

**RNAi dari Fragmen 3'UTR Gen Penyandi H⁺-ATPase Membran Plasma
Melastoma malabathricum L. dapat Menghambat Pertumbuhan Tanaman Tersebut**

***RNAi Including the 3'UTR Fragment of the Gene Coding Plasma Membrane
H⁺-ATPase from Melastoma malabathricum L. Inhibited the Growth of the Plant***

Muzuni^{1*}, Didy Sopandie², Utut Widyastuti Suharsono³, dan Suharsono³

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Haluoleo (University of Haluoleo), Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 16232, Indonesia

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia.

³Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University), Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 1 Februari 2013/Disetujui 3 Mei 2013

ABSTRACT

The RNA silencing technique is an effective tool to examine the biological function of the target mRNA in plants. The recent development of GATEWAYTM cloning technology makes it easy to construct the RNAi vectors with trigger sequences and to analyze the function of a target gene. The objective of this research was to construct RNAi including the 3'UTR fragment of the gene coding plasma membrane H⁺-ATPase from Melastoma malabathricum L., 3'UTRMmpma. RNAi vector had been successfully constructed using GATEWAYTM cloning technology with the 3'UTRMmpma was used as double-stranded RNA (dsRNA) trigger sequence, pENTRTM/D-TOPO[®] as entry vector, and pANDA plasmid as destination vector. RNAi had been successfully introduced into M. malabathricum L. mediated by A. tumefaciens EHA101 to analyze the function of Mmpma gene in the detoxifying Al stress. Based on the test of transgenic plants tolerance to Al stress showed that in the nutrient solution including 3.2 mM Al (AlCl₃.6H₂O), the transgenic plants underwent growth suppression especially roots and leaves, whereas non-transgenic plants underwent growth normally. It showed that suppression of Mmpma gene expression by RNAi to M. malabathricum L. caused the plant became sensitive to Al.

Keywords: 3'UTRMmpma, A. tumefaciens, Al stress, RNAi vector

ABSTRAK

Teknik RNA silencing adalah sebuah cara yang efektif untuk menguji fungsi biologi mRNA target pada tanaman. Perkembangan terkini teknologi pengklonan GATEWAYTM memudahkan untuk mengkonstruksi vektor RNAi yang mempunyai sekuen pemicu dan untuk menganalisis fungsi gen target. Tujuan penelitian ini adalah mengkonstruksi RNAi dari fragmen 3'UTR gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari Melastoma malabathricum L., 3'UTRMmpma. Vektor RNAi telah berhasil dikonstruksi menggunakan teknologi pengklonan GATEWAYTM dimana fragmen 3'UTRMmpma digunakan sebagai sekuen pemicu RNA utas ganda (dsRNA), pENTRTM/D-TOPO[®] sebagai entry vector dan vektor pANDA sebagai destination vector. RNAi telah diintroduksi ke tanaman M. malabathricum L. melalui A. tumefaciens EHA101 untuk mempelajari peranan gen Mmpma dalam detoksifikasi cekaman Al. Berdasarkan uji toleransi tanaman transgenik terhadap cekaman Al menunjukkan bahwa pada larutan hara yang mengandung 3.2 mM Al (AlCl₃.6H₂O), tanaman transgenik mengalami hambatan pertumbuhan terutama pertumbuhan akar dan daun, sedangkan non-transgenik tidak mengalami hambatan. Hal ini menunjukkan bahwa penghambatan ekspresi gen Mmpma dengan RNAi pada tanaman M. malabathricum L. menyebabkan tanaman menjadi sensitif terhadap Al.

Kata kunci: 3'UTRMmpma, A. tumefaciens, cekaman Al, vektor RNAi

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: muzuni71@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

RNA interference (RNAi) adalah RNA yang mengganggu RNA yang ada di dalam sel. Adanya RNAi menyebabkan RNA yang ada di dalam sel dapat diikat oleh RNAi untuk membentuk RNA utas ganda (dsRNA). RNA utas ganda dipotong oleh enzim *Dicer* di sitoplasma menjadi fragmen dsRNA pendek berukuran 21-26 nukleotida dengan ujung 3' *overhangs* dua nukleotida (Waterhouse *et al.*, 2001; Pickford dan Cogoni, 2003; Takeshita dan Ochiya, 2006). Salah satu dari kedua utas dari masing-masing fragmen, yang diketahui sebagai utas pemandu (*guide strand*), bergabung dengan RISC (*RNA-induced silencing complex*) dan berasosiasi dengan mRNA target, dan kemudian mengaktifasi fungsi RISC untuk mendegradasi mRNA target dan menekan ekspresi gen pada berbagai level (Waterhouse *et al.*, 2001; Meister dan Tuschl, 2004; Takeshita dan Ochiya, 2006).

Proses RNAi menghasilkan dua tipe molekul RNA kecil, yaitu microRNA (miRNA) dan small interfering RNA (siRNA). RNA merupakan produk langsung dari gen yang bagian spesifiknya dapat diikat oleh RNA kecil tersebut sehingga pada akhirnya dapat meningkatkan atau menurunkan aktivitas gen tersebut. Aktivitas gen yang meningkat ditandai dengan meningkatnya transkripsi gen, suatu fenomena yang disebut aktivasi RNA, yang dapat terjadi apabila sekuen RNA kecil (siRNA dan miRNA) komplemen dengan bagian promotor gen (Li *et al.*, 2006; Check, 2007). Aktivitas gen menurun apabila RNA kecil komplemen dengan bagian gen yang spesifik atau terkonservasi (Miki *et al.*, 2005). mRNA yang ditranskripsikan oleh gen tersebut membentuk utas ganda dengan RNA kecil yang telah bergabung dengan RISC dan selanjutnya *Argonaute*, komponen aktif dari RISC, dapat memotong mRNA sehingga gen menjadi tidak fungsional (Ahlquist, 2002).

Teknik RNAi adalah sebuah cara yang efektif untuk menguji fungsi biologi mRNA target pada tanaman. Perkembangan terkini mengenai vektor RNAi, yang menggunakan promotor konstitutif dan teknologi teknik pengklonan GATEWAYTM, memudahkan untuk mengkonstruksi vektor RNAi yang mempunyai sekuen pemicu dsRNA dan memudahkan pula untuk menganalisis fungsi gen target. Salah satu vektor RNAi yang dapat digunakan untuk mempelajari fungsi gen target adalah vektor pANDA yang dikembangkan oleh Miki dan Shimamoto (2004). Vektor ini menggunakan promotor *Ubiquitin1* dari jagung yang mengontrol ekspresi mRNA berulang terbalik dari sekuen gen target. Orientasi mRNA berulang terbalik merupakan pemicu pembentukan siRNA. Aplikasi vektor ini dengan gen penyandi *green fluorescent protein* (GFP) dan *phytoene desaturase* (PDS) dapat menekan ekspresi kedua gen tersebut pada tanaman padi (Miki *et al.*, 2005).

Salah satu gen yang diduga terlibat dalam toleransi tanaman terhadap kondisi tanah masam dan aluminium tinggi adalah gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma (Ahn *et al.*, 2004). Gen ini (*Mmpma*) termasuk 3'UTRnya

telah diisolasi dari *Melastoma malabathricum* L. oleh Muzuni *et al.* (2010) dan Muzuni *et al.* (2011). Peranan gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dalam toleransinya terhadap cekaman Al diuji dalam percobaan ini. Dalam pengujian ini, kami mengkonstruksi RNAi menggunakan vektor pANDA dengan sekuen 3'UTR dari gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *M. malabathricum* L. (3'UTRMmpma) sebagai sekuen berulang terbalik. Selanjutnya, sekuen RNAi diintroduksi ke tanaman *M. malabathricum* dan akhirnya tanaman transgenik diuji toleransinya terhadap cekaman Al. Bilamana H⁺-ATPase membran plasma berperan dalam toleransi *M. malabathricum* L. terhadap cekaman Al, maka gangguan ekspresi gen ini melalui RNAi menyebabkan tanaman transgenik yang diperoleh menjadi sensitif terhadap cekaman Al.

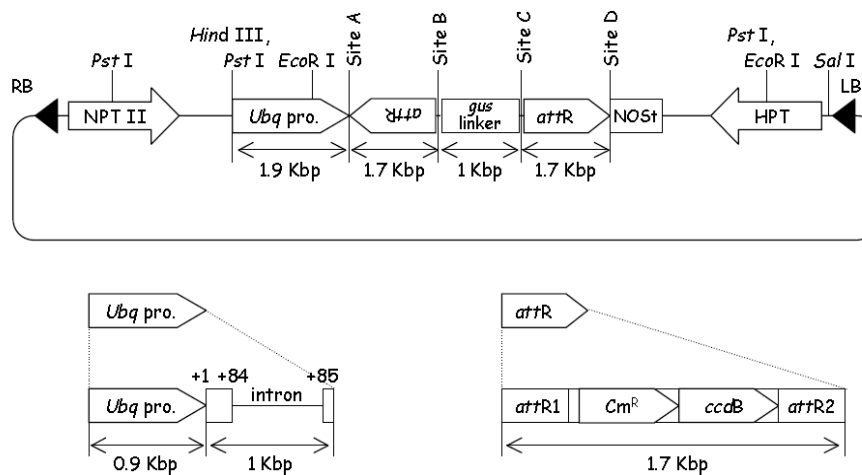
BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari bulan Februari hingga April 2009 di *Plant Molecular Genetics Laboratory, Nara Institute of Science and Technology* (NAIST), Jepang. Penelitian juga dilaksanakan pada bulan Mei 2009 hingga Juli 2010 di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Tanaman, Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor (PPSHB-IPB).

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun tanaman *Melastoma malabathricum* sebagai sumber eksplan. *A. tumefaciens* EHA101 (koleksi Prof. Ko Shimamoto, NAIST, Jepang) digunakan sebagai inang vektor biner. pENTRTM Directional TOPO[®] Cloning (InvitrogenTM) dan Vektor pANDA (koleksi Prof. Ko Shimamoto, NAIST, Jepang, Gambar 1) masing-masing digunakan sebagai *entry vector* dan *destination vector* dalam konstruksi vektor RNAi. Primer spesifik 3'UTR-F (5'-CACCGGAGAGCAACACGATCTTGT-3') dan 3'UTR-R (5'-AATCAAATCGACAGTTGCATAAGA-3') yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen 3'UTR dari gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma didesain berdasarkan hasil isolasi *Mmpma* dengan 3'RACE yang telah dilakukan sebelumnya. Fragmen ini dapat digunakan sebagai pemicu dsRNA dalam konstruksi RNAi. Primer spesifik UbiF1 (5'-TGATGATGTGGTCTGGTTGG-3') dan GusR1 (5'-TGGATCCCGGCATAGTTAAA-3') digunakan untuk mengidentifikasi tanaman transgenik. Primer aktin actF (5'-ATGGCAGATG-CCGAGGATAT-3') dan actR (5'-CAGTTGTGCGACCACTTGCA-3') digunakan sebagai alat evaluasi DNA total.

Fragmen 3'UTR diamplifikasi dengan PCR menggunakan enzim DNA polimerase *proofreading* untuk menghasilkan produk PCR ujung tumpul (*blunt end*) dan primer spesifik dengan penambahan CACC pada primer forward agar dapat disisipkan pada situs pengklonan plasmid pENTRTM/D-TOPO[®] dengan orientasi yang benar.

Subkloning fragmen 3'UTR ke dalam *Entry Vector*. Komposisi reaksi ligasi adalah sebagai berikut: 2 µl (10 ng) produk PCR, 1 µl larutan garam (1.2 M NaCl dan 0.06 M MgCl₂), 1 µl (20 ng) vektor pENTRTM/D-TOPO[®], dan 2 µl



Gambar 1. Vektor pANDA digunakan untuk konstruksi RNAi berukuran 20 kb (Miki and Shimamoto 2004). LB, left border; RB, right border; NPT II, gen resisten Kanamycin; HPT, gen resisten Hygromycin; Ubq pro., promoter ubiquitin1 jagung + intron pertama; attR, kaset rekombinasi LR clonase; attR1 & attR2, situs rekombinasi LR clonase; CmR, gen resisten Chloramphenicol; ccdB, gen ccdB; NOSI, terminator NOS

dH₂O. Komponen reaksi tersebut dicampur dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang (22-23 °C). Proses ligasi antara vektor dan insert terjadi selama inkubasi oleh enzim Topoisomerase I. Sebanyak 3 µL reaksi ligasi dicampur dengan 50 µL bakteri *E. coli* DH5α kompeten, dan diinkubasi di es selama 30 menit. Selanjutnya, campuran ini diperlakukan dengan kejutan panas (*heat-shock*) pada 42 °C selama 30 detik, dan segera diinkubasikan di dalam es. Setelah itu, campuran ditambah dengan 250 µl 2xYT (16 g L⁻¹ Bacto-tryptone, 10 g L⁻¹ bacto yeast extract, 5 g L⁻¹ NaCl, pH 7.0), lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam dengan pengocokan. Sebanyak 50 µL kultur bakteri disebar pada media LB padat yang mengandung 50 µg mL⁻¹ kanamisin dan diinkubasi pada suhu 37 °C semalam.

Pengklonan ke dalam Vektor pANDA

Vektor pENTR™/D-TOPO® rekombinan (*entry clone*) direkombinasikan dengan vektor pANDA menggunakan enzim LR clonase. Campuran reaksinya adalah sebagai berikut: 2 µL buffer reaksi LR (5x), 100-300 ng *entry clone*, 300 ng vektor pANDA, dan buffer TE hingga volume 8 µL. Selanjutnya 2 µL enzim LR clonase ditambahkan ke dalam campuran reaksi dan dicampur lalu diinkubasi pada suhu 25 °C selama semalam. Untuk menghentikan reaksi, sebanyak 1 µL larutan proteinase K (2 µg mL⁻¹) ditambahkan ke dalam campuran reaksi lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit. Hasil rekombinasi diintroduksi ke dalam *E. coli* DH5α dengan mencampur 10 µL larutan hasil rekombinasi dan 50 µl *E. coli* DH5α kompeten yang dilakukan seperti prosedur transformasi di atas dan transformannya diseleksi dengan masing-masing 50 µg mL⁻¹ kanamisin dan higromisin. Verifikasi orientasi fragmen 3'UTR dalam vektor RNAi dilakukan dengan sekuensing menggunakan primer GusF dan GusR. Bila hasil

sekuensing menemukan ujung 5' fragmen 3'UTR, maka orientasi sesuai harapan, yaitu berulang terbalik.

Transformasi *A. tumefaciens* EHA101 dengan Vektor RNAi

Sebanyak 1 µL (150 ng) vektor RNAi dicampur dengan 50 µL *A. tumefaciens* EHA101 kompeten, diberi kejutan listrik pada voltase 1,800 V, kapasitas 25 µF, dan resistensi 200 Ω selama 3-4 mdetik di dalam elektroporator. Bakteri hasil elektroporasi kemudian ditambahkan dengan 1mL 2xYT lalu diinkubasi pada suhu 28 °C sambil dikocok selama 1 jam. Sebanyak 150 µl bakteri kemudian disebar pada cawan petri yang mengandung media 2xYT serta 50 µg mL⁻¹ kanamisin dan higromisin lalu diinkubasi pada suhu 28 °C selama 30 jam.

Transformasi Tanaman dengan Vektor RNAi

Transformasi dilakukan dengan menggunakan *A. tumefaciens* menurut prosedur Akashi *et al.* (2005) yang telah dimodifikasi oleh Darajat (2010). Seleksi dan regenerasi tanaman menggunakan prosedur Darajat (2010). Aklimatisasi tanaman dilakukan setelah tanaman berumur 20 minggu setelah kokultivasi. Media tanam yang digunakan dalam aklimatisasi adalah tanah : arang sekam : tanah pupuk dengan perbandingan 1:1:1 (v/v/v).

Identifikasi Tanaman Transgenik

Tanaman transgenik diidentifikasi menggunakan PCR dengan DNA tanaman transgenik yang diisolasi dengan menggunakan DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) sebagai cetakan dan pasangan UbiF1 dan GusR1 sebagai primer. Komposisi PCR yang digunakan adalah 100 ng DNA, 0.5 µM UbiF1, 0.5 µM GusR1, 1x buffer taq, 0.2 mM dNTP mix, 1.25 U taq DNA polymerase (RBC Bioscience)

dan ddH₂O hingga volume akhir 20 µL. PCR dilakukan sebanyak 35 siklus dengan kondisi pra-PCR 94 °C, 5 menit; denaturasi 94 °C, 1 menit; penempelan primer 55 °C, 30 detik; pemanjangan 72 °C, 1 menit, dan pasca-PCR 72 °C, 5 menit.

Uji Toleransi Tanaman Transgenik Terhadap Cekaman Al

Tanaman transgenik yang berumur 4 bulan setelah aklimatisasi dipotong bagian atasnya hingga 3-4 buku dari pucuk lalu ditumbuhkan pada media H₂O hingga muncul akar sepanjang ±1 cm. Tanaman dipindahkan pada media hara (Watanabe *et al.*, 2001) yang mengandung 3.2 mM AlCl₃.6H₂O dan pH 4 kemudian dibiarkan beberapa hari hingga terjadi penghambatan pertumbuhan pada tanaman transgenik dan tidak pada kontrol (hara tanpa Al).

HASIL DAN PEMBAHASAN

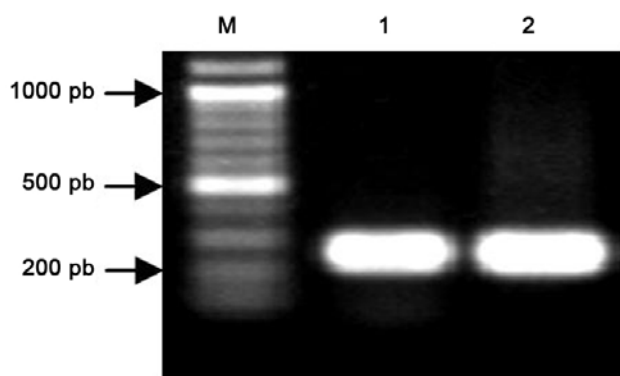
Konstruksi Vektor RNAi

Vektor RNAi dikonstruksi dengan menyisipkan fragmen 3'UTR gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *M. malabathricum* L. ke dalam vektor pANDA melalui vektor pENTRTM/D-TOPO[®] dengan teknologi GATEWAY. Amplifikasi 3'UTR dari gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *M. malabathricum* L. yang berukuran 255 pb

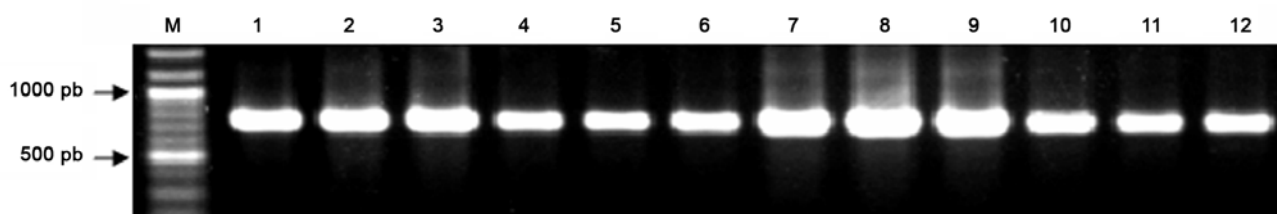
(Gambar 2) dengan penambahan CACC pada ujung 5' telah berhasil dilakukan. Fragmen ini kemudian disisipkan ke dalam pENTRTM/D-TOPO[®].

Hasil rekombinasi antara attR1 dari vektor pANDA dan attL1 dari pENTRTM/D-TOPO[®] dan attR2 dari vektor pANDA dan attL2 dari pENTRTM/D-TOPO[®] menyebabkan terjadinya penyisipan fragmen 3'UTRMmpma ke dalam vektor pANDA pada dua daerah yang orientasinya berulang terbalik (*inverted*), yang selanjutnya disebut sebagai pANDA/3'UTRMmpma. Penyisipan fragmen diverifikasi dengan PCR menggunakan cetakan pANDA/3'UTRMmpma dan primer Ubq-F dan Gus-R untuk verifikasi fragmen di sebelah kiri *gus linker* yang dilihat dari arah pembaca (Gambar 3, kolom 1-6) dan primer Gus-F dan Nost-R untuk verifikasi fragmen di sebelah kanan *gus linker* (Gambar 3, kolom 7-12). Hasil PCR tersebut menunjukkan adanya pita berukuran sekitar 750 pb yang terdiri dari bagian ujung 3' promoter *Ubiquitin1* jagung, fragmen 3'UTRMmpma dan bagian ujung 5' *gus linker* (Gambar 3, kolom 1-6); dan pita lain yang juga berukuran 750 pb yang terdiri atas bagian ujung 3' *gus linker*, fragmen 3'UTRMmpma dan bagian ujung 5' terminator *nos* (Gambar 3, kolom 7-12). Hasil ini juga telah menjelaskan bahwa fragmen 3'UTR telah tersisip pada vektor pANDA dengan urutan posisi: – promoter *ubiquitin1* -3'UTR-*gus linker*-3'UTR-terminator *nos* (Gambar 4).

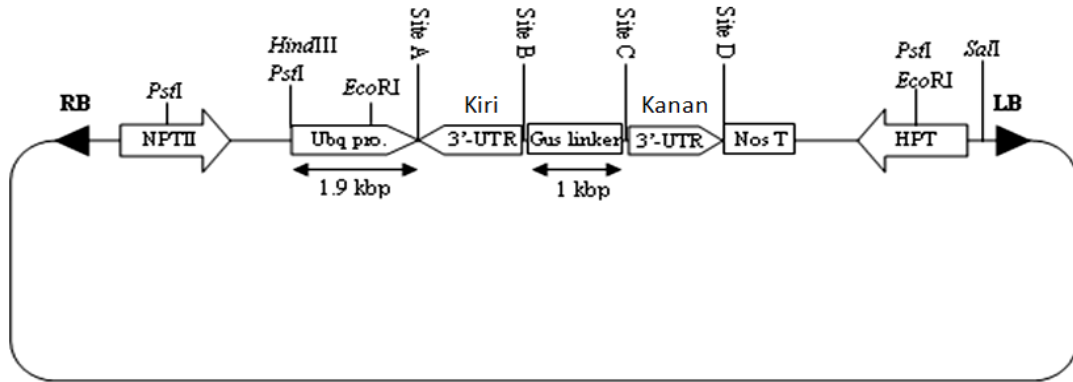
Orientasi fragmen 3'UTR diverifikasi dengan sekuensing menggunakan primer spesifik Gus-F untuk orientasi *sense* (3'UTR di sebelah kanan *gus linker* dari arah pembaca) dan primer spesifik Gus-R untuk orientasi *antisense* (3'UTR di sebelah kiri *gus linker* dari arah pembaca). Hasil sekuensing menunjukkan bahwa di bagian awal hasil sekuensing telah diperoleh ujung 5' fragmen 3'UTRMmpma (data tidak ditunjukkan), yang membuktikan bahwa orientasi fragmen tersebut sesuai dengan yang diharapkan, yaitu urutan berulang terbalik, *inverted repeat* di dalam vektor pANDA (Gambar 4). Di dalam sel, bila kedua UTR ini ditranskripsikan, yang dikontrol oleh promoter konstitutif *Ubiquitin1* jagung, maka mRNA yang dihasilkan membentuk utas ganda (dsRNA). dsRNA yang dihasilkan oleh sel suatu organisme akan dikenali oleh enzim *Dicer* dan dipotong menjadi dsRNA berukuran kecil dan selanjutnya salah satu utasnya (*antisense*) berasosiasi dengan RISC untuk mendegradasi mRNA target sehingga ekspresi gen



Gambar 2. Hasil amplifikasi pMmpma3' dengan menggunakan primer 3'UTR-F dan 3'UTR-R (1 dan 2). M, 100 pb ladder



Gambar 3. Hasil PCR menggunakan pANDA/3'UTRMmpma sebagai cetakan dan pasangan Ubq-F dan Gus-R serta Gus-F dan Nost-R sebagai primer. Pasangan Ubq-F dan Gus-R digunakan untuk mengamplifikasi sisipan fragmen 3'UTR sebelah kiri *gus linker* (1-6), dan pasangan Gus-F dan Nost-R untuk mengamplifikasi sisipan di sebelah kanan *gus linker* (7-12) yang dilihat dari arah pembaca



Site A: RB - BamH I, Sma I, Kpn I, Apa I, Xho I - LB
 Site B: RB - ClaH I, Hind III, EcoR V - LB
 Site C: RB - EcoR I, Pst I, Sma I, BamH I, Xho I, Not I, EcoR V, Pst I, EcoR I - LB
 Site D: RB - EcoR I, Spe I, BamH I, Sac I - LB
 Site E: RB - EcoR I, EcoR V, Hind III - LB

Gambar 4. Fragmen 3'UTR gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *M. malabathricum* L. membentuk orientasi berulang terbalik yang diselingi oleh fragmen dari gen *gus*. Bila terekspresi, maka fragmen 3'UTR membentuk dsRNA dan fragmen gen *gus* membentuk loop

dapat ditekan dalam berbagai level (Waterhouse *et al.*, 2001; Meister dan Tuschl, 2004).

Transformasi A. tumefaciens EHA101 dengan pANDA/3'UTRMmpma

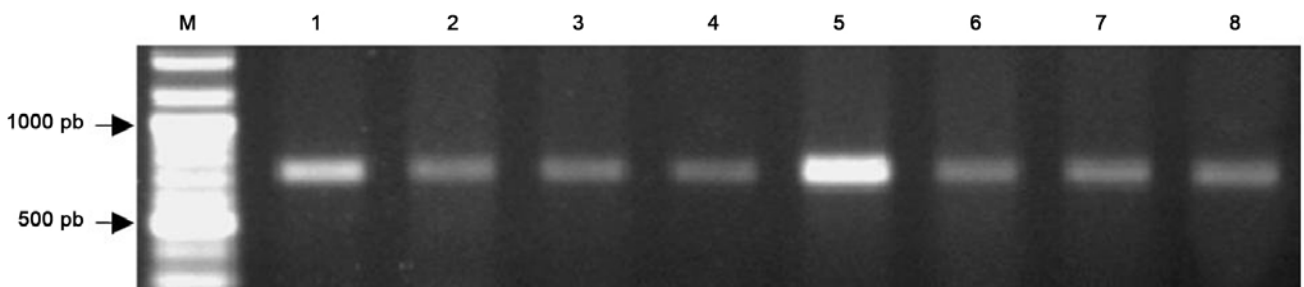
Plasmid pANDA/3'UTRMmpma diintroduksi ke dalam *A. tumefaciens* EHA101 dengan menggunakan metode elektroporasi. *A. tumefaciens* EHA101 dipastikan membawa plasmid pANDA/3'UTRMmpma dengan melakukan PCR terhadap koloni bakteri yang diperoleh dari hasil elektroporasi menggunakan primer Ubq-F dan Gus-R, untuk mengamplifikasi fragmen 3'UTR yang berorientasi antisense (Gambar 5 kolom 1-4), serta primer Gus-F dan Nost-R, untuk mengamplifikasi fragmen yang berorientasi sense (Gambar 5 kolom 5-8). PCR dengan menggunakan kedua pasang primer di atas menghasilkan pita-pita berukuran sekitar 750 pb.

Hasil tersebut menunjukkan adanya fragmen 3'UTRMmpma berada di antara sekuen promotor *ubiquitin1* dan *gus linker* (Gambar 5 kolom 1-4) serta sekuen *gus linker* dan terminator *nos* (Gambar 5 kolom

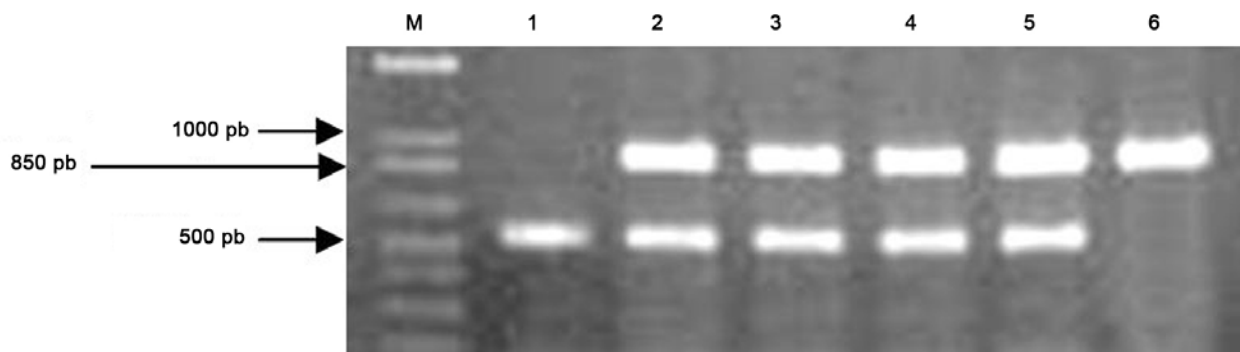
5-8). Hasil tersebut menjelaskan bahwa vektor yang membawa sekuen DNA 3'UTRMmpma berulang terbalik telah berhasil diintroduksi ke dalam *A. tumefaciens* dan siap diintroduksi ke dalam tanaman target, *Melastoma malabathricum* L.

Tanaman Transgenik Hasil Transformasi RNAi

Vektor ekspresi RNAi telah berhasil diintroduksi ke dalam tanaman *M. malabathricum* L. sehingga tanaman *M. malabathricum* L. transgenik yang mengandung dua fragmen 3'UTRMmpma dengan orientasi terbalik yang dikontrol oleh promotor kuat *Ubiquitin1* telah diperoleh. Pengujian dengan PCR menggunakan primer UbiF1 dan GusR1 menghasilkan pita berukuran sekitar 950 pb (Gambar 6, baris pertama), sedangkan PCR menggunakan primer ActF dan ActR menghasilkan pita berukuran sekitar 500 pb (Gambar 6, baris kedua). Pita berukuran 950 pb berasal dari amplifikasi bagian ujung 3' promotor *Ubiquitin1* jagung (sekitar 300 pb), fragmen 3'UTRMmpma (sekitar 255 pb), dan bagian ujung 5' gen Gus (sekitar 400 pb), sedangkan pita berukuran 500 pb merupakan hasil amplifikasi DNA



Gambar 5. Hasil PCR terhadap koloni *A. tumefaciens* hasil elektroporasi. Pasangan Ubq-F dan Gus-R digunakan untuk mengamplifikasi sisipan fragmen 3'UTR yang berorientasi antisense (1-4), dan pasangan Gus-F dan Nost-R untuk mengamplifikasi sisipan fragmen 3'UTR yang berorientasi sense (5-8)



Gambar 6. Hasil PCR menggunakan DNA dari 4 tanaman transgenik independen (kolom 2-5), DNA tanaman kontrol (kolom 1), dan vektor RNAi (kolom 6) sebagai cetakan dan pasangan UbiF1 – GusR1 sebagai primer. M adalah 1 kb ladder untuk mengetahui ukuran fragmen

ekson1–ekson2 dari gen aktin. Fungsi dari penggunaan primer aktin adalah untuk memastikan bahwa DNA yang digunakan sebagai cetakan adalah baik.

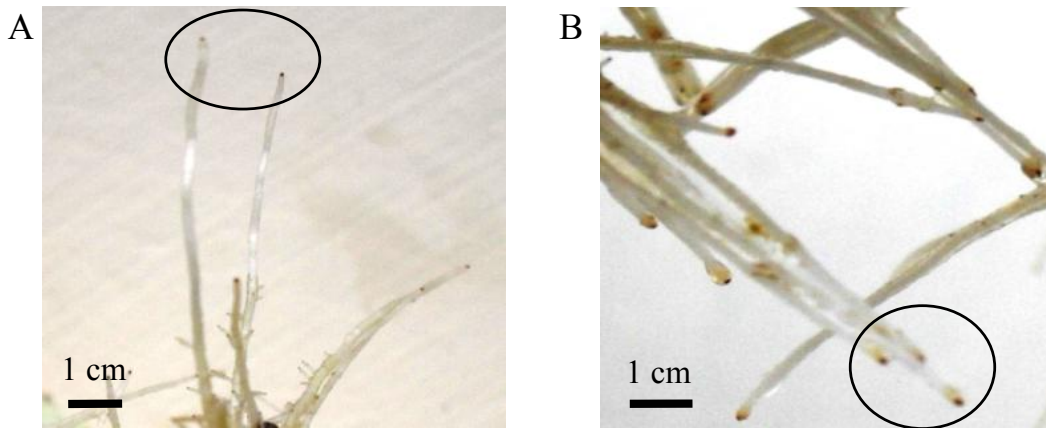
Tanaman *M. malabathricum* L. transgenik menunjukkan perbedaan fenotipe dengan tanaman kontrol (non-transgenik). Ketika tanaman berumur 3 bulan setelah aklimatisasi, tampak adanya perbedaan yang jelas antara tanaman transgenik dan non-transgenik (kontrol). Pertumbuhan tanaman transgenik menjadi terhambat, daun lebih kecil dan cenderung menguning, sedangkan tanaman kontrol tidak menunjukkan hambatan pertumbuhan dengan daun yang lebih lebar dan hijau. Penghambatan pertumbuhan tanaman transgenik diduga disebabkan oleh gangguan ekspresi gen penyandi H^+ -ATPase membran plasma. Gangguan tersebut terjadi karena pada genom tanaman transgenik telah tersisip dua fragmen 3'UTR dengan arah terbalik (*inverted repeat*) di bawah kendali satu promoter kuat, *Ubiquitin1* jagung. Bila kedua fragmen 3'UTR ini diekspresikan, maka mRNA-nya membentuk struktur jepit rambut (*stem and loop*) dimana kedua fragmen 3'UTR membentuk dsRNA dan fragmen gen *gus* membentuk *loop*. dsRNA yang terbentuk akan dipotong oleh enzim *Dicer* menjadi dsRNA berukuran kecil (21-26 nukleotida) dan utas *antisense* RNA kecil berasosiasi dengan RISC untuk memotong mRNA penyandi protein H^+ -ATPase membran plasma sehingga mRNA tidak dapat ditranslasi menjadi protein karena sudah terdegradasi.

Gangguan terhadap ekspresi gen *Mmpma* akan mengganggu aktivitas transporter sekunder yang menggerakkan banyak solut, asimilat, atau metabolit melintasi membran plasma (Sussman, 1994). Selain itu, tanaman juga akan mengalami gangguan homeostasis pH di sitoplasma karena H^+ -ATPase membran plasma, sebagai pompa yang mengeluarkan proton dari sitoplasma, tidak terbentuk (Young *et al.*, 1998) sehingga dapat mengganggu sistem metabolisme di dalam sel. Tanaman yang mengalami gangguan homeostasis pH sitoplasma jika ditanam pada media dengan pH rendah dan Al tinggi, maka pH sitoplasma akan menurun dan menyebabkan masuknya Al ke dalam sel tanaman sehingga tanaman mengalami keracunan Al.

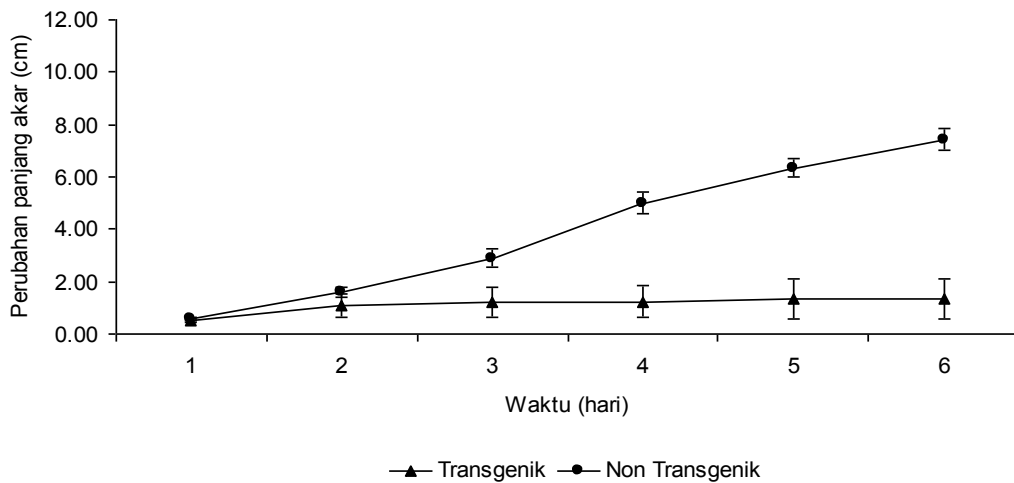
Uji Toleransi Tanaman Transgenik terhadap Cekaman Al

Tanaman *M. malabathricum* L. transgenik yang telah ditumbuhkan pada media hara (Watanabe *et al.*, 2001) yang mengandung 3.2 mM $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ mulai hari ke-2 perlakuan Al tampak ujung akar semua tanaman yang diuji berwarna coklat, dan mulai hari ke-6 perlakuan Al tampak warna coklat berkurang pada tanaman transgenik (Gambar 7A) dan tidak berubah pada tanaman non-transgenik (Gambar 7B). Warna coklat pada ujung akar terbentuk karena *mucilage* yang dieksudasi pada ujung akar tanaman *M. malabathricum* L. mengikat Al dalam jumlah besar (Watanabe *et al.*, 2008). *Mucilage* pada tanaman *M. malabathricum* L. mengandung asam glukuronat yang bermuatan negatif sekitar 42% sehingga mempunyai afinitas yang tinggi terhadap kation trivalent, misalnya Al (Watanabe *et al.*, 2008). Berkurangnya warna coklat pada ujung akar tanaman transgenik diduga disebabkan karena berkurangnya kemampuan tanaman untuk mengeksudasi *mucilage* pada ujung akar. Kemungkinan, fungsi glukosa yang digunakan sebagai prekursor komponen *mucilage*, asam glukuronat, dialihkan sebagai sumber energi untuk mempertahankan diri dari cekaman Al.

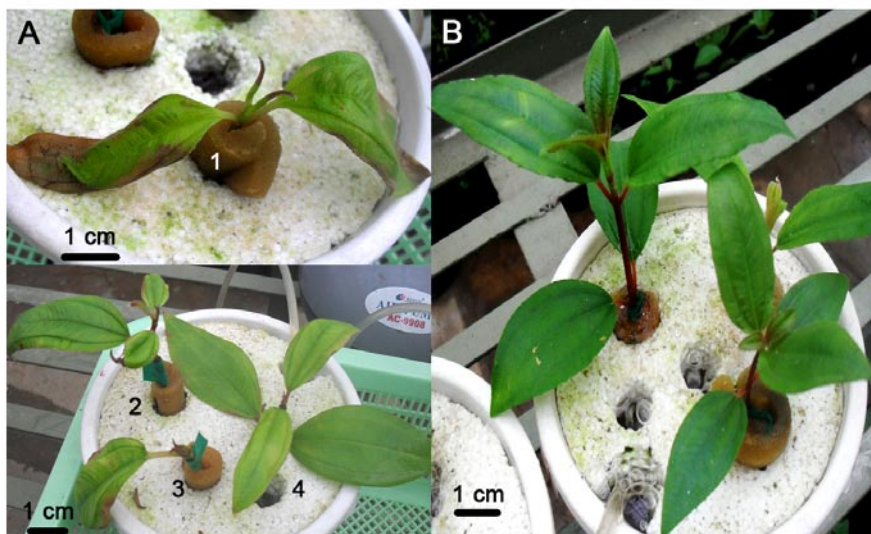
Gejala awal yang muncul adalah pertumbuhan akar terhambat (Gambar 8). Daun mulai menunjukkan gejala kekuningan pada hari ke-2 setelah aplikasi Al lalu berubah menjadi coklat pada ke-7 (Gambar 9A), sedangkan tanaman non-transgenik menunjukkan pertumbuhan normal (Gambar 9B). Hasil tersebut menunjukkan bahwa konstruksi RNAi dari 3'UTRMmpma diduga dapat menghentikan dan/atau menurunkan ekspresi gen penyandi H^+ -ATPase membran plasma pada *Melastoma malabathricum* L. dan juga dapat memberikan dugaan bahwa gen penyandi H^+ -ATPase membran plasma pada *Melastoma malabathricum* L., *Mmpma*, merupakan salah satu gen yang terlibat dalam toleransi tanaman dari cekaman Al. Hal ini sejalan dengan pernyataan bahwa konstruksi RNAi dapat digunakan untuk mempelajari peranan suatu gen pada tanaman (Islam *et al.*, 2005; Miki *et al.*, 2005; Moritoh *et al.*, 2005).



Gambar 7. Akar tanaman transgenik (A) dan non-transgenik (B) setelah perlakuan 3.2 mM Al dan pH 4 dalam larutan hara (Watanabe *et al.*, 2001) selama 6 hari. Warna coklat pada ujung akar tanaman transgenik memudar pada hari ke-6 (A) dan tetap berwarna coklat pada tanaman non transgenik (B)



Gambar 8. Pertumbuhan akar tanaman transgenik dan non-transgenik pada media hara (Watanabe *et al.*, 2001) yang mengandung 3.2 mM $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ dan pH 4 selama 7 hari



Gambar 9. Tanaman transgenik yang diperlakukan dengan 3.2 mM $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ dan pH 4 (A) dan tanaman non-transgenik (B) dalam larutan hara (Watanabe *et al.*, 2001) selama 7 hari

KESIMPULAN

Vektor RNAi yang membawa fragmen 3'UTRMmpma berhasil dikonstruksi dan disisipkan ke genom tanaman *Melastoma malabathricum* L. melalui *Agrobacterium tumefaciens* EHA101. Tanaman transgenik mengalami hambatan pertumbuhan terutama pertumbuhan akar dan daun, sedangkan non-transgenik tidak mengalami hambatan pada larutan hara yang mengandung cekaman Al (3.2 mM AlCl₃·6H₂O). RNAi dari fragmen 3'UTRMmpma diduga menghentikan dan/atau menurunkan ekspresi gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma pada *Melastoma malabathricum* L.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami berterima kasih kepada Program BPPS, Kementerian Pendidikan Nasional, Indonesia atas beasiswa yang telah diberikan; Hibah Kompetensi dengan judul: isolasi dan ekspresi gen dalam rangka perakitan tanaman yang toleran terhadap cekaman asam dan aluminium an. Dr. Suharsono atas dukungan sebagian besar dana penelitian; Prof. Ko Shimamoto dan Dr. Wong Hann Ling dari *Plant Molecular Genetics Laboratory, Nara Institute of Science and Technology*, Jepang atas dukungan fasilitas laboratorium, bahan kimia dan bantuan teknik laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahlquist, P. 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 296:270-1273.
- Ahn, S.J., Z. Rengel, H. Matsumoto. 2004. Aluminum-induced plasma membrane surface potential and H⁺-ATPase activity in near-isogenic wheat lines differing in tolerance to aluminum. *New Phytol.* 162:71-79.
- Akashi, K., K. Morikawa, A. Yokota. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation system for the drought and excess light stress-tolerant wild watermelon (*Citrullus lanatus*). *Plant Biotech.* 22:13-18.
- Check, E. 2007. RNA interference: hitting the on switch. *Nature* 448:855-858.
- Darojat, M.R. 2010. Perakitan *Melastoma malabathricum* transgenik. Skripsi. Departemen Biologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Islam, S.M.S., T. Miyazaki, F. Tanno, K. Itoh. 2005. Dissection of gene function by RNA silencing. *Plant Biotech.* 22:443-446.
- Li, L.C., S.T. Okino, H. Zhao. 2006. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:17337-17342.
- Meister, G., T. Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by doublestranded RNA. *Nature* 431:343-349.
- Miki, D., R. Itoh, K. Shimamoto. 2005. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol.* 138:1903-1913.
- Miki, D., K. Shimamoto. 2004. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant Cell Physiol.* 45:445-450.
- Moritoh, S., D. Miki, M. Akiyama, M. Kawahara, T. Izawa, H. Maki, K. Shimamoto. 2005. RNAi-mediated silencing of OsGEN-L (OsGENlike), a new member of the RAD2/XPG nuclease family, causes male sterility by defect of microspore development in rice. *Plant Cell Physiol.* 46:699-715.
- Muzuni, D. Sopandie, U.W. Suharsono, Suharsono. 2010. Isolasi dan pengklonan fragmen cDNA gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *Melastoma malabathricum* L. *J. Agron. Indonesia* 38:67-74.
- Muzuni, D. Sopandie, U.W. Suharsono, Suharsono. 2011. Isolasi, pengklonan, dan konstruksi RNAi gen penyandi H⁺-ATPase membran plasma dari *Melastoma malabathricum* L. Disertasi. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pickford, A.S., C. Cogoni. 2003. RNA-mediated gene silencing. *Cell Mol. Life Sci.* 60:871-882.
- Sussman, M.R. 1994. Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:211-234.
- Takeshita, F., T. Ochiya. 2006. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.* 97:689-96.
- Watanabe, T., S. Misawa, S. Hiradate, M. Osaki. 2008. Characterization of root mucilage from *Melastoma malabathricum*, with emphasis on its roles in aluminum accumulation. *New Phytol.* 178:581-589.
- Watanabe, T., M. Osaki, T. Tadano. 2001. Al uptake kinetics in roots of *Melastoma malabathricum* L. - an Al accumulator plant. *Plant Soil* 231:283-291.
- Waterhouse, P.M., M.B. Wang, T. Lough. 2001. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. *Nature* 411:834-842.
- Young, J.C., N.D. DeWitt, M.R. Sussman. 1998. A transgene encoding a plasma membrane H⁺-ATPase that confers acid resistance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Genetics* 149:501-507.