

**KLONING DAN TRANSFORMASI GEN HOMOGLUTATION SINTETASE YANG
DIISOLASI DARI BINTIL AKAR LEGUM LIAR PADA *Agrobacterium tumefaciens***

***CLONING AND TRANSFORMATION OF HOMOGLUTATION SYNTHETASE GENE
ISOLATED FROM WILD TYPE ROOT NODULE INTO Agrobacterium tumefaciens***

Bambang B. Santoso dan Sunarpi

Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian, Universitas Mataram

ABSTRAK

Homoglutation diketahui sebagai senyawa tripeptida yang terlibat dalam mekanisme pembentukan bintil akar dan fiksasi nitrogen tanaman legum pada kondisi air terbatas. Karena itu, induksi ekspresi gen yang terlibat dalam biosintesis homoglutation, berperan penting dalam upaya peningkatan produksi legum di lahan kering. Artikel ini melaporkan proses kloning gen homoglutation sintetase (hGSHS) dan transformasinya pada *Agrobacterium tumefaciens*. Gen hGSHS yang diisolasi dari bintil akar legum liar dan disubklon pada vector TOPO, dipotong dengan Eco-R1, disisipkan pada vector biner pSW600 setelah vector tersebut yang juga direstriksi dengan Eco-R1, dan ditransformasi pada *E. coli* strain XL1 Blue. Bakteri *E. coli* yang membawakan gen hGSHS ditransformasi ke *Agrobacterium tumefaciens* dengan prosedur "triparental mating". Hasil percobaan menunjukkan bahwa gen hGSHS berhasil diklon pada vector biner pSW600 dengan arah sesuai konstruksi yang ditetapkan. Selain itu, plasmid yang membawa gen hGSHS juga berhasil ditransformasi ke *Agrobacterium tumefaciens*, dan siap diinfeksi ke tanaman legum untuk menghasilkan tanaman transgenik yang diduga mampu tumbuh dan berproduksi pada kondisi air tanah terbatas.

ABSTRACT

Homoglutation is known as a tripeptide involved on root nodule formation and nitrogen fixation of legumes during water deficit condition. Therefore, the induction of gene expression involved on homoglutation biosynthesis, plays an important role on productivity improvement of legumes in dry land areas. This article reports the process of homoglutation synthetase gene cloning (hGSHS) and its transformation into *Agrobacterium tumefaciens*. hGSHS gene which was isolated from root nodule of wild type legumes and subcloned in TOPO cloning vector, was digested with Eco-R1, inserted in binary vector pSW600 having Eco-R1 site, and transformed into *E. coli* strain XL1-Blue. Then, the bacteria that having hGSHS gene was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* according to "triparental mating" procedure. The results show that hGSHS gene was successfully cloned on binary vector pSW600 and *Agrobacterium tumefaciens*. This clone is ready to be infected into legumes to produce the transgenic plants that may be able to grow and produce high grains under limited water condition.

Kata kunci: Kloning, gen homoglutation sintetase, bintil akar, vector biner dan *Agrobacterium tumefaciens*

Key words: Cloning, homoglutation synthetase gene, root nodule, binary vector and *Agrobacterium tumefaciens*

PENDAHULUAN

Budidaya tanaman pertanian di lahan kering dihadapkan pada berbagai persoalan fisiologis yang menghambat pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Proses fiksasi nitrogen (N) yang merupakan proses penting dalam kaitannya dengan produksi protein tanaman legum bersifat sangat peka terhadap kondisi air terbatas di medium tumbuh (Serraj dan Sinclair, 1996; Silva *et al.*, 1996; Matamoros *et al.*, 1999), meskipun ada sebagian kecil tumbuhan yang bersifat toleran (Vuong *et al.*, 1996). Hal ini disebabkan beberapa enzim katalitik seperti amylase, lipase, dan protease sangat aktif, sehingga terjadi degradasi berbagai makromolekul, seperti polisakarida, lemak, dan protein (Campbell, 1992; Salisbury dan Ross, 1992).

Aktifnya enzim katalitik sistem perakaran tersebut, di satu sisi dapat meningkatkan negatifitas sitosol sel-sel akar (Agboma *et al.*, 1997), sehingga dapat mencegah terjadinya plasmolisis sel-sel akar, bahkan beberapa spesies tanaman yang toleran, kondisi tersebut membantu serapan unsur hara. Namun demikian, kondisi tersebut menyebabkan rusaknya dinding sel akar (Campbell, 1992; Salisbury dan Ross, 1992), sehingga sistem perakaran menjadi sangat poros terhadap oksigen.

Oksigen diketahui sangat penting untuk proses respirasi, baik respirasi sistem perakaran, maupun respirasi bakteri *Rhizobium*. Namun demikian, dalam beberapa literatur dipahami bahwa oksigen berlebih menghambat kerja enzim nitrogenase (Serraj dan Sinclair, 1997), suatu enzim yang berfungsi mengkatalisa penambatan gas nitrogen menjadi ammonia. Hal ini berarti, pembentukan bintil akar juga terhambat, yang mengakibatkan fiksasi N terganggu, sehingga pertumbuhan, perkembangan dan produksi tanaman terganggu. Fenomena ini menjadi perhatian beberapa peneliti dalam beberapa tahun terakhir (lihat review Udvardi, 2001).

Homoglutation yang merupakan tripeptida berberat molekul rendah, sekitar 50 kD, diketahui sebagai senyawa antioksidan yang sangat efektif dalam mengendalikan pengaruh negatif oksigen aktif (Klapeck, 1988; Bergmann dan Rennenberg, 1993; May *et al.*, 1998ab; Xiang dan Oliver, 1998; Riccillo *et al.*, 2000). Peneliti lain melaporkan senyawa tersebut terakumulasi pada bintil akar legum yang toleran defisit air (Moran *et al.*, 2000).

Kajian keterlibatan homoglutation dalam pembentukan bintil akar tanaman kedelai telah juga dilaporkan peneliti sebelumnya (Sunarpi, 2003a), bahwa pada kondisi defisit air, kadar

homoglutation sangat rendah, yang secara konsisten dibarengi dengan rendahnya jumlah bintil akar. Sebaliknya, pada kondisi tersebut, kadar γ -glutamil sistein terakumulasi cukup tinggi. Mengingat pada penelitian tersebut aktivitas enzim homoglutation sintetase tidak terdeteksi, maka disimpulkan bahwa rendahnya kadar homoglutation disebabkan oleh tidak aktifnya enzim homoglutation sintetase yang berperan dalam konversi γ -glutamil sistein menjadi homoglutation pada bintil akar. Dengan demikian, maka pembentukan bintil akar tanaman legum dapat diinduksi pada kondisi defisit air dengan cara mengaktifkan enzim homoglutation sintetase.

Penggunaan bioteknologi melalui transformasi genetik merupakan pendekatan yang paling mungkin dilakukan untuk mengaktifkan enzim homoglutation sintetase di bintil akar pada kondisi defisit air. Hal ini dapat dilakukan dengan mengisolasi gen yang mengkode enzim homoglutation sintetase dari jenis legum yang tahan tumbuh dan mampu memproduksi bintil akar pada kondisi defisit air. Gen tersebut, selanjutnya diklon, dan ditransformasi ke tanaman legum target dengan mediasi *Agrobacterium tumefaciens*. Dengan cara tersebut akan dapat dihasilkan tanaman legum transgenik yang mampu tumbuh dan mampu memproduksi bintil akar pada kondisi defisit air.

Kajian molekular gen homoglutation sintetase telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya (Moran *et al.*, 2000), sehingga urutan basa nitrogen lengkap (*full sequent DNA*) gen homoglutation sintetase (hGSHS) dan urutan asam amino protein produk gen telah didokumentasikan dengan baik. Berdasarkan primer yang didesain dari potongan sequent DNA gen homoglutation sintetase (18 bp dari posisi "start codon"/*forward primer*, atau "stop codon"/*reverse primer*), gen tersebut telah berhasil diamplifikasi dengan teknik PCR (Budianto dan Sunarpi, 2003), dari legum liar tahan kering (*Clotalaria striata*) yang diketahui memiliki aktivitas enzim homoglutation sintetase cukup tinggi pada bintil akarnya (Sunarpi, 2003b). Fragmen DNA produk PCR sepanjang 654 bp yang merupakan gen homoglutation sintetase, telah pula berhasil disubklon oleh kelompok peneliti tersebut pada vector TOPO (TOPO *cloning vector*). Namun demikian, gen tersebut harus diklon pada vector biner (*binary vector*) dan ditransformasi ke *Agrobacterium tumefaciens* untuk dapat diinfeksi ke tanaman target, mengingat spesies bakteri tersebut memiliki gen virulen yang mampu mengintegrasikan gen asing

dengan DNA genom tanaman target (Buchanan *et al.*, 2001).

Artikel ini melaporkan proses kloning gen homoglutation sintetase pada vector biner pSW 600, dan transformasi plasmid yang membawakan gen tersebut pada *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404. Berdasarkan analisis menggunakan enzim restriksi dan sequen DNA, gen homoglutation sintetase telah berhasil diklon dan ditransformasi pada spesies bakteri tersebut. Klon tersebut selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk menghasilkan tanaman legum transgenik yang mampu memproduksi bintil akar, tumbuh dan berproduksi pada kondisi air tanah terbatas.

METODE PENELITIAN

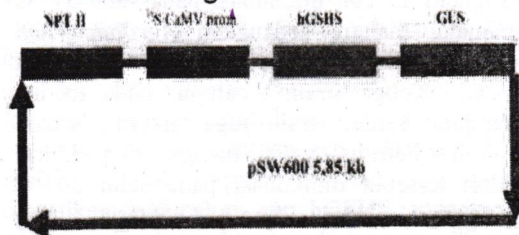
Klon Gen Target pada Vector Biner pSW600

Proses pengklonan gen hGSHS pada vector biner pSW600 yang diturunkan dari vector biner PBI121, diawali dengan memotong gen SFA8 dari pSW600 menggunakan enzim restriksi Eco-R1, karena vector tersebut memiliki sisi (site) enzim Eco-R1. Dengan cara demikian, SFA8 terlepas dari vector pSW600, dan selanjutnya plasmid tersebut memiliki sisi untuk menerima gen hGSHS (Gambar 1). Gen target yang telah disubklon pada "TOPO Cloning Vector" juga dipotong dengan enzim yang sama (Eco-R1). Fragmen hGSHS yang terlepas dari vector TOPO memiliki sisi Eco-R1 sehingga dapat disisipkan pada pSW600 (Gambar 1).

Kedua fragmen selanjutnya diligasi sesuai konstruksi pada Gambar 1, dengan volume campuran reaksi 12 ul, yang terdiri atas vector DNA (fragmen pSW600) 3 ul, fragmen hGSHS 3 ul, dan enzim ligase (*ligation high*) 6 ul. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 16 °C selama 2 jam, ditransformasi pada *E. Coli* strain XL1-Blue dengan prosedur diinkubasi pada es 30 menit, pada suhu 42°C 1 menit, pada es 1 menit. Setelah itu, transforman dipre-kultur pada media LB tanpa antibiotik pada suhu 37 °C selama 1 jam, dan dikulturkan pada media LBA yang mengandung 15 ug/ml kanamisin.

Campuran reaksi pemotongan vector baik pSW600 maupun vector TOPO, dilakukan dengan total volume 30 ul, terdiri atas Vector DNA (pSW600 atau TOPO) 2 ul, Buffer M 3 ul, Enzim Eco-R1 0,5, dan air 24,5 ul. Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37 °C selama dua jam, yang selanjutnya dipisahkan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%. Fragmen hGSHS dan vector pSW 600, yang masing-masing berukuran 654 bp dan 5,21 kb,

dipisahkan dan dimurnikan dari gel dengan "GFX purification kit" yang disuplai oleh Perusahaan Invitrogen.



Gambar 1. Diagram konstruksi plasmid pSW600 yang membawakan gen homoglutation sintetase. Gen hGSHS disisipkan di antara promotor ³⁵SCaMV dan gen GUS yang merupakan gen penanda (marker).

Kultur diinkubasi pada suhu 37 °C selama 12 jam. Untuk mengecek keberadaan vector pSW600 dan fragmen hGSHS pada koloni yang tumbuh di media selektif yang mengandung 15% kanamisin, maka dilakukan koloni PCR menggunakan primer *forward* 0,25 ul dan *reverse* 0,25 ul yang didesain dari sequen hGSHS. Program PCR terdiri atas 94 °C 2 menit, 94 °C 40 detik, 55 °C 0,5 menit, 72 °C 1 menit, 72 °C 1 menit, dan 4 °C tak terhingga. Produk PCR selanjutnya dipisahkan dan divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%.

Koloni yang positif membawakan vector pSW600 dan fragmen hGSHS berdasarkan hasil koloni PCR, dikulturkan pada media LB cair yang mengandung 15 ug/ml kanamisin pada suhu 37 °C sepanjang malam. Plasmid pSW600 yang membawakan fragmen hGSHS diisolasi dengan prosedur "Wizard Miniprep" yang disuplai Promega. Untuk mengecek kebenaran konstruksi DNA rekombinan yang telah dikonstruksi, plasmid dipotong dengan enzim restriksi Eco-R1. Hasil potongan dipisahkan dan divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%. Selain itu, dilakukan sequen plasmid menggunakan DNA sequencer sesuai dengan prosedur baku (Sambrook dan Russell, 2001).

Transformasi Plasmid pSW600 yang Membawakan Gen hGSHS ke *Agrobacterium tumefaciens*

Transformasi plasmid pSW600 dari *E. coli* ke *Agrobacterium tumefaciens* dilakukan secara "triparental mating". Dikulturkan 3 strain bakteri, masing-masing *E. coli* strain XL1-Blue yang membawakan pSW600 pada LBA+ 15 ug/ml kanamisin; *E. coli* strain MM294 (hepler

plasmid) pada LBA yang mengandung 15 ug/ml tetracyclin; dan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 yang mengandung 15 ug/ml rifampicin. *E. coli* diinkubasi pada suhu 37 °C sepanjang malam, sedangkan *Agrobacterium tumefaciens* diinkubasi selama 2 hari pada suhu 30 °C. Ketiga strain dicampur pada media, disamping setiap strain juga dikultur secara terpisah. Petridis yang mengandung kultur bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 30 °C sepanjang malam. Strain bakteri yang dicampur dioleskan (*streak*) pada media LBA yang mengandung 15 ug/ml masing-masing kanamisin dan rifampisin. Kanamisin digunakan untuk menseleksi *Agrobacterium tumefaciens* yang tidak membawakan pSW600, sedangkan rifampisin menseleksi *E. coli*. Petridis selanjutnya diinkubasi selama tiga hari pada suhu 30 °C. Untuk memurnikan strain dioleskan *Agrobacterium tumefaciens* pada LBA+15 ug/ml kanamisin+15 ug/ml rifampisin dan inkubasi secara berulang (dua kali) dengan prosedur yang sama seperti di atas. Setelah didapatkan strain *Agrobacterium tumefaciens* yang murni, disimpan pada LBA yang mengandung 15% gliserol pada suhu -80 °C. Strain *Agrobacterium tumefaciens* ini mengandung plasmid yang membawakan gen hGSHS, dan siap untuk diinfeksi pada tanaman legum untuk menghasilkan tanaman legum transgenik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Klon Gen hGSHS pada Vector pSW600

Gen hGSHS diklon pada vector biner pSW600 yang diturunkan dari vector pBI121 dengan konstruksi seperti ditunjukkan pada Gambar 1. Gen hGSHS disisipkan di antara promotor ³⁵S CaMV dan gen GUS, yang berfungsi sebagai gen penanda. Sebelum promotor, ditempatkan gen NPT-II yaitu gen resisten terhadap antibiotik kanamisin. Karena itu, untuk menseleksi *E. coli* strain XL1 Blue yang membawakan plasmid pSW600 dilakukan dengan mengkulturkan bakteri tersebut pada media LBA yang mengandung 15 ug/ml kanamisin.

M, marker χ -HindIII; 1 vector pMAT (kontrol positif) dipotong dengan Eco-R1; 2-3, vector TOPO dipotong dengan Eco-R1.

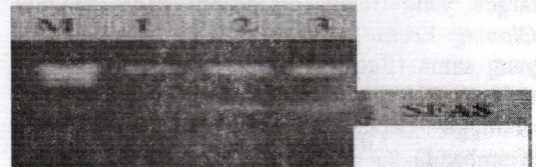
Hasil percobaan menunjukkan bahwa reaksi pemotongan vector TOPO dengan enzim restriksi berlangsung dengan sempurna (Gambar 2). Hal ini dibuktikan dengan vektor pMAT (kontrol positif) yang memiliki tiga sisi Eco-R1, menghasilkan tiga band setelah dipotong dengan enzim Eco-R1. Vector TOPO yang memiliki

dua sisi Eco-R1 juga dicerna dengan sempurna, dan dihasilkan dua band (kolom 2 dan 3 pada Gambar 2), mengingat vector ini memiliki dua sisi Eco-R1. Dengan cara demikian gen hGSHS dapat dipisahkan dari vector TOPO, dan disisipkan pada vector pSW600. Pelepasan gen dari suatu vector menggunakan enzim restriksi merupakan pendekatan yang rutin dilakukan oleh peneliti di bidang Biologi Molekul (Sambrook dan Russell, 2001).



Gambar 2. Hasil elektroforesis pemotongan vector TOPO yang membawa gen hGSHS pada gel agarosa 1% menggunakan enzim restriksi Eco-R1.

Gen hGSHS yang diisolasi dari legum liar dan dilepaskan dari vector TOPO memiliki panjang sekitar 654 bp berdasarkan berat marker χ -HindIII yang digunakan pada Gambar 2. Gen tersebut nampaknya memiliki panjang yang sama dengan gen serupa yang diisolasi oleh peneliti sebelumnya dari tanaman kedelai (Moran *et al.*, 2000) dan tanaman *Medicago truncatula* (Frendo *et al.*, 2001).



Gambar 3. Hasil elektroforesis pemotongan vector pSW600 yang membawa gen hGSHS pada gel agarosa 1% menggunakan enzim restriksi Eco-R1. M, marker χ -HindIII; 1 vector pMAT dipotong dengan Bam H1 (kontrol positif); 2-3, vector TOPO dipotong dengan Eco-R1.

Mengingat gen hGSHS kedua sisinya merupakan sisi Eco-R1, maka vector pSW600 yang akan digunakan sebagai pembawa gen tersebut juga harus memiliki sisi Eco-R1. Karena itu, vector pSW600 dipotong dengan enzim restriksi Eco-R1 (Gambar 3). Hasil percobaan menunjukkan bahwa proses pemotongan (restriksi) vector pSW600 berlangsung seperti yang diharapkan. Vector pMAT yang juga digunakan sebagai kontrol positif pada percobaan ini, memiliki dua sisi BamH1, sehingga pada percobaan ini memberikan dua

band, dengan ukuran yang lebih besar dari gen albumin (SFA8) pada kolom 2-3, yang panjangnya sekitar 524 bp sesuai dengan berat marker χ -HindIII. Berat tersebut sesuai dengan berat gen albumin yang dilaporkan oleh peneliti sebelumnya (Tabe *et al.*, 1990), sehingga dapat dipastikan fragmen yang dilepaskan menggunakan enzim restriksi Eco-R1 merupakan gen albumin yang sebelumnya diklon pada pSW600. Mengingat vector pSW600 juga memiliki dua sisi enzim Eco-R1 pada daerah "multicloning site" nya, maka pemotongan vector tersebut dengan enzim Eco-R1 juga memberikan dua band (Gambar 3), yaitu vector pSW600 yang memiliki dua sisi Eco-R1 terbuka, dan gen albumin (SFA8).

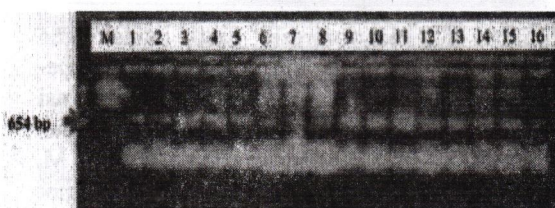
Kedua fragmen, masing-masing pSW600 yang telah memiliki sisi Eco-R1 dan hGSHS yang juga memiliki sisi Eco-R1 diligasi dan ditransformasi ke *E. coli* strain XL1-Blue. Koloni diseleksi menggunakan antibiotik 15 ug/ml kanamisin. Setelah inkubasi, ditemukan koloni yang mampu tumbuh pada media seleksi yang mengandung 15 ug/ml kanamisin. Hal ini memberikan indikasi bahwa pada koloni yang mampu tumbuh tersebut terdapat plasmid pSW600 yang kemungkinan mengandung fragmen hGSHS. Pendekatan pengklonan dan seleksi menggunakan antibiotik ini sudah sangat umum dilakukan oleh peneliti di bidang Biologi Molekul (Ainsworth *et al.*, 1995; Sambrook dan Russel, 2001; Moran *et al.*, 2002).

Namun demikian, keberhasilan koloni tumbuh pada media selektif tidak sepenuhnya pSW600, tetapi juga membawa gen hGSHS, mengingat pSW600 dapat meligasi dirinya sendiri untuk membentuk suatu dimer, seperti disinyalir peneliti lain akhir-akhir ini (Sambrook dan Russell, 2001). Bila hal ini terjadi maka ada kemungkinan plasmid pSW600 tidak membawa gen hGSHS, meskipun bakteri mampu tumbuh pada media selektif. Karena itu, untuk membuktikan kebenaran keberadaan fragmen hGSHS pada koloni yang mampu tumbuh pada media selektif, dilakukan analisis PCR pada koloni dengan menggunakan primer spesifik yang didesain dari sequen gen hGSHS (18 bp), sehingga primer tersebut hanya mengamplifikasi gen hGSHS, seperti proses amplifikasi gen serupa dari genom tanaman kedelai (Moran *et al.*, 2000), *Medicago truncatula* (Frendo *et al.*, 2001) dan bintil akar kedelai (Moran *et al.*, 2002). Berdasarkan hasil penelitian yang cukup meyakinkan dari peneliti di bidang Biologi Molekul akhir-akhir ini, maka pendekatan analisis PCR koloni bakteri, dengan menggunakan DNA koloni sebagai templet merupakan pendekatan yang rutin dilaksanakan

untuk membuktikan keberadaan suatu gen asing yang telah diklon.

Hasil koloni PCR menunjukkan bahwa kolon nomor 1, 2, 4, 5, 13 dan 14 memberikan indikasi positif membawakan vector pSW600 dan fragmen hGSHS (Gambar 4), mengingat fragmen tersebut memiliki panjang sekitar 654 bp, sesuai dengan panjang gen hGSHS. Selain indikator berat, fragmen tersebut juga dapat dipastikan merupakan gen hGSHS, mengingat primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen tersebut bersifat sangat spesifik, didesain dari sequen gen hGSHS, sehingga hanya mengamplifikasi gen target. Hal ini juga konsisten dengan band gen serupa yang dilaporkan peneliti sebelumnya (Moran *et al.*, 2000, 2002; Frendo *et al.*, 2001).

Untuk mendukung kebenaran koloni-koloni tersebut membawakan pSW600 dan fragmen hGSHS (Gambar 4), perlu dilakukan analisis menggunakan enzim restriksi (Sambrook dan Russel, 2001). Pendekatan ini dipandang cukup baku untuk membuktikan kebenaran plasmid dan keberadaan gen tertentu pada suatu plasmid, seperti yang dilakukan peneliti sebelumnya untuk mengklon gen serupa (Moran *et al.*, 2000 dan Frendo *et al.*, 2001).

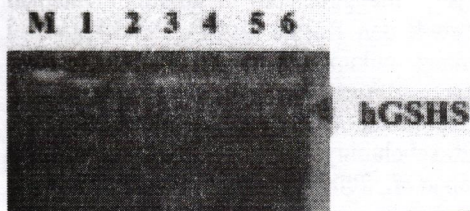


Gambar 4. Hasil PCR beberapa koloni (1-16) yang mampu tumbuh pada media selektif mengandung 15 ug/ml kanamisin. M, marker χ -HindIII, 1-16, nomor koloni.

Dengan mengacu pada prosedur kloning peneliti sebelumnya, maka koloni yang membawakan plasmid pSW600 dan gen hGSHS diinokulasi ke media LB cair yang mengandung 15 ug/ml kanamisin, dan diinkubasi pada suhu 37 °C. Setelah diinkubasi sepanjang malam, plasmid DNA diisolasi dari koloni tersebut, dan dipotong dengan enzim Eco-R1. Hal ini dilakukan mengingat pada kedua sisi gen hGSHS terdapat sisi Eco-R1 (Gambar 1), dengan kata lain pada daerah "multicloning site" plasmid pSW600 terdapat dua sisi Eco-R1 (Sambrook dan Russell, 2001). Karena itu, pemotongan pSW600 yang membawakan gen hGSHS dengan enzim Eco-R1 akan memberikan dua fragmen, potongan pSW600 dan gen hGSHS. Dengan demikian, dengan pendekatan

ini dapat dipastikan bahwa plasmid DNA yang menghasilkan dua band bila dipotong dengan Eco-R1, merupakan plasmid pSW600 yang membawakan gen hGSHS. Pendekatan serupa juga dilakukan untuk membuktikan keberadaan gen "ferric leghemoglobin reductase (FLbR) pada pBI121 asal diturunkannya plasmid pSW600 oleh peneliti sebelumnya (Moran *et al.*, 2002).

Hasil pemotongan plasmid yang diisolasi dari beberapa koloni-koloni tersebut (Gambar 5) menunjukkan bahwa hanya klon nomor 5 dan 6 memberikan dua band, sedangkan klon 1, 2, 3 dan 4 hanya memberikan 1 band. Dengan demikian, berdasarkan peta plasmid pBI121 (Sambrook dan Russell, 2001) yang merupakan asal diturunkannya plasmid pBI600, dan diagram konstruksi (Gambar 1), maka dapat dipastikan bahwa klon nomor 5 dan 6 mengandung plasmid pSW600 dan gen hGSHS.



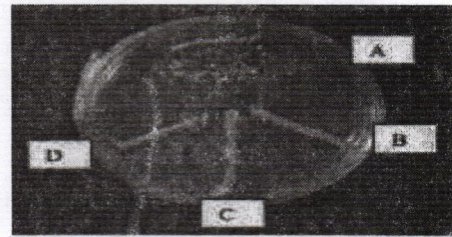
Gambar 5. Elektroforesis hasil pemotongan plasmid yang diisolasi dari beberapa koloni yang berindikasi positif membawakan pSW600 dan hGSHS dengan enzim Eco-R1. M, marker χ -HindIII, 1-16, nomor koloni.

Tahap terakhir untuk membuktikan kebenaran keberadaan pSW600 dan fragmen hGSHS pada plasmid, dilakukan sekuens plasmid menggunakan primer yang didesain dari sekuens hGSHS. Berdasarkan hasil sekuens (terlampir), maka dapat dipastikan bahwa klon nomor 5 dan 6 membawakan vektor pSW600 dan gen hGSHS yang sehat (tidak mengalami mutasi). Dengan demikian, klon nomor 5 dan 6 selanjutnya dilakukan transformasi ke *Agrobacterium tumefaciens*.

Transformasi Plasmid pSW600 dari *E. coli* ke *Agrobacterium tumefaciens*

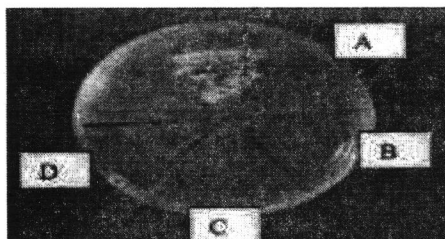
Transformasi plasmid pSW600 yang membawakan gen hGSHS dari *E. coli* ke *Agrobacterium tumefaciens* dilakukan dengan konjugasi secara triparental mating (Ainsworth *et al.*, 1995; Sambrook dan Russell, 2001). Dalam hal ini digunakan tiga induk strain, masing-masing *E. coli* strain XL1-Blue yang

membawakan pSW600, *E. coli* strain MM294 yang membawakan helper plasmid, dan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 yang berfungsi sebagai resipien. Saat ditumbuhkan pada media LBA tanpa antibiotik, ketiga strain bakteri mampu tumbuh, baik yang dikulturkan secara terpisah setiap strain maupun yang dikulturkan secara dicampur (Gambar 6).



Gambar 6. Kultur A, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 yang mengandung pSW600, *E. coli* MM294 dan *E. coli* JM 109; B, *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 tanpa pSW600; C, *E. coli* MM294; dan D, *E. coli* JM109 pada media LBA tanpa antibiotik.

Namun demikian, tidak semua strain bakteri mampu tumbuh pada media LBA yang mengandung 15 ug/ml kanamisin dan 15 ug/ml rifampisin (Gambar 7). Data tersebut memberikan indikasi bahwa hanya *Agrobacterium tumefaciens* yang membawakan vektor pSW600 dan gen hGSHS yang mampu tumbuh pada media selektif tersebut. Hal ini disebabkan karena antibiotik rifampisin menyeleksi kedua strain *E. coli* (MM294 dan JM109), mengingat kedua strain bakteri tidak mengandung plasmid yang membawakan gen resisten terhadap rifampisin (Tabe *et al.*, 1990; Sambrook dan Russell, 2001), sedangkan kanamisin menyeleksi *Agrobacterium tumefaciens* yang tidak membawakan pSW600 yang mengandung gen tahan terhadap antibiotik kanamisin (Effendi *et al.*, 2000). Dengan demikian, maka dapat dipastikan bahwa hanya *Agrobacterium tumefaciens* yang membawakan plasmid pSW600 yang mampu tumbuh pada media LBA yang mengandung 15ug/ml kanamisin dan 15 ug/ml rifampisin. Proses transformasi suatu plasmid dari *E. coli* ke *Agrobacterium tumefaciens* secara "triparental mating", dilaporkan juga berhasil dalam proses transformasi gen S-formylglutathione hydrolase (Haslam *et al.*, 2002); gen PEP-carboxylase kinase (Xu *et al.*, 2003), gen Sultr1-3 (Yoshimoto *et al.*, 2003) dan berbagai jenis gen lainnya (Ainsworth *et al.*, 1995; Sambrook dan Russell, 2001).



Gambar 7. Kultur A, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 yang membawa pSW600; B, *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 tanpa pSW600; C, *E. coli* MM294; dan D, *E. coli* JM109 pada media LBA yang mengandung 15 ug/ml kanamisin dan 15 ug/ml rifampisin.

Strain *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa pSW600 dimurnikan dengan cara mengkulturkan *Agrobacterium tumefaciens* dalam tiga tahap pada media LBA segar yang mengandung 15 ug/ml kanamisin dan 15 ug/ml rifampisin. Untuk mempertahankan kestabilannya, *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa pSW600 ditumbuhkan pada media LB yang mengandung 15% gliserol dan disimpan pada -80 °C. Pada tahap ini, *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa gen hGSHS sudah siap diinfeksi ke tanaman legum, untuk menghasilkan tanaman transgenik yang mampu tumbuh dan berproduksi di lahan kering.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Gen hGSHS yang mengkode enzim homoglutation sintetase berhasil diklon pada vector biner pSW600, dan ditransformasi ke *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404. Plasmid pSW600 yang membawa gen hGSHS dipelihara pada *Agrobacterium tumefaciens* yang dikulturkan pada media LB yang mengandung 15% gliserol dan disimpan pada 80 °C. *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa gen hGSHS tersebut siap ditransformasi ke tanaman legum untuk menghasilkan tanaman transgenik yang mampu tumbuh dan berproduksi pada kondisi air terbatas.

Saran

Mengingat target akhir kegiatan penelitian ini adalah untuk menghasilkan tanaman legum transgenik yang mampu memproduksi bintil akar memadai pada lahan kering sehingga tanaman tersebut dapat berproduksi pada

kondisi air tanah terbatas, maka tahap berikutnya adalah transformasi gen hGSHS ke tanaman legum melalui media *Agrobacterium tumefaciens*. Perlu dilakukan studi lebih lanjut tentang regulasi ekspresi gen tersebut pada berbagai jenis tanaman legum.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainsworth, C., Beynon, J. dan Buchanan-Wollaston, V., 1995. *Techniques in Plant Molecular Biology*. Wye College. University of London. 138.
- Agboma, P.C., Sinclair, T.R., Jokinen, K., Peltonen-Sainio, P. dan Pehu, E., 1997. an evaluation of the effect of exogenous glycine-betaine on the growth and yield of soybean: timing of application, watering regimes and cultivars. *Field Crop Sci.* 54:51-64.
- Bergmann, L. and Rennenberg, H., 1993. Glutathion metabolism in plants. -In: *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants* (, L.J. De Kok, I. Stulen, H. Rennenberg, C.H. Brunold & W.E. Rauser, eds), pp 109-124. SPB academic Publishing, The Hague, The Netherlands. ISBN 90-5103-084-X.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. And Jones, R.L., 2001. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland.
- Budianto, A. dan Sunarpi, 2003. Isolasi dan deteksi gen homoglutation sintetase bintil akar legum liar dengan teknik PCR. *Agroteksos*.
- Campbell, N.A., 1992. *Biology*. Third Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California.
- Efendi, Kisaka, H., Kanno, A. dan Kameya, T., 1999. Transformation of soybean by infecting embryonic calli with *Agrobacterium tumefaciens* and that of soybean and kidney bean by injecting the bacteria into germinating seeds. *Plant Biotech.* 17:187-194.
- Frendo, P., Jimenez, M.J.H., Mathieu, C., Duret, L., Galesi, D., Sype, G.V., Herouart, D. dan Puppo, A., 2001. A *Medicago truncatula* homoglutation synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. *Plant Physiol.* 126:1706-1715.

- Haslam, R., Rust, S., Pallett, K., Cole, D. dan Coleman, J., 2002. Cloning and characterization of S-formylglutathione hydrolase from *Arabidopsis thaliana*: a pathway for formaldehyde detoxification. *Plant Physiol. Biochem.* 40:281-288.
- Klaepck, S., Zopes, H., Levels, H.G. dan Bergmann, L., 1988. Properties and localization of the homogluthation synthetase from *Phaseolus coccineus* leaves. *Physiol. Plant.* 74:733-739.
- Matamoros, M.A., Bird, L.M., Escuredo, P.R., Dalton, D.A., Minchin, F.R., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M.C., Moran, J.F., Gordon, A.J. dan Becana, M., 1999. Stressed-induced legume root nodule senescence: physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol.* 121:97-111.
- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, V. dan Inze, D., 1998a. Glutathion homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.* 49:649-667.
- May, M.J., Verneoux, T., Sanchez-Fernandez, R., Montagu, V. dan Inze, D., 1998b. Evidence for posttranscriptional activation of γ -glutamylcysteine synthetase during plant stress responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:12049-12054.
- Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M.A., Rubio, M.C., Clemente, M.R., Brewin, N.J. dan Becana, M., 2000. Glutathion and homogluthation synthetases of legum nodules. Cloning, ekspresi and subsellular localization. *Plant Physiol.* 124: 1381-1392.
- Moran, J.F., Sun Z., Sarath, G., Peter, R.A., James, E.K., Becana, M. dan Klucas, R.V., 2002. Molecular cloning, functional characterization and subcellular localization of soybean nodule dihydro-lipoamide reductase. *Plant Physiol.* 128:300-313.
- Riccillo, P.M., Muglia, C.I., de Bruijn, F.J., Roe, A.J., Booth, I.R. dan Aguilar, O.M., 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. bacteriol.* 182: 1748-1753.
- Salisbury, F.B., and C.W. Ross. 1992. *Plant Physiology*. Fourth Edition. Wardsworth Publishing Company. Belmont. California. 540p.
- Sambrook, J. dan Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Volume 1. Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York. 1453p
- Sneller, C.H. dan Dombek, D., 1997. Use of irrigation in selection for soybean yield potential under drought. *Crop Sci.* 37:1141-1147.
- Serraj, R. dan Sinclair, T., 1996. Processes contributing to N₂-fixation insensitivity to drought in the soybean cultivar jackson. *Crop Sci.* 36:961-968.
- Serraj, R. dan Sinclair, T., 1997. Variation among soybean in dinitrogen fixation response to drought. *Agron. J.* 89:963-969.
- Silva, M.D., Purcell, L.C. dan King, C.A., 1996. Soybean petiole ureide response to water deficits and decreased transpiration. *Crop Sci.* 36: 611-616.
- Sunarpi, 2003a. Akumulasi beberapa metabolit pada sistem perakaran tanaman kedelai yang diberikan nitrogen dan sulfur pada kondisi defisit air. *Jurnal Biologi Tropika Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, UNRAM* (Submitted).
- Sunarpi, 2003b. Kadar homogluthation dan aktivitas enzim homogluthation sintetase pada bintil akar beberapa jenis legume liar. *Oryza, Universitas Mataram* (Submitted).
- Tabbe, L.M., Huggins, C.M., McNabb, W.C. dan Higgins, T.J.V., 1990. Genetic engineering of grain and pasture legumes for improved nutritive value. *Genetica* 90:181-200.
- Udvardi, M.K., 2001. Legume models strut their stuff. *Mol. Plant Micr. Inter.* 14:6-9.
- Vuong, T.D., Nickell, C.D. dan Harper, J.E., 1996. Genetic and allelism of hypernodulation soybean mutants from two genetic backgrounds. *Crop Sci.* 36:1153-1158.
- Xiang, C. dan Oliver, D.J., 1998. Glutathione metabolic genes coordinately respond to heavy metals and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1539-1550.
- Xu, W., Zhou, Y. dan Chollet, R., 2003. Identification and expression of a soybean nodule-enhanced PEP-carboxylase kinase gene (NE-Ppck) that shows striking up-/down-regulation *in vivo*. *Plant J.* 34:441-452.
- Yoshimoto, N., Inoue, E., Saito, K., Yamaya, T. dan Takahashi, H., 2003. Phloem-localizing transporter, Sultr1-3, mediates re-distribution of sulfur from source to sink organs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131:1511-1517.