

Introduksi Gen Sitrat Sintase *Pseudomonas aeruginosa* ke *Nicotiana tabacum* dan *Jatropha curcas* untuk Meningkatkan Toleransi terhadap Cekaman Aluminium

Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* Citrate Synthase Gene to *Nicotiana tabacum* and *Jatropha curcas* to Enhance Tolerance to Aluminum Stress

Radite Tistama¹, Utut Widyastuti², Suharsono^{2*}

¹Balai Penelitian Sungei Putih, Pusat Penelitian Karet, PO Box 1415 Medan 20001

²Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor Jl. Dramaga, Bogor 16680

*Email : sony.suharsono@yahoo.com

Diterima 20 Juli 2017 / Disetujui 27 Agustus 2017

ABSTRAK

Cekaman aluminium merupakan faktor penghalang utama untuk pengembangan komoditas tanaman unggulan di lahan-lahan masam. Sintesis dan sekresi asam organik oleh akar merupakan salah satu mekanisme mengurangi cekaman aluminium. Penelitian ini bertujuan mengintroduksi gen sitrat sintase bakteri *P. aeruginosa* (*PaCS*) ke dalam tanaman tembakau (*N. tabacum*) dan *Jatropha curcas*. *PaCS* berhasil diintroduksi dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* baik ke dalam jaringan tembakau maupun *J. curcas*. Toleransi tembakau transgenik ditandai dengan pertambahan panjang akar yang lebih tinggi dibanding tipe liarnya pada cekaman 0,3 mM AlCl₃. Toleransi tembakau transgenik dapat mengurangi masuknya Al ke dalam jaringan akar. Sifat toleran gen *PaCS* diturunkan mengikuti Hukum Mendel. Persentase introduksi gen *PaCS* ke dalam *J. curcas* hanya 1% dari jumlah eksplan yang ditranformasi.

Kata kunci : introduksi gen, sitrat sintase, cekaman aluminium, *N. tabacum*, *J. curcas*

ABSTRACT

Aluminum stress is the main obstacle for development of superior commodity in the acid area. Organic acid synthesis and secretion of it by root is one mechanism of aluminum tolerance. This research obtain to introduced citrate synthase of *P. aeruginosa* (*PaCS*) into tobacco (*N. tabacum*) and *J. curcas*. *PaCS* was introduced successfully by *Agrobacterium tumefaciens* into tobacco and *Jatropha*. The tolerance of transgenic tobacco signed with the length increase of root that were higher than its wild type under 0,3 mM AlCl₃ treatment. The transgenic tobacco capable to reduced the aluminum influx to root tissue. The character of *PaCS* gene was inherited followed Mendel's law. The percentage of *PaCS* gene introduction into *J. curcas* was low only 1% from total explants.

Keywords : gene introduction, citrate synthase, aluminum stress, *N. tabacum*, *J. curcas*

PENDAHULUAN

Keracunan aluminium (Al) merupakan penyebab utama berkurangnya pertumbuhan dan produktivitas tanaman pertanian di tanah masam. Pada pH di bawah 5, Al³⁺ merupakan bentuk yang dominan di dalam tanah dan beracun bagi banyak tanaman (Kochian *et al.* 2002), dan dalam konsentrasi mikromolar Al³⁺ dapat menghambat pertumbuhan akar hanya dalam beberapa jam. Aluminium mengganggu fungsi dinding sel, plasma, dan jalur signal transduksi hanya beberapa

jam setelah akar dicekam Al (Poschenrieder *et al.* 2008).

Upaya meningkatkan daya hasil tanaman di lahan masam dapat dilakukan dengan meningkatkan toleransi tanaman terhadap Al dengan mengurangi kontak sel dengan Al. Ma (2000) menyebutkan bahwa salah satu mekanisme toleransi tanaman terhadap Al adalah dengan mencegah Al masuk ke jaringan akar atau mendetoksifikasi Al yang sudah masuk di dalam sel dan kemudian mengeluarkannya. Tanaman

dapat mendektosifikasi Al dengan mensintesis dan mensekresikan asam organik. Usaha untuk mendapatkan tanaman yang toleran Al telah dilakukan dengan mengekspresikan secara berlebih gen yang mengatur sintesis asam sitrat yaitu gen sitrat sintase (de la Fuente *et al.* 1997; Koyama *et al.* 2000; Anoop *et al.* 2003).

Pseudomonas merupakan salah satu mikroba utama di dalam rhizosfer yang banyak digunakan berbagai proses seperti mengatasi cekaman oksidatif (Hassett *et al.* 1993), antimikroba (Chin-A-Woeng *et al.* 2003), dan pengkelat logam (Lemire *et al.* 2010). Beberapa spesies dalam genus ini juga sitrat (Buch *et al.* 2008) yang dikaitkan dengan toleransi bakteri ini terhadap cekaman Al (Mailloux *et al.* 2008; Lemire *et al.* 2010). Hal ini menjadi alasan para peneliti mengisolasi dan mengekspresikan gen sitrat sintase *Pseudomonas* ke dalam tanaman atau khamir (de la Fuente *et al.* 1997; Baron *et al.* 2008).

Tanaman yang banyak digunakan untuk model rekayasa genetik adalah *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana bentamiana* (Deng *et al.* 2009; Anggraito 2012) dan *Nicotiana tabacum* (de la Fuente *et al.* 1997; Hanum 2012). Hanum (2012) melaporkan bahwa efisiensi transformasi melalui perantara *Agrobacterium* pada *N. tabacum* mencapai 92% dan pada *N. bentamiana* mencapai 82%, sedangkan Anggraito (2012) mendapatkan efisiensi transformasi hanya 34,6% dalam mengintroduksi gen *MaMt2*.

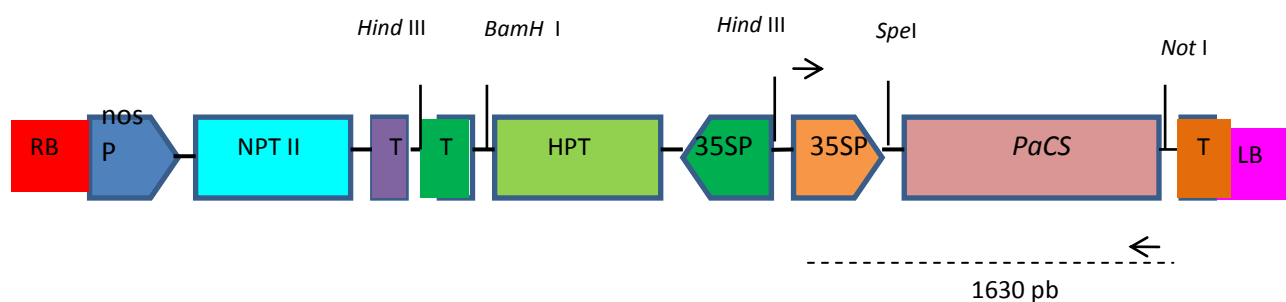
Salah satu tanaman target untuk direkayasa genetiknya adalah *Jatropha curcas*. *J. curcas* merupakan salah satu pilihan sumber utama biodiesel, karena tidak berkompetisi manfaatnya

sebagai pangan (Makkar & Becker, 2009) dan memiliki manfaat ekologis (Fairless, 2007). Namun demikian, *J. curcas* dinilai kurang kompetitif dikembangkan di lahan yang subur, sehingga pengembangan tanaman ini diarahkan ke lahan-lahan marginal dengan kandungan aluminium tinggi. Dari penelitian pertama diketahui bahwa pertumbuhan *J. curcas* menurun akibat cekaman aluminium (Tistama *et al.* 2012).

Upaya untuk meningkatkan toleransi tanaman terhadap aluminium dapat dilakukan dengan mengintroduksi gen *CS* (de la Fuente *et al.* 1997). Penelitian ini bertujuan mengintroduksi gen *PaCS* ke dalam tanaman tembakau dan beberapa aksesori *J. curcas* untuk meningkatkan sintesis dan sekresi sitrat sebagai agen pengkelat aluminium.

METODE PENELITIAN

Bahan untuk penelitian ini meliputi gen *PaCS* yang dikonstruksi ke dalam plasmid pMSH1 sebagai vector ekspresi (Gambar 1) dan *Agrobacterium tumefaciens* LB 4404 sebagai perantara transformasi. Tanaman model yang digunakan untuk menguji ekspresi gen adalah *Nicotiana tabacum*, dan *Jatropha curcas* sebagai tanaman target untuk ditingkatkan toleransinya terhadap cekaman aluminium. Primer 35 S forward (5'AAACCTCCTC-GATTCCATT3') dan PaCS reverse (5'TCAGCCGCGATCCTTGAGGGC3') digunakan untuk menganalisis integrasi transgen *PaCS* di dalam tanaman transgenik.



Gambar 1. Kontruksi gen *PaCS* di vektor ekspresi pMSH1 di sisi pemotongan *Spe* I dan *Not* I .

Introduksi gen PaCS ke *N. Tabacum*

Introduksi gen mengikuti metode Anggaraito (2012). Daun *N. tabacum* dipotong kurang lebih 1cm² sebanyak 50 eksplan. Potongan daun direndam di dalam medium cair Murashige dan Skoog (MS) (Murashige & Skoog 1962) yang mengandung *A. tumefaciens* (OD₆₀₀ = 0,4-0,6) dan 20 µM asetosiringon, selama 10 menit. Daun ditanam pada media kokultivasi yaitu medium padat MS yang diperkaya dengan 1 ppm BAP dan 20 µM asetosiringon, dan diseleksi dengan higromisin dan kanamisin. Tanaman yang mengandung sisipan promotor dan gen *PaCS* disebut sebagai tanaman transgenik T1. Tanaman transgenik T1 diaklimatisasi dan ditanam di pot hingga menghasilkan biji.

Uji Tantang Tanaman Transgenik terhadap Higromisin dan Cekaman Aluminium

Benih tembakau tipe liar (TL) dan transgenik T1 disterilisasi dengan 70% alkohol selama 1 menit, kemudian benih dikecambah selama 1 minggu pada kondisi gelap di media MS0 dengan dan tanpa ditambahkan 50 ppm higromisin. Setelah benih berkecambah, kultur dipindahkan ke kondisi terang. Setelah 1 minggu di kondisi terang, jumlah tanaman yang berkecambah normal dan biji yang tidak berkecambah atau berkecambah tetapi tidak normal pertumbuhannya dihitung. Respon biji T1 terhadap higromisin diuji dengan Chi kwadrat untuk menentukan pola segregasinya.

Kecambah yang lolos seleksi higromisin diaklimatisasi dan dikultur hidroponik menggunakan media ½ konsentrasi MS, pH 6 dan ditumbuhkan selama 1 minggu dengan aerasi. Tanaman tipe liar diperlakukan sama dengan tanaman transgenik. Setelah diadaptasi di medium pH 4 selama 3 hari, tanaman diperlakukan dengan 300 µM Al dalam media ¼ MS0 pH 4 selama 6 hari dan diberi aerasi. Konsentrasi aluminium tersebut telah digunakan untuk menyeleksi tembakau transgenik *MmSOD* (Hanum 2012). Media diganti setiap dua hari dan panjang akar diukur pada hari ke 0, 2, 4 dan ke 6.

Introduksi Gen PaCS ke *Jatropha curcas* dengan di Mediasi oleh *A. tumefaciens*

Introduksi gen *PaCS* ke tanaman *J. curcas* mengikuti metode Li *et al.* (2007), dengan sumber eksplan dari kotiledon. Eksplan yang berkalus dipindahkan ke dalam medium MIK ditempatkan pada kondisi cahaya 2000 lux dan ditambah dengan 200 mg/l cefotaksim dan 20 mg/l kanamisin. Jumlah tunas yang muncul dihitung pada 1 bulan pertama dan kedua setelah 2 bulan perlakuan. Tunas yang hidup pada media seleksi ini kemudian dipindahkan ke dalam media ½ MS, yang diperkaya dengan 20 ppm IBA, 100 µl/L 0,1 M AgNO₃ : Na Thiofosfat (1:4), dan disubkultur setiap 10 hari.

Deteksi Tanaman Transgenik

Gen *PaCS* yang tersisip ke jaringan tanaman dianalisis menggunakan primer 35S *forward* dan *PaCS reverse*. Kondisi PCR diatur sebagai berikut: pre PCR 95°C selama 4 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, annealing pada suhu 55 °C selama 45 detik, pemanjangan pada suhu 72 °C selama 2 menit, siklus ini diulang 40 kali, dan pasca PCR 72 °C selama 5 menit dan suhu 20 °C selama 5 menit. Deteksi *hpt* menggunakan primer *forward* 5'GATGGTTGGCGACCTCGTATT3' dan *reverse* 5'GATGTAGGA-GGGCGTGG-ATA3'. Kondisi PCR sebagai berikut Pre PCR 95°C selama 4 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, annealing pada suhu 60 °C selama 45 detik, pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit, siklus ini diulang 40 kali, dan pasca PCR pada 72 °C selama 5 menit dan suhu 20 °C selama 5 menit.

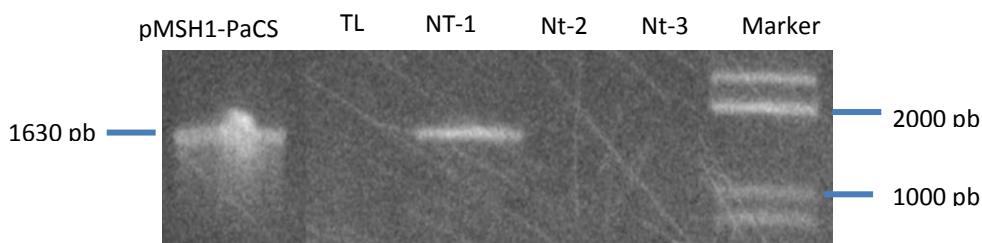
HASIL DAN PEMBAHASAN

Introduksi PaCS ke tanaman model *Nicotiana tabacum*

Tiga plantlet *N. tabacum* lolos seleksi terhadap medium MS yang mengandung diperkaya 30 µg/ml higromisin. Ketiga galur tersebut diduga telah tersisip gen *hpt* yang merupakan bagian dari konstruksi gen *PaCS*. Hasil PCR dengan kombinasi primer gen *PaCS* dengan promotor 35S menunjukkan bahwa hanya satu galur yang

mempunyai pita DNA berukuran 1630 pb. Sisipan tersebut dapat dipastikan merupakan konstruksi yang diintroduksi ke dalam tanaman tembakau dengan ukuran 1630 pb, karena sama ukurannya dengan ukuran gen PaCS dalam pMSH1 (Gambar

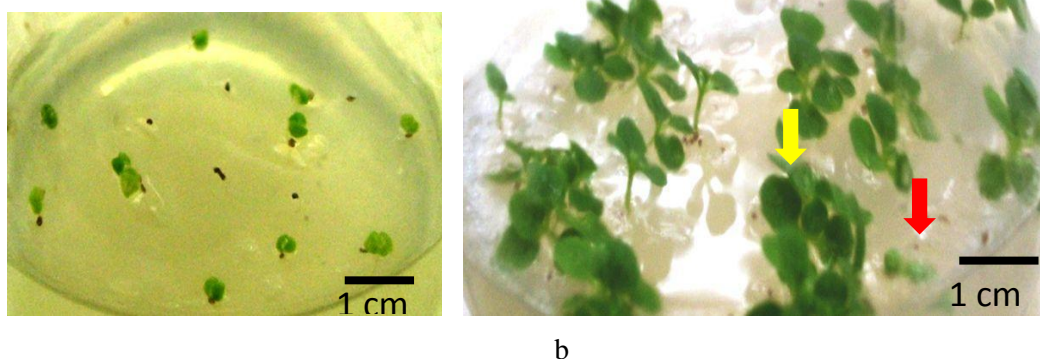
2). Tembakau tipe liar dan dua galur lainnya tidak mengandung sisipan gen PaCS. Tembakau transgenik PaCS ditanam di pot hingga menghasilkan biji.



Gambar 2. Hasil PCR dari tiga galur tembakau yang diduga transgenik yaitu Nt-1, Nt-2 dan Nt-3 dengan kontrol negatif tembakau tipe liar (TL) dan pMSH1-PaCS sebagai kontrol positif.

Biji transgenik pertama (T1) diseleksi untuk membedakan biji transgenik dan non-transgenik dengan menumbuhkan pada media yang mengandung 50 µg/ml higromisin (Hannum 2012; Anggraito 2012). Kecambah biji tembakau transgenik sebagian besar tumbuh normal pada 50

µg/ml higromisin dan hanya sebagian kecil tumbuh kerdil. Tanaman yang tumbuh normal mengandung gen *hpt* yang mengatur toleransi terhadap higromisin, sedangkan biji yang tidak mengandung gen tersebut mengalami penghambatan pertumbuhan (Gambar 3).



Gambar 3. Seleksi tanaman tembakau menggunakan medium MS yang ditambahkan 50 µg/ml higromisin. Semua biji tembakau tipe liar (TL) terhambat perkecambahannya (a), dan T1 (b) sebagian besar tumbuh normal. Tanda kuning menunjukkan tanaman yang toleran terhadap higromisin (transgenik), dan panah merah menunjuk ke tanaman yang peka terhadap higromisin (non transgenik).

Pengujian toleransi 150 biji T1 terhadap higromisin diperoleh 126 benih dapat berkecambah media tersebut. Jumlah biji yang berkecambah dapat tumbuh normal sebanyak 96 biji, sementara pertumbuhan 30 kecambah lainnya mengalami penghambatan dan kerdil. Hasil analisis Chi kuadrat menunjukkan bahwa segregasi NT1 adalah 3:1 (toleran : peka) terhadap

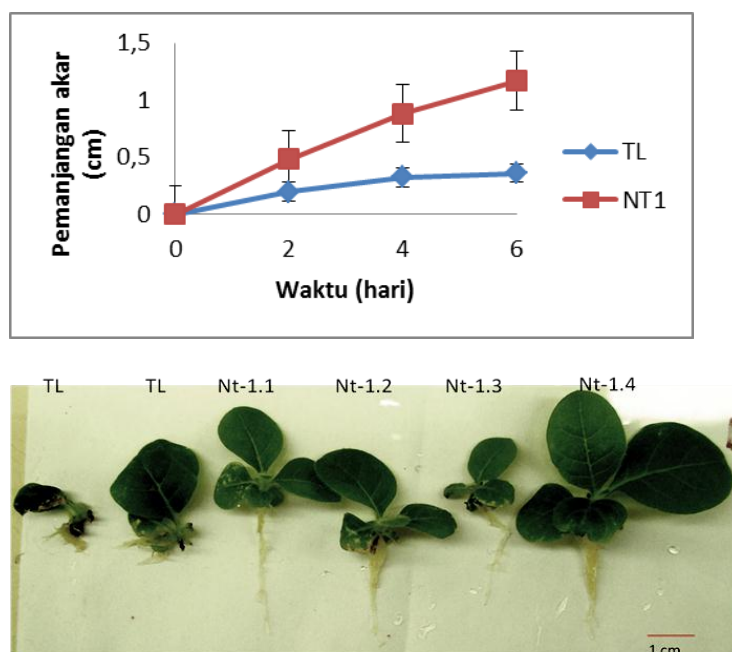
higromisin. Segregasi tanaman 3:1 menunjukkan bahwa gen *hpt* telah terintegrasi di dalam genom tanaman tembakau, dan diwariskan ke generasi berikutnya mengikuti Hukum Mendel. Tanaman transgenik T0 adalah heterozigot untuk *hpt*. Tanaman yang toleran terhadap higromisin diaklimatisasi dan di kultur hidroponik dengan menggunakan ½ konsentrasi media MS pada pH

5,8 selama 1 minggu. Hasil aklimatisasi diperoleh 57 tanaman yang mempunyai pertumbuhan yang baik. Kelima puluh tujuh tanaman ini selanjutnya diuji tantang dengan larutan media yang mengandung aluminium.

Uji Tantang Tanaman T1 terhadap Cekaman Al

Pemanjangan akar tembakau tipe liar (TL) dan sebagian besar tanaman transgenik mengalami penghambatan setelah dicekam dengan 300 μ M Al. Pertambahan panjang akar tembakau TL pada hari ke-2, 4, dan 6 berturut-turut adalah rata-rata 0,2 cm dan 0,12 cm, dan 0,04 cm. Lima tanaman dari 57 tanaman transgenik yang diuji masih tumbuh

dengan normal setelah 7 hari mendapat cekaman Al. Kelima tanaman tersebut adalah tanaman transgenik yang toleran terhadap cekaman Al. Rata-rata pertambahan panjang akar kelima tanaman yang toleran Al (NT1) tersebut pada hari ke 2, 4, dan 6 adalah berturut-turut 0,48 cm, 0,40 dan 0,29 cm (Gambar 4). Laporan Delhaize *et al.* (1993) menyebutkan bahwa tanaman *Triticum sativum* yang peka hampir tidak ada pemanjangan akar lagi setelah 1 hari dicekam oleh Al, demikian juga dengan *Pisum sativum* (Yamamoto *et al.* 2001). Dengan demikian, pertambahan akar kelima tanaman transgenik menunjukkan bahwa gen *PaCS* meningkatkan toleransi tanaman tembakau.



Gambar 4. Pemanjangan akar *N. tabacum* tipe liar (TL) dan tanaman transgenik T1 yang mendapat cekaman 300 μ M Al dalam $\frac{1}{4}$ konsentrasi medium MS. Bar menunjukkan SE dengan $n=5$. Fenotipe akar tanaman tembakau setelah mendapat cekaman Al selama 7 hari.

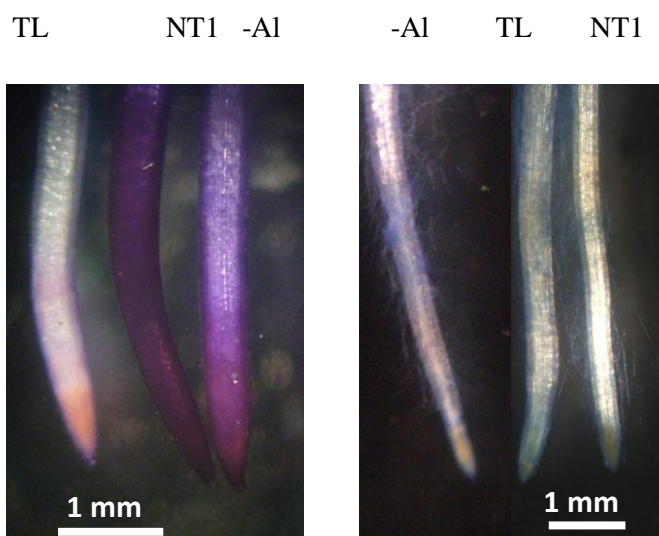
Pemanjangan akar ditentukan oleh aktivitas pembelahan sel-sel di daerah meristem dan diikuti pemanjangan sel-sel di zona pemanjangan (Ryan *et al.* 1993). Penghambatan aktivitas pemanjangan akar oleh Al pada varietas sensitif lebih tinggi dibandingkan dengan varietas toleran. Hal ini telah dilaporkan seperti pada tanaman jagung (Boscolo *et al.* 2003), dan gandum (Ma *et al.* 2004). Tamas *et al.* (2006) melaporkan bahwa cekaman Al selama dua hari menyebabkan penetrasi Al

mencapai bagian luar korteks dan pada hari ketiga penetrasi telah mencapai sebagian besar endodermis. Penghambatan akar terjadi karena Al memicu terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS), menghambat respirasi dan menipiskan ketersediaan ATP dalam sel (Yamamoto *et al.* 2002) dan ROS yang terbentuk menyebabkan degradasi lipid penyusun membran sel (Yamamoto *et al.* 2001).

Analisis Histologi Akar Tanaman Transgenik

Akumulasi Al di ujung akar T1 relatif lebih rendah daripada tipe liarnya. Hal ini ditunjukkan oleh adanya intensitas pewarnaan hematoksilin yang lebih kuat pada akar TL dibandingkan akar tanaman transgenik. Pewarnaan hematoxilin dapat mengikat Al sehingga berwarna keunguan. Akumulasi Al yang tinggi di tanaman TL menyebabkan kerusakan sel-sel pada jaringan ujung akar yang ditunjukkan dengan pewarnaan

Evans blue (Gambar 5). *Evans blue* digunakan sebagai pengukur integritas membran plasma. Warna biru pada sitoplasma dikaitkan dengan kerusakan dan kematian sel (Delisle *et al.* 2001). Akumulasi Al dan kerusakan akar pada galur toleran relatif lebih rendah dibandingkan TL. Sekresi sitrat akar tanaman transgenik diduga lebih tinggi dibandingkan TL. Sekresi sitrat akan mengkelat Al dan membentuk kompleks Al-sitrat untuk mencegah masuk ke dalam sel (Anoop *et al.* 2003). Xue *et al.* (2006) membuktikan bahwa eksudasi sitrat mengurangi penghambatan akar oleh cekaman Al.



Gambar 5. Pewarnaan akar tanaman tembakau tipe liar dan tanaman transgenik T1 mendapat cekaman 300 μ M selama 7 hari dengan hematoksilin (kiri), dan pewarnaan *Evans blue* (kanan). TL: tanaman tipe liar, Nt1: tanaman transgenik T1, -Al: tanpa perlakuan Al.

Introduksi gen PaCS ke dalam *Jatropha curcas*

Kalus kotiledon *J. curcas* mulai terbentuk pada hari ke-15 hingga 20 setelah tanam dan pertumbuhannya mencapai maksimal pada 45 hari setelah tanam. Persentase kalus yang terbentuk pada eksplan IP 3A, IP 3M dan IP 2P yang tidak diperlakukan dengan *Agrobacterium* berturut-turut 59,25 %, 76,79%, dan 66,67% dari jumlah eksplan yang ditanam. Sedangkan eksplan yang dikokultivasi dengan *Agrobacterium* menghasilkan persentase kalus 64%, 69, 51%, dan 58,19% berturut-turut untuk eksplan IP 3A, IP 3M, IP 2P (Tabel 2). Mitchel *et al.* (2008) melaporkan bahwa tiap genotipe dan jenis eksplan mempunyai respon

yang berbeda dalam menghasilkan kalus pada media dasar yang sama.

Penurunan jumlah eksplan yang berkalus pada eksplan yang dikokultivasi dengan *A. tumefaciens* berkisar 36,7%. Tidak semua kalus dapat menghasilkan tunas pada medium seleksi yang mengandung 20 μ g/ml kanamisin (Tabel 2). Persentase tunas yang terbentuk yang toleran kanamisin dari aksesi IP 3A, IP 3M dan IP 2P adalah 12,88%, 10,26% dan 12,5% dari rata-rata tunas pada media tanpa antibiotik. Jumlah tunas toleran ini masih lebih rendah daripada penelitian sebelumnya. Li *et al.* (2007) mampu mendapatkan tunas yang toleran sebanyak 15-20%. Kemungkinan hal ini disebabkan perbedaan

genotipe yang digunakan dalam penelitian ini. Jumlah kalus lolos seleksi toleran terhadap kanamisis pada IP 3A dan IP 2P berturut-turut sebanyak 96 dan 103 kalus.

Tunas-tunas *in vitro* dipindahkan ke medium pengakaran selama 20 hari. Beberapa tunas yang masih bertahan hidup dipindahkan ke media ½ MS tanpa zat pengatur tumbuh. Jumlah tunas yang bertahan pada media ½ MS sebanyak 10 tunas dari aksesori IP 3A, 10 dari aksesori IP3M dan 9 dari aksesori IP 2P. Dari 10 tunas tersebut hanya ada

4 tunas yang dapat berakar atau 40% tunas dapat berakar. Media perakaran diperkaya dengan 20 ppm BAP dan AgNO₃ cukup efektif untuk menginduksi perakaran tanaman jarak. Penelitian Pan *et al.* (2010) hanya mendapat satu planlet dari 120 tunas *in vitro*. Kajikawa *et al.* (2012) telah memperbaiki sistem transformasi genetik pada *J. curcas* dengan efisiensi mencapai 4,3% yang menggunakan *bispyribac* sebagai bahan penyeleksi.

Tabel 2. Jumlah tunas dari masing-masing aksesori *J. curcas* tanpa perlakuan *Agrobacterium* dan tunas terduga transgenik.

| | Jumlah Eksplan | Jumlah Kalus | Jumlah Tunas | Rata-rata tunas/eksplan |
|------------------|----------------|--------------|--------------|-------------------------|
| Kontrol IP 3A | 54 | 32 | 62 | 1,94 |
| Kontrol IP 3M | 56 | 43 | 67 | 1,56 |
| Kontrol IP 2P | 54 | 36 | 49 | 1,36 |
| Transgenik IP 3A | 150 | 96 | 24 | 0,25 |
| Transgenik IP 3M | 164 | 114 | 18 | 0,16 |
| Transgenik IP 2P | 177 | 103 | 17 | 0,17 |



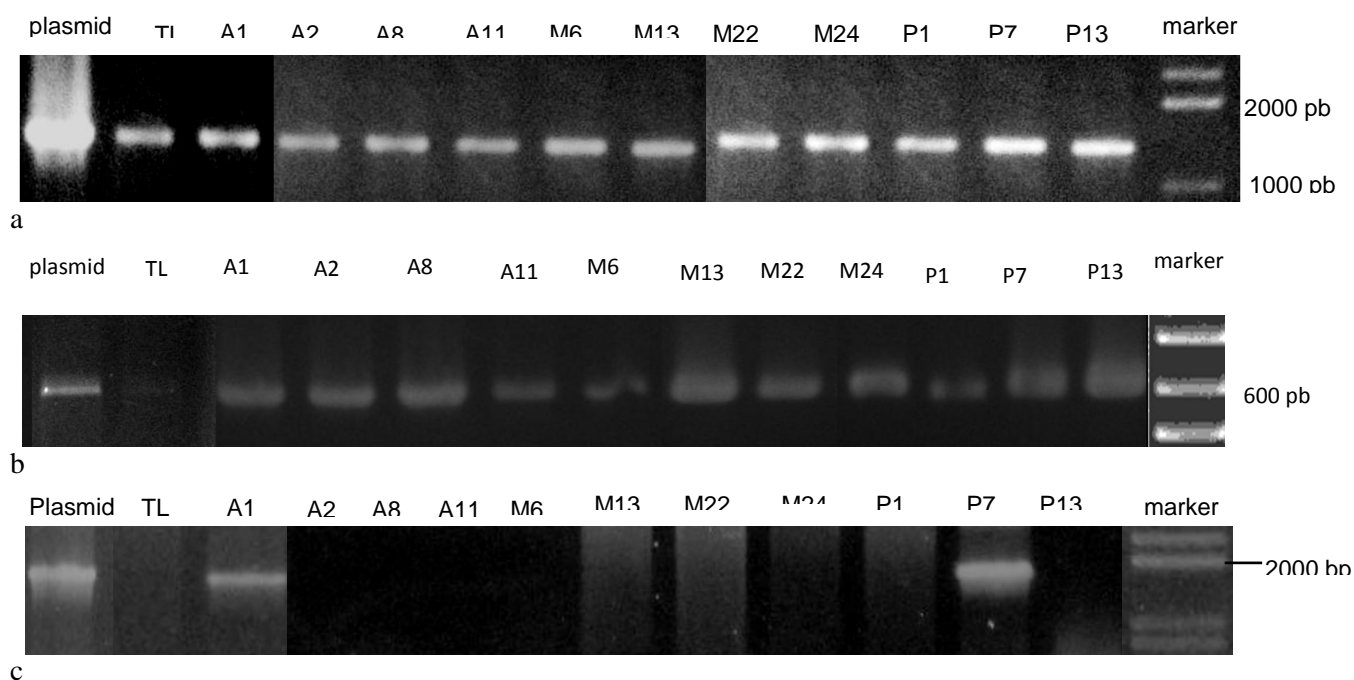
Gambar 6. Proses introduksi gen *PaCS* ke *J. curcas* dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Infeksi eksplan kotiledon dengan *A. tumefaciens* (a). Kokultivasi eksplan dengan *A. tumefaciens* selama 3 hari (b). Induksi kalus menggunakan media MIK yang mengandung 200 ppm cefotaksim (c), di kondisi gelap. Induksi tunas menggunakan media MIK dengan agen seleksi 20 µg/ml kanamisin (d). Pemanjangan tunas di media yang mengandung 0,5 ppm GA₃ (e). Induksi pengakaran menggunakan media yang mengandung 20 ppm IBA (f).

Analisis Integrasi Gen *hpt* dan Promoter-*PaCS* di dalam Genom Tanaman Transgenik

Konfirmasi tanaman yang lolos seleksi dari kanamisin dilakukan dengan menggunakan primer gen *PaCS*, primer spesifik ketahanan higromisin dan primer kombinasi 35S CaMV

forward dengan *PaCS* reverse. Planlet yang diuji sebanyak 27 planlet transgenik yaitu 12 tunas IP 3A, 15 tunas dari IP 3M, dan 11 tunas IP 2P. Primer spesifik gen *PaCS* menunjukkan bahwa semua tunas menghasilkan pita berukuran 1300 pb termasuk tipe liarnya. Diduga *J. curcas* mempunyai gen famili sitrat sintase yang sekuennya mirip dengan *PaCS* (Gambar 7 a). PCR menggunakan primer spesifik gen *hpt* menunjukkan 4 planlet IP 3A, 4 planlet IP 3M dan 3 planlet IP 2P mengandung gen *hpt* yang berukuran 600 pb, sedangkan tipe liar (TL) tidak

mempunyai gen tersebut (Gambar 7 b). Karena posisi gen *hpt* di sisi kiri (*up stream*) dari *npt* di dalam T-DNA maka dipastikan bahwa eksplan-eksplan tersebut mengandung gen ketahanan terhadap kanamisin. Analisis PCR terhadap eksplan yang mengandung *PaCS* menggunakan kombinasi primer 35S CaMV F dengan primer *PaCS* R menunjukkan bahwa hanya ada dua eksplan yang mengandung gen *PaCS* yaitu A1 dan P7 (Gambar 7 c). Jumlah tanaman transgenik *PaCS* yang diperoleh jika dibandingkan dengan jumlah kalus yang lolos seleksi kanamisin hanya berkisar 1%.



Gambar 7. Hasil PCR terhadap tunas transgenik yang terdiri 4 galur IP 3A, 4 galur IP 3M dan 3 galur dari IP 3P. PCR menggunakan primer spesifik gen *PaCS*, semua galur menghasilkan pita 1300 pb (a), menggunakan primer *hpt* menghasilkan semua galur transgenik mengandung gen resistensi antibiotik higromisin (b), dan menggunakan primer promotor 35S CaMV forward dan *PaCS* reverse menghasilkan pita berukuran 1650 pb hanya pada 2 galur yang transgenik yaitu A1 dan P7 (c).

KESIMPULAN

Gen *PaCS* berhasil diintroduksi ke dalam genom tanaman *Nicotiana tabacum* dan *J. curcas* dengan bantuan *A. tumefaciens*. Tanaman tembakau transgenik *PaCS* di bawah kendali promotor 35S CaMV dapat mengurangi penyerapan aluminium ke dalam akar sehingga meningkatkan toleransinya terhadap cekaman Al. Gen tersebut diturunkan ke generasi berikutnya mengikuti hukum Mendel. Introduksi gen *PaCS* ke *J. curcas* masih rendah yaitu 1% dari total eksplan

yang ditransformasi. Introduksi gen pelapor *hpt* tidak selalu diikuti introduksi gen target *PaCS*.

DAFTAR PUSTAKA

Anggraito YU. 2012. Transformasi genetik *Nicotiana bentamiana* L. dan kedelai dengan gen *MaMt2* penyandi metalothionein tipe II dari *Melastoma malabathricum* L. [Disertasi]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Anoop VM, Basu U, McCammon MT, McAlister-Henn L, Taylor GJ. 2003. Modulation of citrate metabolism alters aluminium tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol* 132: 2205-2217.
- Barone P, Rosellini D, LaFayette P, Bouton J, Veronesi F, Parrott W. 2008. Bacterial citrate synthase expression and soil aluminum tolerance in transgenic alfalfa. *Plant Cell Rep* 27: 893-901.
- Boscolo PRS, Menossi M, Jorge RA. 2003. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochem* 62: 181-189.
- Buch AB, Archana G, Naresh-Kumar G. (2008). Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* P4 under phosphorus deficiency. *Res Microbiol* 159: 635-642.
- Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ. 2003. Phenazine and their role in bicontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol* 157: 503-523.
- de la Fuente JM, Ramire-Rondriguez V, Cabrera-Ponce JL, Harrere-Estrell L. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plant by alteration of citrate synthesis. *Science* 276: 1566-1568.
- Delhaize E, Craig S, Beaton CD, Bennet RJ, Jagadish VC, Randall PJ. 1993. Aluminum tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L). I. Uptake and distribution of Aluminum in root apices. *Plant Physiol* 103: 685-693.
- Delisle G, Champoux M, Houde M. 2001. Characterization of oxalate oxidase and cell death in Al-sensitive and tolerant wheat roots. *Plant Cell Physiol* 42(3): 324-333.
- Deng W, Luo K, Li Z, Yang Y, Hu N, Wu H. 2009. Overexpression of *Citrus junos* mitochondrial citrate synthase gene in *Nicotiana benthamiana* confers aluminum tolerance. *Planta* 230(2): 355-365.
- Hannum S. 2012. Ispolasi, pengklonan, dan analisis ekspresi gen penyandi copper-zinc superoxide dismutase (CuZn-SOD) dari *Melastoma malabathricum* L. [Disertasi]. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hassett DJ, Woodruff WA, Wozniak DJ, Vasil ML, Cohen MS, Ohman DE. 1993. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* genes encoding manganese- and iron- cofactored superoxide dismutase: Increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. *J of Bacteriol* : 7668-7665.
- Kajikawa M, Morikawa K, Inoue M, Widyastuti U, Suharsono S, Yokota A, Akashi K. 2012. Establishment of biopyribac selection protocols for *Agrobacterium tumefaciens* dan *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the oil seed plant *Jatropha curcas*. *Plant Biothechnol* 29: 145-153
- Kochian LV, Pence NS, Letham DLD, Pineros MA, Magahaes JV, Hoekenga OA, Garvin DF. 2002. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. *Plant and Soil* 247: 109-119.
- Koyama H, Kawamura A, Kihara T, Hara T, Takita E, Shibata D. 2000. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on phosphorous limited soil. *Plant Cell Physiol* 41: 1030-1037.
- Lemire J, Mailloux R, Auger C, Whalen D, Appana VD. 2010. *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminum toxicity. *Envir Microb* 12(6): 1384-1390.
- Li M, Li H, Jiang H, Pan X, Wu X. 2007. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated cotyledone disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tiss Org Cult* :173-181.
- Ma J F, Nagao S, Sato K, Ito H, Furukawa J, Takeda K. (2004). Molecular mapping of a gene responsible for Al-activated secretion of citrate in barley. *J Exp Bot* 55: 1335-1341.
- Mailloux RJ, Lemire J, Kalyuzhnyi S, Appanna V. 2008. A novel metabolic network leads to enhanced citrate biogenesis in *Pseudomonas*

fluorescens exposed to aluminum toxicity. *Extremophiles* 12: 451-459.

Makkar HPS, Becker K. 2009. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added cproducts. *Eur J Lipid Sci technol* 111: 773-787

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol* 15: 473-497.

Pan J, Fu Q, Xu ZF. 2010. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of biofuel plant *Jatropha curcas* using kanamycin selection. *Afric J Biotec* 2(39): 6477-6481.

Poschenrieder C, Gunse B, Corrales I, Barchelo J. 2008. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Sci of the Tot Envir*: 356-368.

Ryan PR, Ditamaso JM, Kochian LV. 1993. Aluminum toxicity in root: an investigation of spatial sensitivity and of the root cap. *J Exp Bot* 44: 437-446.

Tamas L, Budikova S, Simonovicova M, Huttova J, Siroka B, Mistrik I. 2006. Rapid and simple method for Al-toxicity analysis in emerging barley roots during germination. *Biol Plant* 50(1): 87-93.

Xue YJ, Xie FL, Yang ZM. 2006. Negative regulation of aluminum-responsive citrate efflux from roots of *Cassia tora* by an anion channel antagonist. *Bot Stud* 47: 137-144.

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Devi SR, Rikiishi S, Matsumoto H. 2002. Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and production reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiol* 128:63-72.

Yamamoto Y, Kobayashi Y, Matsumoto H. 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol* 125:199-208.