* pada *K. alvarezii* (Handayani *et al.*, 2014), dan gen *Metallothionein* tipe II pada *K. alvarezii* (Fajriah *et al.*, 2014).

Dalam rangka pembuatan rumput laut transgenik, dua tahap awal diperlukan yaitu pembuatan vektor ekspresi gen dan penyediaan bakteri transforman sebagai kendaraan/biotranspor (Muladno, 2002). Terkait dengan biosintesis kappa-karagenan, telah tersedia informasi sekuen gen penyandi enzim *kappa-Carrageenase* ( $\kappa$ -Car). Gen penyandi enzim  $\kappa$ -Car mengonversi  $\mu$ -karagenan menjadi  $\kappa$ -karagenan dalam tubuh *K. alvarezii* (Campo *et al.*, 2009), namun demikian sampai saat ini belum ada informasi sekuen gennya dalam database. Pembuatan sekuen gen secara sintetik dan pembuatan vektor ekspresi telah dapat dilakukan menggunakan metode molekuler. Selanjutnya, teknik penyediaan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* transformasi menggunakan metode *tri-parental mating*/TPM (Bevan, 1984; Guo *et al.*, 2011) juga sudah dikembangkan untuk kebutuhan pembuatan rumput laut transgenik. Tiga jenis bakteri diperlukan, yaitu *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  sebagai vektor kloning dan donor,

*E. coli* DH1 (pRK2013) sebagai *helper*, dan *A. tumefaciens* LBA4404 sebagai resipien dalam proses TPM.

*Agrobacterium tumefaciens* sebagai agen transformasi telah digunakan pada proses transfer gen pada makroalga laut *Porphyra yezoensis* (Rhodopiceae) (Cheney *et al.*, 2001; Bernasconi *et al.*, 2004), pada *K. alvarezii* (Daud *et al.*, 2013; Handayani *et al.*, 2014; Fajriah *et al.*, 2014), mikroalga *Haematococcus pluvialis* (Kathiresan *et al.*, 2009), mikroalga laut *Schizochytrium* (Cheng *et al.*, 2012), dan fungi perairan *Blastocladiella emersonii* (Vieira dan Camilo, 2011). Hingga saat ini belum ada *K. alvarezii* transgenik yang mengekspresikan gen  $\kappa$ -Car. Dalam rangka pembuatan *K. alvarezii* transgenik tersebut yang mampu menyintesis banyak kappa-karagenan, sebagai tahap awal diperlukan vektor ekspresi dan biotranspor yang membawa vektor ekspresi tersebut. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan konstruksi gen  $\kappa$ -Car dan bakteri *A. tumefaciens* yang membawa konstruksi gen tersebut.

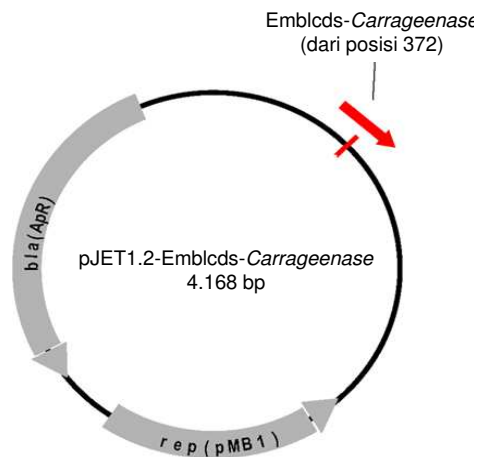
## II. METODE PENELITIAN

### 2.1. Sekuen dan Sumber Gen $\kappa$ -Carrageenase

Gen  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ -Car) yang digunakan pada penelitian ini dibuat secara sintesis *in vitro* menggunakan jasa Genetika Science (1st BASE Pte Ltd. Singapore) berdasarkan sekuen gen  $\kappa$ -Car yang berasal dari *Pseudoalteromonas* (Zhou *et al.*, 2008) yang ada di bank gen. Sekuen gen  $\kappa$ -Car disisipkan sementara pada vektor kloning pJET1.2 (Gambar 1) sebelum digunakan lebih lanjut.

### 2.2. Pembuatan Vektor Ekspresi pMSH/ $\kappa$ -Car

Sekuen gen  $\kappa$ -Car dari plasmid pJET1.2 dikonstruksi (menggunakan jasa Genetika Science/1st BASE Pte Ltd. Singapore) ke vektor ekspresi plasmid biner pMSH (*Nara Institute of Science and Technology/NAIST, Japan*), dan plasmid hasil ligasi dise-



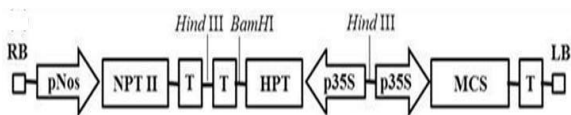
```

214 ATCTACAGTCTGATAGCAGTACCCCTTGTCTTAGCCTTAACAACACCAGCAGAGTTAAC
301 GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGCCCGCAGATCTCCGGATGGCTCGAGTTT
361 TTCAGCAAGATTAGTTAACAGCGAGTAGTCACTTGTCTGATCTTACCCCTTGTCTTAGT
421 TTACAGTGTAGTAGCAGTACCCCTTGTCTTAGCCTTAACAACACCAGCAGAGTTAAC
481 GTAGCAACGTTCTTGTTAGAAGAAGAGTAGATAACCTTCTTGTAGTAGCACAGTTGGC
541 AAAACAGTAGATTCCAAAGTAGTAGATTGACCCCTTCTCRAAGTTTGTCTAGCACAGAC
601 AATTGAACAGAGTTAACAGCAACGAAAGTGTGGACAAGATTGACCTTCACTGGAGCA
661 GAGTTGTGTACCACCTTAACCAAGTTCTAACGTAGTCACTTCCATAGAGTTGGG
721 AAACCTTCAGCAGACTTGTAGCAGATGGGTAGATTGGTTACACTTCCATTGAGTGTGT
781 GAGCTCTCAACCTTGAGACAAGTCAAGTTCATTTGTCTGTGCGCAGTACAAGTTGTCC
841 TTTTCAACAGGATTTCAACGCTCAACGTACCAAGTGTCTTGTCTTAGTACGTTAAC
901 CCGTAAGTGTGGAAGTCTTCTTGGGTGCAATGGCAAGTGTGTAACCGTTGTGGTTAGT
961 TGTGGAAAGACCTGGTCTCATCCAAGTTGGCTTACCGTCTTAAACAAGATGTTGTGC
1021 AAGTCGTGGTCAAGTCTCTAACAGCAGACTTTTGGTCAATTAACAACCTCGATTTC
1081 GAGTATTGACGTCACCTTCTTAGTCAAGATCTCTCGATAGTAGATACATCCAGAAA
1141 GCTGGAGAAACACCTGGGAAAGTAGAAGCACCTTGAATCTAGCTTCGTAGTACCGTAG
1201 TTACCAGTAGCTCTAGACTTAGCAACACCAGAGTGTAGTACAATGGGTAGTTAGCACT
1261 TGTGTGGTTACAACCGTCCCAGAAAGTCTTGTGGTGAAGTCTCTCTTAGTAGTCAAC
1321 TTCAACTTACCGTTAGAAACAGTAGCGTTTTCGTTCTTCCAGACCAACACCGTAGTT
1381 TCAAGTTGGAAGTCCACTTAGTAGCGTCTTAACGTTGAATTCGTAGATCTCTTAGCT
1441 TGCAAGATCCAAGTTTCACTGGCTTAGCGATTGGTGGTTGCATAGAAGCAGTTGAGAA
1501 ACAGCAGACACACACACATAGAGATAGCTGGGATTGGGAAAGCAACGATAGAGATTGGC
1561 TTCATATCTTCTAGAAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAATCGATGTC
1621 TTCTTTTATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAACCTTATATAAGAACTATGCT
    
```

Gambar 1. Sekuen gen  $\kappa$ -Carrageenase (dalam kotak abu-abu pada gambar kanan) berukuran sekitar 1.200 bp (pasang basa) diligasi ke vektor kloning pJET1.2 (gambar kiri) menghasilkan plasmid pJET1.2-Emblcds-Carrageenase dengan ukuran total 4.168 bp.

but pMSH/ $\kappa$ -Car. Plasmid biner pMSH sudah umum digunakan sebagai vektor DNA plasmid pada transgenesis yang dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens*.

Sekuen gen  $\kappa$ -Car disisipkan pada daerah *multiple cloning site* (MCS) pada plasmid pMSH (Gambar 2). Selanjutnya plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car ditransformasikan ke sel kompeten *Escherichia coli* untuk memperbanyak plasmid.



Gambar 2. Peta plasmid pMSH (NAIST, Japan) (A) dan posisi insersi gen  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ -Car) di daerah *multiple cloning site* (MCS) plasmid pMSH, RB: *right border*, pNos: promoter Nos, NPT II: gen *neomycin phosphotransferase* II penyandi resistensi antibiotik neomisin, T: terminator Nos, HPT: gen *hygromycin phosphotransferase* penyandi resistensi antibiotik higromisin, p35S: promoter 35S CaMV, LB: *left border*.

### 2.3. Transformasi pMSH/ $\kappa$ -Car ke *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Transformasi pMSH/ $\kappa$ -Car ke bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  menggunakan metode *heat-shock* dan identifikasi koloni transforman yang membawa plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car dilakukan mengikuti metode Sambrook *et al.* (1989) dan Suharsono *et al.* (2002) dengan beberapa modifikasi.

#### 2.3.1. Pembuatan Sel Kompeten *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

Sebuah koloni bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  diambil dari biakan murni dan dikultur dalam 2 mL media cair Luria Bertani (LB) (1% tripton; 0,5% ekstrak khamir; dan 1% NaCl) dalam tabung reaksi, sebagai subkultur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam pada *shaker* inkubator kecepatan 180 rpm. Hasil kultur segar bakteri diletakkan di atas es selama 30 menit. Sebanyak 1,5 mL disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet ditambahkan *transformation buffer* (TFB) CaCl<sub>2</sub> sebanyak 495  $\mu$ L (0,33 dari volume 1,5 mL) dan diresuspensi, kemudian diletakkan di atas es selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan

dibuang dan pelet ditambahkan dengan TFB sebanyak 125  $\mu$ L (1/12 dari volume 1,5 mL) dan antioksidan *dimethylsulfoxide* (DMSO) sebanyak 8,8  $\mu$ L (7,8% dari volume 1,5 mL), kemudian diletakkan di atas es selama 10 menit. Bakteri yang telah kompeten siap digunakan untuk transformasi.

### 2.3.2. Transformasi

Transformasi dilakukan dengan cara mencampurkan 50  $\mu$ L sel kompeten *E. coli* DH5 $\alpha$  dengan 5  $\mu$ L plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car ke dalam tabung mikro, diinkubasi dalam es selama 20-30 menit, diberi kejutan panas (*heat-shock*) pada suhu 42°C selama 45 detik untuk membuka pori sel bakteri, kemudian diletakkan dalam es selama 5 menit. Hasil kejutan panas ditambahkan 100  $\mu$ L media LB, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C pada *shaker* inkubator dengan kecepatan 200 rpm selama 30-60 menit.

### 2.3.3. Analisis *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ Transforman

Analisis keberhasilan transformasi ke *E. coli* dilakukan dengan pengujian pada media selektif yang mengandung antibiotik, dan analisis PCR koloni *E. coli* hasil transformasi. Pengujian pada media selektif dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri *E. coli* hasil transformasi pada media Luria Bertani Agar (LA) (1% tripton; 0,5% ekstrak khamir; 1% NaCl, dan bacto agar 2,5%) yang mengandung antibiotik kanamisin dan higromisin, masing-masing 50 mg/L. Bakteri yang tumbuh pada media tersebut merupakan kandidat transformasi yang membawa plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car.

Analisis PCR dilakukan untuk meyakinkan koloni bakteri transforman. PCR dilakukan menggunakan primer 35S-F: 5'-ATG GCT GGA GTA TTA GCT GGG-3' dan tNos-R: 5'-CTC ATA AAT AAC GTC ATG CAT TAC A-3' (didesain oleh Hannum, 2012). Templat DNA yang digunakan adalah koloni bakteri yang dilarutkan dengan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 10  $\mu$ L. Program PCR yang digunakan adalah pradenaturasi pada suhu 95°C se-

lama 5 menit, 30 siklus amplifikasi yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 56°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 2 menit, serta ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 5 menit dan pendinginan pada 20°C selama 10 menit. Sebanyak 10  $\mu$ l produk PCR diseparasi dengan elektroforesis 100 V selama 30 menit pada gel agarosa 1% dengan menggunakan bufer TAE 1x (stok TAE 50x terdiri atas *Tris base* : 4,84 g, *Acetic acid glacial* : 1,14 mL, EDTA : 2 mL pH 8 0,5 M, ddH<sub>2</sub>O : 800 mL). Hasil elektroforesis divisualisasi dengan *gel documentation system-UV transilluminator*. Sampel koloni sebagai templat DNA juga digoreskan ke dalam *master plate*, yang merupakan sumber koloni bakteri untuk tahap penelitian berikutnya. *Master plate* berisi koloni bakteri transforman, diinkubasi pada suhu 37°C selama 8 jam.

### 2.4 Transformasi pMSH/ $\kappa$ -Car ke *Agrobacterium tumefaciens*

Transformasi plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car ke *A. tumefaciens* dilakukan menggunakan metode *tri-parental mating* (TPM) mengacu pada Bevan (1984), Liberty *et al.* (2008) dan Handayani *et al.* (2014) dengan beberapa modifikasi. Proses transformasi menggunakan prinsip konjugasi melibatkan tiga macam bakteri, yakni *E. coli* DH5 $\alpha$  sebagai donor pembawa plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car, bakteri *E. coli* DH1 (pRK2013) sebagai *helper*, dan *A. tumefaciens* LBA4404 sebagai resipien. Bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  tahan terhadap antibiotik kanamisin<sup>R</sup> dan higromisin<sup>R</sup>, *E. coli* DH1 tahan kanamisin<sup>R</sup>, dan *A. tumefaciens* LBA4404 tahan terhadap streptomisin<sup>R</sup>.

Ketiga bakteri ini disegarkan terlebih dahulu dengan mengkultur pada media LB yang ditambahkan antibiotik sesuai resistensinya, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (*E. coli* DH5 $\alpha$  dan *E. coli* DH1) dan *A. tumefaciens* pada suhu 30°C selama 32 jam. Hasil kultur segar ditumbuhkan masing-masing sebanyak 20  $\mu$ l pada media LA secara sendiri-sendiri (tunggal) seba-

gai kontrol positif dan secara mix (gabungan ketiganya) untuk proses konjugasi. Selanjutnya bakteri diinkubasi pada suhu 30°C selama 32 jam.

Pembuktian keberhasilan transformasi pMSH/ $\kappa$ -Car ke *A. tumefaciens* hasil konjugasi TPM, dilakukan menggunakan uji pada media selektif mengandung antibiotik, dan analisis PCR terhadap koloni transforman. Pada uji media selektif, koloni dari kultur tunggal (kontrol positif) maupun kultur mix (hasil konjugasi), diambil satu gores dan dilarutkan dengan 1 ml LB, kemudian ditumbuhkan pada media LA yang ditambahkan antibiotik higromisin. Biakan diinkubasi pada suhu 30°C selama 32 jam. Pada analisis PCR, dilakukan sama seperti pada uji koloni *E. coli* transforman.

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 3.1. Vektor Ekspresi pMSH/ $\kappa$ -Car

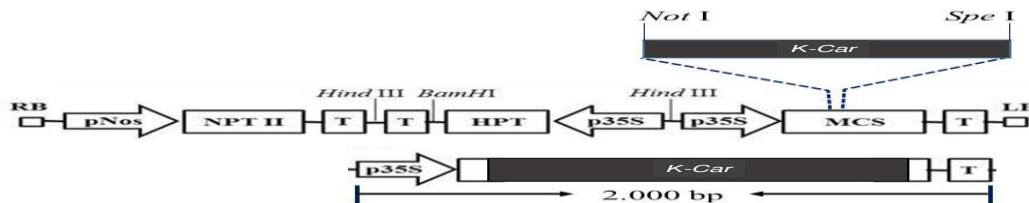
Gen  $\kappa$ -Carrageenase (berukuran sekitar 1.200 bp) tersisip pada situs *Not I* dan *Spe I*

I di daerah *multiple cloning site* (MCS) pada vektor pMSH yang dikendalikan oleh promoter 35S CaMV (berukuran sekitar 300 bp) di bagian depan, dan terminator Nos (tNos; berukuran sekitar 500 bp) di bagian *left border*, sehingga total ukuran sekuen dari promoter 35S, gen  $\kappa$ -Car, sampai dengan tNos adalah sekitar 2.000 bp (Gambar 3).

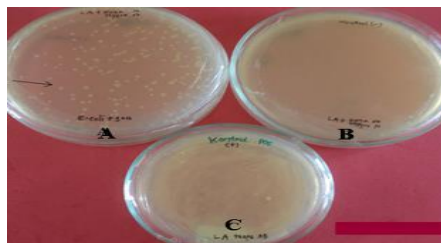
#### 3.2. Identifikasi *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ Transforman

Bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  hasil transformasi yang ditumbuhkan pada media selektif ditunjukkan pada Gambar 4A, *E. coli* DH5 $\alpha$  yang bukan hasil transformasi pada Gambar 4B, sedangkan *E. coli* DH5 $\alpha$  yang ditumbuhkan pada media tanpa antibiotik ditunjukkan pada Gambar 4C.

Kemampuan koloni bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  hasil transformasi untuk tumbuh pada media selektif menunjukkan bahwa bakteri tersebut mengandung pMSH/ $\kappa$ -Car atau disebut sebagai bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  transforman. Bakteri transforman dapat hidup pada



Gambar 3. Peta plasmid biner pMSH/ $\kappa$ -Car: Gen  $\kappa$ -Carrageenase ( $\kappa$ -Car) tersisip pada situs *Not I* dan *Spe I* di daerah *multiple cloning site* (MCS) pada vektor pMSH. Panjang total sekuen dari p35S hingga terminator Nos (T) pada plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car adalah 2.000 bp.



Gambar 4. Koloni bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  pada uji media selektif. A: Koloni-koloni bakteri transforman (ditunjukkan dengan tanda panah) dapat tumbuh pada media selektif mengandung antibiotik, B: koloni *E. coli* DH5 $\alpha$  tanpa transformasi, tidak dapat tumbuh, sebagai kontrol negatif, C: dan koloni *E. coli* pada media LA tanpa antibiotik sebagai kontrol positif.

media selektif karena plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car mengandung gen *neomycin phosphotransferase* II (NPT II) penyandi resistensi terhadap kanamisin, dan *hygromycin phosphotransferase* (HPT) penyandi resistensi higromisin. Sebaliknya, *E. coli* yang bukan transforman, tidak dapat tumbuh pada media selektif (Gambar 4B). Hal tersebut sejalan dengan Muladno (2002); Tsen *et al.* (2002), dan Tu *et al.* (2005), bahwa apabila sel bakteri membawa DNA rekombinan (DNA plasmid dan gen insersi) ditumbuhkan pada media dengan antibiotik marka seleksi, maka sel *E. coli* akan mampu berkembang biak membentuk koloni. Sebaliknya jika sel *E. coli* tidak membawa plasmid gen insersi, akan mati pada media dengan antibiotik

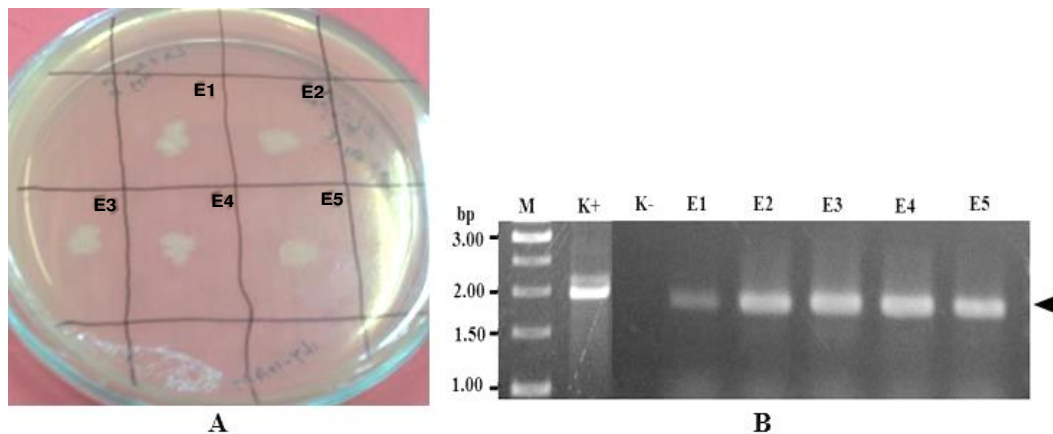
Hasil verifikasi transforman lebih lanjut dengan analisis PCR menggunakan pasangan primer 35S-Forward dan Tnos-Reverse disajikan pada Gambar 5. Lima sampel koloni *E. coli* DH5 $\alpha$  transforman (Gambar 5A) menghasilkan ampikon dengan posisi fragmen sekitar 2.000 bp (Gambar 5B). Fragmen tersebut sesuai dengan total ukuran sekuen promoter 35S CaMV sampai dengan terminator Nos (Gambar 3). Hal tersebut juga menunjukkan bahwa proses ligasi gen  $\kappa$ -Car ke

plasmid pMSH, dan proses transformasi pMSH/ $\kappa$ -Car ke bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  berhasil dilakukan.

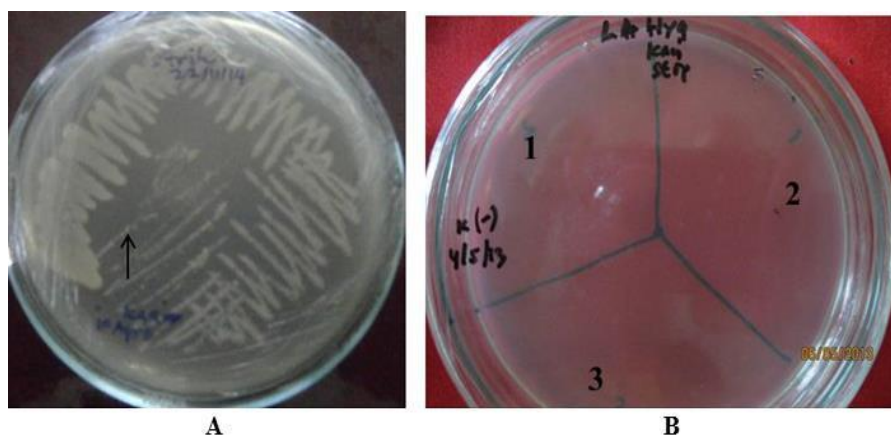
### 3.3. Identifikasi *Agrobacterium tumefaciens* Transforman

Uji keberhasilan konjugasi dengan metode TPM untuk transformasi pMSH/ $\kappa$ -Car ke *Agrobacterium tumefaciens* ditunjukkan pada Gambar 6. Pada kultur tunggal, bakteri *A. tumefaciens* yang dikonjugasi dan diinkubasi pada media selektif berhasil tumbuh (Gambar 6A), sedangkan ketiga bakteri tidak tumbuh (Gambar 6B).

*A. tumefaciens* transforman mampu tumbuh di media selektif yang ditambahkan antibiotik (kanamisin, higromisin dan streptomisin), karena selain memiliki gen penyandi resistensi streptomisin, juga telah membawa gen penyandi resistensi kanamisin dan higromisin yang terdapat pada konstruksi pMSH/ $\kappa$ -Car. Sementara kultur tunggal (donor, helper dan resipien) tidak dapat tumbuh, karena donor *E. coli* DH5 $\alpha$  maupun helper *E. coli* DH1 (pRK2013) hanya membawa gen penyandi resistensi kanamisin dan higromisin saja, tetapi tidak membawa gen penyandi resistensi streptomisin. Demikian juga resipi-



Gambar 5. Master plate (replika) koloni *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transforman (A), elektroforegram hasil amplifikasi PCR menggunakan primer 35S-F dan tNos-R menghasilkan fragmen sekitar 2.000 bp (kepala panah) (B), M: marka *gene ruler* 1kb DNA ladder, K+: produk PCR dengan templat plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car sebagai kontrol positif, K-: produk PCR dengan templat koloni tanpa transformasi sebagai kontrol negatif, E1-E5: koloni bakteri *E. coli* DH5 $\alpha$  hasil transformasi.



Gambar 6. Koloni *Agrobacterium tumefaciens* transforman hasil konjugasi dapat tumbuh pada media selektif (tanda panah) yang mengindikasikan proses *tri-parental mating*/TPM berhasil dilakukan (A), sedangkan kultur tunggal masing-masing: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /donor (1), *E. coli* DH1 (pRK2013)/*helper* (2), *Agrobacterium tumefaciens*/resipien (3) tidak tumbuh pada media selektif, sebagai kontrol negatif (B).

en *A. tumefaciens* (sebelum konjugasi) yang hanya resisten streptomisin tetapi tidak resisten kanamisin dan higromisin. Bakteri yang mampu tumbuh pada media selektif, hanya *A. tumefaciens* hasil konjugasi yang telah mengandung gen insersi (Wise *et al.*, 2006; Sanniyasi *et al.*, 2012), dalam hal ini plasmid pMSH/ $\kappa$ -*Car*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses transformasi pMSH/ $\kappa$ -*Car* ke *A. tumefaciens* telah berhasil dilakukan.

Hasil analisis PCR disajikan pada Gambar 7B, dengan templat DNA dari koloni *A. tumefaciens* yang tumbuh pada media selektif (Gambar 7A). Ukuran produk PCR menggunakan pasangan primer 35S-F dan tNos-R sama dengan hasil PCR dengan templat DNA dari *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  transforman, yakni sekitar 2.000 bp (Gambar 7B). Produk PCR dengan primer 35S-F dan tNos-R (2.000 bp; Gambar 7B) sama dengan yang ukuran total ukuran sekuen promoter 35S, gen  $\kappa$ -*Car*, dan tNos (Gambar 3). Selanjutnya, hasil ini mendukung hasil identifikasi transforman melalui uji pada media selektif. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa proses transformasi konstruksi gen pMSH/ $\kappa$ -*Car* berhasil dilakukan ke *A. tumefaciens*. Bakteri *A. tumefaciens* transforman yang

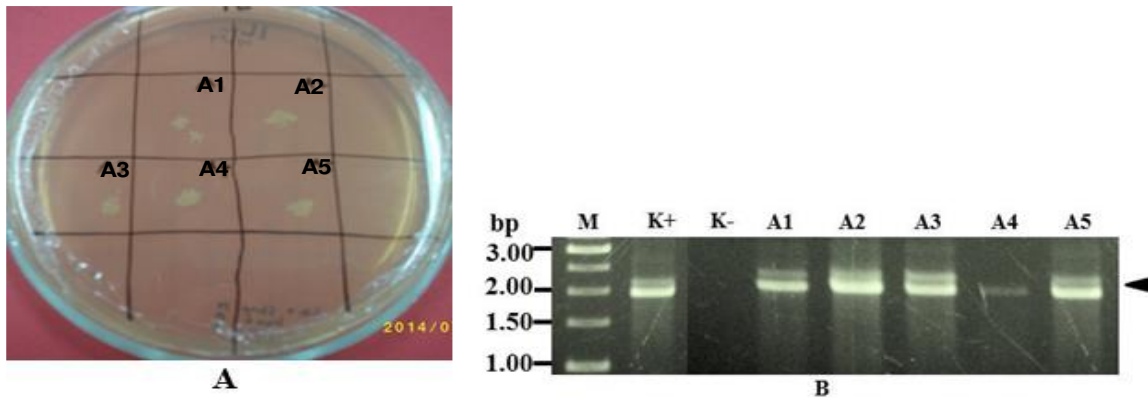
membawa konstruksi pMSH/ $\kappa$ -*Car* telah siap digunakan untuk perlakuan ke rumput laut *Kappaphycus alvarezii* atau rumput laut jenis lainnya untuk pembuatan transgenik.

Proses transfer gen untuk pembuatan *K. alvarezii* transgenik dapat dilakukan menggunakan metode elektroporasi (Rajamuddin *et al.*, 2014), dan metode perantara *A. tumefaciens* (Daud *et al.*, 2013; Fajriah *et al.*, 2014; Handayani *et al.*, 2014).

Rumput laut yang mengekspresikan gen  $\kappa$ -*Carrageenase* diharapkan akan memiliki kandungan kappa-karagenan lebih banyak daripada non-transgenik. Sebagai kelanjutan dari riset ini, pembuatan *Kappaphycus alvarezii* transgenik gen  $\kappa$ -*Carrageenase* menggunakan metode mediasi *A. tumefaciens* sedang dilakukan di laboratorium kami.

#### IV. KESIMPULAN

Produk PCR dengan templat DNA dari *Agrobacterium tumefaciens* berukuran sekitar 2.000 bp menunjukkan bahwa konstruksi gen pMSH/ $\kappa$ -*Car* telah berhasil dibuat, dan *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa konstruksi gen tersebut telah berhasil diperoleh.



Gambar 7. *Master plate* (replika) koloni *A. tumefaciens* transforman (A), dan elektroforegram amplicon PCR menggunakan primer 35S-F dan tNos-R dengan fragmen berukuran sekitar 2.000 bp (B). Tanda kepala panah di sebelah kanan Gambar 5B menunjukkan ukuran produk amplicon PCR, M: marka *gene ruler* 1kb DNA ladder, K+: produk PCR dengan templat plasmid pMSH/ $\kappa$ -Car sebagai kontrol positif, K-: produk PCR dengan templat koloni tanpa transformasi sebagai kontrol negatif.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) Institut Pertanian Bogor, dan Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau, Maros atas bantuan peralatan, fasilitas, dan dana. Terima kasih juga kami ucapkan kepada *anonymous reviewer* yang telah banyak memberikan komentar dan masukan untuk memperbaiki tulisan ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bernasconi, P., T. Cruz-Urbe, G. Rorrer, N. Bruce, and D.P. Cheney. 2004. Development of a TNT detoxifying strain of the seaweed *Porphyra yezoensis* through genetic engineering. *J. Phycol.*, 40 (suppl 1):31.
- Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12:8711-8721.
- Campo, V.L., D.F. Kawano, J.D.B. Silva, and C.I. Ivone. 2009. Carrageenans: biological properties, chemical modifications and structural analysis. *Carbohydrate Polymers*, 77:167-180.
- Cheney, D.P., B. Metz, and J. Stiller. 2001. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in the macroscopic red alga *Porphyra yezoensis*. *J. Phycol.*, 37:11-12.
- Cheng, R., R. Ma, K. Li, H. Rong, X. Ling, Z. Wang, S. Yang, and Y. Ma. 2012. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Microbiological Research*, 167(3):179-186, doi: 10.1016/j.micres.2011.05.003.
- Daud, F.R., U. Widyastuti, Suharsono, E. Suryati, dan A. Parenrengi. 2013. Introduksi gen *Sitrat sintase* ke dalam rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Ris. Akuakultur*, 8(2):201-208.
- Fajriah, U., E. Suryati, A. Parenrengi, Suharsono, dan U. Widyastuti. 2014. Introduksi gen *Metallothionein* tipe II ke dalam rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Ris. Akuakultur*, 9 (3):377-385.
- Guo, M., X. Bian, X. Wu, and M. Wu. 2011. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation: history and progress.



- In: Alvarez, M.A. (ed.) Genetic Transformation. Rijeka. InTech. 5-28pp.*
- Hallmann, A. 2007. Algal transgenics and biotechnology. *Trans Plant J.*, 1(1): 81-89.
- Handayani, T., Alimuddin, U. Widyastuti, E. Suryati E, and A. Parenrengi. 2014. Binary vector construction and mediated *Agrobacterium tumefaciens* transformation of *lysozyme* gene in seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Biotropia*, 21(2):80-90, doi:10.11598/Btb.2014.21.2.2
- Hannum, S. 2012. Isolasi, pengklonan, dan analisis ekspresi gen penyandi *Copper/Zinc Superoxide Dismutase (CuZn-SOD)* dari *Melastoma malabathricum* L. Disertasi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. 107hlm.
- Huddy, S.M., A.E. Meyers and V.E. Coyne. 2012. Transformation of *lacZ* using different promoters in the commercially important red alga *Gracilaria gracilis*. *African J. Biotech.*, 11(8): 1879-1885.
- Kathiresan, S., A. Chandrashekar, G.A. Ravishankar, and R. Sarada. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). *J. Phycol.*, 45(3):642-649.
- Liberty, M. Herman, dan G.A. Wattimena. 2008. Konstruksi plasmid biner pembawa gen *Cry1Ab* dan transformasi plasmid biner dengan metode *tri parental mating*. *Zuriat*, 19(2):130-139.
- Li, F., S. Qin, P. Jiang, Y. Wu, and W. Zhang. 2009. The integrative expression of GUS gene driven by FCP promoter in the seaweed *Laminaria japonica* (Phaeophyta). *J. Appl. Phycol.*, 21:287-293.
- Muladno. 2002. Seputar teknologi rekayasa genetika. Pustaka Wirausaha. Bogor. 123hlm.
- Potvin, G., and Z. Zhang. 2010. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: a review. *Biotechnology Advances*, 28: 910-918.
- Rajamuddin, M.A.L., Alimuddin, U. Widyastuti, and I. Faizal. 2014. Evaluation of different promoters driving the GFP reporter gene in seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Indonesian J. Biotechnology*, 19(2):129-135.
- Sambrook, J., E.D. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor (NY). 1.74-1.110pp.
- Sanniyasi, E., R. Selvarajan, P. Velu, and P. Mylsamy. 2012. Construction of plant expression vector of synthetic *bt-cryIac* gene for genetic transformation. *Elixir Bio Tech.*, 53:11736-11740.
- Suharsono, U., Y. Fujisawa, T. Kawasaki, Y. Iwasaki, H. Satoh, and K. Shimamoto. 2002. The heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99:13307-13312, doi:10.1073/pnas.192244099.
- Tsen, S.D., S.S. Fang, M.J. Chen, J.Y. Chien, C.C. Lie, and D.H.L. Tsen. 2002. Natural plasmid transformation in *Escherichia coli*. *J. Biomed Sci.*, 9(3): 246-252.
- Tu, Z., G. He, K.X. Li, M.J. Chen, J. Chang, L. Chen, Q. Yao, D.P. Liu, H. Ye, J. Shi, and X. Wu. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic J. Biotechnology*, 8(1):113-120.
- Vieira, A.L.G., and C.M. Camilo. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Fungal Genetics and Biology*, 48:806-811.

- Walker, T.L., C. Collet, and S. Purton. 2005. Algal transgenic in the genomic era. *J. Phycol.*, 41:1077-1093.
- Wise, A.A., Z. Liu, and A.W. Binns. 2006. Three methods for introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Meth. Mol. Biol.*, 343(1):43-54
- Zhou, M., J. Ma, J. Li, H. Ye, K. Huang, and X. Zhao. 2008. A  $\kappa$ -carrageenase from a newly isolated *Pseudoalteromonas*-like bacterium, WZUC10. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13:545-551.

*Diterima* : 14 Maret 2016

*Direview* : 21 Juni 2016

*Disetujui* : 27 Juni 2016