

KONSTRUKSI PLASMID OVEREKSPRESI RF2A DAN TRANSFORMASI KEDALAM TANAMAN UNTUK PENINGKATAN KETAHANAN TANAMAN PADI TERHADAP VIRUS TUNGRO

Dwi Astuti¹, Amy Estiati² dan Satya Nugroho³

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Komplek Cibinong Science Center, Jalan Raya Bogor KM.46
Cibinong, Bogor, JawaBarat 16911
Telp: 021-8754587; Fax: 021-8754588
e-mail: iiaasty@yahoo.com

² Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Komplek Cibinong Science Center, Jalan Raya Bogor KM.46
Cibinong, Bogor, JawaBarat 16911
Telp: 021-8754587; Fax: 021-8754588
e-mail: nugroho_amy@yahoo.com

³ Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia
Komplek Cibinong Science Center, Jalan Raya Bogor KM.46
Cibinong, Bogor, JawaBarat 16911
Telp: 021-8754587; Fax: 021-8754588
e-mail: nugroho_satya@yahoo.com

ABSTRACT

Rice tungro disease is caused by the coinfection of *Rice tungro bacilliform tungrovirus* (RTBV) dan *Rice tungro spherical waikavirus* (RTSV) in rice. Tungro infection is done by the the vector green plant hoper *Nephotettix virescens*. RTBV is the causative symptoms, however infection will not occur without the presence of RTSV. In infected plant, RTBV is accumulated in phloem cell. RF2a, which is classified under the basic leucine zipper protein (bZIP) gene, is a transcription factor which plays roles in promoter activity of RTBV and is important for the viral replication process. Besides viral replication, RF2a is also important for plant development. Overexpression of RF2a in rice was known to improve rice resistance against RTBV infection. The aim of this research is using overexpression strategy of the RF2a transcription factor to develop tungro resistant transgenic rice. The study was done in the laboratory and greenhouse of Genomics and Quality Crop Improvement Laboratory, Research Center for Biotechnology LIPI since August 2014 until August 2015. A binary plasmid overexpressing RF2a under the control of CaMV35S was constructed. RF2a was synthesized adding *NcoI* and *BstEII* at the 5' and 3' end, respectively, for convenient cloning into the pCAMBIA1305.1 binary plasmid. Mutation was done in the RF2a coding sequence to replace C into G at base 707, 743 and 1079 to remove 3 *NcoI* sites without changing its amino acid sequence. The synthesized RF2a coding sequence was then cloned into pCAMBIA1305.1 and confirmed by digestion with *NcoI*

and *BstEII*. Transformation into rice cv IR64 was performed by *Agrobacterium* mediated method, and the presence of transgene in T0 plants was analyzed by PCR.

Keywords: Tungro, rice resistance, plasmid construction, RF2a, plant transformation

ABSTRAK

Penyakit tungro disebabkan oleh infeksi bersama *Rice tungro bacilliform tungrovirus* (RTBV) dan *Rice tungro spherical waikavirus* (RTSV). Penyakit ini ditularkan pada tanaman melalui vektor wereng hijau *Nephotettix virescens*. Penentu terjadinya gejala adalah akibat infeksi RTBV, walaupun RTBV tidak dapat menginfeksi tanaman tanpa RTSV. Pada tanaman terinfeksi, RTBV terakumulasi dalam sel phloem tanaman padi. RF2a yang termasuk kedalam kelompok *basic leucine zipper protein* (*bZIP*), merupakan faktor transkripsi yang memegang peranan penting pada aktivasi promotor RTBV atau dengan kata lain penting untuk replikasi virus RTBV pada jaringan tanaman terinfeksi. RF2a diperlukan juga untuk perkembangan tanaman inangnya itu sendiri. Overekspresi faktor transkripsi RF2a pada tanaman padi transgenik telah diketahui dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap infeksi RTBV. Tujuan dalam penelitian ini adalah menggunakan strategi overekspresi faktor transkripsi RF2a untuk mengembangkan padi transgenik tahan penyakit tungro. Penelitian dilakukan di laboratorium dan rumah kaca transgenik Laboratorium Genomik dan Perbaikan Mutu Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI sejak Agustus 2014 sampai Agustus 2015. Dalam penelitian ini telah dilakukan konstruksi plasmid biner pCAMBIA 1305.1 rekombinan membawa RF2a dengan promoter konstitutif CaMV35S dan transformasinya ke dalam tanaman padi varietas IR64. RF2a disintesis dengan menambahkan situs enzim restriksi *NcoI* pada sisi 5' dan *BstEII* pada sisi 3' dari CDS RF2a. Tiga situs enzim *NcoI* yang terdapat dalam CDS RF2a dihilangkan dengan melakukan mutasi satu basa dari basa C menjadi G pada kodon situs enzim pada basa ke- 707, ke- 743 dan ke- 1079 tanpa merubah muatan asam amino yang dihasilkan. RF2a sintetik kemudian difusikan kedalam plasmid pCAMBIA 1305.1. Keberadaan RF2a dikonfirmasi melalui pemotongan plasmid dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*. Transformasi pCAMBIA 1305.1 rekombinan ke dalam tanaman padi varietas IR64 dilakukan dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Keberadaan RF2a dalam genom tanaman padi telah dilakukan dengan PCR menggunakan sepasang primer yang spesifik untuk gen *hpt*. Penelitian ini menghasilkan plasmid overekspresi RF2a dan tanaman padi transgenik yang diharapkan tahan terhadap virus tungro.

Kata Kunci: Tungro, ketahanan padi, konstruksi plasmid, RF2a, transformasi tanaman

PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara terbesar di dunia yang penduduknya mengonsumsi beras. *International Rice Research Institute* (IRRI) memperkirakan bahwa 25 tahun mendatang Indonesia akan membutuhkan beras lebih banyak sehingga produksinya harus ditingkatkan menjadi lebih dari 6 ton/ha (IRRI, 2010). Namun, untuk peningkatan produksi dihadapkan pada berbagai kendala salah satunya adalah gangguan hama dan penyakit tanaman termasuk kerusakan karena infeksi virus (Direktorat Perlindungan Tanaman Pangan, 2011).

Luas serangan virus tungro di Indonesia pada periode Maret-September 2011 mencapai 8 399 ha dan 100 ha diantaranya mengalami puso (Direktorat Perlindungan Tanaman, 2011). Penyakit tungro disebabkan oleh infeksi dua virus yang berasosiasi yakni *Rice tungro bacilliform tungrovirus* (RTBV) dan *Rice tungro spherical waikavirus* (RTSV) yang ditularkan oleh wereng hijau *Nephotettix virescens* Distant (Hibino *et al.*, 1978). Gejala utama penyakit tungro antara lain tampak pada perubahan warna daun, jumlah anakan berkurang dan tanaman menjadi kerdil (Hibino *et al.*, 1978). Penentu gejala tersebut adalah RTBV (Hibino, 1996). RTBV dapat menyebabkan gejala penyakit pada tanaman padi, sedangkan RTSV hanya menyebabkan gejala minor atau tidak menyebabkan gejala (Tyagi *et al.*, 2008).

Virus RTBV diketahui terakumulasi dalam jaringan floem pada tanaman padi terinfeksi tungro (Yin *et al.*, 1997a). RTBV memiliki promotor tunggal yang berinteraksi dengan faktor transkripsi tanaman padi RF2a untuk mengaktifasi transkripsi genom DNA RTBV (Petruccelli *et al.*, 2001). Dengan demikian, RF2a adalah faktor transkripsi tanaman padi yang penting untuk replikasi virus RTBV pada jaringan tanaman terinfeksi. Dilain pihak, RF2a juga sangat dibutuhkan oleh tanaman padi itu sendiri untuk perkembangannya (Dai *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 1997b).

Overekspresi RF2a pada tanaman tembakau transgenik dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap infeksi RTBV (Petruccelli *et al.*, 2001). Hasil yang sama juga dilaporkan pada tanaman padi bahwa overekspresi RF2 pada tanaman padi model, TP309 menunjukkan peningkatan ketahanan tanaman padi terhadap serangan virus tungro. Oleh karena itu tujuan dalam penelitian ini adalah menggunakan strategi overekspresi faktor transkripsi RF2a untuk mengembangkan padi transgenik tahan penyakit tungro.

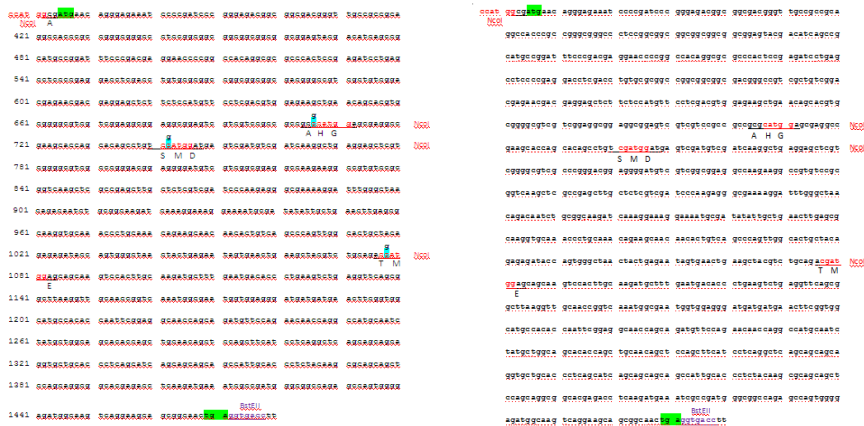
TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di laboratorium dan rumah kaca transgenik Laboratorium Genomik dan Perbaikan Mutu Tanaman, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI sejak Agustus 2014 sampai Agustus 2015.

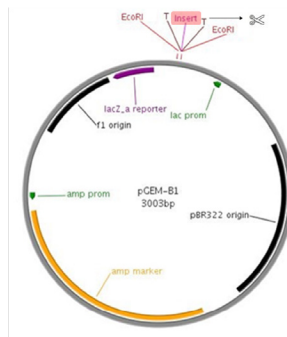
METODE PENELITIAN

Konstruksi plasmid pCAMBIA 1305.1 membawa RF2a

RF2a didapatkan dari *Gene Bank* dengan nomor akses AF005492. Sekuen basa nukleotida yang akan disintetis adalah bagian *full CDS dari* Fragmen *RF2a*. Sebanyak tiga situs enzim *NcoI* terdapat dalam CDS RF2a seperti tampak pada Gambar 1. Untuk kepentingan kloning selanjutnya, maka ketiga situs enzim *NcoI* dihilangkan dengan melakukan mutasi 1 sehingga sekuen yang terbentuk bukan lagi situs enzim restriksi *NcoI*. Mutasi pada ketiga situs enzim tersebut adalah perubahan basa C menjadi G tanpa merubah muatan asam amino pada basa ke-707, basa ke-743, dan basa ke-1079 (Gambar 1). Selain itu, pada sisi 5' dari CDS RF2a, ditambahkan situs enzim restriksi *NcoI* dan pada sisi 3' ditambahkan situs enzim *BstEII* (Gambar 1). Selanjutnya, gen sintetik yang didapatkan telah dikloning ke dalam plasmid pGEM-B1 (Gambar 2).



Gambar 1. Situs enzim restriksi *NcoI* dalam CDS RF2a (A) dan sekuen basa gen sintetik RF2a (B)



Gambar 2. RF2a sintetik (sebagai insert) dalam plasmid pGEM-B1.

```

ccat ggcgatgaac agggagaaat ccccgatccc gggagacggc ggcgacgggt tgccgccgca
ggccaccgcc cgggcggggc ctccggcggc ggcggcgggc gcgaggtacg acatcagccc
catgccggat ttcccagca ggaaccccg ccacaggcgc gcccaactccg agatcctgag
cctccccgag gacctcgacc tgtgcggcgc cggcgggcgc gacggggcgt cgctgtcgga
cgagaacgac gaggagctct tctccatggt cctcgacgtg gagaagctga acagcacgtg
cggggcgctc tcggaggcgg aggcggagtc gtcgtccgcc gccgcgcatg gagcgaggcc
gaagcaccag cacagcctgt cgatggatga gtcgatgtcg atcaaggctg aggagctcgt
cggggcgctc cccgggacgg aggggatgtc gtcggcgggc gccaaagaagg ccgtgtccgc
ggtcaagctc gccgagcttg ctctcgtcga tcccaagagg gcgaaaaagg tttgggctaa
cagacaatct gcggcaagat caaaggaaag gaaaatgcga tatattgctg aacttgagcg
caagtgtaa acctgcaaa cagaagcaac aacactgtca gcccagttgg cactgctaca
gagagatacc agtgggctaa ctactgagaa tagtgaactg aagctacgtc tgcagacgat
ggagcagcaa gtccacttgc aagatgcttt gaatgacacc ctgaagtctg aggttcagcg
gcttaaggtt gcaaccggtc aaatggcgaa tggtggaggg atgatgatga acttcggtgg
catgccacac caattcggag gcaaccagca gatgttccag aacaaccagg ccatgcaatc
tatgtcggca gcacaccagc tgcaacagct ccagcttcat cctcaggctc agcagcagca
ggtgctgcac cctcagcacc agcagcagca gccattgcac cctctacaag cgcagcagct
ccagcaggcg gcacgagacc tcaagatgaa atcgccgatg ggcggccaga gccagtgggg
agatggcaag tcaggaagca gcggcaactg aggtgacctt

```

Gambar 3. Runutan basa RF2a sintetik

Plasmid pGEM-B1 membawa RF2a yang didapatkan, berupa serbuk liofilisasi. Selanjutnya, plasmid ini dilarutkan dalam 20 µl TE pH=8. Sebanyak 1 µl plasmid ditransformasikan ke 25 µl bakteri *E. coli* strain DH5α (Chemically Competent Cells, MAX Efficiency DH5α™, INVITROGEN) menggunakan metode *heat shock*. Hasil transformasi ditumbuhkan pada media seleksi yaitu media LB cair yang mengandung 50 mg/l ampicilin, selama ± 18 jam (37 °C, 200 RPM) untuk kemudian dilakukan isolasi plasmid.

Plasmid rekombinan membawa RF2a, selanjutnya dipotong menggunakan enzim restriksi *NcoI* dan *BstEII* untuk mengeluarkan RF2a. RF2a kemudian diklon ke dalam plasmid biner pCAMBIA 1305.1 untuk mendapatkan plasmid rekombinan pCAMBIA1305.1::RF2a. Untuk menyiapkan plasmid biner pCAMBIA 1305.1, maka plasmid ini pun harus dipotong dengan enzim restriksi yang sama dengan yang dimiliki oleh RF2a pada situs ligasi, yaitu *NcoI* dan *BstEII* (Gambar 3).

Keberadaan RF2a dalam plasmid biner pCAMBIA 1305.1 dibuktikan dengan memotong plasmid rekombinan pCAMBIA 1305.1::RF2a dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*. Dari hasil pemotongan ini, seharusnya didapatkan dua pita yaitu pita dari pCAMBIA1305.1 (3000 bp) dan pita fargmen RF2a (1124 bp). Setelah terbukti

plasmid rekombinan telah membawa RF2a, maka plasmid pCAMBIA 1305.1 membawa RF2a digunakan sebagai materi untuk melakukan transformasi RF2a ke dalam tanaman padi varietas IR64 menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*.

Transformasi pCAMBIA 1305.1 membawa RF2a ke dalam tanaman padi varietas IR64

Sebelum ditransformasikan ke dalam tanaman, plasmid rekombinan pCAMBIA 1305.1 membawa RF2a ditransformasikan terlebih dahulu kedalam *Agrobacterium tumefaciens* sebagai vektor transformasi gen ke dalam tanaman. Transformasi dengan metode elektroporator ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, telah dilakukan.

Elektroporasi dilakukan pada kondisi sebagai berikut: 2500 Volt, 25 μ F, dan 200 Ω menggunakan kuvet *Gene Pulser 0,1 cm electrode* (Bio-Rad). Alasan digunakannya *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Hiei *et al.*, (1994). Penelitian tersebut menggunakan LBA4404 dan dilaporkan bahwa penggunaan LBA4404 tidak mengakibatkan pertumbuhan yang berlebihan (overgrowth) yang akan mengganggu dalam proses kokultivasi.

Bakteri *Agrobacterium* pembawa pCAMBIA 1305.1 rekombinan, dikultur pada media LB dengan antibiotik yang sesuai dan kemudian diinkubasi pada 28 °C selama 3 hari. Bakteri tersebut kemudian diresuspensikan pada media kokultivasi cair dengan penambahan Asetosiringon (0,1 M) sebanyak 10 kali konsentrasi dibanding pada media kokultivasi padat (100 μ M) dan dishaker sampai OD mencapai \pm 1. Setelah mencapai OD tersebut lalu suspensi bakteri ini ditetaskan pada kalus embriogenik padi. Metoda transformasi dan regenerasi menggunakan metoda Hiei dan Komari (2006).

Dikarenakan panjang fragmen RF2a sebesar 1124 bp, maka amplifikasi RF2a pada saat ini masih sulit dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini, untuk membuktikan bahwa RF2a telah terintegrasi dalam genom tanaman padi varietas IR64, analisis PCR menggunakan sepasang primer yang spesifik untuk gen *hpt* telah dilakukan. Penggunaan gen *hpt* dapat mengindikasikan keberadaan RF2a, dikarenakan posisi RF2a dan gen *hpt* berada pada satu T-DNA.

Amplifikasi dilakukan dengan menambahkan 1 μ l DNA kedalam masing-masing reaksi PCR yang mengandung 1x buffer Dreamtaq (Fermentas), 0.5 μ M *hpt* Forward dan Reverse. Kondisi PCR adalah 95^o C 3 menit, 95^o C 1 menit, 62^o C 1 menit, 72^o C 1 menit, 72^o C 10 menit, dan 10^o C (~), sebanyak 35 siklus. Hasil PCR dipisahkan di 1.5% gel agaros. Selanjutnya gel direndam dalam EtBr (0.7 mg/100 ml) dan divisualisasikan dengan UV transilluminator.

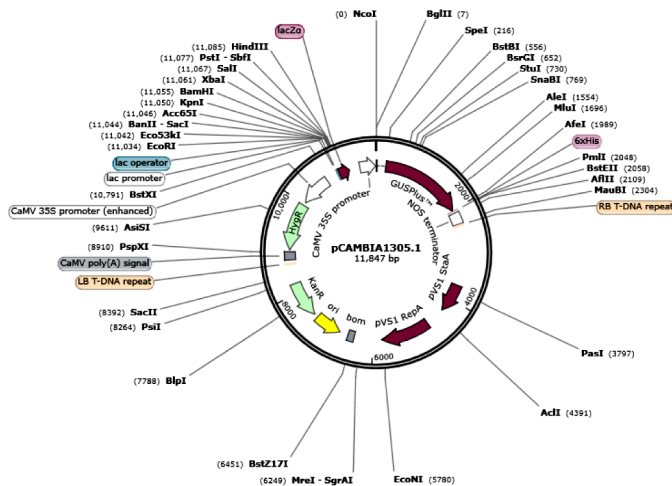
HASIL DAN PEMBAHASAN

Konstruksi plasmid pCAMBIA 1305.1 membawa RF2a

Dalam runutan basa CDS RF2a (GeneBank no.akses AF005492.1) (Yin *et al.*, 1997b), terdapat tiga situs enzim restriksi *Nco*I yang harus dihilangkan karena

terdapat penambahan situs enzim *NcoI* pada sisi 5' dari RF2a yang disintesis. Penambahan situs enzim *NcoI* pada sisi 5' tersebut dilakukan untuk memudahkan proses kloning ke plasmid vektor yang memiliki situs restriksi yang sama yaitu *NcoI*. Oleh karena itu ketiga situs enzim tersebut salah satu basanya diganti akan tetapi tidak merubah asam amino yang dihasilkan. Pada ketiga situs tersebut, basa C diganti dengan basa G pada basa ke-707, basa ke-743, dan basa ke-1079 dan asam amino yang dihasilkan dari ketiga situs tersebut adalah Alanin, Serin dan Threonin.

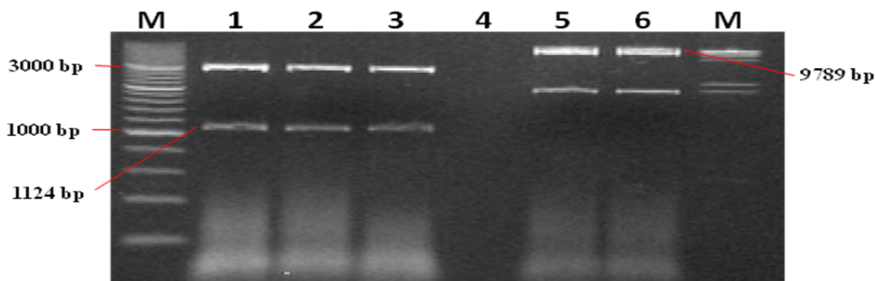
Sintetik RF2a telah didisain dengan runutan basa seperti pada Gambar 3. Penambahan situs *NcoI* dan *BstEII* pada full CDS RF2a bertujuan untuk memudahkan proses ligasi RF2a ini ke plasmid vektor pCAMBIA 1305.1 yang juga memiliki kedua situs enzim tersebut. (Gambar 4).



Gambar 4. Peta plasmid pCAMBIA 1305

Selanjutnya, fragmen gen sintetik RF2a yang telah didapat dan berada dalam plasmid pGEM-B1 membawa RF2a ditransformasikan ke bakteri *E. coli* strain DH5 α (Chemically Competent Cells, MAX Efficiency DH5 α TM, INVITROGEN). Koloni transforman diseleksi menggunakan antibiotik mengandung 50 mg/l ampicilin. Koloni yang tumbuh kemudian diisolasi plasmid untuk mengetahui apakah plasmid hasil ligasi telah berhasil diperoleh. Hasil plasmid yang sudah diisolasi selanjutnya dikonfirmasi kebenarannya dengan memotong plasmid dengan enzim *NcoI/BstEII*, RF2a dipurifikasi dari gel agarose menggunakan *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific), kemudian diligasikan kedalam plasmid biner pCAMBIA 1305.1 sehingga diperoleh pCAMBIA 1305.1 mengandung RF2a.

Hasil pemotongan plasmid pGEM-B1 membawa RF2a menggunakan enzim *BstEII*/*NcoI*, menghasilkan dua pita yaitu plasmid pGEM-B1 (3000 bp) dan RF2a (1124 bp). Dari hasil ini telah membuktikan bahwa RF2a telah berhasil diligaskan kedalam plasmid pGEM-B1 (Gambar 5). Selanjutnya, RF2a hasil restriksi dari plasmid pGEM-B1, dipurifikasi dan diklon ke dalam plasmid biner yaitu plasmid pCAMBIA 1305.1. Sebelum digunakan, pCAMBIA 1305.1 dipotong dengan enzim *NcoI*/*BstEII* sebagai situs penempelan RF2a pada proses ligasi. Plasmid pCAMBIA 1305.1 yang direstriksi oleh *NcoI*/*BstEII* menunjukkan dua band (Gambar 5). Band yang paling panjang (9789 bp) kemudian dipurifikasi menggunakan Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Thermo Scientific).



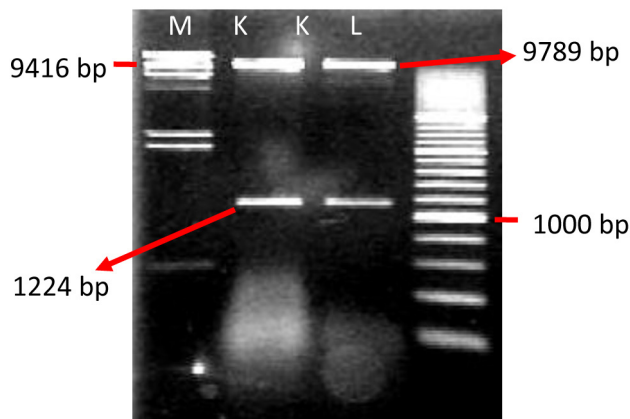
Gambar 5. Hasil restriksi pGEM-B1 membawa RF2a dan pCAMBIA 1305.1 dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*. Lane M: marker 200 bp; lane 1,2, dan 3: pGEM-B1 dan fragmen RF2a hasil restriksi pGEM-B1 membawa RF2a dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*; lane 5 dan 6: hasil restriksi pCAMBIA 1305.1 dengan enzim *NcoI* dan *BstEII* dengan ukuran backbone sebesar 9789 bp; lane M: 1 HindIII.

RF2a dan *backbone* pCAMBIA 1305.1 hasil pemotongan yang telah dielektroforesis, selanjutnya dipurifikasi menggunakan *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific). RF2a ini kemudian diligasikan ke dalam plasmid biner pCAMBIA 1305.1 dengan reaksi ligasi menggunakan perbandingan vektor : insert yaitu 1 : 5 dan diinkubasikan pada suhu 4°C selama 16 jam (*overnight*). Hasil ligasi selanjutnya ditransformasikan ke bakteri *E. coli* strain DH5 α menggunakan metode *heat shock*. Kontrol positif ligasi dibuat dengan meligasi plasmid pCAMBIA 1305.1 yang telah dipotong dengan enzim restriksi *BstEII*. Kontrol negatif ligasi dibuat sama dengan kontrol positif ligasi tanpa penambahan T4 DNA ligase.

Hasil transformasi ditumbuhkan pada media seleksi yaitu media LB padat yang mengandung 50 mg/l kanamisin. Kontrol kompeten sel dibuat dengan menumbuhkan kompeten sel DH5 α pada media LB dan media dengan antibiotik seperti di atas. Selain itu dibuat pula kontrol transformasi dengan mentransformasi plasmid utuh pCAMBIA 1305.1 yang ditumbuhkan pada media antibiotik dan tanpa antibiotik. Koloni yang dihasilkan kemudian ditumbuhkan pada media cair dengan antibiotik yang sama yang kemudian dilakukan isolasi plasmid. Plasmid

yang didapatkan kemudian dipotong dengan enzim *NcoI* dan *BstEII* untuk memastikan keberhasilan ligasi.

Hasil pemotongan menghasilkan dua pita yaitu pCAMBIA 1305.1 (9789 bp) dan RF2a (1124 bp). Dari hasil ini telah membuktikan bahwa RF2a telah berhasil diligasikan ke dalam plasmid pCAMBIA 1305.1 (Gambar 6). Plasmid pCAMBIA1305.1::RF2a yang didapatkan selanjutnya ditransformasikan ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 sebagai materi transformasi RF2a ke dalam tanaman padi varietas IR64 melalui kokultivasi pada kalus padi.



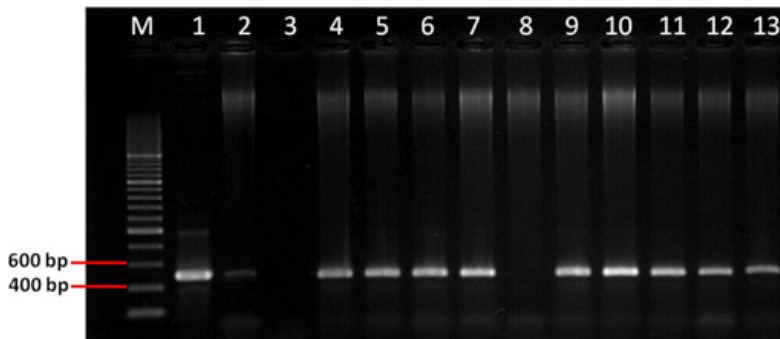
Gambar 6. Hasil restriksi pCAMBIA1305.1 membawa RF2a dengan enzim *NcoI* dan *BstEII*. Lane M: marker λ HindIII; lane K: fragmen pCambia 1305.1 (9789 bp) dan RF2a (1124 bp) hasil restriksi pCAMBIA::RF2a dengan *NcoI* dan *BstEII*; lane L: marker 200 bp ladder.

Transformasi pCAMBIA 1305.1 membawa RF2a ke dalam tanaman padi varietas IR64

Jaringan target untuk proses transformasi berupa immature embryo tanaman padi varietas IR64. Transformasi gen ke dalam tanaman dan regenerasi tanaman mengacu pada metoda Hiei dan Komari (2006). Dari hasil transformasi menggunakan metoda Hiei dan Komari (2006), diketahui presentase keberhasilan transformasi sebesar 0.77% dan presentase keberhasilan regenerasi tanaman sebesar 0.52%. Planlet tanaman hasil transformasi yang telah memiliki daun dan akar, selanjutnya diaklimatisasi dalam rumah kaca.

Dikarenakan panjang fragmen RF2a sebesar 1124 bp, maka amplifikasi RF2a pada saat ini masih sulit dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini, untuk membuktikan bahwa RF2a telah terintegrasi dalam genom tanaman padi

varietas IR64, analisis PCR menggunakan sepasang primer yang spesifik untuk gen *hpt* telah dilakukan. Penggunaan gen *hpt* dapat mengindikasikan keberadaan RF2a, dikarenakan posisi RF2a dan gen *hpt* berada pada satu T-DNA. Hasil PCR dipisahkan di 1.5% gel agarose. Selanjutnya gel direndam dalam EtBr (0.7 mg/100 ml) dan divisualisasikan dengan UV transilluminator.



Gambar 7. Hasil analisis PCR menggunakan sepasang primer yang spesifik untuk gen *hpt* pada sepuluh tanaman padi hasil transformasi pCAMBA1305.1 membawa RF2a. Lane M; 200 bp ladder; lane 1: pCAMBIA1305.1 membawa RF2a; lane 2: kontrol positif tanaman membawa gen *hpt*; lane 3: kontrol negatif dengan mengganti DNA sampel tanaman dengan dH₂O; lane 4-13: sampel tanaman hasil transformasi

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa dari sepuluh tanaman yang di PCR, sembilan tanaman mampu mengamplifikasi gen *hpt*. Ini membuktikan bahwa sembilan tanaman hasil transformasi yang diuji adalah benar-benar tanaman transgenik membawa RF2a. (Gambar 7). Pada lane 8 dapat dilihat bahwa tanaman tidak mampu mengamplifikasi gen *hpt*. Hal ini diduga karena tanaman lolos seleksi pada media seleksi mengandung higromisin meskipun tanaman tersebut bukan tanaman transgenik.

Pada penelitian selanjutnya, dilakukan analisis PCR menggunakan sepasang primer yang spesifik untuk RF2a, hibridisasi Southern untuk mengetahui dan membuktikan integrasi gen *hpt* dan RF2a dalam genom tanaman transgenik dan pengujian ketahanan tanaman padi transgenik hasil overekspresi RF2a terhadap serangan virus tungro.

KESIMPULAN

1. Telah didapatkan plasmid pCAMBIA 1305.1 membawa RF2a yang telah ditransformasikan ke dalam tanaman padi varietas IR64 untuk meningkatkan sifat ketahanan tanaman terhadap virus tungro dengan pendekatan overekspresi RF2a.

2. Berdasarkan hasil analisis PCR, telah didapatkan tanaman padi transgenik terbukti membawa RF2a.
3. Pengujian ketahanan tanaman padi transgenik hasil overekspresi RF2a terhadap virus tungro akan dilakukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih penulis ucapkan kepada Eva Parita yang telah membantu penulis dalam pekerjaan kultur jaringan tanaman serta rekan-rekan Lab. dan Rumah Kaca Laboratorium Genomik dan Perbaikan Mutu Tanaman, Puslit Bioteknologi LIPI yang telah membantu penelitian ini. Riset ini didanai oleh Insentif Riset SINas Tahun Anggaran 2014-2015, Kementerian Riset dan Teknologi.

DAFTAR PUSTAKA

- Dai S., Wei X., Alfonso AA., Pei L., Duque UG., Zhang Z., Babb GM., and Roger RN. 2008. Transgenic rice plants that overexpress transcription factors RF2a and RF2b are tolerant to rice tungro virus replication and disease. *PNAS*. 105(52):21012-21016.
- Direktorat Perlindungan Tanaman Pangan. 2011. *Peta Daerah Sebaran Serangan OPT Padi*. Jakarta: Direktorat Jendral Tanaman Pangan Kementerian Pertanian.
- Hibino, H., Roechan, and S. Sudarisman. 1978. Association of two types of virus particle with penyakit habang (tungro disease) of rice in Indonesia. *Phytopathology*. 68:1412-1416.
- Hibino. 1996. Biology and epidemiology of rice viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:249-274.
- Hiei, Y., and T. Komari. 2006. Improved protocols for transformation of indica rice mediated by agrobacterium tumefaciens. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 85(3): 271-283
- International Rice Research Institute. 2010. Diakses 10 Maret 2012. Country profiles: Indonesia. <http://irri.org/index.php?option=comk2&view=itemlist&task=category&id=480&Itemid=10021..>
- Petrucelli S., Dai S., Carcamo R., Yin Y., Chen S., and Beachy RN. 2001. Transcription factor RF2a alters expression of the rice tungro bacilliform virus promoter in transgenic tobacco plants. *PNAS*. 98(13):7635-7640.
- Tyagi H, Rajasubramaniam S, Rajam MV, and Dasgupta I. 2008. RNA-interference in rice against Rice tungro bacilliform virus results in its decreased accumulation in inoculated rice plants *Transgenic Res* 17:897–904.

- Yin Y., Chen L., and Beachy R. 1997a. Promoter elements required for phloem-specific gene expression from the RTBV promoter in rice. *The Plant Journal*. 12(5):1179-1188.
- Yin Y., Zhu Q., Dai S., Lamb C., and Beachy RN. 1997b. RF2a, a bZIP transcriptional activator of the phloem-specific rice tungro bacilliform virus promoter, functions in vascular development. *EMBO J*. 16(17): 5247-5259.