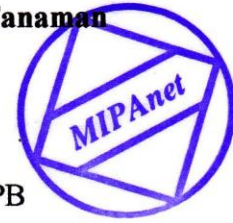


Transformasi Kandidat Gen Toleran Aluminium (*B11*) pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabaccum L.*)^{*)}

Dewi Indriyani Roslim¹ dan Miftahudin^{2,3}



- 1) Mahasiswa S3 Program Studi Biologi, Sekolah Pascasarjana IPB
- 2) Departemen Biologi, FMIPA Institut Pertanian Bogor
- 3) Penulis untuk korespondensi

ABSTRAK

Toleransi aluminium (Al) pada tanaman dikendalikan oleh satu atau lebih gen. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kandidat gen toleran Al *B11* yang diisolasi dari tanaman padi (*Oryza sativa*) ke tanaman tembakau (*Nicotiana tabaccum*). Gen *B11* sebagai kandidat gen toleran Al dari tanaman padi telah berhasil disisipkan pada vektor ekspresi pGWB5 dengan promotor 35SCaMV dan telah diintroduksi ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* AGL-O. Koloni *A. tumefaciens* yang positif membawa gen target selanjutnya diinfeksi ke tanaman model tembakau. Dari 35 tanaman tembakau transgenik putatif, 15 tanaman positif membawa gen target. Secara morfologi terdapat variasi bentuk dan ukuran daun pada tanaman tembakau transgenik putatif dibandingkan tanaman tembakau kontrol. Tanaman tembakau transgenik putatif lebih tinggi habitusnya dibandingkan tanaman tembakau kontrol. Analisis toleransi Al pada media MS + 300 μ M Al, pH 4.0 terhadap 6 nomor tanaman tembakau transgenik putatif (T0) menunjukkan adanya sifat toleransi terhadap cekaman Al pada salah satu nomor tanaman yang diuji (T0-1). Walaupun masih memerlukan pengujian lebih lanjut, hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa gen *B11* turut berperan dalam toleransi cekaman Al.

Kata kunci: aluminium, *Nicotiana tabaccum*, *Oryza sativa*, toleransi Al, transformasi

*) Makalah disampaikan pada Seminar Nasional Sains III, 13 Nopember 2011, Bogor. Indonesia

PENDAHULUAN

Keracunan aluminium (Al) merupakan masalah yang harus dihadapi tanaman yang tumbuh di tanah masam dengan pH<5. Keracunan Al menyebabkan sistem perakaran tanaman menjadi rusak sehingga mengganggu penyerapan nutrisi dari dalam tanah, menghambat pertumbuhan dan perkembangan serta menurunkan produksi tanaman.

Areal tanah masam tersebar luas di kepulauan Indonesia (Subagyo *et al.*, 2000). Pesatnya pertumbuhan penduduk di Indonesia telah menggeser kegiatan

pertanian ke lahan marginal seperti lahan masam yang mengandung Al maupun logam berat lainnya pada konsentrasi yang bersifat toksik bagi tanaman.

Umumnya tanaman pertanian tidak tahan tumbuh di lahan masam dengan Al tinggi. Namun demikian di dalam spesies tanaman padi (*Oryza sativa*) terdapat beberapa varietas yang toleran asam dan Al tinggi. Salah satunya adalah varietas Hawarabunar (Silitongan, 2008).

Kami telah mengisolasi kandidat gen toleran Al dari tanaman padi varietas Hawarabunar. Diharapkan kandidat gen ini memang berperan dalam pengendalian sifat toleran Al pada tanaman dan dapat diaplikasikan pada tanaman pertanian lainnya untuk mengatasi masalah keracunan Al. Untuk menguji peran dari kandidat gen tersebut terhadap sifat toleransi Al kami telah mengintroduksi kandidat gen tersebut ke tanaman model tembakau.

METODOLOGI

Bahan Penelitian. Bahan penelitian berupa fragmen ORF dari gen *B11*, tanaman tembakau (*Nicotiana tabaccum*) cv. Columbia dan vektor ekspresi pGWB5 (Nakagawa *et al.*, 2007).

Konstruksi Plasmid Rekombinan. Daerah *open reading frame* (ORF) dari gen *B11* sepanjang 343 pb disisipkan ke dalam vektor klon pENTR/D-TOPO menggunakan kit kloning pENTR/D-TOPO® (Invitrogen) dan menghasilkan vektor entri. Selanjutnya vektor entri ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli* DH5α dengan media seleksi 50 µg/ml Kanamycin. Lalu dilakukan PCR koloni dan pengurutan DNA dari koloni terseleksi untuk mengkonfirmasi keberadaan dan orientasi dari gen target di dalam plasmid. Selanjutnya vektor entri direaksikan dengan vektor biner ekspresi pGWB5 menggunakan kit *The Gateway® LR Clonase™ enzyme mix* (Invitrogen) untuk menghasilkan plasmid rekombinan pembawa gen target. Seleksi koloni *E.coli* DH5α yang membawa plasmid rekombinan dilakukan menggunakan 50 µg/ml Kanamisin dan 10 µg/ml Hygromycin.

Transformasi ke dalam sel *Agrobacterium tumafaciens*. Plasmid rekombinan ditransformasikan ke dalam sel *Agrobacterium tumafaciens* AGL-O

dengan metode *freeze-thaw* mengikuti prosedur yang dilakukan Xu & Li (2008) dan diseleksi menggunakan 50 µg/ml Kanamisin dan 10 µg/ml Hygromycin.

Introduksi ke tanaman model tembakau (*Nicotiana tabaccum*). Koloni *A. tumefaciens* yang positif membawa gen target selanjutnya diinfeksi ke potongan daun (1cmx1cm) dari tanaman tembakau (*Nicotiana tabaccum* cv. Columbia) dan diseleksi pada media MS + 0.5 ppm BAP + 50 µg/ml Kanamisin + 10 µg/ml Hygromycin selama 6 minggu. Selanjutnya eksplan ditumbuhkan pada media regenerasi MS selama 3 bulan, diaklimatisasi selama 4 minggu lalu ditanam di rumah kaca pada media tanah:arang sekam:pupuk casting (3.5:0.5:1). Tanaman tembakau transgenik yang diperoleh dipakai untuk menguji keterkaitan gen *B11* dengan sifat toleransi Al.

Analisis generasi T0. Analisis dilakukan dengan (1) mengisolasi DNA dari daun tanaman T0 untuk diamplifikasi menggunakan primer gen *B11*. Isolasi DNA dilakukan menggunakan prosedur yang dilakukan Miftahudin *et al.* (2004); (2) menguji toleransinya pada media MS modifikasi + 300 µM Al, pH 4.0 selama 5 minggu. Konsentrasi ion fosfat direduksi menjadi 10 µM, kalsium menjadi 100 µM dan menggunakan besi tanpa pengkelat EDTA (Parrot & Bouton, 1990); dan (3) mengamati variasi bentuk dan ukuran daun serta tinggi dan habitus tanaman.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penyisipan pada vektor entri pENTR/D-TOPO® memperoleh beberapa koloni yang tumbuh pada media seleksi. Pengujian pada 4 koloni dengan mengamplifikasi menggunakan primer gen *B11 forward* dan *reverse* yang masing-masing dipasangkan dengan primer T7 mendapatkan 3 koloni membawa gen target dan memiliki orientasi yang benar (Gambar 1).

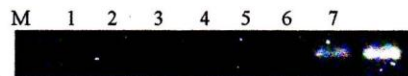


Gambar 1. Konfirmasi keberadaan gen *B11* dan orientasinya setelah disisipkan ke dalam vektor entri pENTR/D-TOPO. M: 100 bp DNA Ladder. Kolom 1, 3, 5 dan 7: PCR koloni menggunakan pasangan primer gen *B11/F* dan T7. Kolom 2, 4, 6 dan 8: PCR koloni menggunakan pasangan primer gen *B11/R* dan T7.

Vektor entri pENTR/D-TOPO® memungkinkan untuk menyisipkan secara langsung gen atau produk PCR lainnya hanya dengan menambahkan 4 nukleotida

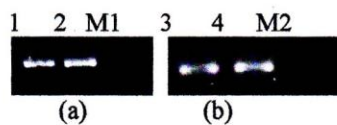
pada ujung 5' primer (Invitrogen). Namun demikian perlu dilakukan konfirmasi dengan analisis restriksi, PCR atau pengurutan DNA (Xu & Li, 2008). Orientasi gen target yang benar ditandai dengan adanya pita jika plasmid rekombinan diamplifikasi dengan pasangan primer gen *B11*/F dan T7 dan tidak ada pita jika diamplifikasi menggunakan primer gen *B11*/R dan T7 (Invitrogen).

Penyisipan gen target dari vektor entri ke dalam vektor biner ekspresi pGWB5 menggunakan teknik *gateway* dengan enzim klonase. Prosesnya mengikuti prinsip rekombinasi (atau *shuttle*). Proses rekombinasi menghasilkan beberapa koloni DH5 α yang positif membawa plasmid rekombinan. Selanjutnya transformasi plasmid rekombinan ke dalam *A. tumefaciens* menghasilkan 2 koloni yang positif membawa plasmid tersebut berdasarkan hasil PCR koloni menggunakan primer gen *B11* (Gambar 2).



Gambar 2. PCR koloni menggunakan primer gen *B11* terhadap koloni *Agrobacterium tumefaciens* setelah diintroduksi dengan plasmid rekombinan.

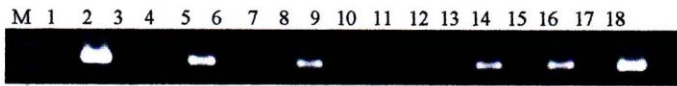
Hasil amplifikasi plasmid dari koloni *A. tumefaciens* no 6 dan 7 menggunakan primer gen *B11* menunjukkan bahwa kedua koloni memang positif membawa fragmen ORF dari gen *B11* (Gambar 3). Kedua koloni tersebut (6 dan 7) siap digunakan untuk menginfeksi tanaman tembakau.



Gambar 3. (a) Plasmid rekombinan dari koloni *A. tumefaciens* transforman dan (b) PCR dengan primer gen *B11*. Kolom 1 dan 2: plasmid rekombinan, M1: 1kb DNA Ladder, 3 dan 4: hasil PCR plasmid rekombinan dengan primer gen *B11*, M2: 100bp DNA Ladder

Introduksi gen *B11* ke dalam tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) dengan perantara *A. tumefaciens* menghasilkan 35 tanaman transforman dan 15 diantaranya positif membawa gen *B11* berdasarkan amplifikasi DNA total tanaman transforman tersebut dengan primer gen *B11*. Tidak ada gen *B11* di dalam DNA plasmid pGWB5 dan DNA genom tanaman tembakau kontrol. Tanaman tembakau transforman menghasilkan pita amplifikasi dari gen *B11*

dengan ukuran yang sama dengan yang teramplifikasi di plasmid rekombinan (Gambar 4).



Gambar 4. Amplifikasi DNA genom tanaman tembakau menggunakan primer gen *BII*. M: 100 DNA Ladder, 1: pGWB5, 2: Plasmid rekombinan, 3: *Nicotiana tabaccum* kontrol, 4-18: tembakau transforman.

Tinggi dari tanaman tembakau transforman berkisar 150-205 cm, lebih tinggi daripada tanaman kontrol yang memiliki tinggi kurang dari 150 cm. Bentuk dan ukuran daun dari tanaman tembakau transforman bervariasi, begitu pula dengan habitusnya.

Selanjutnya analisis sifat toleransi Al terhadap 6 nomor tanaman tembakau transforman (T0) yang diambil secara acak menunjukkan adanya perbedaan pertumbuhan tajuk dan akar dari tanaman tembakau transforman dibandingkan kontrol. Tanaman tembakau transforman menghasilkan lebih banyak akar lateral dibandingkan kontrol. Tajuk dari tanaman tembakau transforman berkembang lebih baik daripada kontrol, terutama T0-1.

Fenomena yang berbeda terlihat pada T0-1, yaitu media tumbuh yang diberi perlakuan Al yang ditanami tanaman T0-1 mencair setelah 4 minggu dengan pH tetap 4.0. Hal ini tidak dijumpai pada tanaman tembakau transforman lain maupun tanaman tembakau kontrol yang diuji, baik yang ditanam pada media kontrol maupun perlakuan Al.

KESIMPULAN

Dari 35 tanaman tembakau transgenik putatif, 15 tanaman positif membawa gen target. Secara morfologi terdapat variasi bentuk dan ukuran daun pada tanaman tembakau transgenik putatif dibandingkan tanaman tembakau kontrol. Tanaman tembakau transgenik putatif lebih tinggi habitusnya dibanding tanaman tembakau kontrol. Analisis toleransi Al pada media MS + 300 μ M Al, pH 4.0 terhadap 6 nomor tanaman tembakau transgenik putatif (T0) menunjukkan adanya sifat toleransi terhadap cekaman Al pada salah satu nomor tanaman yang diuji (T0-1). Walaupun masih memerlukan pengujian lebih lanjut, hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa gen *BII* turut berperan dalam toleransi cekaman Al.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Riset Dasar T.A. 2008-2009 a.n. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si. Terima kasih juga disampaikan kepada Hibah Penelitian Mahasiswa Program Doktor dari Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DIKTI), Departemen Pendidikan Nasional yang juga telah membiayai bagian akhir dari penelitian ini, serta Tsuyoshi Nakagawa (*Shimane University, Japan*) atas pGWB5 yang telah diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Invitrogen Co: Gateway® Technology Manual. [<http://www.invitrogen.com>].
- Miftahudin, Scoles GJ & Gustafson JP. 2004. Development of PCR-based co-dominant markers flanking the *Alt3* gene in rye. *Genome* 47:231-238.
- Nakagawa T., Kurose T., Hino T, Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jinbo T. & Kimura T. 2007. Development of series gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J of Biosci & Bioengineering* 104(1):34-41.
- Parrot W. A. & Bouton J. H. 1990. Aluminum tolerance in *Alfalfa* as expressed in tissue culture. *Crop Sci.* 30:387-389.
- Silitonga, T.S. 2008. Konservasi dan pengembangan sumberdaya genetik padi untuk kesejahteraan petani. *Pekan Budaya Padi 2008 – KRKP. Badan Penelitian dan Pengembangan, Departemen Pertanian.*
- Subagyo, H., Nata Suharta, dan Agus. B. Siswanto. 2000. Tanah-tanah pertanian di Indonesia. hlm. 21-66 dalam Buku Sumber daya Lahan Indonesia dan Pengelolaannya. Pusat Penelitian Tanah dan Agroklimat, Bogor.
- Xu R & Li Q. Q. 2008. Protocol: Streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway® TOPO vector system. *Plant Methods* 4(4). doi:10.1186/1746-4811-4-4
<http://www.plantmethods.com/content/4/1/4>