

Karakterisasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. Var. BL) Transgenik Double Overekspresigen *SoSPS1-SoSUT1* Generasi Kedua*)

Rachmita Rafikasari¹, ParawitaDewanti², Bambang Sugiharto^{1*}

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Jember
Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember
Email: sugiharto.fmipa@unej.ac.id

ABSTRAK

Sucrose Phosphate Synthase (SPS) merupakan enzim kuncidan berperan penting dalam biosintesis sukrosa dalam tanaman. Sukrosa hasil biosintesis selanjutnya ditranslokasikan dari jaringan asal (source tissue) ke jaringan penyimpanan (sink tissue) oleh protein Sucrose transporter (SUT). Saat ini telah diperoleh tanaman tebu transgenik double over ekspresi *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi pertama yang memiliki kandungan enzim, protein dan sukrosa lebih tinggi dari kontrolnya. Salah satu kendala dalam perakitan tanaman transgenic adalah gen target tidak diwariskan ke generasi berikutnya. Melalui analisis PCR, gen target *SoSPS1* dan *SoSUT1* telah diwariskan pada generasi kedua. Gen tersebut juga dapat diekspresikan pada tingkat translasi dengan menghasilkan protein SUT dan enzim SPS yang lebih tinggi dan aktif secara fungsional. Hal tersebut dibuktikan dengan kandungan sukrosa batang dan daun pada tanaman tebu double overekspresi gen *SoSPS1-SoSUT1* rata-rata lebih tinggi daripada tanaman hasil transformasi single *SoSUT1* maupun tanaman tebu non-transformasi.

Kata Kunci: Tebu, Sucrose Phosphate Synthase, Sucrose transporter, stabilitas genetik, sukrosa batang.

PENDAHULUAN

Sukrosa merupakan produk utama fotosintesis yang dihasilkan dari proses asimilasi karbon di daun (Campbell *et al.*, 2000). *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) merupakan enzim kunci dan berperan penting dalam biosintesis sukrosa dalam tanaman tebu (Huber dan Huber, 1996). Enzim SPS mengkatalisis reaksi pada pembentukan *sucrose-6-phosphate* dari *uridine diphosphate glucose* dan *fructose-6-phosphate*. *Sucrose-6-phosphate* kemudian dihidrolisis oleh enzim *sucrose phosphate phosphatase* menjadi sukrosa (Anderson *et al.*, 1991).

Sukrosa hasil biosintesis selanjutnya ditranslokasikan dari jaringan asal (*source tissue*) ke jaringan penyimpanan (*sink tissue*) oleh protein *Sucrose transporter* (SUT). Protein SUT merupakan protein membrane sel yang diekspresikan oleh gen *SUT* (Riesmeier *et al.*, 1992). Protein tersebut berperan penting untuk memfasilitasi terjadinya translokasi sukrosa pada jaringan tanaman.

Gen *SoSPS1* tanaman tebu telah berhasil diisolasi (Sugiharto *et al.*, 1997) dan over ekspresi gen ini dapat meningkatkan aktivitas SPS dan kandungan sukrosa pada daun tanaman transgenic tembakau dan tebu (Sugiharto *et al.*, 2003; Miswar *et al.*, 2005). Hasil penelitian oleh Ningtyas (2013) telah diperoleh tanaman tebu yang telah ditransformasi dengan gen penyandi enzim *Sucrose Phosphate Synthase* dan protein *Sucrose Transporter*. Keberadaan gen *SoSPS1-SoSUT1* dalam tanaman tersebut juga telah dikonfirmasi dengan menggunakan analisis PCR. Sugiharto *et al.* (2008) menyebutkan overekspresi gen *SoSPS* dan *SoSUT* menyebabkan meningkatnya aktivitas enzim

SPS dan jumlah protein SUT. Hal tersebut menyebabkan sintesis sukrosa dan transportnya ke jaringan penyimpanan akan meningkat sehingga akumulasi sukrosa juga meningkat.

Hasil penelitian Widodo (2013) pada generasi pertama yang ditanam di greenhouse menyebutkan gen *SoSPS* dan *SoSUT* pada tanaman tebu hasil transformasi tersebut juga dapat diekspresikan pada tingkat translasi. Hal tersebut menghasilkan Protein SUT dan enzim SPS yang lebih tinggi dan aktif secara fungsional. Hal tersebut menyebabkan kandungan sukrosa batang dan daun pada tanaman tebu hasil transformasi rata-rata lebih tinggi daripada tanaman tebu non-transformasi.

Salah satu kendala dalam perakitan tanaman PRG adalah gen target tidak terintegrasi dengan stabil ke dalam kromosom tanaman inang sehingga gen tersebut tidak diwariskan ke generasi berikutnya (Christou *et al.*, 1991). Hasil analisis pada generasi pertama masih bersifat fluktuatif sehingga perlu dilakukan analisis stabilitas genetiknya pada generasi selanjutnya. Selain itu pada generasi kedua, tanaman double overekspresi gen *SoSPS1-SoSUT1* perlu ditanam pada media lapang. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah gen yang diinsersikan dapat diwariskan pada tanaman generasi kedua dan mengetahui ekspresi gen *SoSPS1-SoSUT1* dalam hubungannya dengan akumulasi sukrosa pada tanaman tebu.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan adalah tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L. varietas BL) hasil *double*

overekspresigen *SoSPSI-SoSUTI* event 212bd(1), 33ab(2), 31a(3), 31c(4), 3.4(5), 212ba(6), 32b(7), 32a(8), 212 bd(9), 26bc(10), 31b(11), 32c(12), sut2(13) dan tanaman tebu non-transformasi sebagai kontrol (*wild type*). Tanaman generasi pertama dikecambahkan kemudian ditanam di media pot dengan tanah sebanyak 25 kg.

Analisis PCR

Isolasi DNA genom dilakukan seperti metode yang disebutkan oleh Zheng (1995). Master mix Solution dicampur dengan 1 µl primer forward, 1 µl primer reverse, 7µl ddH₂O dan 1 µl DNA sampel. Primer yang digunakan untuk konfirmasi gen *SoSPSI* adalah primer *nptII* (*the neomycin phosphotransferaseII gene*)-F (5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3'), primer *nptII*-R (5'-GTCGCTTGGTCGGTCATTTTCG-3') dengan ukuran ±550 bp sedangkan untuk mengetahui konfirmasi gen *SoSUTI* adalah primer *hptII* (*the higromycin phosphotransferaseII gene*)-F (5'-TCC TGC AAG CTC CGG ATG CCT C-3'), primer *hptII*-R (5'-CGT GCA CAG GGT GTC ACG TTG C-3') dengan ukuran ±490 bp. DNA yang teramplifikasi kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada 1% gel agarose.

Penentuan Aktifitas Sukrosa Phosphate Synthase (SPS)

Aktivitas enzim SPS diuji dengan menggunakan metode seperti yang telah dilakukan oleh Sugiharto (1996). Untuk uji aktivitas enzim, supernatan hasil sentrifugasi

pada tahap ekstraksi protein terlarut dilewatkan dalam kolom kromatografi Sephadex-25. Larutan pereaksi mengandung 50mM MOP-NaOH (pH 7,5), 15mM MgCl₂ 10µl, 70 mM *fructose-6-phosphate* dan 10µl 70mM *uridine diphosphate glucose*, 10µl 70mM *glucose 6-phosphate*. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 70µl NaOH 0,5N dan divortekskemudian dipanaskan selama 10 menit pada suhu 100°C. Jumlah sukrosa yang terbentuk selama reaksi ditentukan dengan metode recorcinol.

Pengukuran Kandungan Sukrosa Daun dan Batang

Ekstraksi sukrosa daun dilakukan dengan menggerus sampel dengan nitrogen cair kemudian diberi buffer MCW (Metanol : Cloroform : Water) dengan perbandingan 12 : 5 : 3. Hasil ekstraksi dikeringkan dengan rotary evaporator dan dilarutkan dengan air distilasi. Sedangkan untuk kandungan sukrosa batang, sukrosa diekstraksi dengan menggerus 2 gr batang tebu kemudian disentrifugasi. Kandungan sukrosa diukur dengan metode recorcinol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan transformasi genetik ditentukan oleh terintegrasinya gen target ke dalam genom tanaman. Hasil analisis PCR menunjukkan terdapat 99% tanaman positif transgenik *SoSPSI*. Hal itu ditunjukkan dengan terbentuknya pita fragmen DNA dengan



Gambar 1. Rangkaian alat perengkahan

ukuran ±550 bp (*SoSPSI*) dan ±490 bp (*SoSUTI*) (Gambar 1.) sesuai dengan panjang plasmid.

Gambar 1. Elektroforesis gel agarose 1% DNA hasil PCR dengan pasangan (a) primer *nptII*-F/R dan (b) primer *nptII*-F/R. Template DNA genom tanaman tebu transgenic *double over ekspresi* gen *SoSPSI-SoSUTI*; wt :control (*wild type*).

Terbentuknya pita DNA *nptII* dengan ukuran ±550 bp dan pita DNA *hptII* dengan ukuran ±490 bp menunjukkan bahwa gen target *SoSPSI* dan gen *SoSUTI* yang berada dalam satu kaset T-DNA bersama gen *nptII* dan gen *hptII* sebagai *selectable marker* telah terinsersi ke dalam genom tanaman. Hal tersebut berarti bahwa gen target telah diwariskan pada generasi setelahnya.

Aktivitas Enzim SPS (Sucrose phosphate Synthase)

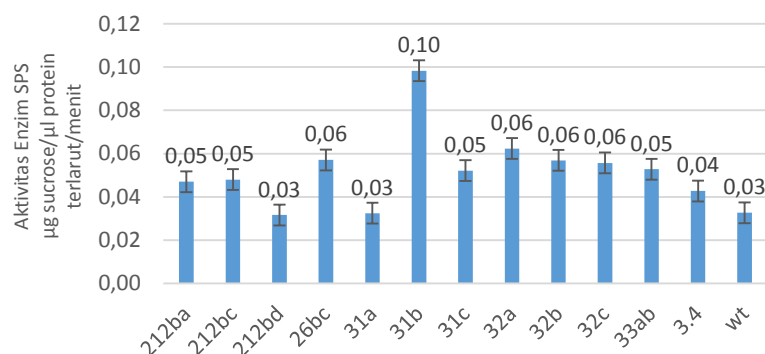
Hasil analisis aktivitas enzim pada tanaman tebu transgenic *double overekspresi SoSPSI-SoSUTI* generasi kedua menunjukkan bahwa terjadi

kenaikan 2-3 kali dibanding tanaman tebu non transforman (*wild type*) (Gambar 2).

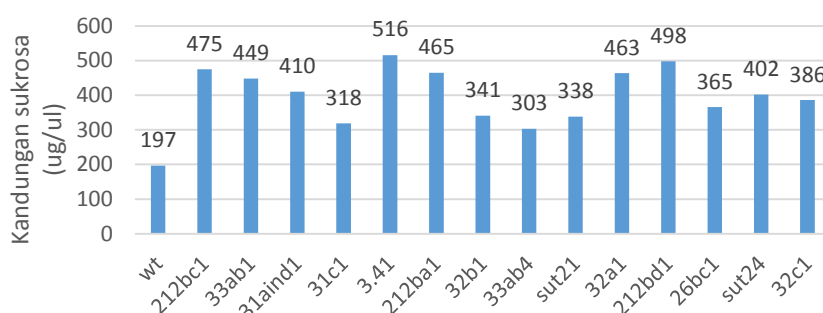
Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian oleh Widodo (2013) yang menunjukkan bahwa aktivitas enzim SPS pada tanaman tebu transgenic *double overekspresi SoSPSI-SoSUTI* generasi pertama lebih tinggi jika dibandingkan dengan tanaman kontrol non-transformasi. Over ekspresi gen SPS dapat meningkatkan aktivitas SPS pada tanaman tebu (Sugiharto *et al.*, 2003) berkorelasi positif meningkatkan kandungan sukrosa (Sugiharto *et al.*, 1997).

Kandungan Sukrosa Daun dan Batang

Pada tanaman tebu biosintesis sukrosa dikatalisis oleh enzim SPS dan peningkatan aktivitas SPS berkorelasi positif peningkatan kandungan sukrosa (Sugiharto *et al.*, 1997) sedangkan peningkatan protein SUT menyebabkan peningkatan translokasi sukrosa dari daun (*source tissue*) ke organ penyimpanan (*sink tissue*) (Lamoine *et al.*, 2007).



Gambar 2. Peningkatan aktivitas enzim SPS (microgram sukrosa/ mikrogram protein/menit pada tanaman tebu transgenic *double over ekspresi* gen *SoSPS1-SoSUT1* dibanding tanaman kontrol (wt).



Gambar 3. Hasil analisis kandungan sukrosa (a) daun dan (b) batang pada tanaman tebu transgenic *double over ekspresi* gen *SoSPS1-SoSUT1* dibanding tanaman kontrol (wt).

Peningkatan translokasi sukrosa yang diikuti juga oleh peningkatan biosintesis sukrosa menyebabkan kandungan sukrosa pada daun dan batang tanaman tebu transgenic *overekspresi* gen *SoSPS1-SoSUT1* lebih tinggi daripada tanaman kontrol non-transformasi.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa gen target *SoSPS1-SoSUT1* pada tanaman tebu transgenic *double overekspresi* gen *SoSPS1-SoSUT1* telah diwariskan pada generasi berikutnya. Gen tersebut juga dapat diekspresikan pada tingkat translasi dengan menghasilkan protein SUT dan enzim SPS yang lebih tinggi dan aktif secara fungsional. Hal tersebut dibuktikan dengan kandungan sukrosa batang dan daun pada tanaman tebu *double overekspresi* gen *SoSPS1-SoSUT1* rata-rata lebih tinggi daripada tanaman *overekspresi single SoSUT1* maupun tanaman tebu non-transformasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh PT Perkebunan Nusantara XI dan MP3EI tahun 2012 atas nama Prof Bambang Sugiharto. Ucapan terimakasih disampaikan kepada semua pihak yang membantu terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J. W. and Beardall, J. 1991. *Molecular Activities of Plant Cells. An Introduction to Plant Biochemistry*. Australia: Blackwell Scientific publications.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, dan L. G. Mitchell. 2000. *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- Christou, P., P. Vain., A. Kohli., M. Leech., j. Oard & S. Linscombe. 1992. Introduction of Multiple Genes Into Elite Rice Varieties. Evaluation of Transgenen Stability, Gene Expression and Field Performance of Herbicide-Resistant Transgenic Plant. *Annal of Botany*. Vol 77: 223-235.
- Huber, S. C., dan Huber. 1996. Role And Regulation Of Sucrose-Phosphate Synthase In Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol, Biol*. Vol. 47:431-444.
- Miswar, B. Sugiharto, J. Soedarson dan S. Moeljopawiro (2005). Transformasi gen *sucrose-phosphate synthase (SoSPS1)* tebu (*Saccharum officinarum L.*) untuk meningkatkan sintesis sukrosa pada daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*). *Berkala Ilmiah Biologi*. Vol 4(5):337-347.
- Ningtyas, H. M. 2012. *Karakterisasi Tanaman Tebu (saccharum officinarum l. Varbl) Transgenik Overekspresi Gen SoSUT1 event A-D*.

- Tidak dipublikasikan. Skripsi. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Reismeyer, J. W., Willmitzer, L., Frommer, W. B. 1992. Isolation and Characterization of A Sucrose Carrier cDNA from Spinach by Functional Expression in Yeast. *The EMBO Journal*. Vol. 11: 4705-4713.
- Sugiharto B, Handoyo T, dan Sumadi, 1996. Variation and correlation in photosynthetic and sucrose metabolism enzymes in some genotype of sugarcane. *Zuriat*. Vol 7: 76-85.
- Sugiharto, B., H. Sakakibara, Sumadi, dan T. Sugiyama. 1997. Differential Expression of Two Genes for Sucrose Phosphate Synthase in Sugar Cane: Molecular cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. *Plant Cell Physiol*. Vol. 38: 961 – 965.
- Sugiharto, B., Miswar, U. Murdiyatmo. 2003. *Overekspresi gen sucrose-phosphate synthase untuk peningkatan biosintesis sukrosa pada tanaman tebu*. Laporan Akhir RUT VIII. Universitas Jember dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, 42p.
- Sugiharto, B., Slameto dan Dewanti, P. 2008. *Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen SPS dan SUT pada Tanaman Tebu*. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi. *Unpublished*.
- Widodo, Wimbuh T., 2013. *Aktivitas Sucrose Phosphate Synthase dan Sucrose Transporter serta Akumulasi Sukrosa pada Tanaman Tebu Transgenik Overekspresi Ganda Gen SoSPSI-SoSUTI*. Tidak dipublikasikan. Skripsi. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Zheng, K., Huang, N., Bennet P., and Khush G. S. 1995. *PCR Based Marker Assisted Selection in Rice Breeding*. IRRI news lett 2.