

KONSTRUKSI VEKTOR BINER UNTUK EKSPRESI GEN *dip22* (YANG DIISOLASI DARI TEBU VARIETAS M 442-51) PADA TANAMAN

Wiwit Budi Widyasari* dan Sony Suhandono**

* Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia, Jl. Pahlawan 25 Pasuruan

** Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa 10 Bandung

ABSTRACT

Sugarcane is the principle plant for producing sugar in Indonesia. Water supply is one key element in the agronomy of sugarcane. Sugarcane is a high biomass crop which requires large amounts of water. Low yields of sugar observed in water stressed plants indicate that sugarcane is very sensitive to drought. A number of genes that respond to drought, salt, and cold stress at the transcriptional level have been reported. dip22 (drought inducible protein) protein isolated from drought resistance variety M 442-51 was predicted to be a protein regulator to water stress in sugarcane. Increasing of tolerance to water stress by over expression of dip22 genes in high yield sugarcane variety hopefully will maintain sugar production. The goal of this research was to construct a binary vector for dip22 gene expression in plant. dip22 gene from mutated PCR was cloned to pGEM®-T Easy and transformed to Escherichia coli strain DH5α. And then, these gene was isolated again from pGEM®-T Easy-dip22 (pGdip) plasmid using restriction enzymes NcoI and PmlI. pCAMBIA 1303 plasmid is an expression vector which has the constitutive promoter CaMV35S. Recombinant plasmid was transformed to Escherichia coli strain DH5α for plasmid propagation through DNA replication. Recombinant plasmid was isolated, and digested with NcoI and PmlI to examine the presence of dip22 gene in the pCAMBIA 1303 plasmid. The recombinant plasmid was transformed to A. tumefaciens strain LBA 4404. Plasmid isolated from A. tumefaciens was digested with Bst XI and Bst EII to examine the similarity between pCAMBIA 1303-dip22 (pCdip) from Escherichia coli and A. tumefaciens. The result by electrophoresis showed that both plasmids had the same size after digested. It was concluded that the transformed A. tumefaciens strain LBA 4404 bacteria has pCAMBIA 1303-dip22 (pCdip) plasmid indeed. Therefore, this construct of dip22 gene in binary vector can be used for improving drought tolerance in plant.

Key words: *dip22 gene, sugarcane, binary vector, drought tolerant*

PENGANTAR

Pergeseran budidaya tebu dari lahan sawah ke lahan kering menuntut tersedianya varietas tebu komersial yang toleran terhadap cekaman kekeringan, sehingga produksi kristal gula yang optimal dapat dipertahankan. Hal ini didukung dengan kondisi tanaman tebu yang memiliki biomassa tinggi sehingga membutuhkan air dalam jumlah yang banyak (Inmam-Bamber dan McGlinchey, 2003; Wiedenfeld, 1995 dalam Wiedenfeld, 2004). Hasil panen tebu yang kurang maksimal pada kondisi cekaman air ringan mengindikasikan bahwa tebu sangat sensitif terhadap kekeringan (Wiedenfeld, 2004).

Upaya untuk meningkatkan sifat toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan melalui rekayasa genetik, dapat ditempuh dengan cara transformasi gen yang mengkode suatu protein atau enzim, yang berperan dalam sistem pertahanan diri tumbuhan terhadap cekaman kekeringan. Pendekatan melalui teknik ini telah berhasil dilakukan pada padi (Xu *et al.*, 1996), tembakau (Kishore *et al.*, 1995), dan tebu (Zhen Zhang *et al.*, 2006).

Meskipun pemuliaan konvensional dapat menghasilkan varietas yang toleran terhadap cekaman lingkungan tertentu, tetapi pencapaian lebih jauh hanya bisa dicapai melalui manipulasi gen yang terlibat dalam toleransi terhadap cekaman (Smirnoff dalam Babu *et al.*, 2004). Metode konvensional yang dipakai sebelumnya untuk mengatasi masalah kekeringan pada tebu adalah dengan perkawinan silang. Namun varietas tebu yang digunakan sebagai tetua adalah tebu hibrida hasil persilangan sebelumnya. Dengan demikian metode pemuliaan konvensional pada tebu, dibatasi oleh *gene pool* yang sempit, genom yang kompleks, fertilitas rendah, dan siklus seleksi yang panjang (Suprasanna dan Bapat, 2006).

Strategi baru untuk memecahkan masalah pada program pemuliaan konvensional adalah dengan teknologi DNA rekombinan. DNA rekombinan merupakan teknik yang dapat digunakan untuk menguraikan mekanisme-mekanisme kompleks yang berkaitan dengan ekspresi gen. Rekayasa genetika merupakan salah satu teknik DNA rekombinan. Teknik ini mengubah urutan DNA untuk

memodifikasi gen, yang selanjutnya dimasukkan kembali ke dalam sel atau organisme sehingga dapat meningkatkan (over ekspresi) atau menurunkan (*silencing*) sejumlah protein yang dihasilkan tanaman transgenik. Gen yang direkayasa dapat berasal dari spesies yang sama atau berbeda dengan spesies tanaman yang akan disisipkan gen tambahan (Alberts *et al.*, 1994).

Teknologi DNA rekombinan merupakan perpaduan sejumlah teknik dalam biologi molekuler. Beberapa teknik tersebut antara lain adalah (1) restriksi DNA dengan enzim nuklease, sehingga memudahkan isolasi dan manipulasi setiap gen yang dikehendaki; (2) kloning DNA, yaitu apabila sebuah fragmen DNA tertentu telah diintegrasikan ke dalam suatu unsur genetik yang dapat menggandakan diri sendiri (plasmid atau virus) dan hidup pada bakteri sehingga sebuah molekul DNA dapat direproduksi untuk menghasilkan salinan identik yang berjumlah jutaan; (3) rekayasa genetika, yaitu suatu cara mengubah urutan DNA untuk memodifikasi gen, yang selanjutnya dimasukkan kembali ke dalam sel atau organisme (Alberts *et al.*, 1994).

Pada dasarnya tersedianya promoter aktif yang kuat sangat diperlukan untuk over-ekspresi suatu gen pada tanaman baik monokotil maupun dikotil. Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa *CaMV35S* adalah promoter konstitutif yang aktif pada sel tanaman monokotil, akan tetapi kekuatannya sedikit menurun pada sel dikotil dan tidak aktif pada beberapa tipe sel seperti pollen (Christensen dan Quail, 1996). Selain itu, promoter *Adh1* yang diisolasi dari jagung sudah digunakan pada penelitian transformasi gen pada tanaman monokotil, akan tetapi aktivitasnya terbatas pada akar, tunas meristem, endosperm, dan pollen (Christensen dan Quail, 1996). Sejauh ini, kebanyakan laporan penelitian tentang over ekspresi gen asing untuk meningkatkan toleransi terhadap cekaman abiotik pada tanaman menggunakan promoter konstitutif (Su dan Wu, 2004).

Pada penelitian sebelumnya, dilaporkan adanya ekspresi kuat dari gen *dip22* (*drought inducible protein*) pada tebu yang tercekam kekeringan (Widyasari, 2004 dan Widyasari *et al.*, 2004). Dengan menggunakan metode DNA rekombinan, over ekspresi gen *dip22* pada varietas tebu unggul yang peka kekeringan, diharapkan dapat meningkatkan sifat toleransi varietas tersebut terhadap cekaman kekeringan sehingga produksi gula yang dihasilkan tetap optimal meskipun ditanam pada lahan kering. Penelitian ini bertujuan mengkonstruksi vektor biner untuk ekspresi gen *dip22* pada tanaman, khususnya tanaman tebu.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan beberapa bahan, di antaranya adalah klon gen *dip22* dalam plasmid *pGEM*[®]-T Easy yang diperoleh dari penelitian sebelumnya (Sugiharto *dkk.*, 2001). Selanjutnya klon gen *dip22* tersebut diperbanyak pada *E. coli* strain DH5 α (Widyasari, 2004). Vektor ekspresi yang digunakan adalah plasmid *pCAMBIA* 1303 yang diperoleh dari *Center for Application of Molecular Biology on International Agriculture* (CAMBIA), Australia.

Cara Kerja

Persiapan PCR mutagenesis

Agar gen *dip22* dapat disisipkan pada vektor ekspresi yang diinginkan, maka gen tersebut harus dimutasi dengan metode PCR mutagenesis sehingga memiliki tempat pemotongan enzim yang sesuai dengan vector ekspresinya. Pada penelitian ini, *dip22* akan disambungkan pada *pCAMBIA* 1303, oleh karena itu dilakukan strategi sebagai berikut.

Design primer

Gen *dip22* memiliki ukuran sekitar 840 pasang basa (pb). *Start codon* berada pada basa ke 130 sedangkan *stop codon* pada nukleotida ke-560. Pada *start codon* (\pm 130 pb) terdapat tempat pemotongan untuk enzim *Nco* I, hal ini sesuai dengan peta restriksi *pCAMBIA* 1303. Pada *stop codon* tidak terdapat tempat pemotongan untuk enzim *Pml*I seperti yang ada pada *pCAMBIA* 1303. Oleh karena itu, perlu dilakukan penyisipan tempat pemotongan *Pml*I pada gen *dip22* menggunakan metode PCR mutagenesis. Pertama kali yang harus dilakukan adalah merancang primer untuk PCR mutagenesis. *Primer forward* yang digunakan adalah 5'- TCG ATC CAA TTG TTC ACT CGC TCA G-3' (dimulai dari basa ke-50 sampai 74). Sedangkan primer *backward* adalah 5'-CAC⁴GTG ATC AGC CGA AGA AGT GGT GCT TC-3' (dimulai dari basa nukleotida ke 560).

Reaksi PCR mutagenesis

Reaksi PCR dilakukan menggunakan program reaksi sebagai berikut: tahap pertama pada suhu 96 °C selama 2 menit satu kali siklus reaksi; tahap kedua 30 kali siklus reaksi dengan suhu 96 °C selama 45 detik, 45 °C selama 30 detik, 72 °C selama 1 menit; dan tahap ketiga dilakukan satu kali siklus reaksi dengan suhu 72 °C selama 7 menit.

Purifikasi DNA dengan *Gel Extraction Kit* dari QIAGEN

Purifikasi DNA dari gel mengikuti protokol dari produsen Qiagen. Ke dalam tabung mikrosentrifuga yang berisi gel, ditambahkan 3× volume gel agarosa bufer Q1. Tabung diinkubasi pada temperatur 50 °C selama 10 menit atau sampai semua gel larut sehingga warnanya sama dengan bufer Q1. Campuran bufer Q1 dan gel agarosa yang telah larut dimasukkan ke dalam kolom membran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 1 menit. Cairan yang tertampung di bagian bawah kolom dibuang. Untuk membersihkan kolom dari sisa-sisa gel agarosa, ke dalam kolom ditambahkan 500 µL bufer Q1 kemudian kolom disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 1 menit. Pemurnian dilanjutkan dengan menambahkan 750 µL bufer P1 ke dalam kolom, kemudian kolom disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 g selama 1 menit. Lalu ke dalam kolom ditambahkan 40 µL bufer EB tepat di bagian tengah dari membran yang terdapat pada kolom. Kolom ditempatkan pada tabung mikrosentrifuga steril kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 g selama 1 menit. DNA yang bersih akan terlarut dalam bufer EB dan ditampung dalam tabung mikrosentrifuga baru.

Persiapan sel kompeten

Pembuatan sel kompeten dilakukan sesuai anjuran protokol yang terdapat dalam kit sel kompeten *E. coli* (Promega) dengan sedikit modifikasi. Bakteri strain DH5α dari stok gliserol (-70 °C) digoreskan di atas permukaan medium agar padat M9+thiamine HCl. Medium tersebut mengandung 0,6% Na₂HPO₄; 0,3% KH₂PO₄; 0,5% NaCl; 0,1% NH₄Cl; 1,5% agar; 0,2% (v/v) 1 M MgSO₄, 0,01% (v/v) 1 M CaCl₂; 1% (v/v) 20% glukosa; dan 0,1% (v/v) 1 M Thiamine HCl.

Cawan petri tersebut diinkubasi semalam pada suhu 30 °C. Setelah itu diambil 1–2 koloni tunggal dan dimasukan dalam LB cair dan dikocok pada kecepatan 150 rpm, suhu 30 °C selama 24 jam. Sebanyak 0,5 ml LB cair, dan dikocok pada suhu 30 °C sampai nilai absorbansi pada OD₆₀₀ mencapai 0,45–0,55 selama kurang lebih 1 jam 45 menit. Suspensi sel dipindah ke dalam tabung baru dingin dan steril dalam keadaan aseptik, kemudian didinginkan dalam es selama 2 jam. Selanjutnya tabung berisi suspensi bakteri disentrifugasi pada 5000 rpm, 4 °C selama 10 menit. Fasa air dibuang dengan hati-hati agar endapan bakteri tidak ikut terbuang. Sebanyak 1–2 ml buffer triturasi dingin dimasukkan dalam tabung secara hati-hati untuk mensuspensikan endapan bakteri. Kemudian ditambahkan buffer yang sama sebanyak 50 ml. Selanjutnya suspensi bakteri diinkubasi

dalam es selama 45 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Fasa air dibuang sedangkan endapan bakteri yang diperoleh disuspensikan dengan 5 ml buffer triturasi dingin. Sel kompeten bisa langsung digunakan atau disimpan dalam -80 °C.

Transformasi plasmid rekombinan ke dalam bakteri *E. coli* strain DH5α

Transformasi plasmid ke dalam sel kompeten mengikuti prosedur dari Promega dengan sedikit modifikasi. Sebanyak 5 µl dari setiap hasil ligasi atau plasmid dimasukkan secara hati-hati ke dalam tabung polipropilen 50 ml dingin dan ke dalam setiap tabung dimasukkan bakteri yang telah kompeten sebanyak 100 µl. Tabung berisi bakteri kompeten dan plasmid selanjutnya disimpan dalam es selama 30 menit. Setelah itu tabung dimasukkan ke *water bath* untuk memberi kejutan panas pada suhu 42 °C selama 50 detik. Selanjutnya tabung tersebut segera didinginkan dalam es selama 2 menit. Sebanyak 950 µl SOC cair ditambahkan ke dalam tabung kemudian suspensi sel diinkubasi pada suhu 37 °C pada 175 rpm selama 21 jam. Setelah diinkubasi, 100 µl kultur ditanam pada medium LB padat yang mengandung 100 µg/ml antibiotik ampicilin dan 50 mg/ml X-gal serta 100 µl 0.1 M IPTG. Kultur bakteri diratakan di atas medium LB padat dengan bantuan bola-bola kaca steril berdiameter 3 mm. Kultur bakteri selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama semalam (16–18) jam.

Isolasi plasmid

Isolasi plasmid mengikuti metode (Xiang *et al.*, 1994). Tahapan isolasi plasmid adalah sebagai berikut. Koloni tunggal hasil transformasi dipilih secara acak, masing-masing koloni dimasukkan dalam sebuah tabung reaksi yang berisi 4 ml medium TB cair yang mengandung antibiotik disesuaikan dengan vektor yang digunakan. Tabung kemudian diinkubasi semalam pada suhu 37 °C pada kecepatan 250 rpm. Kultur sel selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga sebanyak 1,5 ml dan disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang, kemudian endapan bakteri ditambah dengan 100 µl GTE. Setelah itu endapan bakteri dihomogenkan dengan vorteks. Setelah homogen ditambahkan bufer lisis sebanyak 200 µl kemudian dibolak-balik dan ditambahkan 200 µl 5 M potassium asetat kemudian dibolak-balik kembali sampai homogen. Tabung lalu disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Endapan yang diperoleh dibuang, kemudian supernatan ditambah 100% etanol dingin sebanyak 1 ml. Tabung disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama

10 menit. Supernatan dibuang, pellet dicuci dengan 70% etanol kemudian dikering-anginkan. Pelet kering disuspensikan dalam 100 µl TE.

Konstruksi gen *dip22* pada vektor ekspresi

Pada penelitian ini *dip22* akan disisipkan pada vektor ekspresi *pCAMBIA1303* yang mengandung promoter *CAMV35S* pada tempat pemotongan enzim *NcoI* dan *PmlI*. Untuk mencapai tujuan tersebut *pCAMBIA1303* dipotong terlebih dahulu dengan *PmlI* dan *NcoI*. Pemotongan atau restriksi ini dimaksudkan untuk menyediakan tempat penyisipan bagi gen *dip22* yang sudah termutasi. Setelah itu dilakukan penyambungan atau ligasi. Ligasi dilakukan dengan mencampur reaksi antara vektor plasmid, DNA sisipan, dan T4 DNA Ligase. Ligasi dilakukan dalam tabung mikrosentrifuga 0,5 ml pada suhu 4 °C selama satu malam. Pada proses ligasi digunakan *Ligation Buffer* 10 × sejumlah 0,1 × volume total reaksi. Selanjutnya hasil ligasi sebanyak 5 µl ditransformasi ke *E. coli* (DH5α) dan ditanam pada medium LB yang mengandung 50 µg/ml kanamisin.

Transformasi *pCAMBIA1303-CAMV35S-dip22* (*pCdip*) ke *Agrobacterium tumefaciens*

Sebelum transformasi, dilakukan pembuatan sel kompeten *Agrobacterium tumefaciens*. Mula-mula 1 koloni *A. tumefaciens* dimasukkan ke dalam 50 ml medium YEP cair yang telah ditambahkan antibiotik rifampisin 25 ppm. Bakteri ditumbuhkan pada suhu ruang (28 °C) selama 12 jam sambil dikocok 200 rpm. Lalu 2 ml kultur dipindahkan ke 50 ml medium baru YEP cair yang telah ditambahkan antibiotik rifampisin 25 ppm. Kultur ditumbuhkan pada suhu ruang (28 °C) sampai OD₆₀₀ mencapai 0,4–0,5 sambil dikocok 200 rpm. Kultur lalu didinginkan di es selama 10 menit, kemudian kultur disentrifugasi 5.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4 °C sehingga terbentuk 2 fase, fase supernatan yang merupakan medium YEP dibuang. Pelet sel kompeten *A. tumefaciens* dilarutkan dalam 1 ml 20 mM CaCl₂.

Proses transformasi dimulai dengan memasukkan 100 µl sel kompeten *A. tumefaciens* ke dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml, kemudian ditambahkan 1 µl plasmid. Tabung lalu didinginkan ke dalam nitrogen cair selama 5 menit, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 25 menit. Ke dalam tabung kemudian ditambahkan 1 ml medium YEP cair, dan bakteri ditumbuhkan pada suhu ruang (28 °C) selama 3 jam sambil dikocok 50 rpm. Setelah itu kultur disentrifugasi 12.000 g selama 30 detik. Pelet yang merupakan sel transforman *A. tumefaciens* disuspensikan dengan 1 ml YEP. Bakteri lalu ditumbuhkan dalam

25 ml medium YEP padat yang telah ditambahkan antibiotik rifampisin 25 ppm dan kanamisin 50 ppm pada suhu ruang (28 °C) selama 48 jam.

Isolasi *pCAMBIA1303-CAMV35S-dip22* (*pCdip*) dari *Agrobacterium tumefaciens*

Ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml medium YEP yang telah ditambahkan antibiotik rifampisin 25 ppm dan kanamisin 50 ppm dimasukkan satu koloni bakteri *A. tumefaciens* hasil transformasi. Bakteri lalu ditumbuhkan selama 24 jam pada suhu ruang (28 °C) selama 24 jam sambil dikocok 200 rpm. Kultur lalu dimasukkan dalam tabung mikrosentrifuga 1,5 ml, kemudian disentrifugasi 12.000 g selama 10 menit sampai terbentuk 2 fase, supernatan yang merupakan medium YEP dibuang. Tahapan isolasi plasmid dari *A. tumefaciens*, sama dengan isolasi plasmid dari *E. coli*. Perbedaannya pada isolasi plasmid *A. tumefaciens* perlu diekstraksi dengan fenol:kloroform (1:1).

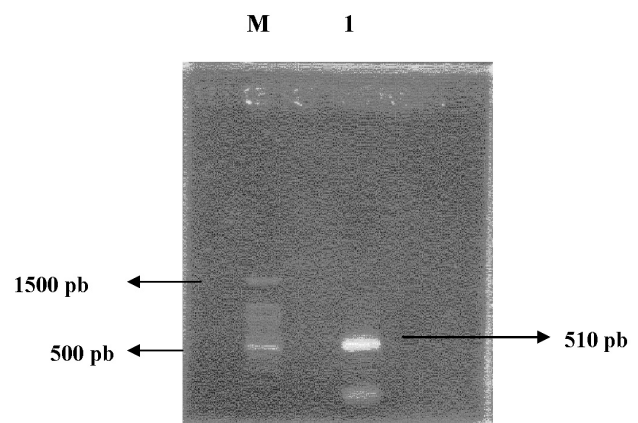
Sequencing konstruk *pCAMBIA1303-CAMV35S-dip22* (*pCdip*)

Setelah diperoleh konstruk gen *dip22* pada vector *pCAMBIA1303* dilakukan sequencing untuk mengkonfirmasi kebenaran konstruk tersebut.

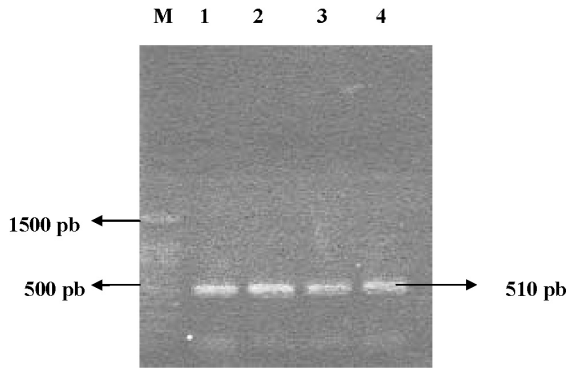
HASIL

Hasil PCR Mutagenesis

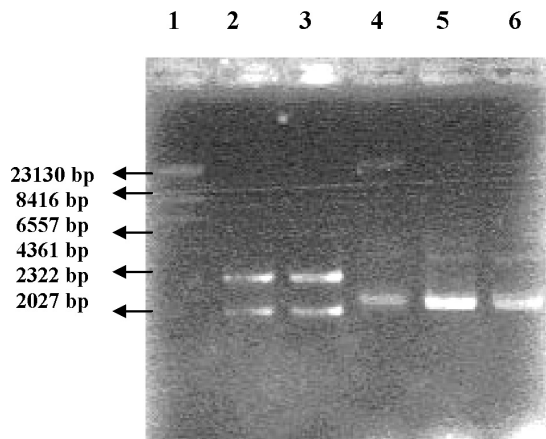
Hasil PCR termutasi ditunjukkan pada Gambar 1. Pada Gambar 1 terlihat ada pita yang berukuran 510 pb yang tampak cukup tebal.



Gambar 1. Hasil PCR termutasi pada gen *dip22* (M = Marker 100 pb DNA Ladder, 1 = gen *dip22* termutasi)



Gambar 2. DNA ukuran 510 pb (*dip22* termutasi) sebelum (sumur 1 dan 2) dan setelah ekstraksi dari gel (sumur 3 dan 4) (M = Marker 100 pb DNA Ladder)



Gambar 3. Hasil isolasi DNA plasmid dari 5 klon (1 = Marker Lambda DNA/ *Hind* III, 2, 3, 4, 5, 6 = DNA plasmid klon 1, klon 2, klon 3, klon 4, klon 5)

Selanjutnya pita yang berukuran 510 pb tersebut diekstraksi dari gel. Pita DNA 510 pb tersebut adalah gen *dip22* yang termutasi. Hasil ekstraksi disajikan pada Gambar 2.

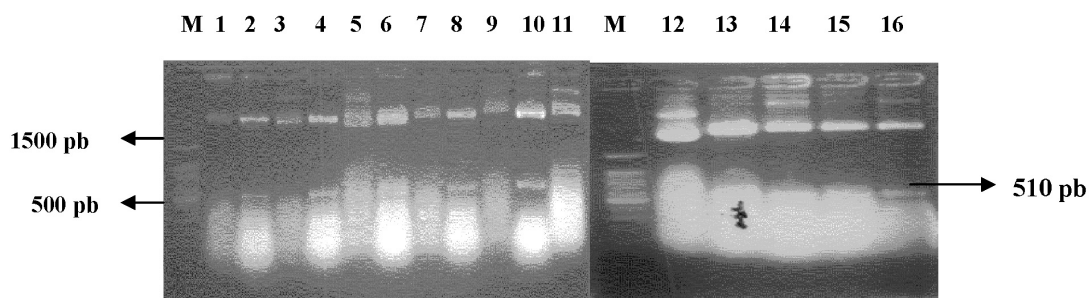
Pada Gambar 2 terlihat pita DNA 510 pb yang diekstraksi dari gel berukuran sama dengan DNA hasil PCR termutasi.

Kloning *dip22* hasil PCR mutagenesis pada pGEM® T-Easy- (pG*dip*)

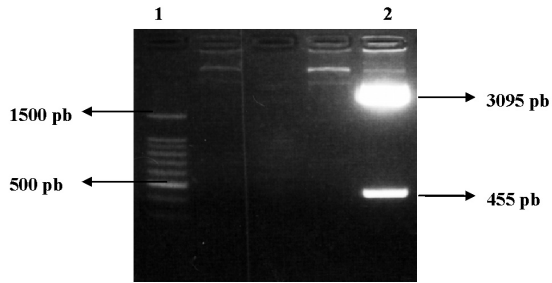
Hasil ekstraksi pita 510 pb tersebut (Gambar 2), kemudian diligasi pada vektor kloning pGEMT-easy dan selanjutnya ditransformasi ke *E. coli* strain DH5 α untuk memperbanyak plasmid. Setelah itu, DNA sisipan yang merupakan gen *dip22* termutasi tersebut, diisolasi lagi dari plasmid. Tahap pertama dilakukan isolasi plasmid pada 10 koloni tunggal putih. Hasil isolasi plasmid dari kelima klon ditunjukkan pada Gambar 3.

Selanjutnya DNA plasmid dari semua klon (klon 1–10) dipotong dengan *EcoRI* untuk melihat ada tidaknya DNA sisipan. Hasil pemotongan DNA plasmid kesepuluh klon dengan enzim *EcoRI*, ditampilkan pada Gambar 4.

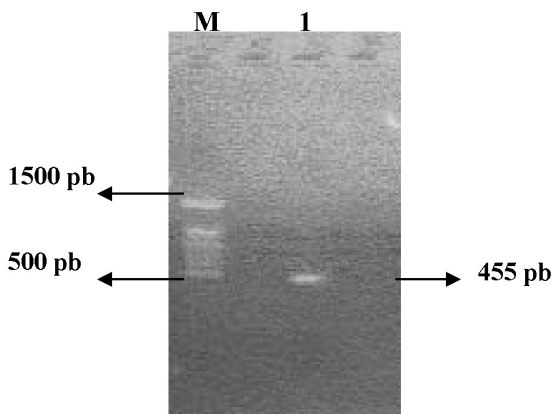
Pada Gambar 4 terlihat adanya sisipan DNA yang berukuran 510 pasang basa. DNA dengan ukuran 510 pb tersebut tidak lain adalah gen *dip22* hasil PCR termutasi. Selanjutnya gen *dip22* tersebut diisolasi dari plasmid pGEMT-easy (pG-*dip*). Isolasi gen *dip22* dilakukan dengan menggunakan dua enzim restriksi. Pada awalnya plasmid pG*dip* dipotong dengan enzim *NcoI*. Reaksi pemotongan dilakukan pada suhu 37 °C. Hasil elektroforesis plasmid hasil restriksi ditunjukkan pada Gambar 5.



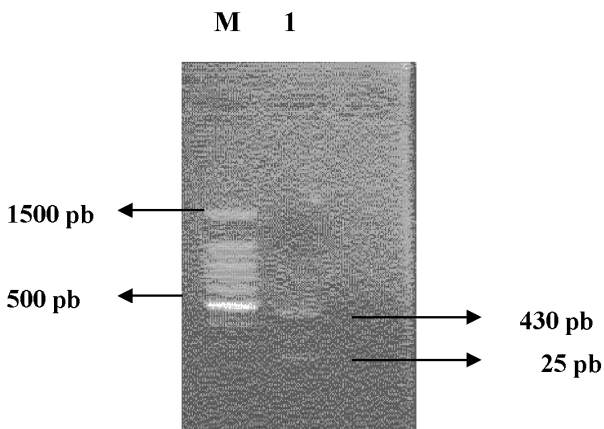
Gambar 4. Hasil pemotongan DNA plasmid dengan *EcoRI* (M = marker DNA Ladder 100 pb, 1 = DNA klon no. 2 yang tidak dipotong, 2 = DNA klon no. 2 yang dipotong, 3 = DNA klon no. 3 yang tidak dipotong, 4 = DNA klon no.3 yang dipotong, 5 = DNA klon no. 4 yang tidak dipotong, 6 = DNA klon no. 4 yang dipotong, 7 = DNA klon no. 5 yang tidak dipotong, 8 = DNA klon no. 5 yang dipotong, 9 = DNA klon no. 10 yang tidak dipotong, 10 = DNA klon no. 10 yang dipotong, 11 = DNA klon no. 1 yang dipotong, 12 = DNA klon no. 7 yang tidak dipotong, 13 = DNA klon no. 7 yang dipotong, 14 = DNA klon no. 6 yang dipotong, 15 = DNA klon no. 8 yang dipotong, 16 = DNA klon no. 9 yang dipotong)



Gambar 5. Hasil pemotongan plasmid klon no 7 dengan *NcoI* (1 = Marker DNA Ladder 100 pb, 2 = klon no. 7 yang dipotong dengan *NcoI*)

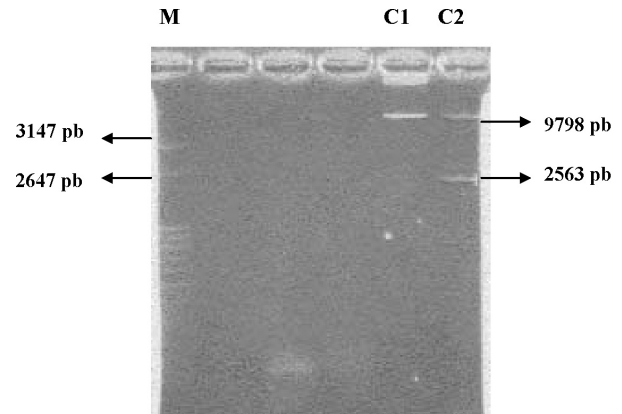


Gambar 6. Hasil purifikasi pita 455 pb (M = Marker DNA Ladder 100 pb, 1 = pita 455 pb)



Gambar 7. Hasil pemotongan fragmen 455 pb plasmid pGEM[®]-T Easy-*dip22/NcoI* dengan *PmlI*. M = Marker 100 bp DNA Ladder, 2. p*Gdip/NcoI* + *PmlI* (10 µg)

Selanjutnya pita DNA yang berukuran 455 pb dipotong dan diekstraksi dari gel. Hasil purifikasi dari gel ditampilkan pada Gambar 6.



Gambar 8. Hasil pemotongan *pCAMBIA 1303* dengan *PmlI* dan *NcoI* (M = Marker DNA step Ladder 50 pb, C1 : *pCAMBIA/PmlI*, C2 : *pCAMBIA PmlI/NcoI*)

Larik DNA yang berukuran 455 pb dipurifikasi dengan Gel Extraction Kit. Hasil purifikasi dipotong lagi dengan enzim *PmlI*. Reaksi pemotongan dilakukan pada suhu 37 °C selama 4 jam. Seluruh volume reaksi lalu dielektroforesis pada gel agarosa 1% seperti terlihat dalam Gambar 7.

Pada Gambar 7 terlihat ada dua larik DNA yang berukuran 430 pb dan 25 pb. Larik DNA yang berukuran 430 pb kemudian diisolasi dari gel dan dipurifikasi, sehingga didapatkan gen *dip22* dengan ujung 5' yang merupakan hasil restriksi *NcoI* dan ujung 3' yang merupakan hasil restriksi *PmlI*.

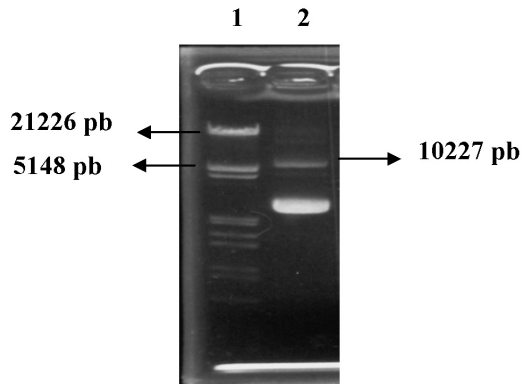
Konstruksi Gen *dip22* pada *pCAMBIA1303*

Supaya gen *dip22* dapat disambungkan pada vektor ekspresi *pCAMBIA1303*, maka terlebih dahulu *pCAMBIA 1303* dipotong dengan enzim *PmlI* dan *NcoI*. Hasil restriksi *pCAMBIA 1303* ditampilkan pada Gambar 8.

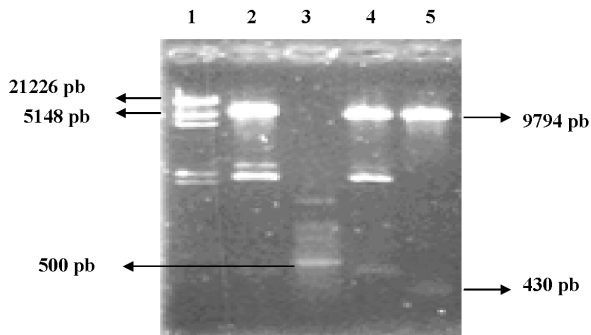
Setelah dipotong dengan enzim *PmlI* dan *NcoI*, hasil elektroforesis pada Gambar 8 menunjukkan ada 2 pita dengan ukuran 9798 bp dan 2563 bp. Pita dengan ukuran 9798 bp dipotong dari gel kemudian diekstraksi dengan Gel extraction DNA dari Qiagen untuk disisipi *dip22*.

Selanjutnya gen *dip22* diligasi dengan plasmid *pCAMBIA 1303* yang telah dipotong dengan enzim *NcoI* dan *PmlI* dengan reaksi: 0,8 µg *pCAMBIA 1303*; 0,6 µg *dip22*; 2 µl Air Deion; 1 µl Buffer Ligase 10x; 3 U T4 DNA Ligase.

Hasil ligasi antara *pCAMBIA 1303* dan *dip22* kemudian ditransformasi ke *E. coli* strain DH5α. Transformasi ke *E. coli* dilakukan untuk memperbanyak jumlah DNA plasmid rekombinan. Kemudian plasmid rekombinan diisolasi lagi dari bakteri untuk ditransformasikan ke *A. tumefaciens*.



Gambar 9. Hasil isolasi plasmid pCAMBIA 1303-*dip22* dari *Escherichia coli* strain DH5 α . 1. Marker Lambda DNA/*Eco* RI + *Hind* III, 2. pC*dip*



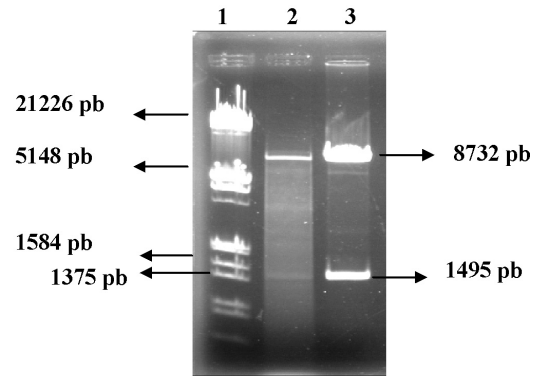
Gambar 10. Hasil pemotongan plasmid pCAMBIA 1303-*dip22* dengan *Nco*I dan *Pml*I. 1. Marker Lambda DNA/*Eco* RI + *Hind* III, 2. pC*dip*/*Nco*I + *Pml*I klon 1, 3. Marker 100 bp DNA Ladder, 4. pC*dip*/*Nco*I + *Pml*I klon 2, 5. pC*dip*/*Nco*I + *Pml*I klon 3

Hasil Isolasi Plasmid pCAMBIA 1303-*dip22* (pC*dip*) dari *Escherichia coli* Strain DH5 α

Hasil isolasi DNA plasmid dielektroforesis sehingga larik-larik DNA yang berbeda ukuran terpisah. Hasil elektroforesis setelah diwarnai terlihat seperti pada Gambar 9. Konsentrasi DNA plasmid hasil isolasi adalah 11,95 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

DNA plasmid hasil isolasi kemudian dipotong dengan enzim *Nco*I dan *Pml*I untuk memeriksa bahwa plasmid tersebut benar adalah pCAMBIA 1303 dan mengandung gen *dip22*. Hasil pemotongan DNA kemudian dielektroforesis pada gel agarosa dan ditampilkan pada Gambar 10.

Hasil pemotongan menunjukkan bahwa plasmid klon 3 adalah pCAMBIA 1303 yang telah disisipi gen *dip22*. Hal ini diperlihatkan dari ukuran larik DNA 9794 pb yang merupakan ukuran rantai DNA pCAMBIA 1303 setelah dipotong dengan *Nco*I dan *Pml*I, dan larik DNA 430 pb yang merupakan ukuran dari gen *dip22*.



Gambar 11. Hasil pemotongan pCAMBIA 1303-*dip22* dengan *Bst* XI dan *Bst* EII. 1. Marker Lambda/*Eco*RI + *Hind* III, 2. pC*dip*/*Bst* XI + *Bst* EII dari *Agrobacterium tumefaciens*, 3. pC*dip*/*Bst* XI + *Bst* EII dari *Escherichia coli*

Hasil Transformasi pCAMBIA 1303-*dip22* ke *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA 4404

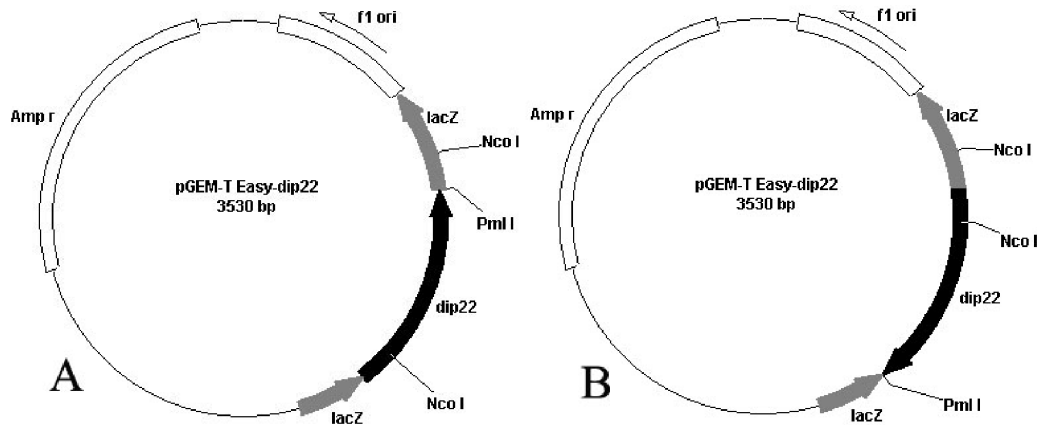
Untuk menguji plasmid hasil isolasi adalah pC*dip* maka hasil isolasi plasmid dari *Agrobacterium tumefaciens* dipotong dengan enzim restriksi *Bst* XI dan *Bst* EII. Hasil restriksi kemudian dielektroforesis dalam gel agarosa dan diwarnai. Hasil restriksi terlihat pada Gambar 11.

Sekuensing Konstruksi pCAMBIA1303-CAMV35S-*dip22* (pC*dip*)

Hasil sekuensing plasmid pC-*dip22* lalu dibandingkan dengan urutan nukleotida gen *dip22* yang sebelumnya telah diklon pada pGEMT-easy. Penjajaran urutan DNA tersebut menggunakan program genedoc dan hasilnya ditunjukkan pada Gambar 12.

PEMBAHASAN

Strategi dalam mengkonstruksi suatu gen harus mempertimbangkan dua hal yaitu urutan nukleotida gen yang akan dikonstruksi dan vektor ekspresi yang akan digunakan. Pada penelitian ini urutan nukleotida *dip22* dimulai dengan start kodon yang mengandung tempat pemotongan enzim *Nco*I, dan diakhiri dengan stop kodon yang mengandung tempat pemotongan enzim *Sau*3AI, *Mbo*I, dan *Nde*II. Pada peta restriksi pCAMBIA1303, terdapat *Nco*I tepat di belakang promoter *CaMV35S*, yang mengekspresikan gen *gusA* dan gen *gfp*. Sebelum NOS poly-A terdapat tempat pemotongan enzim *Pml*I. Dengan demikian urutan nukleotida *dip22* harus dimutasi dengan cara menambahkan urutan DNA untuk menyediakan tempat pemotongan *Pml*I. Urutan nukleotida tersebut ditambahkan pada primer reverse yaitu pada nukleotida ke-560.



Gambar 13. Kemungkinan orientasi gen *dip 22* dalam plasmid pGEM[®]-T Easy

Etidium bromida merupakan senyawa polisiklik aromatik bermuatan positif, yang akan berikatan dengan DNA yang bermuatan negatif dengan menginsersikan dirinya di antara pasangan basa (interkalasi). Interkalasi menyebabkan DNA heliks melonggar sekitar 26° (Turner *et al.*, 2000). Proses isolasi, elektroforesis, dan pewarnaan DNA dengan etidium bromida ternyata juga mempengaruhi putaran DNA heliks. Pada Gambar 3 sumur 4, 5, dan 6 menunjukkan bahwa larik DNA paling bawah yang memiliki bentuk superkoil memiliki konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan DNA superkoil yang lebih sederhana.

Elektroforesis gel agarosa (sejenis polisakarida yang diisolasi dari ganggang laut) dapat memisahkan DNA linear berdasarkan perbedaan ukuran, melalui migrasi DNA pada sebuah matriks dalam pengaruh medan listrik karena setiap nukleotida dalam sebuah molekul asam nukleat membawa sebuah muatan negatif. Elektroforesis bisa digunakan untuk mendeterminasi organisasi molekul plasmid (Alberts *et al.*, 1994; Turner *et al.*, 2000).

Setelah diperoleh DNA plasmid rekombinan (*pGdip*), plasmid tersebut ditransformasi ke *E. coli* strain DH5 α untuk memperbanyak DNA yang disisipkan (*dip22*). Transformasi adalah proses memasukkan DNA asing (*gene transfer*), biasanya plasmid, ke dalam suatu organisme. Metode transformasi antara lain dengan metode fisika (injeksi, partikel *bombardment*, pulsa medan listrik), metode kimia (melarutkan DNA dalam larutan PEG dan penggunaan kejutan panas), atau secara biologis (menggunakan vektor *E. coli* atau *Agrobacterium tumefaciens*) (Endress, 1994). Transformasi ke sel bakteri dilakukan dengan perlakuan Ca^{2+} sehingga membuat bakteri tersebut kompeten untuk dimasuki DNA plasmid (Turner *et al.*, 2000).

Selanjutnya *pGdip* tersebut dipotong dengan enzim restriksi *EcoRI*. Pada Gambar 4 tampak adanya gen *dip22* termutasi yang disisipkan pada pGEM[®]-T Easy. Enzim restriksi merupakan enzim bakteri yang memotong (hidrolisis) DNA menjadi fragmen berukuran tertentu. Pada banyak spesies bakteri, sistem restriksi merupakan mekanisme pertahanan terhadap introduksi DNA asing ke dalam sel. Sistem restriksi terdiri atas dua tahap; pertama adalah metilasi, penambahan gugus metil terhadap basa C atau A di antara urutan yang dikenali dalam DNA seluler. Tahap kedua adalah endonuklease yang mengenali urutan DNA pendek (4–8 nukleotida) dan simetris, dan memotong (hidrolisis) ikatan DNA pada tiap rantai pada sisi spesifik di antara urutan DNA (Glover, 1986; Turner *et al.*, 2000; Alberts *et al.*, 1994). Enzim restriksi (endonuklease) contohnya *EcoRI* yang diisolasi dari *E. coli*, berperan sebagai dimer dan hanya akan mengenali urutan 5'GAATTC 3'. Produk dari reaksi pemotongan pada sisi ini pada DNA linear adalah dua fragmen rantai ganda DNA, masing-masing dengan sebuah ujung identik rantai tunggal ujung 5'- dengan gugus fosfat, sedangkan ujung 3'- memiliki gugus hidroksil. Hasil pemotongan ini disebut ujung lancip, karena mereka bisa berikatan pada ujung mana pun yang memiliki urutan *overhang* yang sama, melalui pasangan basa ujung rantai tunggal. Enzim restriksi lain seperti *HaeIII* dari *Haemophilus aegyptius* dapat menghasilkan ujung tumpul. Ujung 5'- yang baru terbentuk pada ujung tumpul selalu memiliki grup fosfat (Turner *et al.*, 2000).

Berdasarkan hasil pemotongan *pGdip* dengan enzim *NcoI* (seperti pada Gambar 5), ada dua kemungkinan orientasi penempelan DNA hasil PCR termutasi pada plasmid *pGEM[®]-T Easy* yang mengandung T *overhang*

Agrobacterium. Plasmid pCAMBIA memiliki rentang yang luas sehingga stabil ditransformasikan baik ke dikotil maupun monokotil (Cambia Co. Australia). Plasmid pCAMBIA 1303 mengandung promotor CaMV35S (*cauliflower mosaic virus*). Promotor ini berhubungan dengan urutan yang terpoliadenilasi pada T-DNA plasmid. Hal ini memungkinkan pembuatan klon langsung ke dalam T-DNA plasmid. Gen *gusA* (*beta-glucuronidase*) dalam plasmid pCAMBIA 1303 berfungsi sebagai gen *reporter* untuk memonitor proses transformasi dan introduksi gen yang direkayasa.

Selanjutnya rekombinan *pCdip* (pCAMBIA1303-*dip22*) ditransformasi ke *E. coli* DH5 α untuk memperbanyak plasmid. Kemudian pCdip diisolasi kembali dari *E. coli* untuk ditransformasi ke *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 supaya gen *dip22* dapat ditransfer ke tanaman terutama tebu. *Agrobacterium tumefaciens* dan *A. rhizogenes* adalah bakteri tanah yang menginduksi timbulnya *crown gall* akibat dari transfer fragmen DNA (T-DNA) dari plasmid Ti (*tumour-inducing*) bakteri ke sel tanaman (Tzfira dan Citovsky, 2002) dan penyakit *hairy root* pada sisi yang dilukai pada tanaman dikotil dan beberapa monokotil (Draper *et al.*, 1988). Plasmid Ti ditemukan pada semua strain *A. tumefaciens* virulen, berukuran sekitar 200–250 kb dan stabil dalam *Agrobacterium* pada temperatur di bawah 30 °C. Selama pembentukan tumor urutan tertentu plasmid Ti T-DNA, ditransfer ke sel tanaman dan berintegrasi ke genom inti sel tanaman (Draper *et al.*, 1988; Tzfira dan Citovsky, 2002).

Sisi integrasi T-DNA ke DNA tanaman bersifat acak (Draper *et al.*, 1988). Efisiensi integrasi T-DNA pada tanaman dengan vektor *Agrobacterium* lebih tinggi daripada metode transformasi lain seperti menggunakan partikel *bombardment*. Hal ini disebabkan aktivitas komponen protein kompleks-T: VirD2 dan VirE2 yang bersama-sama dengan impor inti sel tanaman dan mekanisme perbaikan DNA (Tzfira dan Citovsky, 2002).

Untuk mengkonfirmasi kebenaran konstruksi *dip22* ke pCAMBIA1303, *pCdip* dari *A. tumefaciens* dan *E. coli* dipotong dengan enzim *Bst* XI dan *Bst* EII. Hasil restriksi yang ditunjukkan Gambar 11, tampak bahwa pola larik DNA plasmid serupa pada *A. tumefaciens* dan *E. coli*. Larik DNA hasil restriksi dengan *Bst* XI dan *Bst* EII berukuran 8732 pb dan 1495 pb, sesuai dengan ukuran *pCdip* jika dipotong dengan kedua enzim tersebut. Jadi disimpulkan bahwa dalam bakteri *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 tersebut telah terdapat plasmid *pCdip*.

Kesimpulan di atas diperkuat dengan hasil peninjauan urutan nukleotida gen *dip22* setelah PCR termutasi yang

disisipkan pada pCAMBIA 1303 dengan gen *dip22* sebelum PCR termutasi yang diklon pada pGEM[®]-T Easy (Gambar 12). Hasil peninjauan menunjukkan bahwa 99,8% urutan nukleotida yang diisolasi dari pCAMBIA 1303, sama dengan data urutan nukleotida gen *dip22* pada klon rekombinan awal pGEM[®]-T Easy-*dip22*. Sekuensing ulang ini dimaksudkan untuk meyakinkan kebenaran penyambungan frame pada vektor dan mengetahui ada tidaknya perubahan urutan nukleotida selama proses kloning dan konstruksi. Oleh karena itu, konstruk gen *dip22-pCAMBIA1303* pada vektor biner ini dapat ditransfer pada tanaman melalui sistem *Agrobacterium tumefaciens*. Dengan demikian, konstruk gen tersebut dapat dimanfaatkan untuk perbaikan sifat toleransi tanaman terutama tebu terhadap cekaman kekeringan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Negara Riset dan Teknologi yang telah memberi dana untuk penelitian ini melalui Program Riset Unggulan Terpadu IX (RUT IX).

KEPUSTAKAAN

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, dan Watson JD, 1994. *Molecular Biology of The Cell*. Garland Publishing, Inc: New York.
- Babu RC, Zhang J, Blum A, Ho T-HD, Wu R dan Nguyen HT, 2004. HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* 166: 855–862.
- Christensen, Alan H, dan Peter H Quail, 1996. Ubiquitin promoter based vector for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic research*. 5: 213–218.
- Draper J, Scott R, Armitage P dan Walden R, 1988. *Plant Genetic Transformation and Gene Expression*. The Alden Press, Oxford.
- Endress R, 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Glover DM, 1986. *Gene Cloning. The Mechanics of DNA Manipulation*. University Press: Cambridge.
- Inmam-Bamber NG, dan McGlinchey MG, 2003. Crop coefficients and water-use estimates for sugarcane based on long-term Bowen ratio energy balance measurement. *Field Crop research* 83: 125–138.
- Kishore PBK, Hong Z, Guo-Hua Miao, Chein-An Hu, dan Verma DPS, 1995. Overexpression of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant physiol.* 108: 1387–1394.
- Promega, 2003. *Technical Manual. PGEM[®]-T and pGEM[®]-T- Easy Vector Systems*. Promega Corporation, Madison.

- Su J dan Wu R, 2004. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Science* 166: 941–948.
- Sugiharto B, Tri Handoyo, Wiwit Budi Widyasari, Hitoshi Mori, dan Hitoshi Sakakibara, 2001. Molecular study on drought-tolerant sugarcane: Cloning and Expression Analysis of a Drought Inducible Gene. *Agrivita*. 23(2): 119–126
- Suprasanna dan Bapat VA, 2006. Advances in the development of in vitro culture systems and transgenics in sugarcane. *Proc. International Symposium on Technologies to Improve Sugar Productivity in developing countries, Guilin, China*. p. 629–636.
- Turner PC, McLennan AG, Bates AD dan White MRH, 2000. *Instant Notes in Molecular Biology*. Springer Verlag: Singapore.
- Tzfira T dan Citovsky V, 2002. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*. *Trends in Cell Biology*. 12(3): 121–130.
- Widyasari WB, Sugiharto B, Ismayadi C, Wahjudi KA dan Murdiyatmo U, 2004. Isolasi dan karakterisasi gen yang responsif terhadap cekaman kekeringan pada tebu. *Berkala Penelitian Hayati* 9: 69–73.
- Widyasari WB, 2004. Karakterisasi dan over-ekspresi gen *dip22* untuk perbaikan ketahanan tebu terhadap cekaman kekeringan. *Laporan Riset Unggulan Terpadu IX*. Kementerian Riset dan Teknologi, Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia & Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Wiedenfield B, 2004. Scheduling water application on drip irrigated sugarcane. *Agricultural Water Management* 64: 169–181.
- Winnacker E-L, 1987. *From Genes to Clones. Introduction to Gene Technology*. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim.
- Xiang C, Wang H, Siel P, Berger PDJ, dan Guerra A, 1994. Modified alkaline lysis miniprep protocol using a single microcentrifuge tube. *BioTechniques*. 17(1): 30–31.
- Xu DP, Duan X, Wang B, Hong B, David Ho T, dan Wu R, 1996. Expression of late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol*. 110: 249–257.
- Zhen Zhang-Shu, Ben-Peng yang, Cui-Lian Feng, Ru-Kai Chen, Jing-Ping Luo, wen-Wei cai, dan fei-Hu liu, 2006. Expression of the grifola frondosa trehalose synthase gene and improvement of the drought-tolerance in sugarcane. *Proc. International Symposium on Technologies to Improve Sugar Productivity in developing countries, Guilin, China*, 606–612.

Reviewer: **Dr. Ni Nyoman Tri P., MSi.**