

Introgresi Gen *CsNitr1-L* dari Transgenik Nipponbare ke Ciherang dan Analisis Pewarisannya pada Generasi BC3F4

Introggression of CsNitr1-L Transgene from Transgenic Nipponbare to Ciherang and Analysis of Its Inheritance in the BC3F4

Nazarudin¹, Suharsono², dan Sustiprijatno^{1*}

¹Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-BIOGEN),
Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Cimanggu, Bogor, Indonesia

²Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) Institut Pertanian Bogor IPB,
Jl. Kamper, Gd. PAU IPB Darmaga, Bogor, Indonesia

Diterima 25 Maret 2014/Disetujui 22 Agustus 2014

ABSTRACT

CsNitr1-L gene is a gene encoding nitrites transporter and is included in the group of proton oligopeptide transporter (POT) gene family. The absorption of nitrites by plants expressing this transporter becomes efficient. The gene encoding this protein (CsNitr1-L) under the control of 35S CaMV Promoter had been introduced into rice plants (Oryza sativa L.) subspecies japonica cv. Nipponbare to transfer this gene. The japonica transgenic rice had been crossed with Ciherang variety followed by back-cross and self polination until BC3F4 generation. The aim of this study was to analyse introgression of CsNitr1-L gene in the transgenic rice BC3F4 generation. The transgenic rice plants in BC3F4 generation were selected based on the resistance to hygromycin. More than 90% population of BC3F4 are putative introgression rice lines carrying the transgene. The introgression of the transgene were indirectly confirmed by PCR analysis using primer corresponding to hpt gene. The yield of introgression line was higher than these of original Ciherang cultivar. Four introgression lines (G3, G7, G8 and G11) that had higher yield were analysed by PCR. Result of the analysis showed that these four transgenic plants carried the introgression.

Keywords: proton oligopeptide transporter, nitrites transporter, efficient nitrogen, transgenic rice

ABSTRAK

Gen CsNitr1-L adalah gen yang menyandikan nitrit transporter dan termasuk dalam kelompok proton oligopeptide transporter (POT). Penyerapan nitrit oleh tanaman yang mengekspresikan transporter ini menjadi efisien. Gen yang menyandikan protein ini (CsNitr1-L) di bawah kontrol promotor 35S CaMV telah diintroduksi ke tanaman padi (Oryza sativa L.) subspecies japonica cv. Nipponbare untuk mentransfer gen ini padi transgenik japonica telah disilangkan dengan varietas Ciherang diikuti dengan silang balik dan menyerbuk sendiri sampai generasi BC3F4. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis introgresi gen CsNitr1-L di dalam tanaman padi transgenik generasi BC3F4. Tanaman padi transgenik generasi BC3F4 dipilih berdasarkan ketahanan terhadap higromisin. Lebih dari 90% dari populasi BC3F4 adalah tanaman padi transgenik putatif. Transgen yang terintrogresi dikonfirmasi dengan analisis PCR menggunakan primer yang sesuai dengan gen hpt. Hasilnya galur introgresi lebih tinggi daripada kultivar Ciherang. Empat galur introgresi G3, G7, G8, G11, berdasarkan produktivitas tertinggi dianalisis dengan PCR. Hasil analisis menunjukkan bahwa empat tanaman transgenik ini membawa transgen introgresi CsNitr1-L.

Kata kunci: proton oligopeptide transporter, nitrit transporter, efisien nitrogen, padi transgenik

PENDAHULUAN

Upaya peningkatan produksi padi saat ini memiliki berbagai kendala, seperti konversi lahan sawah, perubahan iklim dan penurunan kualitas sumberdaya lahan yang berdampak terhadap penurunan produktivitas (Pramono *et al.*, 2005; Wangiyana *et al.*, 2008; Azwir dan Ridwan,

2009). Petani memberikan tambahan pupuk untuk meningkatkan produktivitas padi terutama pupuk nitrogen. Kondisi sawah dengan penggenangan untuk menanam padi dapat mengakibatkan hilangnya unsur hara nitrogen karena terlarut, menguap dan mengalami denitrifikasi, sehingga sebagian besar dari jumlah pupuk nitrogen yang diaplikasikan di lahan sawah tidak dapat diserap tanaman secara optimal (Ikhwan, 2012).

Tanaman mengambil nitrogen dalam bentuk NH_4^+ (amonium) dan NO_3^- (Yao-Hong *et al.*, 2007). Alur asimilasi

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: susti11@yahoo.com

nitrat memperlihatkan bahwa pertama kali nitrat direduksi menjadi nitrit oleh enzim nitrat reduktase di dalam sitoplasma, kemudian nitrit direduksi menjadi amonium oleh enzim nitrit reduktase di dalam kloroplas (Mokhele *et al.*, 2012). Amonium yang dihasilkan merupakan bahan dasar untuk metabolisme protein. Nitrit adalah produk antara yang sangat penting tetapi dapat meracuni tanaman, sehingga keberadaannya di sitoplasma harus sesedikit mungkin atau secepatnya ditranslokasikan ke organel lain (Sugiura *et al.*, 2007; Tsay *et al.*, 2007). Nitrit di sitoplasma dapat ditransfer dengan cepat oleh protein transporter nitrit menuju kloroplas, sehingga akumulasi nitrit dalam sitoplasma dapat dikurangi.

Tanaman padi memiliki transporter nitrit namun tidak aktif (Sustiprijatno *et al.*, 2006; Pertiwi, 2010). Asimilasi nitrat pada tanaman terjadi di akar dan daun (Nasholm *et al.*, 2009). Nitrat akan disimpan pada vakuola akar atau akan ditransfer ke mesofil daun. Akan tetapi, sebelumnya nitrat akan direduksi terlebih dahulu menjadi nitrit di sitosol, kemudian direduksi lagi menjadi NH₄⁺ di dalam kloroplas (Sugiura *et al.*, 2007).

Sustiprijatno *et al.* (2006) telah berhasil memodifikasi proses transfer nitrit dari sitosol ke kloroplas pada tanaman padi *Oryza sativa* L. *japonica* cv. Nipponbare dengan memasukkan gen *Nitr1-L* yang berasal dari tanaman ketimun (*Cucumis sativus* L., *CsNitr1-L*). Gen *CsNitr1-L* merupakan gen yang menyandi transporter nitrit dan termasuk dalam kelompok *proton oligopeptide transporter* (POT). Nitrit di sitoplasma dapat dipindahkan dengan cepat oleh gen transporter nitrit menuju kloroplas, sehingga penyerapan nitrat oleh tanaman padi menjadi semakin besar. Tanaman padi transgenik yang membawa transgen *CsNitr1-L* telah disilangkan dengan padi varietas Ciherang kemudian disilang balik (*back-cross*) 3 kali dengan varietas Ciherang yang digunakan sebagai tetua betina. Hasil silang balik diperlakukan menyerbuk sendiri sampai generasi F4. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menganalisis pewarisan gen *CsNitr1-L* pada tanaman padi Ciherang transgenik generasi F4 dari silang balik ke tiga (BC3F4) melalui analisis antibiotik higromisin untuk memisahkan tanaman yang diduga membawa gen *hpt*, kemudian analisis fenotipe digunakan untuk mendapatkan tanaman yang memiliki produktifitas yang tinggi, dan analisis molekuler digunakan untuk memastikan keberadaan gen *CsNitr1-L* terintrogressi pada galur tanaman padi BC3F4.

BAHAN DAN METODE

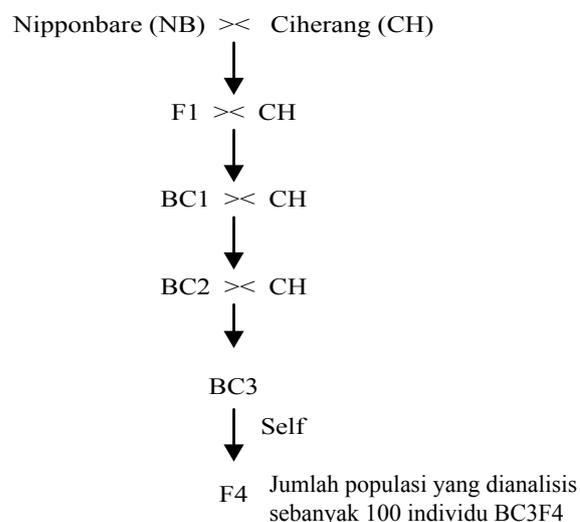
Penelitian ini dilakukan mulai bulan April sampai dengan Agustus tahun 2012 di Laboratorium Biologi Molekuler dan Rumah Kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik (BB BIOGEN), Badan Litbang Pertanian, Bogor. Penelitian ini menggunakan benih padi galur Ciherang introgressi generasi F4 dari hasil silang balik ketiga (BC3F4) antara varietas Ciherang dan varietas Nipponbare transgenik yang membawa transgen *CsNitr1-L* (Gambar 1).

Higromisin digunakan untuk menguji ketahanan kecambah padi galur introgressi Ciherang BC3F4, sehingga diperoleh kecambah yang toleran terhadap higromisin. Kecambah yang toleran terhadap higromisin kemudian dianalisis secara molekuler dengan menggunakan primer oligonukleotida HPT-F (5'GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG3') dan HPT-R (5'GCATCTCCCGCCGTGCAC3'). Amplifikasi PCR menggunakan primer oligonukleotida 35S-F 'GAGAGAAAGCTTCATGGAGTCAAAGATTCAA3') dan *CsNitr1-L-R* (5'ATAGATGATGGAGGCGATGG3') digunakan untuk memastikan keberadaan gen *CsNitr1-L* yang terintegrasi dalam genom padi hasil introgressi. Primer Aktin-F (5'TCCATCTTGCCATCTCTCA3') dan primer Aktin-R 5'GTACCCGCATCAGGCATC3' digunakan sebagai kontrol internal tanaman padi untuk memastikan DNA yang digunakan mempunyai kualitas yang baik untuk PCR.

Seleksi Kecambah BC3F4 dengan Higromisin

Benih padi BC3F4 yang akan digunakan dikeringkan di dalam inkubator pada suhu 45 °C selama 2 hari. Benih-benih tersebut kemudian disterilisasi dengan perendaman dalam etanol 70% selama 1 menit dan pada larutan pemutih/bleach 30% (konsentrasi akhir *sodium hypochlorite* NaOCl 2%) + tween selama 1 jam. Benih kemudian dibilas lima kali dengan akuades steril. Seratus benih BC3F4 yang telah disterilkan kemudian ditumbuhkan selama tiga minggu di media MS0 dengan penambahan 50 mg L⁻¹ antibiotik higromisin untuk mendapatkan bibit yang tahan higromisin. Sebagai kontrol efektivitas media seleksi, 100 benih padi varietas Ciherang ditanam di media selektif yang sama.

Kecambah padi yang tumbuh dipindahkan ke cawan petri baru dengan media air selama 1 minggu, kemudian dipindah ke bak kecil berupa media tanam tanah selama 2 minggu. Selanjutnya, bibit padi yang pertumbuhannya baik dipindah ke media ember berisi tanah, yang telah dianalisis



Gambar 1. Asal usul padi Ciherang BC3F4

terlebih dahulu untuk mengetahui kandungan N-totalnya. Bobot tanah yang digunakan sebagai media tumbuh adalah 10 kg. Setiap ember ditanami satu bibit. Setiap genotipe pada setiap dosis pemupukan terdiri atas dua bibit.

Perlakuan Pupuk

Tanaman padi introgresi BC3F4 dan padi cv. Ciherang yang telah dipindahkan ke ember diberi pupuk dasar TSP 100 kg ha⁻¹ dan KCl 100 kg ha⁻¹ pada saat tanam. Pupuk urea diberikan sebagai perlakuan dengan empat taraf yaitu 0, 50, 100, dan 150 kg ha⁻¹. Urea diberikan 3 kali yaitu 25% dosis pada saat tanam, 25% dosis pada saat berumur 4 MST, dan 50% dosis ketika memasuki masa pembungaan.

Analisis Fenotipe

Fenotipe yang diamati meliputi tinggi tanaman, jumlah anakan tiap rumpun, jumlah biji per malai dan berat biji tiap rumpun. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan metode sidik ragam.

Isolasi DNA Tanaman

Isolasi DNA tanaman padi BC3F4 maupun kontrol (cv. Ciherang) menggunakan prosedur Doyle dan Doyle (1990) yang menggunakan buffer CTAB. Sebanyak 0.5 g daun padi digerus dengan nitrogen cair hingga membentuk serbuk, kemudian ditambah 600 µl larutan buffer CTAB (CTAB, PVP, β-merkaptotanol) dan 1/10 volume Na asetat di dalam tabung mikro. Tabung mikro yang berisi suspensi sel dan DNA diinkubasi pada suhu 65 °C selama 30 menit dan diinkubasi di dalam air es selama 5 menit, ditambah 1x volume chloroform-isoamil alkohol (24:1), dibolak-balik agar tercampur dan disentrifugasi dengan kecepatan 11,000 g selama 15 menit.

Fase cairan yang terdapat di atas suspensi dipindahkan ke tabung mikro baru, ditambahkan 1/10 volume Na asetat, isopropanol dingin 2/3 volume dan 2 x volume etanol absolute (98%) lalu dibolak-balik sebentar agar tercampur, kemudian disimpan di air es selama 15 menit. Tabung disentrifugasi lagi dengan kecepatan 11,000 g cairan yang ada di tabung dibuang dan endapan yang terbentuk ditambah etanol 70% kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 11,000 g selama 5 menit, selanjutnya etanol 70% dibuang dari tabung mikro dan endapan yang ada dikeringkan dengan vakum selama 5 menit, lalu dilarutkan dengan TE (Tris-HCl; EDTA) 50 µl buffer dan diberi perlakuan 1 µl RNAse. Suspensi DNA kemudian di inkubasi 37 °C selama 30 menit. Kualitas dan kuantitas DNA yang diisolasi selanjutnya diukur dengan nanodrop.

Analisis Gen *hpt* dan *CsNitr1-L* dengan PCR

DNA padi BC3F4 maupun cv. Ciherang yang telah diisolasi selanjutnya dianalisis dengan PCR menggunakan metode Sambrook dan Russel (1989). Kondisi PCR yang digunakan untuk analisis gen *hpt* adalah pra PCR 94 °C selama 5 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, *annealing*

65 °C selama 30 detik, *extension* pada suhu 72 °C selama 30 detik, seluruh rangkaian dilakukan selama 35 siklus dan diakhiri dengan pasca PCR pada suhu 72 °C selama 5 menit. Kondisi PCR yang digunakan untuk analisis gen *CsNitr1-L* adalah pra PCR 95 °C selama 4 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55 °C selama 45 detik, *extension* pada suhu 72 °C selama 1 menit, seluruh rangkaian dilakukan sebanyak 30 siklus, diakhiri dengan pasca PCR pada suhu 72 °C selama 5 menit. Hasil PCR di elektroforesis pada gel agarose 1% dengan voltase 75 volt selama 45 menit. Selanjutnya, gel direndam dengan larutan etidium bromida (0.5 mg L⁻¹) selama 10 menit dan di air selama 7 menit. Visualisasi pita DNA di gel dilakukan pada gel doc dengan UV *transiluminator*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi Kecambah Padi dengan Antibiotik Higromisin

Hasil seleksi terhadap kecambah dalam media dengan penambahan higromisin menunjukkan bahwa rata-rata kecambah yang resisten adalah di atas 90%, yaitu kecambah G3 96%, G7 93%, G8 91%, dan G11 98%. Pengamatan pada media selektif yang sama menunjukkan tidak satupun kecambah dari tanaman padi varietas Ciherang yang berkecambah (Tabel 1). Semua kecambah padi cv. Ciherang tumbuh normal pada media non-selektif yang merupakan media MS0 tanpa higromisin (Gambar 2). Penelitian yang sama dilakukan oleh Hanum (2011) pada tembakau, Anggraito (2012) pada kedelai, Sianturi (2012) pada padi, menunjukkan bahwa media selektif MS0 dengan penambahan 50 mg l⁻¹ higromisin mampu membedakan tanaman transgenik dari tanaman non-transgenik.

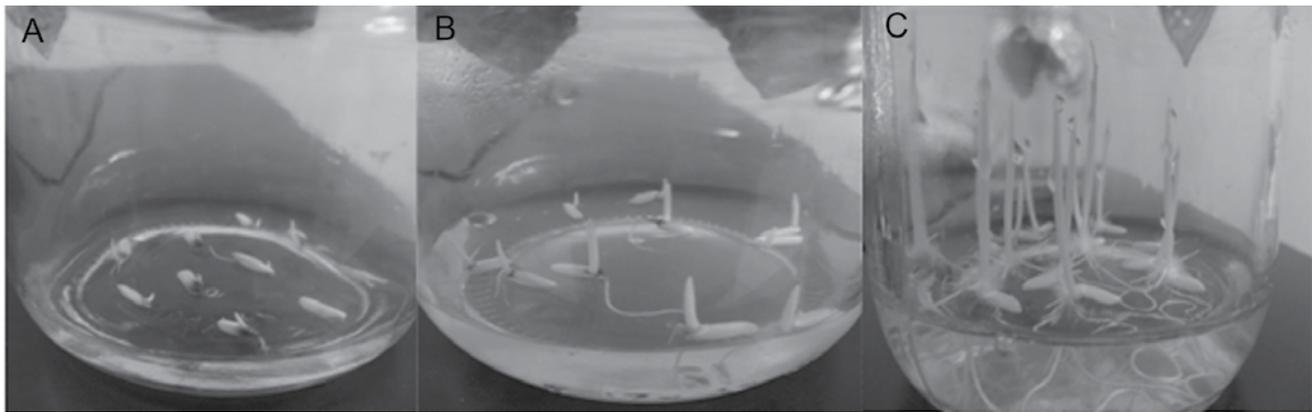
PCR dengan primer HPT-F dan HPT-R menghasilkan amplifikasi sebesar 516 pasang basa (pb) yang sesuai dengan daerah *hpt* yang diapit oleh kedua primer tersebut. PCR terhadap tanaman padi Ciherang non transgenik dengan primer yang sama dan kondisi yang sama tidak menghasilkan amplifikasi DNA (Gambar 3). Hasil ini mengkonfirmasi bahwa tanaman yang resisten higromisin tersisipi gen *hpt*.

Tinggi Tanaman Padi

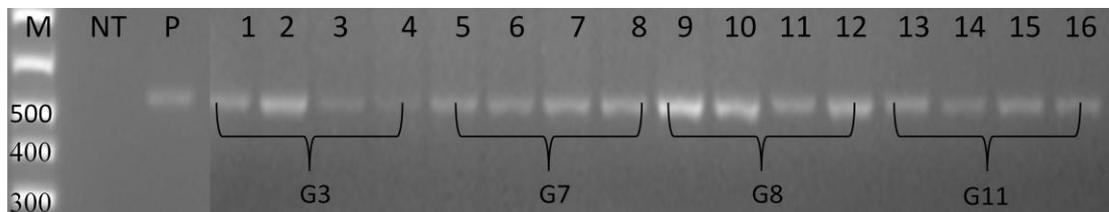
Pertumbuhan tanaman padi tidak lepas dari peran unsur hara terutama unsur Nitrogen (N). Masa vegetatif

Tabel 1. Seleksi ketahanan benih padi BC3F4 dan padi cv. Ciherang terhadap higromisin

Genotipe	Jumlah biji awal	Resisten higromisin	Persentase
G3	100	96	96%
G7	100	93	93%
G8	100	91	91%
G11	100	98	98%
Ciherang	100	0	0%



Gambar 2. Perkecambah padi pada media selektif MS0 dengan penambahan 50 mg L⁻¹ antibiotik higromisin dan pada media non-selektif MS0 yang tidak mengandung higromisin umur 2 minggu. (A) Kecambah padi cv. Ciherang pada media selektif, (B) Kecambah padi introgesi BC3F4 pada media selektif, (C) Kecambah padi cv. Ciherang pada media non selektif



Gambar 3. Hasil PCR dengan kombinasi primer HPT-F dan primer HPT-R untuk amplifikasi gen *hpt*. M = marka DNA 1 Kb ladder; P = Plasmid yang mengandung gen *hpt*; NT = padi Ciherang non transgenik; 1-16 = galur padi introgesi BC3F4 G3, G7, G8, dan G11 dari BC3F4

awal tanaman padi membutuhkan unsur N yang tinggi untuk pertambahan biomas dan pembentukan tajuk tanaman serta pengisian biji (Tegeder dan Rentsch, 2010).

Tanaman BC3F4 pada tingkat pemupukan urea yang sama, mempunyai tinggi yang tidak berbeda nyata dengan tanaman cv. Ciherang (Tabel 2). Pertumbuhan dari tanaman padi pada galur-galur tersebut di pengaruhi oleh karakter yang kuat dari tetua asalnya yaitu Ciherang (Gardner *et al.* 1991).

Jumlah Anakan Tiap Rumpun

Jumlah anakan tiap rumpun tanaman BC3F4 tidak berbeda nyata dengan tanaman cv. Ciherang pada perlakuan

dosis 0 dan 100 kg urea ha⁻¹, pada dosis 50 dan 150 kg urea ha⁻¹, tanaman transgenik dan non-transgenik juga tidak berbeda nyata namun G3 (50 dan 150 kg urea ha⁻¹) dan G11 (150 kg urea ha⁻¹) berbeda nyata dibandingkan dengan Ciherang (Tabel 3). Tingginya jumlah anakan pada G3 dan G11 mungkin disebabkan adanya gen transporter nitrit yang berperan dalam meningkatkan proses asimilasi nitrat lebih baik dari galur transgenik lainnya meski dalam kondisi tergenang.

Jumlah Biji Tiap Malai

Tanaman BC3F4 (G3, G7, G8, dan G11) menghasilkan jumlah biji tiap malai yang lebih tinggi pada setiap dosis yang

Tabel 2. Pengaruh genotipe terhadap tinggi tanaman pada setiap taraf pemupukan urea

Genotipe	Pupuk urea (kg ha ⁻¹)			
	0	50	100	150
G3	99.0	101.0	106.0a	110.0
G7	94.5	97.0	98.5ab	113.5
G8	93.0	92.5	92.5b	106.5
G11	94.0	94.5	100.5a	109.0
Ciherang	100.0	100.5	102.5a	105.5

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada α = 5%

Tabel 3. Perbedaan jumlah anakan tiap rumpun berbagai genotipe padi pada setiap pemupukan urea

Genotipe	Pupuk Urea (kg ha ⁻¹)			
	0	50	100	150
G3	5.5	19.0a	12.0	24.0a
G7	4.0	13.0b	13.0	12.0b
G8	7.5	7.5c	15.5	18.0b
G11	11.5	16.0ab	18.5	27.5a
Ciherang	13.5	10.0bc	11.0	12.0b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada $\alpha = 5\%$

diberikan dibandingkan dengan tanaman cv. Ciherang (Tabel 4). Hal ini diduga fungsi dari gen *CsNitr1-L* pada tanaman BC3F4 memacu pembentukan biji. Gen transporter nitrit ini bekerja langsung mentransfer bentuk-bentuk nitrogen yang diserap ke dalam kloroplas untuk pembentukan malai. Akan tetapi, pembentukan biji pada malai padi cv Ciherang terjadi secara alami karena tidak ada sisipan gen *CsNitr1-L*. Penelitian yang sama dilakukan oleh Limbongan *et al.* (2009) menunjukkan bahwa jumlah gabah dipengaruhi oleh galur dan pemupukan. Selanjutnya Suhartatik *et al.* (2007) menjelaskan bahwa asimilat yang dihasilkan lebih banyak di alokasikan untuk pembentukan gabah.

Berat Biji Tiap Rumpun

Rata-rata produksi biji tiap rumpun tanaman padi BC3F4 lebih tinggi daripada tanaman cv. Ciherang. Di

antara tanaman BC3F4, G3 dan G11 mempunyai produksi biji yang lebih tinggi dari pada galur BC3F4 lainnya (Tabel 5). Tingginya produksi biji tanaman BC3F4 kemungkinan disebabkan oleh transporter nitrit yang disandi oleh gen *CsNitr1-L* yang berada pada tanaman BC3F4 mengalokasikan sebagian besar asimilat yang terbentuk (*source*) maupun yang tersimpan (*sink*) untuk pengisian biji. Hasil penelitian Ning *et al.* (2009) menunjukkan hasil fotosintat lebih banyak terdistribusikan ke pembentukan malai dan pengisian biji. Asimilat yang dikumpulkan dengan cepat oleh tanaman BC3F4 dengan adanya gen *CsNitr1-L* digunakan untuk pembentukan biji sehingga berat biji rata-rata tanaman BC3F4 lebih tinggi dari tanaman cv. Ciherang. Hal ini dijelaskan oleh Pertiwi (2010) secara molekuler bahwa tanaman BC3F3 yang membawa gen *CsNitr1-L* mengekspresikan enzim transporter nitrit lebih tinggi dibandingkan tanaman cv. Ciherang.

Tabel 4. Pengaruh genotipe terhadap jumlah biji tiap malai pada setiap taraf pemupukan urea

Genotipe	Pupuk Urea (kg ha ⁻¹)			
	0	50	100	150
G3	83.8ab	91.3	102.5	112.1b
G7	71.8ab	91.0	127.8	131.8a
G8	84.0ab	85.6	133.5	133.6a
G11	96.3a	109.6	122.3	135.3a
Ciherang	61.1b	66.5	101.6	105.5b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada $\alpha = 5\%$

Tabel 5. Pengaruh genotipe terhadap berat biji (g) tiap rumpun pada setiap taraf pemupukan urea

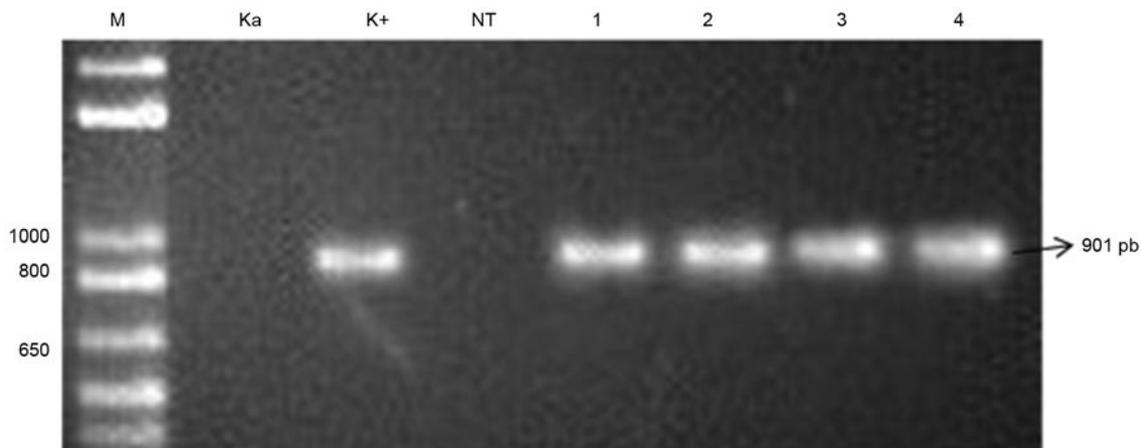
Genotipe	Pupuk Urea (kg ha ⁻¹)			
	0	50	100	150
G3	17.3	39.5	41.2ab	57.83a
G7	18.7	22.4	34.7abc	41.27ab
G8	15.5	18.2	24.6bc	49.41ab
G11	17.2	33.7	47.9a	58.74a
Ciherang	9.2	17.0	17.0c	34.75b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada $\alpha = 5\%$

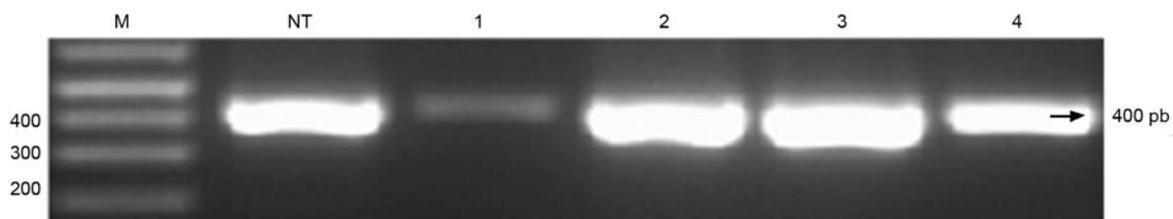
Analisis Integrasi Gen CsNitr1-L

Empat galur yang berbeda yang mempunyai produksi yang paling tinggi diambil untuk dianalisis dengan PCR. Hal ini dilakukan untuk mengetahui adanya gen *CsNitr1-L* pada generasi BC3F4. Analisis PCR dengan pasangan primer 35S CaMV dan primer *CsNitr1-LR* terhadap 4 tanaman menunjukkan bahwa keempat tanaman tersebut membawa fragmen berukuran 901 pasang basa (pb). DNA dari tanaman cv. Ciherang tidak menghasilkan amplifikasi

sebesar 901 pb dengan kondisi PCR yang sama (Gambar 4). Seluruh tanaman baik tanaman BC3F4 maupun cv. Ciherang dapat menghasilkan fragmen sebesar 400 pb, dengan primer yang dapat mengamplifikasi gen aktin (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa seluruh DNA dari tanaman yang dianalisis memiliki kualitas dan kuantitas yang baik dan menunjukkan ampikon yang berukuran sekitar 901 pb adalah fragmen yang terdiri atas promotor 35S CaMV dan gen *CsNitr1-L*. Hasil ini menunjukkan bahwa transgen *CsNitr1-L* diwariskan ke generasi BC3F4.



Gambar 4. Hasil PCR dengan kombinasi primer 35S-F dan *CsNitr1-L-R*. M = marka DNA (1 Kb ladder plus); Ka = Kontrol air; K+ = Nipponbare transgenik 4.1; NT = varietas Ciherang non transgenik; 1-4 = galur introgesi G3, G7, G8, G11



Gambar 5. Hasil amplifikasi PCR terhadap DNA tanaman padi menggunakan pasangan primer aktin-F dan primer aktin-R. M = marka DNA (1 kb ladder); NT = tanaman padi cv. Ciherang; 1-4 = galur introgesi G3, G7, G8, G11

KESIMPULAN

Seleksi resistensi padi introgesi populasi BC3F4 dalam media MS0 dengan penambahan hygromisin 50 mg L⁻¹ pada media MS0, menghasilkan kecambah yang resisten terhadap higromisin. Tanaman yang resisten higromisin mewarisi gen *hpt*. Pertumbuhan tanaman BC3F4 tidak berbeda nyata dengan tanaman cv. Ciherang. Tanaman transgen galur G3, G7, G8 dan G11 membawa transgen *CsNitr1-L* dibawah kendali promotor 35S CaMV dan diwariskan ke generasi BC3F4. Tanaman transgen galur G3, G7, G8 dan G11 mempunyai produktivitas yang lebih tinggi daripada tanaman cv. Ciherang.

DAFTAR PUSTAKA

Anggraito, Y.U. 2012. Genetic transformation of *Nicotiana benthamiana* L. and soybean with MaMt2 gene encoding metallothionein Type II from *Melastoma malabathricum* L. Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.

Azwir dan Ridwan. 2009. Peningkatan produktivitas padi sawah dengan perbaikan teknologi budidaya. Akta Agrosia 12:212-218.

Doyle, J.J., J.L. Doyle. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15.

- Gardner, F.P., R.B. Pearce, R.L. Mitchell. 1991. Fisiologi Tanaman Budidaya. UI Press. Jakarta.
- Hanum, S. 2011. Isolasi, pengklonan dan analisis ekspresi gen penyandi Copper-Zinc Superoxide Dismutase (Cu/Zn-SOD) dari *Melastoma malabathricum* L. Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ikhwani. 2012. The effect of submergence and N fertilizer application on plant growth and production of submerged tolerant rice variety. J. Lahan Suboptimal 1:12-21.
- Limbongan, Y.L., B.S. Purwoko, Trikosoemaningtyas, H. Aswidinoor. 2009. Respon padi sawah terhadap pemupukan nitrogen di dataran tinggi. J. Agron. Indonesia 37:175-182.
- Mokhele, B., X. Zhan, G. Yang, X. Zhang. 2012. Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. Can. J. Plant Sci. 92:1-7.
- Nasholm, T., K. Kielland, U. Ganeteg. 2009. Uptake of organic nitrogen by plants. New Phytol. 182:31-48.
- Ning, H., Z. Liu, Q. Wang, Z. Lin, S. Chen, G. Li, S. Wang, Y. Ding. 2009. Effect of nitrogen fertilizer application on grain phytic acid and protein concentrations in japonica and its variations with genotypes. J. Cereal Sci. 50:49-55.
- Pramono, J., S. Basuki, Widarto. 2005. Increasing effort of irrigated rice productivity through of integrated crop and resources approach. Agrosains 7:1-6.
- Pertiwi, N. 2010. Ekspresi gen CsNitr1-L pada padi transgenik dan pengaruhnya terhadap variasi pemupukan nitrogen. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sambrook, J., D.W. Russel. 1989. Molecular cloning : A Laboratory Manual. 3rd edition. Laboratory Pr. New York, US.
- Sianturi, R.M.D. 2012. Introduksi gen Osdep1 ke dalam tanaman padi varietas Ciherang, Nipponbare, dan Kasalath melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sugiura, M., M.N. Georgescu, M. Takahashi. 2007. A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. Plant Cell Physiol. 48:1022-1035.
- Suhartatik, E., A.K. Makarim, B. Abdullah. 2007. Respons galur padi tipe baru terhadap waktu dan jumlah pemberian pupuk nitrogen. J. Litbang Pertanian 33:649-661.
- Sustiprijatno, M. Sugiura, K. Ogawa, M. Takahashi. 2006. Improvement of nitrate- and nitrite-dependent growth of rice by the introduction of a constitutively expressing chloroplastic nitrite transporter. Plant Biotechnol. 23:47-54.
- Tegeder, M., D. Rentsch. 2010. Uptake and partitioning of amino acids and peptides. Molecular Plant 3:997-1011.
- Tsay, Y.F., C.C. Chiu, C.B. Tsai, C.H. Ho, P.K. Hsu. 2007. Nitrat transporters and peptide transporter. FEBS. Letters 581:2290-2300.
- Wangiyana, W., R.D. Pramurti, A. Wiwesyamsi. 2008. Pertumbuhan dan hasil padi cv. Ciherang antara teknik konvensional dan SRI dengan pemberian stres air ringan dan pemupukan lewat daun padi fase reproduktif. Agroteksos 18:1-3.
- Yao-Hong, Z., F. Jian-Bo, Z. Ya-Li, W. Dong-Sheng, H. Qi-Wei, S. Qi-Rong. 2007. N accumulation and translocation in four japonica rice cultivars at different N rates. Pedosphere 17:792-800.