

TRANSFORMATION OF GENE *TcPIN* THE EXPRESSION VECTOR *pBIN*⁺ FOR SOYBEAN POD BORER RESISTANCE

Mayta Novaliza Isda^{1(*)}, Tetty Chaidamsari², Wahyu Lestari¹

¹Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Unri Pekanbaru

²Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor

*E-mail : maytaisda@yahoo.com

ABSTRACT

Potential of gene resistance found in cocoa like proteinase inhibitor (*pin*) has an important role in plant defense system against predators and pathogens. Utilization of the *pin* is a new alternative to soybean in pod borer resistance. Proteinase Inhibitor (*PIN*) is known as a part of the plants defences system towards the pest. The research is conduct to construct *TcPIN* gene from cocoa crop into expression *pBIN*⁺ vector. The first step of the research is designed a new primary for the *TcPIN* gene construction. The *TcPIN* gene yielded from the purification of PCR product is construct into a *flap* plasmid completed with promotor and terminator. And as the next step, the gene fragment is constructed into *pBIN*⁺ and transformed inside competence cell of XL-1 Blue to multiply the plasmid. The result of the amplification is digested with the restrict enzyme *SaI* and *BamHI* to exposed the insert (*PIN* gene) from *pGEMT*-easy vector. The exposed insert (*PIN* gene) is transform by *pFlap* before transferred into the expression vector which is *pBIN*⁺. The result showed that the gene *TcPIN* has been inserted into *pBIN*⁺. The construction of the recombinant DNA shown with the digestion result of *pBIN*⁺, after cutting with *AscI* and *PacI* restrict enzyme.

Key words : *TcPIN* gene, soybean pod borer, gene constuction, proteinase inhibitor

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* (L) Merrill) merupakan salah satu komoditas tanaman pangan yang penting di Indonesia, dimana kebutuhan akan kedelai meningkat setiap tahun. Keperluan kedelai per kapita saat ini ± 8 kg/kapita/tahun, dan diperkirakan setiap tahun kebutuhan biji kedelai ± 1,8 juta ton/tahun (Deptan, 2006). Usaha peningkatan produksi kedelai di Indonesia terkendala oleh adanya serangan hama penggerek polong. Serangan hama ini merupakan salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya produksi kedelai. Kehilangan produksi dapat mencapai hingga 80%, dan biji kedelai yang terserang mutunya menurun atau bahkan tidak laku dijual.

Salah satu pemecahan yang menjadi pusat perhatian saat ini adalah penyediaan bibit tanaman kedelai yang tahan terhadap hama penggerek polong. Untuk mencari alternative lain dikembangkan tanaman kedelai transgenik yang membawa gen ketahanan terhadap penggerek polong. Agar dapat diterima masyarakat, gen ketahanan diambil dari tanaman, yang dalam penelitian ini menggunakan gen proteinase inhibitor yang diisolasi dari tanaman kakao (Isda *et al.*, 2008). Sifat ketahanan hama yang dibawa oleh gen *pin* adalah monogenik, maka pemanfaatannya untuk perakitan tanaman tahan hama sangat potensial (Tai *et al.* 1991).

METODE PENELITIAN

Kloning pada vektor *flap* yang berguna untuk mengklon gen *pin* dibawah promotor 35CaMV. Hal ini perlu dilakukan, karena *pBIN*⁺ tidak mengandung promotor tersebut. Langkah awal yang dilakukan adalah mengambil gen *Tcpin* yang telah terklon pada *pGEMT* easy, dengan menggunakan satu primer spesifik dengan menggunakan program PCR. Plasmid yang mengandung gen *pin* dan vektor *flap* dipotong menggunakan enzim *SaI* dan *BamHI*. Selanjutnya fragmen gen *Tcpin* dan vektor *flap* diligasi selama satu malam, dan selanjutnya ditransformasikan pada *Escherichia coli* strain XL1-Blue. Seleksi transforman dilakukan dengan PCR koloni menggunakan primer spesifik dan koloni yang membawa insert selanjutnya akan digunakan pada tahap berikutnya.

Plasmid yang mengandung gen *pinflap* dan *pBIN*⁺ dipotong menggunakan enzim *AscI* dan *PacI*. Hal ini dilakukan karena gen *pin* yang telah tersisip di depan promotor 35SCaMV berada diantara enzim *AscI* dan *PacI*. Hasil ligasi kemudian ditransformasikan pada *E.Coli XL1Blue*. Konfirmasi transforman dilakukan dengan memotong kembali *pBIN*⁺ yang membawa insert dengan enzim *AscI* dan *PacI*. Koloni positif yang membawa gen *pin* selanjutnya ditransformasikan pada *Agrobacterium* AGL0.

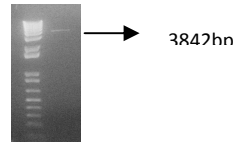
HASIL DAN PEMBAHASAN

Digesti Gen *PIN* dan *pFlap* dengan Enzim Restriksi

Manipulasi gen memerlukan sarana khusus seperti vektor dan sel inang. Vektor digunakan sebagai pembawa gen yang akan dimasukkan ke dalam sel dan juga berperan dalam mereplikasi gen yang diklon. Plasmid *pflap* pada penelitian ini digunakan terlebih dahulu sebelum dimasukkan ke vektor ekspresi karena plasmid *pflap* tersebut mempunyai promotor dan terminator. Tahap awal untuk mengkonstruksi gen ini adalah digesti gen *pin* dan *pflap* itu sendiri. Plasmid yang mengandung gen *pin* dan *pflap* dipotong dengan enzim restriksi yang sama.

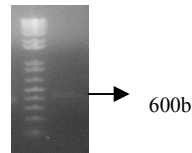
Enzim restriksi yang digunakan untuk memotong *pFlap* dan gen *pin* pada penelitian ini adalah *SalI* dan *BamHI*. Alasan enzim *SalI* dan *BamHI* digunakan pada penelitian ini karena gen *pin* akan dimasukkan ke dalam vektor ekspresi. Untuk dapat memotong, hal pertama yang harus dilihat adalah *restriction map* dari *pflap* dan *pGEMT-Easy*. Enzim-enzim yang ada pada *pflap* disesuaikan terlebih dahulu dengan enzim yang ada pada *pGEMT-Easy*. Jika enzim yang akan digunakan tersebut sesuai dengan terdapat pada vektor kloning maupun vektor ekspresi maka enzim tersebut dapat digunakan untuk memotong gen yang diinginkan.

Setelah dipotong dengan enzim *SalI* dan *BamHI*, hasil elektroforesis menunjukkan pita dengan ukuran sekitar 3842 bp. Pita dengan ukuran 3842 bp tersebut merupakan ukuran *pFlap* yang berhasil dipotong dengan enzim *SalI* dan *BamHI*. Hasil purifikasi dari plasmid *pFlap* disajikan pada Gambar 1. Hasil purifikasi tersebut menunjukkan adanya pita dengan ukuran 3842 bp. Hal ini menggambarkan bahwa purifikasi plasmid *pFlap* hasil digesti telah murni didapatkan.



Gambar 1. Hasil purifikasi plasmid Flap

Begitu pula sebaliknya, gen *pin* dipotong dengan enzim *SalI* dan *BamHI* dari vektor kloning *pGEMT-Easy* (Promega, 1999) untuk disambungkan pada vektor kloning *pFlap*. Setelah dipotong dengan enzim *SalI* dan *BamHI*, hasil elektroforesis menunjukkan ada 2 pita dengan ukuran sekitar 3000 bp dan 600 bp. Dengan demikian disimpulkan bahwa gen *pin* sudah terpisah sempurna dari vektor kloning. Selanjutnya fragmen dari gen *pin* dipotong dari gel lalu elusi (Gambar 2.) untuk diligasi dengan *pFlap*.



Gambar 2. Hasil purifikasi gen PIN

Ligasi Gen *pin* dengan *pflap*

Gen *PIN* dan *pflap* yang telah dipotong dengan enzim *SalI* dan *BamHI*, kemudian diligasi. Hasil ligasi antara *pFlap* dan gen *pin* kemudian ditransformasi ke *E. coli* strain XL1-Blue. Berdasarkan hasil isolasi DNA plasmid gen *PIN* yang ditransformasi ke dalam sel *E. coli* menghasilkan satu ukuran yaitu ± 4442 bp. Ukuran ini didapat dari penggabungan ukuran *pFlap* yaitu 3842 bp dan gen *PIN* itu sendiri yang mempunyai ukuran sekitar 600 bp.

Kloning Gen *pinflap* ke vektor ekspresi

Setelah verifikasi pada gel agarosa menunjukkan hasil sesuai dengan yang diharapkan, selanjutnya kloning gen dilakukan dengan menggunakan *pBIN⁺* sebagai vektor ekspresi. Sebanyak 2,0 μ L insert (hasil elusi) ditambahkan dengan 5 μ L buffer ligase, 2 μ L vektor *BIN⁺* dan 1 μ L T4 ligase. Sehingga total campuran sebanyak 10 μ L. Setelah itu campuran diinkubasi selama semalam pada suhu 4°C.

Transformasi Gen *pinFlap* ke *Escherichia coli* (XL1-blue)

Hasil ligasi antara gen *pinFlap* dan *pBIN⁺* kemudian ditransformasi ke *E. coli* strain XL1-Blue sebagai tahap terakhir proses kloning. Seleksi sel yang telah mengandung vektor dilakukan berdasarkan pada marka seleksi yang dimiliki oleh vektor. Marka seleksi biasanya berupa gen yang membawa sifat resistensi terhadap antibiotik tertentu dan vektor yang digunakan pada

penelitian ini memiliki sifat resistensi terhadap ampisilin. Setelah hasil transformasi menghasilkan koloni warna putih yang mengandung plasmid rekombinan, maka beberapa koloni tersebut dikultur koloni.

Selanjutnya dilakukan isolasi plasmid, hasil isolasi plasmid kemudian diverifikasi pada gel agarosa 1%. Hasil isolasi DNA plasmid rekombinan memiliki ukuran yang tidak jauh dengan ukuran total plasmid $pBIN^+$ sekitar 12300 bp dan ukuran gen $pinFlap$ 4442 bp. Hasil klon transforman dan ukuran plasmid rekombinan membuktikan bahwa transformasi gen target ke dalam sel kompeten *E. Coli* XL-1 *Blue* dengan vektor ekspresi telah berhasil dilakukan.

Digesti Gen $PIN BIN^+$ dengan Enzim Restriksi

Plasmid yang telah diisolasi selanjutnya dianalisis pola restriksinya dengan pemotongan menggunakan enzim *AscI* dan *PacI* untuk memastikan bahwa sel yang tumbuh adalah sel transforman *E. coli* *XL1-blue* (berisi konstruk $PIN BIN^+$). Setelah dipotong dengan enzim restriksi DNA rekombinan dengan *AscI* dan *PacI* menghasilkan 2(dua) pita yaitu pita vektor ekspresi dan pita gen PIN yang mempunyai promotor dan terminator.

KESIMPULAN

Konstruk gen PIN telah berhasil disisipkan ke dalam vektor ekspresi BIN^+ . DNA rekombinan yang terkonstruksi dapat dibuktikan dengan pemotongan kembali menggunakan enzim restriksi spesifik.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Penelitian Hibah Bersaing Lembaga Penelitian Universitas Riau No. 222/H19.2/PL/2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Deptan, 2006. Usaha Pengembangan Kedelai. [http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/tan/tp2006/LP Kedelai 2. html](http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/tan/tp2006/LP%20Kedelai%20.html).
- Isda, M.N., M. Kasim, Mansyurdin dan T. Chaidamsari. 2008. Isolasi Gen *Proteinase Inhibitor* dari Tanaman Kakao (*Theobroma cacao*, L.). Seminar Nasional Kakao. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Andalas, Padang pada tanggal 22 Agustus 2008.
- Promega. 1999. *pGEM-T and pGEM-T Easy Vector System (Technical Manual No. 042)*. Wisconsin: Promega Corporation.
- Tai, H., McHenry, L., Fritz, P.J., & D.B. Furtek. (1991). Nucleid acid sequence of a 21 kDa *cocoa* seed protein with homology to the *soybean trypsin inhibitor (Kumitz)* family of *protease inhibitors*. *Plant Mol. Biol.* 16: 913-915.