

Identifikasi *Transgene* pada Tanaman Padi (*oryza sativa* var. *koshihikari*) yang Ditransformasi dengan Bantuan *Agrobacterium tumefaciens*, Menggunakan Metode Tanpa Teknik Kultur Jaringan.
Transgene Identification in Rice (oryza sativa var. koshihikari) which Transformed Using Agrobacterium tumefaciens without Tissue Culture Technic.

I Putu Suparthana^{1*}, Masahiro Nogawa² dan Mineo Kojima²

Jurusan Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Udayana¹
dan Department of Applied Biology, Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu
University, 3-15-1 Tokida, Ueda, Nagano 386-8567, Japan².

Diterima 15 Agustus 2014 / Disetujui 22 Agustus 2014

ABSTRAK

Metode transformasi tanaman dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* biasa dilakukan dengan melibatkan teknik kultur jaringan, akan tetapi teknik kultur jaringan memiliki beberapa kelemahan yaitu memerlukan suatu kondisi steril, memakan banyak waktu, sering terjadi mutasi dalam proses kultur *in vitro* dan sejumlah tanaman bersifat rekalsitran pada tahap regenerasi. Disisi lain metode baru (*in planta transformation system*) yang dikembangkan dalam penelitian ini mampu mengatasi kelemahan-kelemahan tersebut. Penelitian dilakukan pada tanaman padi dengan bantuan *A. tumefaciens* sebagai inokulum namun tidak melibatkan teknik kultur jaringan pada masa regenerasinya. Biji padi (*Oryza sativa* L. var. *Koshihikari*) direndam dalam air selama 2 hari, dengan demikian embrionya yang mengandung sel apikal meristem dapat diinokulasi dengan cara menusukkan jarum yang telah dicelupkan dalam inokulum. Biji padi yang telah diinokulasi selanjutnya ditumbuhkan dilapangan selayaknya pembenihan biasa tanpa perlakuan steril. Untuk menentukan keberhasilan teknik ini, dua jenis strain mutan *A. tumefaciens* (M-21 dan LBA4404) digunakan dalam transformasi. Mutan M-21 mengandung Tn5 tersisip dalam gen *iaaM* dan mutan LBA4404 membawa binari plasmid vektor. Transgen dari mutan M-21 dapat diidentifikasi dari perubahan fenotipe pada tanaman padi transgenik sedangkan dari mutan LBA4404 dapat diidentifikasi dengan uji histokimia dan ketahanan terhadap antibiotik (*hygromycin B*).

Kata kunci: *in planta transformation, A. tumefaciens, transformation method*

*Korespondensi Penulis:
Email: ipsuparthana@gmail.com

PENDAHULUAN

Agrobacterium-mediated transformation adalah suatu metode pengubahan genetik (transformasi genetik) pada tanaman yang dilakukan dengan menggunakan bantuan dari *Agrobacterium tumefaciens*. Metode ini telah berkembang menjadi sebuah metode baku dan diterapkan di laboratorium-laboratorium di seluruh dunia. *A. tumefaciens* pada habitat aslinya merupakan bakteri penyebab penyakit tumor *crown gall* pada tanaman dikotil. *A. tumefaciens* secara alami memiliki kemampuan mengubah susunan genetik inangnya dengan cara memindahkan (transfer) suatu materi genetik dari plasmidnya ke dalam genom tanaman inangnya. Rekayasa genetik yang dilakukan pada plasmid *A. tumefaciens* tetap dapat ditransfer ke dalam genom dan dapat diekspresi di dalam sel tanaman inangnya. Penemuan inilah yang kemudian mengantarkan bioteknologi tanaman berkembang dengan pesat dan diaplikasi oleh peneliti-peneliti di seluruh dunia.

Diawal tahun 1990an Hiei (1994) melakukan suatu terobosan besar dengan keberhasilannya melakukan transformasi genetik pada tanaman padi dengan bantuan *A. tumefaciens*. Sejak itu kemudian *Agrobacterium-mediated transformation* pada tanaman padi menjadi sebuah metode yang rutin dilakukan di berbagai laboratorium di seluruh dunia. Metode ini pada dasarnya sama dengan metode yang telah umum dilakukan pada tanaman dikotil. Pada

metode ini, pertama-tama *A. tumefaciens* diinokulasi pada jaringan tanaman yang mengandung sel-sel embrio yang sedang aktif membelah, seperti misalnya kalus, yang dilakukan di dalam sistem kultur jaringan. Selanjutnya, *A. tumefaciens* dihilangkan dengan menggunakan antibiotik dan sel-sel embrio yang telah ditransformasi diseleksi dengan menggunakan media yang sesuai. Pada tahap akhir embrio yang mulai tumbuh menjadi tanaman baru diregenerasi dengan berbagai medium yang sesuai. Walaupun *Agrobacterium-mediated transformation* di dalam sistem kultur jaringan telah digunakan secara luas oleh para peneliti, namun metode ini memiliki beberapa kelemahan yaitu memerlukan suatu kondisi steril, memakan banyak waktu, sering terjadi mutasi dalam proses kultur *in vitro* dan sejumlah tanaman bersifat rekalsitran pada tahap regenerasi.

Disisi lain, berbeda halnya dengan transformasi tanaman di dalam sistem kultur jaringan, suatu metode transformasi tanaman yang tidak menggunakan kultur jaringan (*in planta transformation system*) dapat mengatasi kelemahan-kelemahan yang disebutkan diatas. *In planta transformation system* tidak menggunakan kultur *in vitro*, yang menjadi keunggulan dari metode ini.

Sejauh ini transformasi pada tanaman padi dengan bantuan *A. tumefaciens* menggunakan sistem *in planta* baru pertama kali dilakukan dalam penelitian ini dan penelitian sejenis belum pernah dilaporkan oleh peneliti lain.

Pada penelitian ini apical meristem pada biji padi yang telah direndam beberapa hari diinokulasi dengan *A. tumefaciens*, selanjutnya ditumbuhkan selayaknya menanam padi di lapangan. Agar dapat diverifikasi terjadinya transformasi genetik pada tanaman padi tersebut, kami menggunakan strain *A. tumefaciens*. M-21 dan LBA4404. Strain M-21 adalah strain mutan yang bersifat avirulen karena Gen *iaaM* yang terlibat dalam biosintesa indoleacetic acid (IAA) termutasi oleh penyisipan Tn5, sementara gen-gen lainnya pada T-DNA *region* termasuk gen yang terlibat dalam sintesa sitokinin (*ipt*) masih tetap utuh. Adapun konsekuensi penggunaan strain M-21 adalah dihasilkannya tanaman padi yang memproduksi lebih banyak sitokinin sehingga menampilkan perubahan fenotip yang cukup dramatis yang disebabkan oleh ketidakseimbangan hormon dalam sel tanaman tersebut. Ini merupakan indikasi yang diharapkan sebagai petunjuk keberhasilan metode transformasi dengan *in planta transformation system*. Sementara itu pada strain LBA4404 terkandung plasmid binary yaitu pIG121-Hm yang dapat dideteksi dengan system histokimia dan seleksi ketahanan terhadap *hygromycin* B karena dalam plasmid ini terdapat gen GUS (β -glucuronidase) dan gen ketahanan terhadap *hygromycin* B.

BAHAN DAN METODE

Strain *A. tumefaciens* dan binary vector

A. tumefaciens yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain mutan M-21 dan LBA4404. Strain M-21 dibuat dengan

cara memutasi *A. tumefaciens* virulen A208 menggunakan transposon 5 (Tn5). Tn5 menyisipi gen yang terlibat dalam biosintesa IAA yaitu gen tryptophan monooxygenase (*iaaM*) yang terdapat di dalam T-DNA *region* pada Ti-plasmid. Strain ini menjadi avirulen karena gagal mengintegrasikan T-DNA nya ke dalam genom sel inang.

Strain LBA4404 mengandung plasmid binary pIG121-Hm yang dikonstruksi oleh Ohta et.al. Di dalam plasmid binary ini terkandung gen ketahanan terhadap *kanamycin* (*nptII*), gen ketahanan terhadap *hygromycin* (*hpt*) dan gen β -glucuronidase (GUS) yang diekspresi di dalam sel tanaman inang.

Transformasi

Strain-strain *A. tumefaciens* ditumbuhkan pada media LB mengandung antibiotika kanamycin (50 μ g/ml) dan rifampicin (10 μ g/ml) untuk M-21, dan streptomycin (50 μ g/ml), kanamycin (50 μ g/ml) dan rifampicin (10 μ g/ml) untuk LBA4404 pada suhu 28°C selama 2 hari. Bakteri ini diambil dengan menggunakan loop dan disuspensi dalam air steril dengan kepekatan $1,0 \times 10^9$ sel/ml.

Biji padi disterilisasi dengan menggunakan ethanol dan sodium hypochlorite lalu direndam dalam air steril selama 2 hari pada suhu 20°C. Air diganti sekali selama proses perendaman. Setelah 2 hari perendaman, bagian embrio akan berubah menjadi putih. *A. tumefaciens* diinokulasikan ke dalam embrio dengan menusukkan jarum steril (kedalaman 1-1,5 mm) yang telah dicelupkan ke dalam inokulum *A. tumefa-*

ciens. Biji padi yang telah diinokulasi diletakkan diatas kertas saring di dalam cawan petri (dibungkus alumunium foil) yang telah diisi tanah steril. Biji padi didalam cawan petri ini selanjutnya diinkubasi dalam ruang tertutup pada suhu 23°C selama 9 hari. Pada masa inkubasi ini 70-75% biji padi akan berkecambah yang selanjutnya kecambah-kecambah padi tersebut di rendam dalam larutan mengandung *cefotaxime* (1000 ppm) selama 1 jam pada suhu ruang. Pada bagian akhir, kecambah-kecambah padi ini kemudian ditanam dalam pot selayaknya menanam padi di lapangan. Tanaman padi transgenik ini ditumbuhkan dan dirawat seperti biasa hingga didapatkan biji-biji padi sebagai T1 nya. Untuk tanaman kontrol, saat inokulasi biji padi, jarum hanya dicelupkan pada air steril sebelum ditusukkan pada bagian embrionya.

Penentuan Resistensi Terhadap Hygromycin pada Tanaman Padi Transgenik

Kecambah tanaman padi dibersihkan kulitnya lalu disterilisasi dengan ethanol dan *sodium hypochloride* (1%). Bibit tanaman padi ini kemudian dibilas tiga kali dengan air lalu ditumbuhkan pada kondisi steril dalam air (kedalaman 2-3 mm) mengandung *hygromycin* B (20µg/ml) pada suhu 28°C selama 16 jam dengan sinar dan 8 jam tanpa sinar. Ketahanan terhadap *hygromycin* B dinilai setelah 6 hari kemudian.

Uji Histokimia Aktifitas β -glucuronidase (GUS)

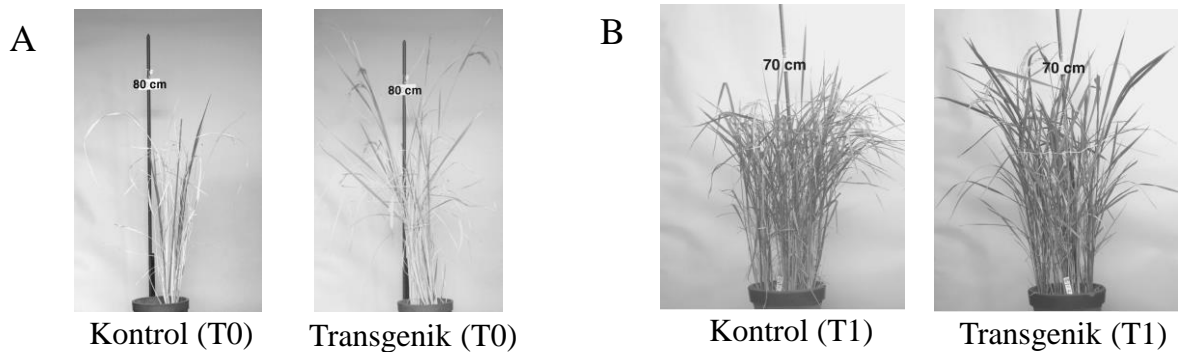
Ekspresi gen GUS dalam sel tanaman padi diuji dengan metode yang kenalkan oleh Kapila *et.al*. Seluruh bagian tanaman yang berumur 4 hari di rendam dalam larutan pewarnaan histokimia.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Transformasi menggunakan *A. tumefaciens* strain mutan M-21.

Tanaman transgenik yang ditransformasi dengan *A. tumefaciens* strain mutan M-21 diharapkan dapat menunjukkan adanya suatu perubahan fenotipe yang disebabkan oleh ketidakseimbangan produksi hormon pertumbuhan di dalam selnya. Dengan dasar pertimbangan tersebut dalam penelitian ini pertama-tama kami mentransformasi tanaman padi dengan menggunakan *A. tumefaciens* strain mutan M-21 dan menentukan apakah terjadi perubahan fenotipe pada tanaman transgenik dan apakah perubahan ini dibawa pada keturunan T1 nya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman transgenik (T₀) yang ditransformasi dengan *A. tumefaciens* strain mutan M-21 menampakkan adanya perubahan fenotipe sebagaimana ditunjukkan pada gambar 1, panel A.

Tanaman transgenik mempunyai ketinggian melebihi tanaman kontrolnya. Perubahan fenotipe yang ditunjukkan oleh tanaman transgenik (T₀) ini belum dapat dipastikan apakah memang benar disebabkan oleh adanya ketidakseimbangan hormon di dalam selnya. Akan tetapi yang dapat dipastikan



Gambar 1. Panel A adalah tanaman transgenik (T₀) yang menunjukkan perubahan fenotipe (tinggi tanaman) yang dihasilkan dari transformasi *in planta* menggunakan strain M-21. Panel B, perubahan fenotipe tanaman transgenik diwariskan pada turunannya (T₁).

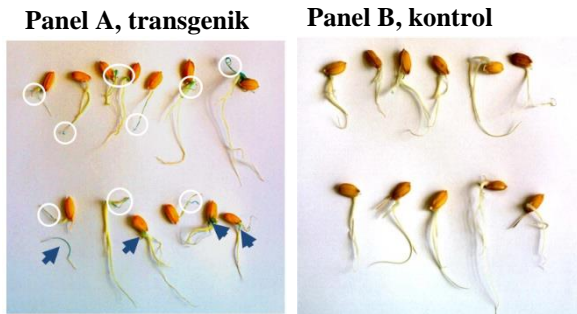
adalah perubahan fenotipe ini dapat diwariskan pada keturunannya (T₁) sebagaimana ditunjukkan pada gambar 1, panel B. Adanya pewarisan sifat berupa perubahan fenotipe (tinggi tanaman) dari tanaman padi transgenik T₀ diturunkan pada tanaman padi transgenik T₁ menunjukkan suatu indikasi keberhasilan transformasi yang dilakukan dengan metode transformasi tanaman yang tidak menggunakan kultur jaringan (*in planta transformation system*).

Transformasi menggunakan *A. tumefaciens* strain LBA4404 yang mengandung binari plasmid pIG121-Hm.

Binari plasmid vektor pIG121-Hm mengandung gen GUS yang disisipi intron dan gen ketahanan terhadap *hygromycin* di dalam T-DNANYa sehingga pengujian dengan metode pewarnaan secara histokimia dan ketahanan terhadap *hygromycin* dapat dilakukan terhadap tanaman transgenik yang dihasilkan dari

transformasi dengan strain ini. Sebanyak 30 biji tanaman padi (T₁) yang dihasilkan dari tanaman transgenik induk (T₀) dipilih secara acak untuk dianalisa dengan metode pewarnaan histokimia. Sementara itu sebagai pembanding, sebanyak 30 biji padi (T₁) yang dihasilkan dari tanaman yang ditransformasi dengan air dianalisa dengan metode yang sama. Gambar 2, panel A menunjukkan bahwa dari 30 biji tanaman padi yang dites, 13 diantaranya bereaksi positif terhadap uji gen GUS. Sementara itu seluruh biji tanaman padi hasil transformasi menggunakan air bereaksi negatif terhadap uji gen GUS (Gambar 2, panel B).

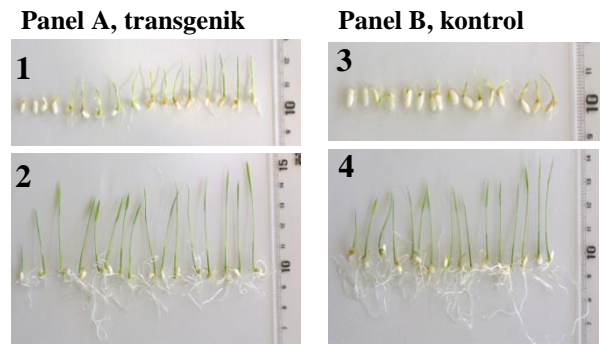
Ketahanan tanaman padi transgenik terhadap *hygromycin* di uji dengan cara perkecambahan biji padi pada media air yang mengandung *hygromycin* B (20 ppm). Dari 17 biji padi (T₁) yang berasal dari induk (T₀) tanaman padi transgenik yang dikecambahkan pada media air yang mengandung *hygromycin* B, 12 diantaranya dapat berkecambah dengan



Gambar 2. Panel A, ekspresi transgen (GUS) dapat dideteksi dengan uji histokimia pada perkecambahan tanaman transgenik (T1). Panel B, ekspresi transgen berupa gen GUS tidak ditemukan pada perkecambahan tanaman kontrol (T1).

baik (Gambar 3, panel A-1), sebagaimana biji padi transgenik yang dkecambahkan pada media air (.Gambar 3, panel A-2). Sementara itu 15 biji padi (T1) yang berasal dari induk (T0) tanaman kontrol tidak dapat berkecambah dengan baik pada media air yang mengandung *hygromycin* B (Gambar 3, panel B-3), sedangkan 16 biji padi (T1) lainnya yang dkecambahkan pada media air tanpa antibiotik dapat tumbuh dengan baik (Gambar 3, panel B-4).

Dari keseluruhan hasil yang diperoleh dari penelitian ini, empat jenis pembuktian dapat memverifikasi keberhasilan metode transformasi yang dikembangkan dalam penelitian ini. Pertama, transformasi menggunakan strain M-21 dapat menghasilkan tanaman transgenik yang mengalami perubahan fenotipe berupa tinggi tanaman. Kedua, perubahan fenotipe ini dapat diwariskan pada keturunannya (T1). Ketiga, transgene berupa gen GUS dapat dideteksi dengan metode histokimia pada perkecambahan biji padi transgenik (T1). Keempat, biji padi transgenik (T1)



Gambar 3. Panel A, biji padi transgenik (T1).tetap mampu berkecambah pada media mengandung *hygromycin* B (1), sebagaimana perkecambahan pada media air (2). Panel B, biji padi kontrol (T1).sangat terganggu perkecambahannya pada media mengandung *hygromycin* B (3), sementara pada media air dapat berkecambah dengan baik (4).

memiliki ketahanan terhadap antibiotik *hygromycin* B sehingga dapat berkecambah dengan baik pada media air mengandung *hygromycin* B.

Efisiensi metode transformasi yang dikembangkan dalam penelitian ini mencapai 43% pada analisis transgen (gen GUS) dengan uji histokimia. Nilai efisiensi ini tampak jauh lebih besar dibandingkan hasil-hasil penelitian yang telah dilaporkan oleh Hiei *et.al.*, 1997; Park *et.al.*, 1996 dan Cheng *et.al.*, 2004 yang menggunakan metode *in vitro*. Walaupun demikian kenyataan ini cukup beralasan mengingat *A. tumefaciens* di alam adalah bakteri patogen yang dapat menimbulkan penyakit tumor melalui kemampuannya mentransfer materi genetik kedalam genom tanaman inangnya yang tidak lain adalah merupakan proses transformasi secara alami. Ketika *A. tumefaciens* strain A208 yang merupakan

induk dari mutan M-21 yang digunakan dalam penelitian ini, diinokulasikan pada daun tanaman cocor bebek (*Kalanchoe daigremontiana*) yang ditanam dalam pot dengan cara menggoreskan tusuk gigi yang telah dilumuri inokulum pada permukaan daunnya, *gall* tumor dapat terbentuk (100%) pada luka-luka bekas goresan tersebut setelah 6 minggu (Majumder *et.al.*, 2001). Efisiensi infeksi semacam ini, dalam hal ini adalah transformasi, pada tanaman yang diinokulasi mungkin dipengaruhi oleh sejumlah faktor seperti auxin, sitokinin dan sejumlah faktor lain yang belum dapat diidentifikasi, yang dibutuhkan untuk pembentukan *gall* pada waktu yang tepat, konsentrasi yang optimal dan kombinasi yang tepat. Hal lainnya adalah sel-sel atau jaringan dari tanaman utuh yang digunakan dalam *in planta transformation system* tentunya memiliki ketahanan yang cukup kuat terhadap patogen dan stres, kapasitas diferensiasi, regenerasi dan lainnya yang cukup tinggi dibandingkan sel-sel atau jaringan sel yang digunakan pada sistem kultur jaringan. Infeksi *A. tumefaciens* pada tanaman utuh menyerupai metode transformasi yang dikembangkan dalam penelitian ini; kami menginokulasi *A. tumefaciens* pada biji yang telah direndam selama 2 hari, kemudian menumbuhkannya dalam pot tanpa perlakuan steril selayaknya menumbuhkan tanaman biasanya. Oleh karena itu *in planta transformation system* yang dikembangkan dalam penelitian ini menyerupai proses infeksi yang dilakukan *A. tumefaciens* secara alami. Hal inilah yang mendukung tingginya efisiensi transformasi yang dikembangkan dalam penelitian ini.

KESIMPULAN

Kami telah mentransformasi tanaman padi melalui bijinya dengan metode *in planta* sebagaimana dilaporkan dalam hasil penelitian ini dan telah pula melakukan beberapa kali pengulangan. Hasil yang kami dapat dari seluruh ualangan tersebut adalah sama seperti hasil dalam laporan (artikel) ini. Hal ini menunjukkan keberhasilan *in planta transformation system* yang dikembangkan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Hiei, Y., Ohta, S., Komari. T. and Kumashiro T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.*, 6, 271-282.
- Majumder, P., Shioiri, H., Nozue, M. and Kojima, M. (2001). Isolation and characterization of a new virulence gene (*abvA*) of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 67, 124-133.
- Cheng, M., Lowe, B. A. Spencer, T. M., Ye, X. and Armstrong, C. L. (2004): Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species. *In vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 40, 31- 45.
- Kapila, J., Ryke, R. D., Montagu, M, V. and Angenon, G. (1977). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*. 122, 101-108.