

# Konstruksi Vektor Biner dan Transformasi Gen *LcCsp* Sintetis ke dalam Genom Padi Nipponbare dengan Bantuan *Agrobacterium tumefaciens*

## (Construction of Binary Vector and Transformation of Synthetic *LcCsp* Gene into Nipponbare Rice Genome by *Agrobacterium tumefaciens* Transformation Method)

Dina Sri Yulita<sup>1,2</sup>, Aqwin Polosoro<sup>1\*</sup>, Atmitri Sisharmini<sup>1</sup>, Aniversari Apriana<sup>1</sup>,  
Febi Nurilmala<sup>2</sup>, dan Kurniawan Rudi Trijatmiko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia  
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; \*E-mail: aqwin@pertanian.go.id

<sup>2</sup>Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Nusa Bangsa, Jl. K.H. Sholeh Iskandar Km. 4,  
Cimanggu, Bogor 16114 Indonesia

Diajukan: 18 November 2019; Direvisi: 2 Juni 2020; Diterima: 16 Juni 2020

### ABSTRACT

Cold shock protein (Csp) is an essential bacterial protein for increasing abiotic stress tolerance, especially cold stress. Several studies discovered that overexpression of the gene successfully improves the tolerances of several types of plant not only under cold stress, but also other abiotic stresses, e.g. hot and drought conditions. The objectives of this study were to construct a binary vector containing the *LcCsp* gene modified from *Lactobacillus casei* and transform the gene into Nipponbare rice genome. The native *LcCsp* gene sequence, however, has low GC content (46.7%) while rice as transformation target plant has 52% GC content. The native *LcCsp* gene sequence, therefore, was optimized to the level close to 52.7% similar to GC content of the rice genome. This *LcCsp* gene was synthesized by using DNA printing technology (gBlocks® Gene Fragments Entry, IDT). The synthetic *LcCsp* gene was successfully inserted into the pCAMBIA1300-*int* binary vector driven by *Ubiquitin1* promoter and NOS terminator. The T-DNA cassette was successfully transformed into Nipponbare rice genome by *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 using immature embryo transformation protocol. A total of 51 T<sub>0</sub> Nipponbare lines survived from hygromycin selections and 21 lines were successfully acclimatized. Molecular analysis of the candidate lines showed that all Nipponbare transgenic putative lines contain the *LcCsp* gene demonstrating high transformation efficiency of 11.8%. The rice lines resulted from this study should be further analyzed and might be useful for developing rice transgenic lines tolerance to heat, drought, or saline stress condition.

**Keywords:** Rice, *LcCsp* gene, abiotic stresses, *Lactobacillus casei*, transformation.

### ABSTRAK

Cold shock protein (Csp) merupakan protein penting yang diproduksi bakteri untuk meningkatkan toleransinya terhadap cekaman abiotik, terutama cekaman dingin. Overekspresi gen *Csp* berhasil meningkatkan toleransi beberapa jenis tanaman terhadap cekaman dingin dan cekaman abiotik lainnya, seperti panas dan kekeringan. Tujuan penelitian ini ialah mengonstruksi vektor biner pCAMBIA1300-*int* dengan modifikasi sekuen gen *Csp* dari *Lactobacillus casei* dan mentransformasikannya ke dalam genom tanaman padi Nipponbare. Sekuen orisinal gen *LcCsp* memiliki kandungan GC yang rendah (46,7%) dibanding dengan kandungan GC padi (52,7%) sebagai tanaman target transformasi. Dengan demikian, sekuen tersebut perlu dimodifikasi agar kandungan GC-nya mendekati kandungan GC padi dengan melakukan sintesis DNA. DNA gen sintetis dilakukan dengan teknologi *printing* DNA (*gBlocks® Gene Fragments Entry*, IDT). Gen sintetis kemudian disisipkan ke dalam vektor biner pCAMBIA1300-*int* yang dikendalikan oleh promotor *Ubiquitin1* dan terminator NOS. T-DNA dengan gen sintetis telah berhasil ditransformasi ke dalam genom padi Nipponbare dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 menggunakan protokol transformasi *immature embryo*. Transformasi menghasilkan 51 galur putatif T<sub>0</sub> Nipponbare yang lolos pada media seleksi dengan antibiotik higromisin dan 21 galur berhasil diaklimatisasi. Analisis molekuler menunjukkan bahwa semua galur kandidat Nipponbare transgenik tersebut mengandung gen *LcCsp* yang menunjukkan efisiensi transformasi yang tinggi (11,8%). Galur ini perlu dianalisis lebih lanjut karena potensial sebagai kandidat galur padi transgenik toleran terhadap cekaman panas, kekeringan, atau salin.

**Kata kunci:** Padi, gen *LcCsp*, cekaman abiotik, *Lactobacillus casei*, transformasi.

## PENDAHULUAN

Faktor cekaman lingkungan, seperti kekeringan, suhu tinggi, salinitas, dan peningkatan CO<sub>2</sub>, memengaruhi pertumbuhan tanaman dan menjadi ancaman bagi pertanian berkelanjutan. Dengan menggunakan pemodelan *Shierary*, produksi padi di Indonesia diprediksi turun sebesar 11,1% pada lahan irigasi dan 14,4% pada lahan tadah hujan untuk setiap kenaikan suhu 1°C (Yuliawan dan Handoko 2016). Selain itu, pengaruh faktor-faktor tidak langsung lainnya yang terkait perubahan iklim, seperti kekeringan, kondisi tanah (antara lain salinitas dan tingkat keasaman yang tinggi), dan faktor biotik (serangan hama dan penyakit tanaman) juga berpotensi menyebabkan penurunan hasil pertanian.

Berdasarkan fakta di atas, upaya pemuliaan tanaman untuk mengatasi perubahan iklim menjadi sangat penting. Salah satunya dengan merakit tanaman yang toleran terhadap cekaman abiotik. Berbagai upaya telah dilakukan, di antaranya dengan melakukan overekspresi gen-gen yang terkait respons terhadap cekaman abiotik seperti *dehydration-responsive element-binding (DREB)* yang terbukti meningkatkan toleransi terhadap cekaman salinitas dan kekeringan pada *Arabidopsis thaliana* (Peng et al. 2011) dan padi (Bihani et al. 2011). Selain itu, introduksi gen penyandi protein yang menstabilkan struktur enzim metabolisme pada saat keadaan ekstrim, seperti *cold shock protein (Csp)* atau *heat shock protein (Hsp)*, ternyata dapat meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman abiotik.

*Cold shock protein (Csp)* merupakan protein yang umum dihasilkan oleh bakteri sebagai respons terhadap penurunan suhu yang cepat. Prinsip umum cara kerja protein ini yaitu menjaga asam nukleat agar terhindar dari pembentukan struktur sekunder pada mRNA pada saat suhu rendah atau suhu tinggi sehingga memudahkan inisiasi translasi (Sachs et al. 2012). Introduksi gen *Csp* sintesis dari *Escherichia coli* ke dalam genom tanaman gandum terbukti tidak hanya meningkatkan ekspresi gen-gen yang responsif terhadap cekaman, tetapi juga meningkatkan keragaman dan produktivitas tanaman pada kondisi cekaman kekeringan dan salinitas (Yu et al. 2017). Hasil serupa diperoleh pada transformasi gen *CspA* atau *CspB* sintesis dari *E. coli* ke dalam genom padi, yaitu dampak peningkatan karakteristik pertumbuhan pada kondisi cekaman suhu dingin, panas, dan defisit air (Castiglioni et al. 2008).

*Lactobacillus casei* adalah bakteri Gram-positif, fakultatif anaerob, non-motil, dan non-spora yang merupakan bakteri asam laktat mesofilik (Kato et al.

2000). Bakteri ini digunakan dalam produk susu fermentasi yang proses pengolahannya melewati suhu rendah atau beku. Penonaktifan gen *Csp* pada bakteri mutan terbukti menurunkan toleransi terhadap beberapa cekaman dibanding dengan kontrol (Fukunaga et al. 1999). Fakta ini menunjukkan gen *Csp* pada *L. casei* memiliki peran yang sangat penting. Introduksi gen *Csp* dari *L. casei* ke dalam genom tanaman secara langsung akan memiliki hambatan karena kandungan GC (*GC content*) pada sekuen DNA bakteri yang rendah. Kandungan GC yang rendah pada untai DNA ternyata memengaruhi struktur kromatin dengan meningkatkan kondisi heterokromatin sehingga akses translasi tertutup (Barahimipour et al. 2015). Untuk itu, perlu dilakukan optimasi sekuen gen *Csp* dari bakteri yang disesuaikan dengan kandungan GC pada genom tanaman target.

Untuk mempermudah proses studi fungsi dan pengaruh gen baru, penggunaan tanaman model menjadi sangat penting. Padi telah menjadi tanaman monokotil rujukan atau tanaman model yang disebabkan berlimpahnya informasi molekuler (Sakata et al. 2000), efisiensi transformasi yang relatif tinggi (Tyagi dan Mohanty 2000), dan ukuran genom yang kecil (430 Mb) (Arumuganathan dan Earle 1991). Nipponbare merupakan salah satu varietas model yang memiliki efisiensi transformasi yang cukup tinggi (Apriana et al. 2011; Enggarini et al. 2017; Windiastri et al. 2018) dan informasi genetik yang lengkap (Matsumoto et al. 2016).

Penelitian ini bertujuan mengonstruksi vektor biner pCAMBIA1300-*int* dengan modifikasi sekuen gen *Csp* dari *L. casei* dan mentransformasikannya ke dalam genom tanaman padi Nipponbare. Fungsi gen *LcCsp* yang vital dalam proses industri yang menggunakan suhu ekstrim diharapkan akan memberikan dampak yang signifikan terhadap toleransi tanaman padi terhadap cekaman abiotik. Penyesuaian kandungan GC sekuen gen *LcCsp* tanpa perubahan kodon dan urutan asam amino juga diharapkan dapat meningkatkan efisiensi translasi gen ini di dalam genom padi.

## BAHAN DAN METODE

### Materi Genetik

Penelitian ini menggunakan gen *LcCsp* sintesis hasil modifikasi dari sekuen *Csp* yang berasal dari *L. casei*. Padi kultivar Nipponbare digunakan sebagai tanaman target untuk transformasi, sementara vektor biner yang digunakan untuk mentransformasi *LcCsp*

adalah pCAMBIA1300-*int* dengan bantuan *A. tumefaciens* strain LBA4404.

#### Modifikasi Sekuen dan Gen Sintesis *LcCsp*

Sekuen gen *Csp* berasal dari *L. casei* yang merupakan prokariota dengan kandungan GC 46,7% dan terdiri atas 201 pasang basa nukleotida (nomor akses: CP048003.1). Sementara, padi merupakan organisme eukariota memiliki kandungan GC yang lebih tinggi dengan rata-rata 52% (Guo et al. 2007). Modifikasi urutan basa nukleotida gen *LcCsp* dilakukan dengan cara mengganti basa nukleotida adenin (A) dan timin (T) dengan guanin (G) atau sitosin (C) dalam suatu kodon tanpa mengubah urutan asam amino hasil translasi serta melakukan pemerataan sebaran GC ke seluruh bagian gen. Dengan demikian, didapatkan sekuen baru yang memiliki kandungan GC sesuai dengan kondisi genom padi. Selanjutnya, sekuen dianalisis dengan perangkat lunak *gBlocks® Gene Fragments Entry* (IDT) untuk menganalisis stabilitas fragmen RNA yang akan ditranslasi dengan meminimalkan terbentuknya *hairpin*. Sekuen hasil modifikasi kemudian disintesis dan diklon ke dalam vektor kloning pIDT-Smart (IDT).

#### Konstruksi Plasmid Rekombinan pCAMBIA1300::*LcCsp*

Plasmid pIDT-Smart-*LcCsp* dan pCAMBIA1300-*int* dipotong dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Kpn*II. Fragmen DNA hasil pemotongan dipisahkan dengan elektroforesis dan fragmen hasil elektroforesis dipurifikasi dengan menggunakan *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN). Konstruksi kandidat gen pCAMBIA1300::*LcCsp* dirakit dengan menyambungkan fragmen gen *LcCsp* dan vektor *backbone* pCAMBIA1300-*int* dengan ujung-ujung kohesif (Gambar 2C). Hasil ligasi diinkubasi pada suhu 4°C selama satu malam. Plasmid rekombinan yang terbentuk kemudian ditransformasikan ke bakteri *E. coli* kompeten strain Dh5 $\alpha$  dengan metode *heat shock* (Sambrook et al. 1989). Bakteri *E. coli* hasil transformasi kemudian ditanam pada media seleksi yang mengandung antibiotik kanamisin 100  $\mu$ g/ml.

Koloni tunggal yang diperoleh dari hasil transformasi bakteri tersebut ditumbuhkan pada media LB cair yang mengandung kanamisin 100  $\mu$ g/ml dan diinkubasi satu malam. Plasmid rekombinan diekstraksi dari media cair dengan menggunakan *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen). Keberhasilan konstruksi plasmid rekombinan pCAMBIA1300::*LcCsp* diverifikasi dengan analisis PCR menggunakan primer pZmUbi *forward* (5'-TGATGGCCCTGCCTTCATACG-3') dan tNOS *reverse* (5'-

TAATCATCGCAAGACCGGCA-3'). Reaksi amplifikasi dilakukan dengan tahap awal denaturasi pada 94°C selama 3 menit, 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada 94°C selama 15 detik, penempelan primer pada 55°C selama 30 detik, dan pemanjangan pada 72°C selama 30 detik, diikuti proses pemanjangan akhir pada 72°C selama 1 menit dan proses pendinginan pada 12°C selama 5 menit. Selanjutnya, produk PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa 1% yang mengandung *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium). Hasil elektroforesis divisualisasi dengan *ChemiDoc™ EQ Imaging System* (Bio-Rad). Amplifikasi gen *LcCsp* menghasilkan fragmen dengan ukuran 400 bp. Validasi plasmid rekombinan dilakukan dengan metode sekuensing menggunakan primer pZmUbi *forward* dan tNOS *reverse*. Hasil sekuensing dianalisis penyejajaran dengan program *Clustal W* yang mengacu pada sekuen gen rujukan.

#### Transformasi Gen *LcCsp* ke dalam Genom Padi Nipponbare

Transformasi gen *LcCsp* ke dalam genom padi Nipponbare dilakukan dengan mengikuti tahapan prosedur yang menggunakan media pertumbuhan seperti yang diuraikan oleh Slamet-Loedin et al. (2013). Teknik transformasi embrio muda (*immature embryo*) ini terbagi atas enam tahap, yaitu sterilisasi eksplan, proses penanaman embrio, kokultivasi, seleksi, regenerasi, dan aklimatisasi. Sterilisasi eksplan dengan alkohol 70% beberapa menit dilanjutkan dengan larutan natrium hipoklorit 20% selama 5 menit dan dicuci dengan air steril 3–6 kali. Proses penanaman embrio dilakukan di dalam laminar dengan cara melukai embrio padi dan merendamnya dengan *A. tumefaciens* strain LBA4404 yang mengandung konstruksi vektor ekspresi pada media AB yang telah dilarutkan dalam 10 ml media kokultivasi dengan penambahan antibiotik asetosiringon hingga konsentrasi 200  $\mu$ M. Kalus padi ditanam pada media kokultivasi selama 7 hari. Kalus padi kemudian dipindahkan dan diinkubasi pada media seleksi dengan penambahan antibiotik higromisin 30 mg/l selama 10 hari dengan tiga kali periode pemindahan. Kalus yang bertahan pada media seleksi kemudian dipindahkan ke media regenerasi hingga tumbuh tunas, kemudian dipicu pertumbuhan akarnya pada media perakaran sehingga terbentuk planlet. Planlet yang telah stabil kemudian diaklimatisasi dan DNA genomiknya dianalisis secara molekuler.

### Analisis Molekuler Tanaman Padi Nipponbare Transgenik Putatif Mengandung Gen *LcCsp*

Analisis molekuler dilakukan dengan teknik PCR yang merupakan metode deteksi cepat untuk mengonfirmasi keberadaan transgen di dalam jaringan tanaman transgenik putatif. DNA genomik padi transgenik putatif diisolasi dengan menggunakan metode Dellaporta et al. (1983). Sisipan gen *LcCsp* dianalisis dengan menggunakan satu pasang primer yang mengapit gen *LcCsp*, yaitu primer pZmUbi *forward* dan tNOS *reverse* yang menghasilkan fragmen DNA produk PCR dengan ukuran 400 bp. Reaksi PCR menggunakan 100 ng DNA padi Nipponbare transgenik putatif mengandung gen *LcCsp* dan reagen *FastStart Taq DNA Polymerase* (Roche) dengan volume total 10  $\mu$ l. Reaksi PCR menggunakan mesin *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad) dengan tahapan siklus sebagai berikut: denaturasi awal pada 95°C selama 3 menit, 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada 95°C selama 30 detik, penempelan primer pada 60°C selama 30 detik, dan pemanjangan DNA pada 72°C selama 30 detik, diakhiri dengan reaksi pemanjangan akhir pada 72°C selama 1 menit. Produk PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1% yang mengandung *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium). Hasil elektroforesis divisualisasi dengan *ChemiDoc™ EQ Imaging System* (Bio-Rad).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Struktur Sekuen Gen *LcCsp* Hasil Modifikasi

Sekuen orisinal gen *LcCsp* berasal dari lokus *LCA12A\_0970* pada genom *L. casei* (Broadbent et al. 2012) memiliki kandungan GC yang rendah, yaitu 46,7%. Persentase ini lebih rendah daripada kandungan GC pada tanaman monokotil, terutama padi yang menjadi target transformasi yang memiliki kandungan GC 52% pada mRNA total (Peng et al. 2010). Kandungan GC yang rendah dipercaya berpengaruh terhadap efisiensi translasi dan stabilitas mRNA pada tanaman (Barahimipour et al. 2015). Untuk itu, perlu dilakukan modifikasi dan optimasi sekuen DNA. Sekuen gen *LcCsp* dimodifikasi dengan cara mengubah basa nukleotida A dan T menjadi G dan C pada kodon menjadi kodon lain yang menyandi asam amino yang sama (Gambar 2) dengan memperhatikan kandungan GC dan kemungkinan ketidakstabilan mRNA seperti terbentuknya *hairpin* (Jackson et al. 2014). Hasil modifikasi sekuen ini berhasil mendapatkan sekuen baru dengan kandungan GC sebesar 52,7%.

Optimalisasi kodon sangat berpengaruh terhadap aktivitas gen asing pada tanaman target. Jackson et al. (2014) melaporkan bahwa optimalisasi sekuen gen *luc* yang diintegrasikan pada genom tanaman tebu dapat meningkatkan ekspresi gen hingga 935 kali lipat dibanding dengan sekuen orisinalnya. Hasil senada dengan tingkat ekspresi yang lebih rendah dilaporkan oleh Jeong et al. (2017) bahwa optimasi kodon gen *PAC* dengan menaikkan kandungan GC

Sekuen <i>LcCsp</i> (Ori)	ATG	GAA	CAC	GGC	ACA	GTT	AAA	TGG	TTC	AAT	GCT	GAA
Asam Amino	M	E	H	G	T	V	K	W	F	N	A	E
Sekuen <i>LcCsp</i> (Mod)	ATG	GAG	CAC	GGA	ACA	GTC	AAA	TGG	TTC	AAT	GCT	GAG
Sekuen <i>LcCsp</i> (Ori)	AAG	GGT	TAC	GGT	TTT	ATC	ACT	CGC	GAA	GAT	GGT	AGC
Asam Amino	K	G	Y	G	F	I	T	R	E	D	G	S
Sekuen <i>LcCsp</i> (Mod)	AAG	GGA	TAC	GGC	TTC	ATA	ACT	AGG	GAA	GAT	GGC	TCT
Sekuen <i>LcCsp</i> (Ori)	GAT	GTT	TTC	GTT	CAC	TTC	TCA	GCT	ATC	CAA	GGC	GAC
Asam Amino	D	V	F	V	H	F	S	A	I	Q	G	D
Sekuen <i>LcCsp</i> (Mod)	GAC	GTC	TTC	GTC	CAC	TTC	TCC	GCG	ATA	CAG	GGG	GAT
Sekuen <i>LcCsp</i> (Ori)	GGC	TAC	AAG	ACC	CTC	GAA	GAA	GGC	CAA	GCA	GTC	ACT
Asam Amino	G	Y	K	T	L	E	E	G	Q	A	V	T
Sekuen <i>LcCsp</i> (Mod)	GGT	TAC	AAG	ACC	CTG	GAG	GAA	GGC	CAA	GCC	GTA	ACG
Sekuen <i>LcCsp</i> (Ori)	TTT	GAA	GTT	GAA	GAC	AGC	GAT	CGC	GGT	CCA	CAA	GCG
Asam Amino	F	E	V	E	D	S	D	R	G	P	Q	A
Sekuen <i>LcCsp</i> (Mod)	TTC	GAG	GTC	GAG	GAC	TCC	GAT	CGT	GGG	CCT	CAA	GCG
Sekuen <i>LcCsp</i> (Ori)	GTT	AAC	GTT	AAC	AAA	GAC	TAA					
Asam Amino	V	N	V	N	K	D						
Sekuen <i>LcCsp</i> (Mod)	GTC	AAT	GTC	AAC	AAA	GAT	TAG					

**Gambar 1.** Hasil modifikasi sekuen gen *LcCsp* dari *Lactobacillus casei* pada beberapa basa nukleotida agar kandungan GC-nya mendekati kandungan GC genom tanaman padi. Warna abu-abu menunjukkan perubahan basa nukleotida pada setiap kodon. Ori = orisinal, Mod = modifikasi.

dari 50,9% menjadi 58,7% berhasil meningkatkan produksi protein dan metabolit masing-masing sebanyak 2,8 kali dan 2,9 kali lipat pada tanaman padi. Pengintroduksian gen asing ke dalam genom tanaman target dapat terkendala karena kesukaan pilihan penggunaan kodon pada tiap spesies tanaman berbeda. Levy et al. (2018) melaporkan bahwa gen yang diisolasi dari bakteri ekspresi proteinnya rendah ketika diekspresikan pada genom tanaman. Gen yang ekspresinya tinggi, memiliki kombinasi kodon pada tRNA mengerucut pada spesimen kodon tertentu yang spesifik untuk setiap organisme (Fuglsang 2003).

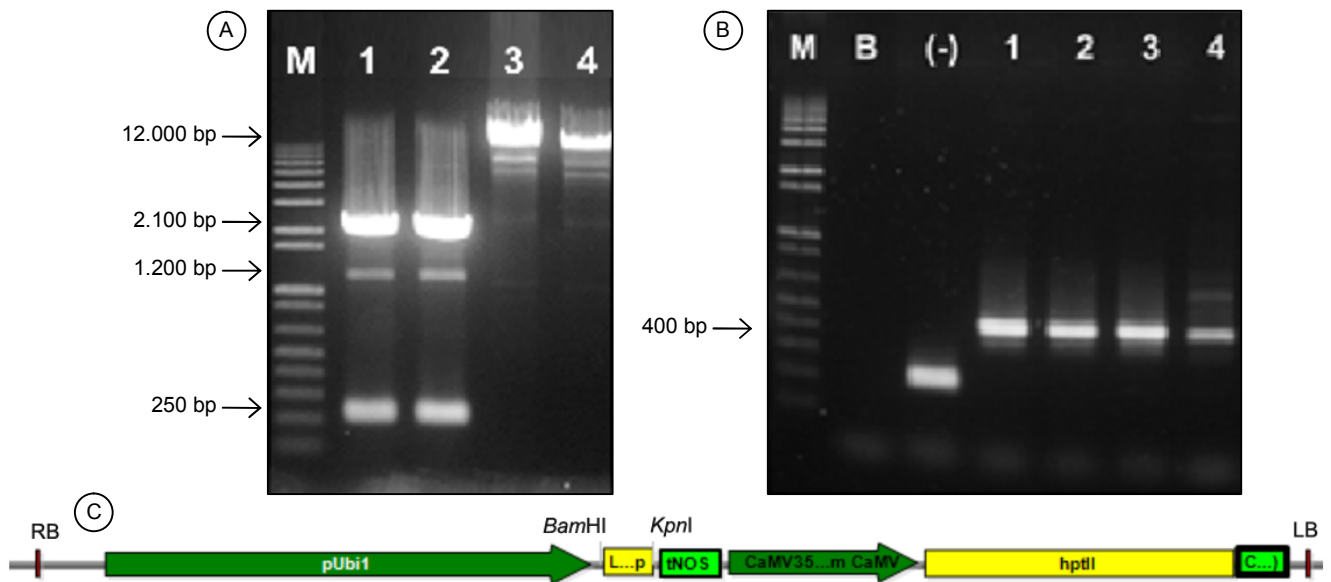
**Introduksi Gen *LcCsp* ke dalam Vektor Biner pCAMBIA1300-*int***

Pemotongan plasmid pIDT-Smart-*LcCsp* yang dilakukan dengan dua enzim restriksi (*Bam*HI dan *Kpn*I) berhasil menghasilkan tiga fragmen DNA. Kedua enzim memotong situs pemotongan pada kedua tepi sekuen gen *LcCsp* yang menghasilkan fragmen dengan ukuran 250 bp dan satu situs pemotongan lain pada bagian *backbone* yang membagi vektor kloning pIDT-Smart menjadi dua fragmen masing-masing berukuran 2.100 bp dan 1.200 bp (Gambar 2A). Pemotongan vektor biner pCAMBIA1300-*int* juga dilakukan dengan enzim yang sama, kedua enzim memotong pada bagian *multicloning site* yang terletak antara promotor pZmUbi dan terminator tNOS sehingga menghasilkan

plasmid yang terlinearisasi dengan ukuran 1.200 bp (Gambar 2A).

Fragmen gen *LcCsp* dan plasmid pCAMBIA1300-*int* sebagai vektor biner disambungkan dan kemudian ditransformasi ke dalam *E. coli* kompeten strain DH5 $\alpha$ . Transformasi tersebut menghasilkan beberapa koloni bakteri yang tumbuh pada media seleksi (LB padat) dengan penambahan kanamisin. Ketahanan *E. coli* didapatkan dari gen *neomycin phosphotransferase II (nptII)* yang terdapat pada plasmid *backbone* pCAMBIA1300-*int*. Plasmid dari lima sampel koloni terbaik dianalisis PCR dengan primer pZmUbi dan tNOS. Kedua fragmen ini mengapit gen *LcCsp* sepanjang 201 bp dan membentuk amplicon berukuran 400 bp. Dari lima sampel yang diuji diperoleh empat koloni yang positif mengandung plasmid rekombinan pCAMBIA1300::*LcCsp* dengan amplicon berukuran 400 bp (Gambar 2B). Sementara, pada kontrol negatif menggunakan plasmid pCAMBIA1300-*int* teramplifikasi fragmen antara promotor pZmUbi dan terminator tNOS tanpa insersi gen *LcCsp* sehingga dihasilkan amplicon berukuran 201 bp (Gambar 2B).

Validasi fragmen gen *LcCsp* hasil PCR dari plasmid rekombinan pCAMBIA1300::*LcCsp* dilakukan dengan sekuensing. Amplifikasi fragmen gen *LcCsp* menggunakan dua primer yang mengapit dan menjangkau seluruh bagian gen *LcCsp*. Hasil analisis penyejajaran sekuen menunjukkan bahwa sekuen



**Gambar 2.** Introduksi gen *LcCsp* ke dalam vektor biner pCAMBIA1300-*int*. (A) Visualisasi hasil elektroforesis pemotongan plasmid pIDT-Smart-*LcCsp* (1 dan 2) dan pCAMBIA1300-*int* (3 dan 4) dengan enzim restriksi *Bam*HI dan *Kpn*I (*double digest*). M = marka, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). (B) Visualisasi hasil elektroforesis produk PCR plasmid rekombinan pCAMBIA1300::*LcCsp* dengan primer pZmUbi dan tNOS. M = marka, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), B = blangko, (-) = plasmid pCAMBIA-*int* tanpa insersi gen *LcCsp*, 1-4 = koloni bakteri hasil transformasi positif mengandung insersi gen *LcCsp*. (C) Peta konstruksi plasmid rekombinan pCAMBIA1300::*LcCsp* dengan situs pemotongan enzim restriksi *Bam*HI dan *Kpn*I.

fragmen plasmid rekombinan memiliki sisipan gen *LcCsp* yang identik dengan sekuen gen rujukan (Gambar 3). Tujuan dilakukannya validasi tidak hanya untuk mengonfirmasi keberadaan gen *LcCsp*, tetapi juga untuk memastikan tidak adanya mutasi pada bagian gen target selama proses konstruksi plasmid berlangsung. Proses kloning dan PCR berpotensi memicu mutasi pada gen target (Barnes 1992). Dari penelitian ini telah diperoleh plasmid vektor biner

yang mengandung gen *LcCsp* dengan urutan basa yang sama dengan sekuen gen *LcCsp* rujukan.

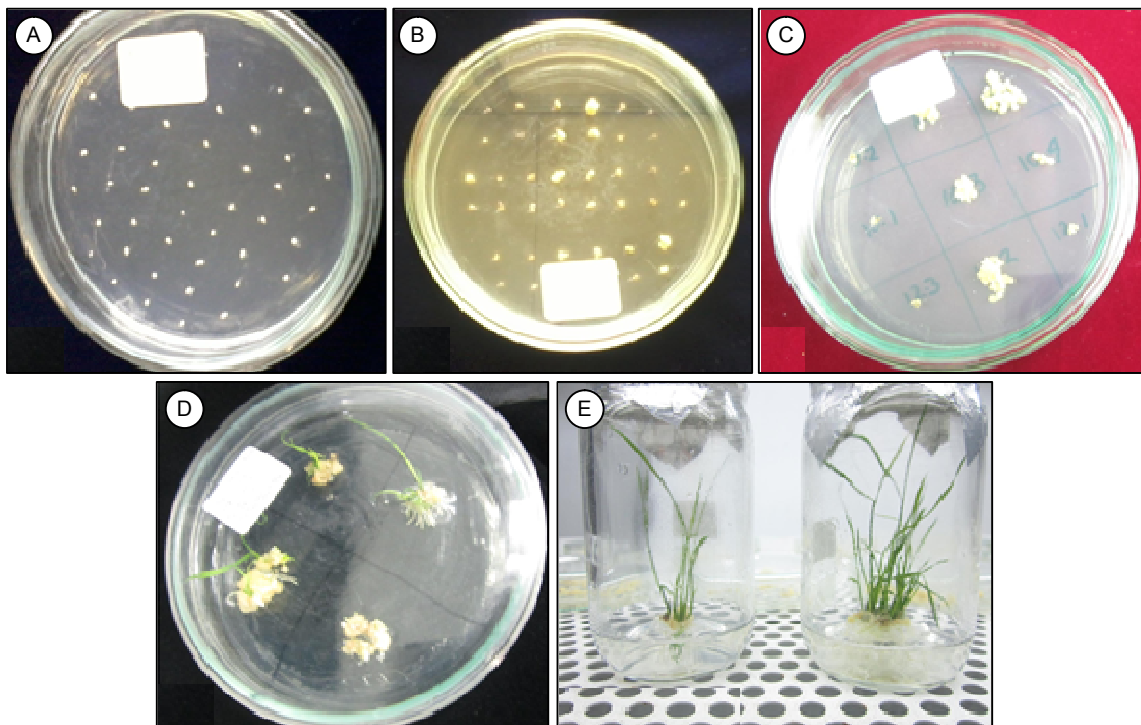
**Transformasi Konstruk pCAMBIA1300::*LcCsp* ke dalam Genom Padi Nipponbare**

Konstruk pCAMBIA1300::*LcCsp* diintroduksi ke dalam genom padi Nipponbare dengan bantuan *A. tumefaciens* strain LBA4404 melalui metode *immature embryo* yaitu dengan menggunakan

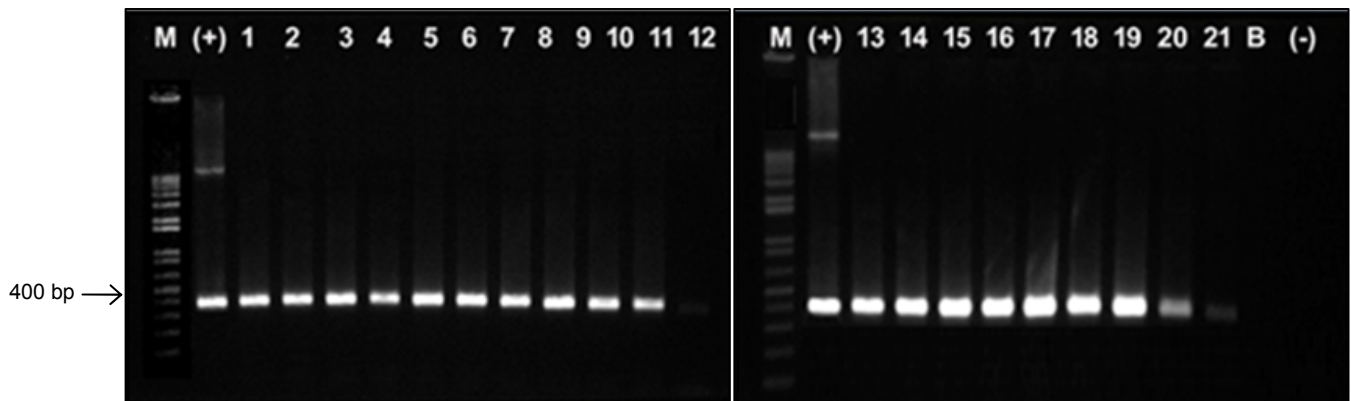
```

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment
pCAMBIA1300::LcCsp ATGGAGCACGGAACAGTCAAATGGTTCAATGCTGAGAAGGGATACGGCTTCATAACTAGG
LcCsp (Mod) ATGGAGCACGGAACAGTCAAATGGTTCAATGCTGAGAAGGGATACGGCTTCATAACTAGG
*****
pCAMBIA1300::LcCsp GAAGATGGCTCTGACGTCTTCGTCCACTTCTCCGCGATACAGGGGGATGGTTACAAGACC
LcCsp (Mod) GAAGATGGCTCTGACGTCTTCGTCCACTTCTCCGCGATACAGGGGGATGGTTACAAGACC
*****
pCAMBIA1300::LcCsp CTGGAGGAAGGCCAAGCCGTAACGTTGAGGTCGAGGACTCCGATCGTGGGCCTCAAGCG
LcCsp (Mod) CTGGAGGAAGGCCAAGCCGTAACGTTGAGGTCGAGGACTCCGATCGTGGGCCTCAAGCG
*****
pCAMBIA1300::LcCsp GTCAATGTCAACAAAGATTAG
LcCsp (Mod) GTCAATGTCAACAAAGATTAG
*****
  
```

**Gambar 3.** Hasil analisis penyejajaran dengan program CLUSTAL W dari sekuen gen *LcCsp* rujukan (*reference gene sequence*) hasil modifikasi dan hasil sekuensing gen *LcCsp* dari plasmid rekombinan pCAMBIA1300::*LcCsp*.



**Gambar 4.** Transformasi gen *LcCsp* ke dalam genom padi Nipponbare dengan bantuan *A. tumefaciens* strain LBA4404. (A) Embrio muda pada media inokulasi. (B) Kalus pada media seleksi yang mengandung antibiotik higromisin 30 mg/l. (C) Kalus pada media praregenerasi. (D) Kalus pada media regenerasi yang mulai menunjukkan pembentukan tunas. (E) Tunas padi transgenik putatif mulai membentuk akar pada media perakaran.



**Gambar 5.** Hasil analisis PCR tanaman padi transgenik Nipponbare-*LcCsp* dengan primer pengapit gen *LcCsp*. M = marka, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen), (+) = plasmid pCAMBIA1300::*LcCsp*, (-) = Nipponbare non transgenik, 1–21 = galur Nipponbare transgenik putatif hasil aklimatisasi. Galur nomor 12 dan 21 keduanya positif mengandung gen *LcCsp*, namun pita DNA yang dihasilkan tipis (*faint bands*).

eksplan embrio muda (Gambar 4). Dari total 432 embrio yang ditransformasi dengan gen *LcCsp*, sebanyak 192 embrio muda berhasil membentuk kalus (44,4%) pada media induksi kalus (*resting*). Kalus-kalus yang tumbuh selanjutnya dipindahkan ke media seleksi I, II, dan III yang mengandung higromisin untuk seleksi. Kalus dari sebanyak 120 embrio muda (27,8%), 120 embrio muda (27,8%), dan 115 embrio muda (26,8%) yang ditransformasi berturut-turut berhasil lolos pada media seleksi I, II, dan III dari total kalus yang diseleksi. Kalus dari sebanyak 78 embrio muda (18,1%), 67 embrio muda (15,5%), dan 64 embrio muda (14,4%) hasil transformasi berturut-turut menghasilkan spot hijau pada media regenerasi, menghasilkan tunas pada media regenerasi, dan berakar pada media perakaran. Kalus dari sebanyak 51 embrio muda (11,8%) yang ditransformasi menghasilkan tanaman transgenik putatif sampai pada tahap aklimatisasi. Dengan demikian, penelitian ini menghasilkan efisiensi transformasi sebesar 11,8%.

Dari jumlah kalus hasil transformasi yang dihasilkan, sebanyak 62,5% kalus bertahan tumbuh pada tiga media seleksi, kalus-kalus yang tidak tersisipi t-DNA yang mengandung gen ketahanan *hygromycin phosphotransferase II (hptII)* terhambat pertumbuhannya kemudian mati. Setelah melewati tiga periode pada media seleksi tersebut, kalus kemudian memasuki proses regenerasi. Sebanyak 67,8% kalus yang diregenerasi berhasil membentuk spot hijau dan hampir seluruhnya (95,5%) berhasil membentuk planlet pada media perakaran. Akan tetapi, hanya 75% planlet yang layak untuk dilanjutkan ke tahap aklimatisasi.

Berdasarkan jumlah planlet yang dihasilkan jika dibandingkan dengan jumlah embrio muda yang digunakan, proses transformasi gen *LcCsp* dengan

bantuan *A. tumefaciens* strain LBA4404 ini memiliki efisiensi regenerasi sebesar 11,8%. Nilai efisiensi ini sangat mirip dengan hasil penelitian transformasi yang dilaporkan oleh Enggarini et al. (2017) sebesar 11,9% dengan metode transformasi yang sama. Bahkan, penggunaan *A. tumefaciens* strain LBA4404 pada penelitian ini menghasilkan efisiensi transformasi lebih tinggi dibanding dengan penggunaan strain *Agrobacterium* lainnya seperti strain Agl-1 dan strain EHA 105 yang berturut-turut hanya mencapai 9,6% dan 2,6% (Apriana et al. 2011). Efisiensi transformasi sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya strain *Agrobacterium*, genotipe tanaman, jenis eksplan, vektor plasmid, komposisi media kultur, dan pengurangan tekanan infeksi *Agrobacterium* setelah kokultivasi (Opabode 2006).

#### Analisis Molekuler Tanaman Padi Nipponbare Transgenik Putatif Mengandung Gen *LcCsp*

Hasil analisis molekuler menunjukkan bahwa semua tanaman Nipponbare transgenik putatif yang diuji dengan PCR terkonfirmasi mengandung gen *LcCsp* (Gambar 5). Hal ini mengindikasikan hasil transformasi penelitian ini sangat efisien menghasilkan tanaman transgenik sampai pada tahap aklimatisasi. Hasil ini juga mengindikasikan bahwa seleksi dengan menggunakan higromisin dengan konsentrasi 30 mg/l pada media seleksi cukup efektif. Konsentrasi antibiotik pada media seleksi ini bervariasi dan bergantung pada jenis spesies dan varietas tanaman target. Untuk padi, varietas seperti Taipei-309 dan Asemendi memiliki ketahanan yang lebih tinggi terhadap higromisin sehingga konsentrasi yang digunakan mencapai 40 mg/l. Sementara, varietas Bio I dan Cisadane lebih rentan dengan konsentrasi higromisin optimal sebesar 35 mg/l (Somantri et al. 2001).

Penelitian ini telah berhasil melakukan transformasi gen *LcCsp* pada genom padi model Nipponbare menggunakan eksplan embrio muda dengan efisiensi transformasi sebesar 11,8%. Penelitian selanjutnya yaitu melakukan uji fenotipe toleransinya terhadap cekaman abiotik, seperti kekeringan dan salinitas. Galur transgenik yang terkonfirmasi toleransinya terhadap cekaman abiotik dapat disilangkan dengan varietas padi unggul nasional untuk mengintegrasikan karakter toleransi cekaman abiotik tersebut ke dalam genom varietas padi unggul nasional.

### KESIMPULAN

Gen *LcCsp* telah berhasil dimodifikasi dan dikonstruksi pada vektor biner pCAMBIA1300-*int*. Konstruksi gen ini dikendalikan oleh promotor konstitutif *Ubiquitin1* dan terminator NOS dengan kaset vektor biner yang membawa gen *hptII* untuk ketahanan terhadap antibiotik higromisin. Transformasi gen *LcCsp* pada plasmid rekombinan pCAMBIA1300::*LcCsp* ke dalam genom padi Nipponbare telah berhasil dilakukan dengan bantuan *A. tumefaciens* dengan efisiensi transformasi sebesar 11,8%. Sebanyak 21 galur padi Nipponbare transgenik telah dihasilkan dari tahap aklimatisasi. Berdasarkan analisis molekuler berbasis PCR, semua galur transgenik tersebut terkonfirmasi mengandung gen *LcCsp*. Galur-galur padi Nipponbare-*LcCsp* ini berpotensi toleran terhadap cekaman lingkungan. Pengujian galur transgenik hasil penelitian ini terhadap cekaman panas, kekeringan, dan salinitas perlu dilakukan.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Bapak Heri Hersusatyo, Ibu Nuryati, serta pihak-pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini. Penelitian ini didanai melalui DIPA BB Biogen, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian TA 2014–2015.

### KONTRIBUTOR PENULISAN

DSY dan AP: kontributor utama, melaksanakan eksperimen, analisis data, dan penulisan dan revisi naskah publikasi. AS dan AA: kontributor anggota, membantu teknis penelitian. FN: kontributor anggota, membantu dalam pembahasan data. KRT: kontributor anggota, penanggung jawab penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Apriana, A., Sisharmini, A., Enggarini, W. & Khumaida, N. (2011) Introduksi konstruk over-ekspresi kandidat gen *OsWRKY76* melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman padi Nipponbare. *Jurnal AgroBiogen*, 7 (1), 19–27.
- Arumuganathan, K. & Earle, E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*. [Online] 9 (3), 208–218. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF02672069> [Accessed 3 July 2017].
- Barahimipour, R., Strenkert, D., Neupert, J., Schroda, M., Merchant, S.S. & Bock, R. (2015) Dissecting the contributions of GC content and codon usage to gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*. [Online] 84 (4), 704–717. Available from: <https://doi.org/10.1111/tpj.13033> [Accessed 1 January 2018].
- Barnes, W.M. (1992) The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene*. [Online] 112 (1), 29–35. Available from: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90299-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90299-5) [Accessed 5 August 2017].
- Bihani, P., Char, B. & Bhargava, S. (2011) Transgenic expression of sorghum *DREB2* in rice improves tolerance and yield under water limitation. *Journal of Agricultural Science*. [Online] 149 (1), 95–101. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0021859610000742> [Accessed 3 June 2016].
- Broadbent, J.R., Neeno-Eckwall, E.C., Stahl, B., Tandee, K., Cai, H., Morovic, W., Horvath, P., Heidenreich, J., Perna, N.T., Barrangou, R. & Steele, J.L. (2012) Analysis of the *Lactobacillus casei* supragenome and its influence in species evolution and lifestyle adaptation. *BMC Genomics*. [Online] 13, 533. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-533> [Accessed 13 June 2014].
- Castiglioni, P., Warner, D., Bensen, R.J., Anstrom, D.C., Harrison, J., Stoecker, M., Abad, M., Kumar, G., Salvador, S., D'Ordine, R., Navarro, S., Back, S., Fernandes, M., Targolli, J., Dasgupta, S., Bonin, C., Luethy, M.H. & Heard, J.E. (2008) Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiology*. [Online] 147 (2), 446–455. Available from: <https://doi.org/10.1104/pp.108.118828> [Accessed 16 June 2016].
- Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hicks, J.B. (1983) A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. [Online] 1 (4), 19–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF02712670> [Accessed 20 June 2013].



- Enggarini, W., Polosoro, A., Sustiprijatno & Trijatmiko, K.R. (2017) Introduksi konstruk gen *CsNitr1-L* dengan promotor *Ubiquitin* melalui *Agrobacterium tumefaciens* dan deteksi molekulernya pada padi kultivar Nipponbare. *Jurnal Biologi Indonesia*. [Online] 13 (2), 261–270. Tersedia pada: <https://doi.org/10.14203/jbi.v13i2.3400> [Diakses 22 Desember 2017].
- Fuglsang, A. (2003) Codon optimizer: A freeware tool for codon optimization. *Protein Expression and Purification*. [Online] 31 (2), 247–249. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00213-4](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00213-4) [Accessed 24 August 2013].
- Fukunaga, N., Sahara, T. & Takada, Y. (1999) Bacterial adaptation to low temperature: Implications for cold-inducible genes. *Journal of Plant Research*. [Online] 112 (2), 263–272. Available from: <https://doi.org/10.1007/PL00013883> [Accessed 24 August 2013].
- Guo, X., Bao, J. & Fan, L. (2007) Evidence of selectively driven codon usage in rice: Implications for GC content evolution of Gramineae genes. *FEBS Letters*. [Online] 581 (5), 1015–1021. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.088> [Accessed 22 July 2013].
- Jackson, M.A., Sternes, P.R., Mudge, S.R., Graham, M.W. & Birch, R.G. (2014) Design rules for efficient transgene expression in plants. *Plant Biotechnology Journal*. [Online] 12 (7), 925–933. Available from: <https://doi.org/10.1111/pbi.12197> [Accessed 20 January 2016].
- Jeong, Y.S., Ku, H.K., Kim, J.K., You, M.K., Lim, S.H., Kim, J.K. & Ha, S.H. (2017) Effect of codon optimization on the enhancement of the  $\beta$ -carotene contents in rice endosperm. *Plant Biotechnology Reports*. [Online] 11 (3), 171–179. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11816-017-0440-0> [Accessed 23 March 2018].
- Kato, Y., Sakala, R.M., Hayashidani, H., Kiuchi, A., Kaneuchi, C. & Ogawa, M. (2000) *Lactobacillus algidus* sp., Nov., a psychrophilic lactic acid bacterium isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. [Online] 50 Pt. 3, 1143–1149. Available from: <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1143> [Accessed 21 June 2014].
- Levy, A., Conway, J.M., Dangl, J.L. & Woyke, T. (2018) Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome. *Cell Host & Microbe*. [Online] 24 (4), 475–485. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.09.005> [Accessed 23 May 2019].
- Matsumoto, T., Wu, J., Itoh, T., Numa, H., Antonio, B. & Sasaki, T. (2016) The Nipponbare genome and the next-generation of rice genomics research in Japan. *Rice*. [Online] 9 (1), 33. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12284-016-0107-4> [Accessed 18 May 2018].
- Opabode, J.T. (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: Emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. [Online] 1 (1), 12–20. Available from: <https://academicjournals.org/journal/BMBR/article-abstract/0F759E540214> [Accessed 12 June 2016].
- Peng, Z., Lu, T., Li, L., Liu, X., Gao, Z., Hu, T., Yang, X., Feng, Q., Guan, J., Weng, Q., Fan, D., Zhu, C., Lu, Y., Han, B. & Jiang, Z. (2010) Genome-wide characterization of the biggest grass, bamboo, based on 10,608 putative full-length cDNA sequences. *BMC Plant Biology*. [Online] 10, 116. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-116> [Accessed 10 July 2019].
- Peng, X.J., Ma, X.Y., Fan, W.H., Su, M., Cheng, L.Q., Alam, I., Lee, B.H., Qi, D.M., Shen, S.H. & Liu, G.S. (2011) Improved drought and salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* by transgenic expression of a novel *DREB* gene from *Leymus chinensis*. *Plant Cell Reports*. [Online] 30 (8), 1493–1502. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1058-2> [Accessed 23 June 2019].
- Sachs, R., Max, K.E.A., Heinemann, U.D.O. & Balbach, J. (2012) RNA single strands bind to a conserved surface of the major cold shock protein in crystals and solution. *RNA*. [Online] 18 (1), 65–76. Available from: <https://doi.org/10.1261/rna.02809212> [Accessed 21 February 2014].
- Sakata, K., Antonio, B.A., Mukai, Y., Nagasaki, H., Sakai, Y., Makino, K. & Sasaki, T. (2000) INE: A rice genome database with an integrated map view. *Nucleic Acids Research*. [Online] 28 (1), 97–101. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.97> [Accessed 23 June 2018].
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edition. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Slamet-Loedin, I.H., Chadha-Mohanty, P. & Torrizo, L. (2013) *Agrobacterium*-mediated transformation: Rice transformation. *Cereal Genomics Methods and Protocols*. [Online] 1099, 261–271. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-715-0\\_21](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-715-0_21) [Accessed 17 August 2019].
- Somantri, I.H., Ambarwati, A.D., Dewi, I.S., Apriana, A. & Santoso, T.J. (2001) *Transformasi padi dengan bombardmen mikroprojektil*. [Online] Tersedia pada: [http://biogen.litbang.pertanian.go.id/terbitan/pdf/prosiding2002\\_102-110\\_idahanarida.pdf](http://biogen.litbang.pertanian.go.id/terbitan/pdf/prosiding2002_102-110_idahanarida.pdf) [Diakses 11 Mei 2016].
- Tyagi, A.K. & Mohanty, A. (2000) Rice transformation for crop improvement and functional genomics. *Plant Science*. [Online] 158 (1), 1–18. Available from: [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00325-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00325-3) [Accessed 9 August 2016].
- Windiastris, V.E., Pantouw, C.F., Astuti, D., Widyajayantie, D., Estiati, A. & Nugroho, S. (2018) *Transformasi genetik faktor transkripsi OsMYB6 dan OsMYB7 pada kultivar padi Nipponbare untuk manipulasi kadar lignin*. [Online] Tersedia pada: <https://smujo.id/psnmbi/article/view/2909> [Diakses 22 Juni 2019].

- Yu, T.F., Xu, Z.S., Guo, J.K., Wang, Y.X., Abernathy, B., Fu, J.D., Chen, X., Zhou, Y.B., Chen, M., Ye, X.G. & Ma, Y.Z. (2017) Improved drought tolerance in wheat plants overexpressing a synthetic bacterial cold shock protein gene *SeCspA*. *Scientific Reports*. [Online] 7, 44050. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep44050> [Accessed 30 June 2019].
- Yuliawan, T. & Handoko, I. (2016) The effect of temperature rise to rice crop yield in Indonesia uses Shierary rice model with geographical information system (GIS) feature. *Procedia Environmental Sciences*. [Online] 33, 214–220. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2016.03.072> [Accessed 5 May 2018].
-