



**EKSPRESI GEN *SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE* (SPS)  
TEBU PADA TANAMAN TEMBAKAU TRANSGENIK**

**KARYA ILMIAH TERTULIS  
(SKRIPSI)**

**Diajukan Guna Memenuhi Salah Satu Syarat untuk  
Menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu  
Jurusan Budidaya Pertanian Program Studi Agronomi  
Fakultas Pertanian Universitas Jember**

Oleh

**Nur Imamatus Sholehah  
NIM. 981510101230**

Asli

Terima

No. Induk

Pengantarog

*Jey*

632.7  
✓ 110  
E

9

**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
UNIVERSITAS JEMBER  
FAKULTAS PERTANIAN**

**Juni 2004**

KARYA ILMIAH TERTULIS BERJUDUL

**EKSPRESI GEN *SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE* (SPS)  
TEBU PADA TANAMAN TEMBAKAU TRANSGENIK**

Oleh

**Nur Imamatus Sholehah**  
NIM. 981510101230

Diperiapkan dan disusun dibawah bimbingan:

Pembimbing Utama : Ir. Miswar, MSi  
NIP. 131 880 473

Pembimbing Anggota : Ir. Parawita Dewanti, MP  
NIP. 131 877 581

KARYA ILMIAH TERTULIS BERJUDUL

**EKSPRESI GEN *SUCROSE PHOSPHATE SYNTIASE* (SPS)  
TEBU PADA TANAMAN TEMBAKAU TRANSGENIK**

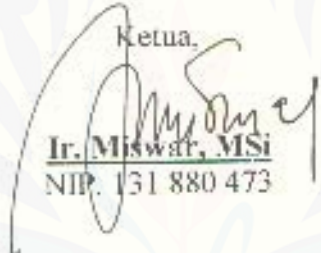
Dipersiapkan dan disusun oleh

**Nur Imamatus Sholehah**  
NIM. 981510101230


Telah diuji pada tanggal  
5 Juni 2004  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

**TIM PENGUJI**

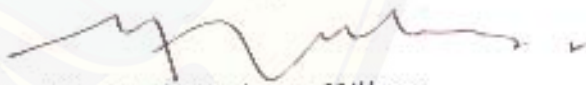
Ketua,

  
**Ir. Miswar, MSI**  
NIP. 131 880 473

Anggota I

  
**Ir. Parawita Dewanti, MP**  
NIP. 131 877 581

Anggota II

  
**Dr. Ir. Ketut Anom Wijaya**  
NIP. 131 474 910



MENGESAHKAN  
Dekan,

  
**Ir. Anic Mudjiharjati, MS**  
NIP. 130 609 808

Nur Imamatus Sholehah, 981510101230, Ekspresi Gen *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) Tebu pada Tanaman Tembakau Transgenik (dibimbing oleh Ir. Miswar, MSi sebagai DPU dan Ir. Parawita Dewanti, MP sebagai DPA).

## RINGKASAN

*Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman. Enzim ini menentukan kemampuan daun untuk mensintesis sukrosa yang kemudian ditranslokasikan ke bagian tanaman yang lain untuk pertumbuhannya. Selain berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sukrosa juga dibutuhkan manusia dalam bentuk gula. Peningkatan kebutuhan gula perlu diikuti dengan upaya peningkatan produksinya. Salah satu alternatif untuk meningkatkan produksi gula pada tanaman tebu dapat dilakukan melalui teknologi rekayasa genetik, yaitu dengan transformasi gen. Transformasi gen SPS tebu pada tanaman tembakau merupakan model untuk pengembangan tanaman tebu. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi gen SPS tebu pada tanaman tembakau transgenik sehingga diperoleh informasi mengenai keberhasilan transformasi gen SPS tebu pada tanaman tembakau terutama dalam meningkatkan kandungan sukrosa.

Bahan tanam yang digunakan adalah *planlet* tembakau transgenik hasil transformasi dengan gen SPS tebu menggunakan *Agrobacterium* dan *planlet* tembakau *wild type* yang ditanam pada media yang berupa campuran pasir dan tanah. Untuk mengetahui keberhasilan integrasi gen SPS tebu pada kromosom tembakau dilakukan analisis PCR. Sedangkan analisis *western blot* untuk mengetahui adanya ekspresi gen tersebut dalam bentuk protein yang kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas enzim SPS dan kandungan sukrosa.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen SPS tebu telah berintegrasi pada kromosom tembakau transgenik Galur 3, 13 dan 17 dan diekspresikan dalam bentuk protein. Hal ini juga didukung oleh tingginya aktivitas enzim SPS dan kandungan sukrosanya. Peningkatan aktivitas enzim SPS dan kandungan sukrosa pada Galur 13 masing-masing mencapai 65,76% dan 74,69% dari tembakau *wild type*.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ke hadirat Allah SWT, karena dengan rahmat dan hidayahnya penulis dapat menyelesaikan Karya Ilmiah Tertulis berjudul “Ekspresi Gen *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) Tebu pada Tanaman Tembakau Transgenik” ini sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Pendidikan Program Strata Satu pada Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Dalam menyelesaikan Karya Ilmiah Tertulis ini, penulis telah mendapatkan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Bapak M. Mudhar dan Ibu Sufiatun atas doa restu, dukungan dan ridhonya kepada penulis dalam menuntut ilmu
2. Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember
3. Ketua Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember yang telah memberi ijin dan menyetujui pelaksanaan penelitian ini
4. Kepala Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember atas kemudahan yang diberikan selama penelitian
5. Ir. Miswar, MSi selaku DPU dan dosen wali yang telah memberikan bimbingan dan arahan selama kuliah hingga terselesaikannya Karya Ilmiah Tertulis ini
6. Ir. Parawita Dewanti selaku DPA I dan Dr.Ir. Ketut Anom Wijaya selaku DPA II yang telah memberikan bimbingan dan arahan hingga terselesaikannya Karya Ilmiah Tertulis ini
7. Dosen beserta staff Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Jember yang telah memberikan bantuan dan kemudahan dalam melaksanakan penelitian
8. Mbak Ratna, dik Anny dan Hairun atas dukungan, doa dan semangatnya
9. Nilam, Ika, Trina, dan teman-teman Biomol atas dukungan dan bantuannya selama ini
10. Sahabat-sahabatku: Anita, Ipink, Tria, Lita, Rike, Thanthuwy dan Agro '98, kehadiran kalian sangat berarti bagi penulis

11. Teman-teman Bali House: Henik, Hany, Triana, Nur, Novi dan Ariani, atas persaudaraannya selama ini.

Akhirnya penulis berharap hasil penelitian dalam Karya Ilmiah Tertulis ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya yang sebidang dengan penelitian ini.

Jember, Juni 2004

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	ix
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	x
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	2
1.3 Manfaat .....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1 Peranan SPS dalam Biosintesis Sukrosa .....	4
2.2 Pemuliaan Tanaman melalui Rekayasa Genetik .....	5
2.3 Ekspresi Gen pada Tanaman Transgenik .....	7
2.4 Hipotesis .....	8
<b>III. METODE PENELITIAN</b> .....	9
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	9
3.2 Bahan dan Alat .....	9
3.3 Metode Penelitian .....	9
3.4 Pelaksanaan Penelitian .....	9
3.4.1 Penyediaan Bahan untuk Analisa .....	9
3.4.2 Analisis PCR .....	10
3.4.3 Ekstraksi Enzim .....	11
3.4.4 Pengukuran Aktivitas Enzim SPS .....	11
3.4.5 Penentuan Kandungan Total Protein Terlarut .....	12
3.4.6 Penentuan Kandungan Sukrosa .....	12
3.4.7 Penentuan Kandungan Protein SPS (Analisis <i>Western Blot</i> ) .....	12

<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	14
4.1 Karakteristik dan Kondisi Pertumbuhan Tembakau Transgenik dan <i>Wild Type</i> .....	14
4.2 Analisis PCR pada Tembakau Transgenik dan <i>Wild Type</i> .....	14
4.3 Kandungan Protein SPS pada Tembakau Transgenik dan <i>Wild Type</i> .....	16
4.4 Aktivitas Enzim SPS pada Tembakau Transgenik dan <i>Wild Type</i> .....	17
4.5 Hubungan antara Aktivitas Enzim SPS dan Kandungan Sukrosa pada Tembakau Transgenik dan <i>Wild Type</i> .....	18
<b>V. KESIMPULAN</b> .....	21
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	22
<b>LAMPIRAN</b> .....	25



DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Halaman
1.	Fiksasi CO <sub>2</sub> pada daur Calvin dalam kloroplas tanaman C <sub>3</sub> .....	4
2.	Elektroforesis DNA hasil PCR tembakau transgenik dan <i>wild type</i> .....	15
3.	Pola protein daun tembakau transgenik dan <i>wild type</i> .....	16
4.	Hasil analisis <i>western blot</i> tembakau transgenik dan <i>wild type</i> .....	17
5.	Aktivitas enzim SPS tembakau transgenik dan <i>wild type</i> .....	18
6.	Kandungan sukrosa tembakau transgenik dan <i>wild type</i> .....	19
7.	Hubungan antara aktivitas enzim SPS dan kandungan sukrosa.....	20

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor	Judul	Halaman
1.	Komposisi larutan hara Hoagland dan Arnold.....	25
2.	Data aktivitas enzim SPS tembakau transgenik dan <i>wild type</i> .....	26
3.	Data kandungan sukrosa tembakau transgenik dan <i>wild type</i> .....	27
4.	Skema kerja isolasi DNA.....	28
5.	Skema kerja ekstraksi enzim.....	30
6.	Skema kerja pengukuran aktivitas enzim SPS dan TPT.....	31
7.	Skema kerja pengukuran kandungan sukrosa.....	32
8.	Skema kerja analisis <i>western blot</i> .....	34

## I. PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang Permasalahan

Sukrosa merupakan hasil utama proses fotosintesis pada tanaman yang dihasilkan dari asimilasi karbon atau dari akumulasi pati yang tersimpan dalam jaringan penyimpanan. Sukrosa berfungsi sebagai cadangan makanan serta sumber energi di sel fotosintetik dan dengan mudah ditranslokasikan melalui pembuluh floem menuju jaringan yang sedang tumbuh (Lakitan, 1995). Biosintesis sukrosa pada jaringan fotosintetik selain ditentukan oleh jumlah unsur karbon yang diasimilasi, juga dipengaruhi oleh aktivitas enzim pembentuk sukrosa.

Berdasarkan sejumlah penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa (Huber dan Huber, 1996). Menurut Walker dan Huber (1989) enzim ini menentukan kemampuan daun untuk mensintesis sukrosa yang kemudian ditranslokasikan ke bagian tanaman yang lain untuk pertumbuhannya. Lebih lanjut hasil penelitian Kohler *et al.* (1988) menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang positif antara aktivitas SPS dan akumulasi sukrosa pada daun tanaman tebu.

Selain berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman, sukrosa juga penting terutama karena dibutuhkan manusia dalam bentuk gula, dimana kebutuhan gula sampai saat ini masih terus mengalami peningkatan. Peningkatan kebutuhan gula terjadi sebagai akibat dari peningkatan jumlah penduduk dan pesatnya perkembangan industri makanan dan minuman yang menggunakan gula sebagai salah satu bahan bakunya. Peningkatan kebutuhan gula ini perlu diikuti oleh upaya peningkatan produksi gula. Peningkatan produksi gula pada tanaman tebu sebagai tanaman penghasil gula yang utama di Indonesia sampai saat ini masih terus dilakukan, diantaranya dengan menyediakan varietas tebu genjah. Varietas tebu genjah ini berasal dari tetua berpotensi rendemen tinggi yang saling dikawinkan (Sukarso *et al.*, 1992).

Alternatif lain terhadap peningkatan produksi gula pada tanaman tebu dapat dilakukan melalui teknologi rekayasa genetik. Keberhasilan pengisolasian gen SPS tebu oleh Sugiharto *et al.* (1997) dalam bentuk cDNA telah mendorong dilakukannya transformasi gen SPS tebu pada tanaman tembakau, dimana tanaman tembakau ini merupakan tanaman model yang akan digunakan dalam usaha pengembangan tanaman tebu. Transformasi gen SPS ini dilakukan dengan menggunakan *Agrobacterium* karena tanaman dikotil merupakan inang dari *Agrobacterium* (Zupan dan Zambrysky, 1995) dan juga telah berhasil digunakan pada tanaman tebu (Arencibia *et al.*, 1995).

Transformasi gen SPS tebu pada tanaman tembakau telah menghasilkan planlet tembakau transgenik yang memiliki sifat ketahanan terhadap antibiotika kanamisin. Sekalipun sifat ketahanan terhadap antibiotika kanamisin dapat digunakan sebagai kriteria awal keberhasilan transformasi, namun masih belum memberikan bukti yang memadai terhadap keberhasilan transformasi gen SPS tebu pada tanaman tembakau. Bukti transformasi stabil harus ditunjukkan dengan copi (sejumlah copi) gen yang ditransformasi telah berintegrasi dan selanjutnya kestabilan gen tersebut bertahan selama pembelahan sel serta penilaian terhadap aktivitas dan banyaknya produk gen tersebut (Nasir, 2002). Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan pengamatan terhadap ekspresi gen SPS yang meliputi keberadaan gen SPS tebu, kandungan protein SPS, aktivitas enzim SPS serta kandungan sukrosa pada tanaman tembakau transgenik dan *wild type* (sebagai kontrol). Hal ini untuk mengetahui keberhasilan transformasi gen SPS tebu pada tanaman tembakau terutama dalam meningkatkan kandungan sukrosa.

## 1.2 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi gen SPS tebu pada tanaman tembakau transgenik.

### 1.3 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran mengenai ekspresi gen SPS tebu pada tanaman tembakau transgenik dan dapat berguna bagi penelitian selanjutnya terutama dalam hubungannya dengan peningkatan akumulasi sukrosa pada tanaman, khususnya pada tanaman tebu.

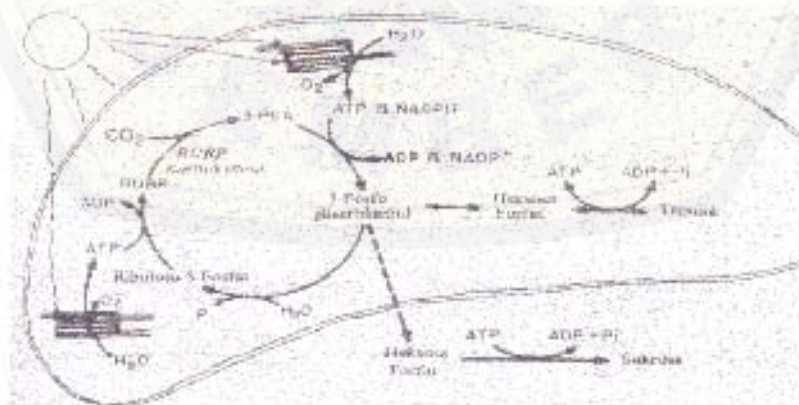


## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Peranan SPS dalam Biosintesis Sukrosa

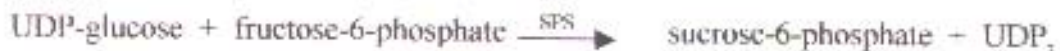
Hasil akhir dari fotosintesis pada tanaman tingkat tinggi adalah sukrosa dan pati (Anderson dan Beardall, 1991). Pati disintesis dan diakumulasi di kloroplas sedangkan sukrosa disintesis di sitosol (Lakitan, 1995) dari hasil asimilasi karbon atau dari akumulasi pati dalam organ penyimpanan (Chavez-Barcenas *et al.*, 2000). Hasil fotoasimilat tersebut selanjutnya ditranslokasikan ke seluruh bagian tanaman untuk perkembangan tanaman (Huber dan Huber, 1996). Pada beberapa tanaman, sukrosa merupakan komponen utama pada jaringan penyimpanan. Sukrosa terakumulasi dalam jumlah besar seperti pada tanaman tebu dan pada beberapa buah, sebagai cadangan makanan (Smith, 1993).

Sukrosa dibentuk dari 3-asam fosfoglisarat (3PGA) melalui daur Calvin dari fiksasi  $\text{CO}_2$  oleh ribulosa bisfosfat (RuBP) karboksilase (Gambar 1). Gugus karboksil dalam 3PGA direduksi menjadi sebuah gugus aldehyd dalam 3-fosfogliseraldehyd. Sebagian molekul 3-fosfogliseraldehyd digunakan di kloroplas untuk membentuk pati dan sebagian lainnya diangkut keluar dari kloroplas (Salisbury dan Ross, 1992). 3-fosfogliseraldehyd yang diangkut keluar akan membentuk heksosa fosfat yang selanjutnya akan menghasilkan sukrosa.



Gambar 1. fiksasi  $\text{CO}_2$  pada daur Calvin yang terjadi dalam kloroplas tanaman  $\text{C}_3$  (Gardner, 1991)

Beberapa enzim yang dianggap berperan terhadap akumulasi sukrosa pada tanaman antara lain *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS), *Sucrose Synthase* (SS) dan *Invertase*. SPS merupakan enzim yang berperan mengkatalisis sukrosa-6-phosphat dalam sintesis sukrosa, seperti tampak pada reaksi berikut:



sebaliknya SS dan *Invertase* lebih mengarah pada degradasi sukrosa seperti pada reaksi berikut (Buchanan *et al.*, 2000):



Sintesis sukrosa diawali oleh sintesis dua molekul fructose-6-phosphate (fru-6-p) dari dua fructose-2,6P<sub>2</sub> oleh enzim *Fructose-1,6-Biphosphate*. Selanjutnya sebagian besar fru-6-p mengalami konversi menjadi glucose-6-phosphate oleh enzim *Hexose-6-Isomerase* dan akhirnya membentuk uridine diphosphoglucose (UDP glucose). Fru-6-p dan UDP glucose selanjutnya disintesis oleh enzim SPS menjadi sucrose-6-phosphate. Sucrose-6-phosphate kemudian dikonversikan menjadi sukrosa yang dikatalisis oleh enzim *Sucrose Phosphate Phosphatase* (SPP). Sukrosa juga dapat disintesis secara langsung oleh enzim SS, tapi enzim tersebut lebih condong pada katabolisme daripada sintesis sukrosa dan lebih aktif pada jaringan penyimpanan daripada jaringan fotosintetik (Anderson dan Beardall, 1991).

SPS merupakan enzim kunci dalam pembentukan sukrosa pada sel tanaman (Bruneau *et al.*, 1991). Pada tanaman tebu aktivitas enzim SPS menentukan akumulasi sukrosa di daun dan berkorelasi dengan tingkat pertumbuhan dan produksi gulanya (Sugiharto *et al.*, 1997).

## 2.2 Pemuliaan Tanaman melalui Rekayasa Genetik

Pemuliaan tanaman merupakan kegiatan mengelola dan merakit keragaman genetik untuk mendapatkan kombinasi sifat yang diinginkan guna memenuhi kebutuhan manusia, telah memberikan sumbangan yang besar dalam peningkatan produksi pertanian (Aswidinnoor, 1995). Pemuliaan tanaman secara konvensional

dilakukan dengan persilangan kedua galur sehingga dihasilkan hibrida dengan susunan genetik dari kedua induknya. Pemuliaan tanaman secara konvensional ini terbatas pada spesies-spesies yang berkerabat dekat dan yang dapat dihibridisasi satu sama lainnya (Watson *et al.*, 1988). Sebaliknya pemuliaan tanaman melalui teknologi rekayasa genetik dapat dilakukan dengan menyisipkan gen-gen tertentu atau melalui mutasi sehingga tanaman mempunyai berbagai karakteristik yang diinginkan, seperti kemampuan meningkatkan fotosintesis (Pai, 1987). Teknologi ini dipandang sebagai teknologi masa depan dalam mengatasi berbagai masalah dalam bidang pangan, kesehatan, pertanian, peternakan, perikanan dan lain-lain. Pemanfaatan teknologi ini dalam bidang pertanian adalah untuk meningkatkan jumlah dan kualitas panen (Toha, 2001).

Menurut Nasir (2002) pemuliaan tanaman melalui rekayasa genetik didasarkan pada manipulasi gen-gen yang relevan dan tersedianya vektor untuk transformasi ke dalam sel tanaman. Transformasi gen yang mengkode enzim-enzim tertentu pada suatu tanaman dapat memodifikasi dan memperbaiki sifat-sifat tertentu pada tanaman tersebut. Berkembangnya teknik transformasi gen pada tanaman memungkinkan perluasan sumber keragaman genetik yang dapat dimanfaatkan oleh pemulia tanaman, baik dari tanaman maupun dari organisme lain yang sebelumnya belum mungkin untuk dimanfaatkan.

Menurut Muladno (2002), pada dasarnya gen apa saja dapat dipindahkan dari tanaman satu ke tanaman lainnya, namun yang menjadi pertimbangan utama dalam memilih gen yang akan ditransformasikan biasanya berdasarkan nilai ekonomis dan peranan gen tersebut pada tanaman. Tanaman yang dihasilkan dari transformasi gen asing disebut tanaman transgenik.

Transformasi gen yang mengendalikan karakter-karakter yang mempunyai nilai ekonomis telah banyak dilakukan, sejalan dengan tersedianya gen-gen tersebut, misalnya gen-gen untuk karakter agronomi penting seperti ketahanan terhadap penyakit, serangga, dan ketahanan terhadap cekaman kondisi lingkungan (Aswidinnoor, 1995). Begitu juga dengan transformasi gen SPS yang berhubungan



dengan biosintesis sukrosa dan dapat meningkatkan akumulasi sukrosa telah berhasil dilakukan pada beberapa tanaman, diantaranya gen SPS jagung pada tanaman tomat (Worrel *et al.*, 1991; Laporte *et al.*, 1997).

### 2.3 Ekspresi Gen pada Tanaman Transgenik

Ekspresi gen merupakan suatu proses penerjemahan gen menjadi protein atau enzim. Ekspresi gen asing oleh tanaman yang ditransformasi dapat dinilai melalui penentuan banyaknya produk atau aktivitas produk gen tersebut (Nasir, 2002). Beberapa metode yang pernah dikembangkan untuk mengkaji ekspresi gen pada tingkat transkripsi dan translasi adalah dengan cara melacak produk transkripsi (mRNA) atau produk translasi (protein).

Menurut Salisbury dan Ross (1992), penentuan ekspresi gen pada tingkat RNA dapat dilakukan melalui *nothern blotting* dengan mengisolasi RNA-total dari jaringan tumbuhan dan dipisahkan dengan elektroforesis. Hasil elektroforesis ini kemudian dihibridisasi dengan probe untuk mengenali jenis mRNA komplementernya. Selain dapat mengetahui jumlah molekul mRNA tertentu, metode ini juga dapat digunakan untuk menentukan ukuran molekulnya. Besarnya ekspresi gen pada tingkat protein dapat dilakukan melalui *western blotting* dengan menggunakan antibodi tertentu setelah dilakukan pemindahan dari gel elektroforesis ke membran nitrocellulose. Sedangkan pelacakan gen (DNA) dapat dilakukan dengan teknik *southern blotting*, yaitu dengan memindahkan molekul DNA dari gel ke membran untuk memungkinkan terjadinya hibridisasi antara DNA probe sebagai pelacak dan DNA genom yang akan dilacak posisi gennya (Muladno, 2002).

SPS sebagai enzim biosintesis sukrosa pada tanaman telah berhasil diekspresikan pada tanaman transgenik dengan meningkatnya aktivitas SPS dan akumulasi sukrosa. Keberhasilan yang telah dicapai antara lain SPS jagung pada tanaman tomat transgenik dapat meningkatkan aktivitas SPS pada daun, akar dan buah sehingga terjadi peningkatan kandungan gula pada buah tomat (Laporte *et al.*, 1997). Hasil penelitian sebelumnya oleh Worrel *et al.* (1991) juga telah dilaporkan

terjadi peningkatan aktivitas SPS dan akumulasi sukrosa pada tanaman tomat transgenik yang mengandung gen SPS jagung. Gen SPS jagung juga telah berhasil diekspresikan pada tanaman *Arabidopsis thaliana* dengan meningkatnya aktivitas SPS dan rasio kandungan sukrosa/pati pada daun (Signora *et al.*, 1998). Hasil penelitian Lunn *et al.*, (2003) terhadap SPS jagung yang diekspresikan pada tanaman tomat transgenik menunjukkan peningkatan aktivitas SPS namun tidak menunjukkan perubahan yang berarti terhadap kandungan sukrosa di daun.

#### 2.4 Hipotesis

Gen SPS tebu yang berhasil diintegrasikan pada kromosom tembakau dapat diekspresikan oleh tembakau transgenik dan dapat meningkatkan kandungan sukrosa daun.

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Pusat Penelitian Biologi Molekuler Universitas Jember mulai bulan Juni 2003 sampai Pebruari 2004.

#### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan tanam yang digunakan dalam penelitian ini adalah *plantlet* tembakau *wild type* dan transgenik hasil transformasi gen SPS tebu menggunakan *Agrobacterium*. Bahan yang digunakan untuk analisa antara lain  $N_2$  cair, sephadex G-25, reaction mixture untuk pengukuran aktivitas enzim SPS, HCl, resorsinol dan bahan pendukung lainnya yang berasal dari Sigma dan E-merek. Alat-alat yang digunakan adalah spektrofotometer, timbangan analitik, tabung reaksi, mikropipet, stopwatch, sentrifuge, mortal-stumper, dan lain-lain.

#### 3.3 Metode Penelitian

Tanaman tembakau transgenik yang merupakan hasil transformasi gen SPS tebu menggunakan *Agrobacterium* dan tanaman tembakau *wild type* sebagai kontrol diamati DNA SPS, kandungan protein SPS, aktivitas enzim SPS serta kandungan sukrosanya untuk mengetahui ekspresi gen SPS tebu pada tanaman tembakau transgenik.

#### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

##### 3.4.1 Penyediaan Bahan untuk Analisa

*Plantlet* tembakau transgenik dan *wild type* dibersihkan dari sisa-sisa media kultur jaringan pada air mengalir dan direndam dalam larutan fungisida (dithane 0,1%) untuk mencegah timbulnya jamur. *Plantlet* selanjutnya diaklimatisasi pada media pasir steril dan nutrisi Hoagland selama kurang lebih 3 minggu. Pemeliharaan selama aklimatisasi dilakukan dengan pemberian larutan nutrisi Hoagland dan

penyemprotan dengan aquadest menggunakan sprayer untuk menjaga kondisi kelembaban tanaman. Penanam dilakukan pada bak-bak tanam dengan media yang berupa campuran pasir dan tanah dengan perbandingan 1:1, sedangkan nutrisinya berasal dari larutan hara Hoagland.

### 3.4.2 Analisis PCR

Isolasi DNA genomik dilakukan dengan menggunakan metode SDS. Daun sebanyak 1 gr digerus dengan mortal-stumper dan N<sub>2</sub> cair sampai halus, lalu ditambah buffer ekstraksi 3 kali berat sampel (3mL) dan 240 $\mu$ L SDS 20%. Setelah divortek dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit, ditambah 1mL 5M *potassium acetate* kemudian disimpan dalam es selama 20 menit dan disentrifuse (12.000 rpm, 10 menit, 4°C). Supernatan diambil dan ditambah 2mL *isopropanol*, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu -20°C dan disentrifuse (12.000 rpm, 10 menit, 4°C). Pellet yang didapat ditambah TE buffer dan RNAase lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, setelah itu ditambah 600 $\mu$ L PCI dan disentrifuse (12.000 rpm, 10 menit, 4°C). Supernatan yang didapat ditambah 0,8 kali volume *isopropanol* dan 0,2 kali volume 3M Na-*acetate*. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam lalu disentrifuse (12.000 rpm, 10 menit, 4°C), pelletnya ditambah 1mL *ethanol* 70% dan disentrifuse lagi. Pellet dikeringkan kemudian ditambah 50 $\mu$ L TE dan DNA siap digunakan sebagai DNA *template* dalam analisis PCR.

Dalam PCR digunakan primer yang dirancang berdasarkan sekuen promotor CaMV sebagai *forward primer* dan sekuen gen SPS sebagai *reverse primernya*. Selama proses PCR terjadi proses denaturasi (90°C, 2 menit), annealing (55°C, 1 menit) dan polimerasi (70°C, 2 menit). Produk PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose.

### 3.4.3 Ekstraksi Enzim

Daun sebanyak 2 gr digerus menggunakan mortal-stumper dingin dengan  $N_2$  cair, setelah halus ditambah larutan buffer ekstraksi dengan volume 3 kali berat sampel (6mL). Komposisi buffer ekstraksi terdiri dari 50mM Mops-NaOH (pH 7,5), 10mM  $MgCl_2$ , 1mM EDTA, 5mM DTT, 2% PEG 20.000, 0,5mM PMSF dan 10% PVP.

Ekstraktan disentrifuse dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan sebagian disaring dengan kolom kromatografi Sephadex G-25 yang telah dicuilibrasi dengan buffer yang mengandung 50mM Mops-NaOH (pH 7,5), 10mM  $MgCl_2$ , 1mM EDTA, dan 5mM DTT. Larutan enzim yang sudah disaring siap untuk pengukuran aktivitas enzim, sedangkan sisanya (belum disaring) digunakan sebagai sampel protein untuk analisis *western blot*.

### 3.4.4 Pengukuran Aktivitas Enzim SPS

Aktivitas enzim SPS diukur menurut metode yang disebutkan Kohler *et al.* (1988). Larutan penguji (*Reaction mixture*) sebanyak 70  $\mu$ L yang terdiri dari 40  $\mu$ L 85mM Mops-NaOH dan 26mM  $MgCl_2$  dengan pH 7,44, 10  $\mu$ L 0,1M fructose-6-phosphate, 10  $\mu$ L 0,1M glucose-6-phosphate, dan 10  $\mu$ L 0,1M UDP-glucose ditambahkan dengan 100  $\mu$ L sampel enzim. Campuran tersebut diinkubasi selama 0, 10, dan 20 menit pada suhu 30°C. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 70  $\mu$ L 0,5N NaOH dan dipanaskan selama 10 menit pada suhu 100°C. Setelah dingin ditambah dengan 250  $\mu$ L reagent resorsinol (resorsinol 0,1% dalam ethanol 95%) dan 750  $\mu$ L HCl 30%, kemudian dipanaskan pada suhu 80°C selama 8 menit. Penentuan aktivitas enzim dilakukan dengan membandingkan hasil pengukuran absorbansi sampel enzim pada panjang gelombang 520nm dengan absorbansi yang diperoleh dari standart sukrosa 1  $\mu$ g  $\mu$ L.

### 3.4.5 Penentuan Kandungan Total Protein Terlarut

Kandungan protein diukur menggunakan metode Bradford (Deutcher, 1990) yaitu dengan memasukkan 5  $\mu\text{L}$  dan 10  $\mu\text{L}$  sampel dalam larutan Bradford, kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 595nm. *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  digunakan sebagai standart protein dengan konsentrasi 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 dan 20  $\mu\text{L}$ .

### 3.4.6 Penentuan Kandungan Sukrosa

Daun sebanyak 2 gr digerus pada mortal-stumper sampai halus dan ditambahkan 5mL *ethanol* 80% (80°C) lalu diinkubasi pada suhu 80°C selama 10 menit kemudian disentrifuse. Supernatan yang dihasilkan ditampung, sedangkan pelletnya ditambah *ethanol* lagi, diinkubasi pada suhu 80°C dan supernatannya ditampung, begitu seterusnya hingga pellet berwarna keputih-putihan. Supernatan yang telah ditampung dievaporasi menggunakan rotary evaporator sampai agak kering, kemudian dilarutkan dengan 5mL air dan disentrifuse. Supernatan yang dihasilkan merupakan sampel yang digunakan untuk pengukuran kandungan sukrosa.

Kandungan sukrosa diukur dengan menggunakan 50  $\mu\text{L}$  sampel yang ditambah 70  $\mu\text{L}$  0,5N NaOH. Campuran dididihkan pada suhu 100°C selama 10 menit. Setelah dingin ditambahkan 250  $\mu\text{L}$  reagent resorsinol dan 750  $\mu\text{L}$  HCl 30%, kemudian diinkubasi pada suhu 80°C selama 8 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 520 nm dan standart sukrosa 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  sebagai pembanding.

### 3.4.7 Penentuan Kandungan Protein SPS (Analisis Western Blot)

Kandungan protein SPS diamati melalui analisis *western blot*. Sampel protein (50  $\mu\text{g}$ ) dicampur dengan buffer sampel dan dipanaskan selama 3 menit pada suhu 100°C. Protein kemudian dipisahkan menggunakan sodium dedoksil sulfat polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Protein yang terpisah ditransfer ke membran nitroselulose dengan menggunakan listrik 250mA selama 2 jam, kemudian

membran dibilas dengan tris-buffered saline (TBS) dan skim milk 0,5% selama 30 menit dan dilanjutkan dengan inkubasi dengan antibod I (SPS). Setelah inkubasi, membran dibilas dengan TBS lalu diinkubasi lagi menggunakan antibod II (goat anti-rabbit IgG horseradish peroksidase conjugated) kemudian dibilas TBS dan dilanjutkan dengan pewarnaan menggunakan bromo-kloro-indol-fosfat (BCIP) dan nitroblue tetrazolium (NBT).



## V. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa gen SPS tebu yang ditransformasikan pada tembakau dengan menggunakan *Agrobacterium* dapat diekspresikan terutama pada Galur 3, 13 dan 17. Ekspresi gen SPS tebu pada tembakau transgenik Galur 13 dapat meningkatkan aktivitas enzim SPS dan kandungan sukrosa masing-masing sebesar 65,76% dan 74,69%.





DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J.W and J.Beardall. 1991. *Molecular Activities of Plant Cell, An Introduction of Biochemistry*. Blackwell Scientific Publications. London Edinburg
- Arencibia, A.D., E.R.Carmona, P.Tellez, M.Chan, S.Yu, L.E.Trujillo and P.Oramas. 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Sacharum spp.L.*) transformation mediated by *Agrobacterium tumifaciens*. *Trans Res.* 7:213-232.
- Aswidimoor, H. 1995. Transformasi gen: sumber baru keragaman genetik dalam pemuliaan tanaman. *Zuriat*. 6(2): 56-66.
- Bruneau, J.M., A.C.Worrel, B.Cambow, D.Lando and T.A.Voelker. 1991. Sucrose phosphate synthase, a key enzyme for sucrose biosynthesis in plant. *Plant Physiol* 89: 518-524.
- Buchanan, B.B., W.Gruissem and R.L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plant*. The American Society of Plant Physiologists.
- Chavez-Barcenas, A.T., J.J.Valdez-Alarcon, M.Martinez-Trujillo, L.Chen, B.Xoconostle-Cararez, J.W.Lucas and I.Herera-Estrella. 2000. Tissue-specific and developmental pattern of expression of rice *SPS1* gene. *Plant Physiol*. 124: 641-653.
- Huber,S.C. and J.L.Huber. 1992. Role of sucrose phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiol*. 89:518-524.
- Gardner,F.P., R.B.Pearce dan R.L.Mitchell. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. UI-Press. Jakarta.
- \_\_\_\_\_ 1996. Role and regulation of sucrose phosphate synthase in higher plant. *Annu.Rcv.Plant Physiol. Plant.Mol.Biol.* 17: 431-444.
- Kohler, J., E.Komor, M.Thom and Maretzki. 1988. Activity of sucrose phosphate synthase in sugarcane leaves. *Phytochemistry*. 77: 1605-1608.
- Lakitan, B. 1995. *Dasar-Dasar Fisiologi Tumbuhan*. Raja Grafindo Persada. Jakarta.

- Laporte, M.M., J.A.Galagan, J.A. Shapiro, M.R.Boersig, C.K. Shewmaker and T.D. Sharkey. 1997. Sucrose phosphate synthase activity and yield analysis of tomato plants transformed with maize sucrose phosphate synthase. *Planta*. 203: 253-259.
- Miron,D. and Schaffer. 1990. sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill. and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb.and Bonpl. *Plant Physiol*. 95: 623-627.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetik*. Pustaka Wirausaha Muda, Bogor
- Nasir, M. 2002. *Bioteknologi Potensi dan Keberhasilannya dalam Bidang Pertanian*. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Pai, A.C. 1987. *Dasar-Dasar Genetika*. Erlangga. Jakarta.
- Salisbury, F.B. dan C.W.Ross. 1992. *Plant Physiology*. Wadsworth Publishing Company. Belmont, California.
- Smith, C.J. 1993. *Carbohydrate Chemistry in Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons Ltd. UK.
- Sugiharto, B., T.Handoyo dan Sumadi. 1997. Variasi dan korelasi enzim fotosintetik dan enzim metabolisme sukrosa pada beberapa genotipe tebu. *Zuriat*. 7(2): 76-84.
- Sugiharto,B., H.Sakakihara, Sumadi and T.Sugiyama. 1997. Differential expression of two genes of sucrose phosphate synthase in Sugarcane: molecular cloning of the cDNA and comparative analysis of gene expression. *Plant Cell Physiology*. 38(8): 961-965.
- Toha, A.H.A. 2001. *Deoxyribo Nucleac Acid. Keragaman, Ekspresi, Rekayasa dan Efek Pemanfaatannya*. Alfabeta. Bandung
- Watson,J.D., J.Tooze and D.T. Kurtz. 1988. *DNA Rekombinan Suatu Pelajaran Singkat*. Erlangga. Jakarta.

- Walker, J.L. and S.C. Huber. 1989. Purification and preliminary characterization of sucrose phosphate synthase using monoclonal antibodies. *Plant Physiol.* 89: 518-524.
- Zupan, J.K. dan P.Zambrysky. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. *Plant Physiol.* 107:1041-1042.



**Lampiran 1. Komposisi larutan hara Hoagland dan Arnold**

Komposisi larutan stok Hoagland dan Arnold

- Larutan I : 50,6 gr  $\text{KNO}_3$  dan 35,5 gr  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  dalam 1L.  
Larutan II : 37,3 gr  $\text{KCl}$  dalam 200ml.  
Larutan III : 22,1 gr  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  dalam 100ml.  
Larutan IV : 24,7 gr  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dalam 100ml.  
Larutan V : 15,6 gr  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 12 mg EDTA, 7 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dan 10 gr  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  dalam 100ml.

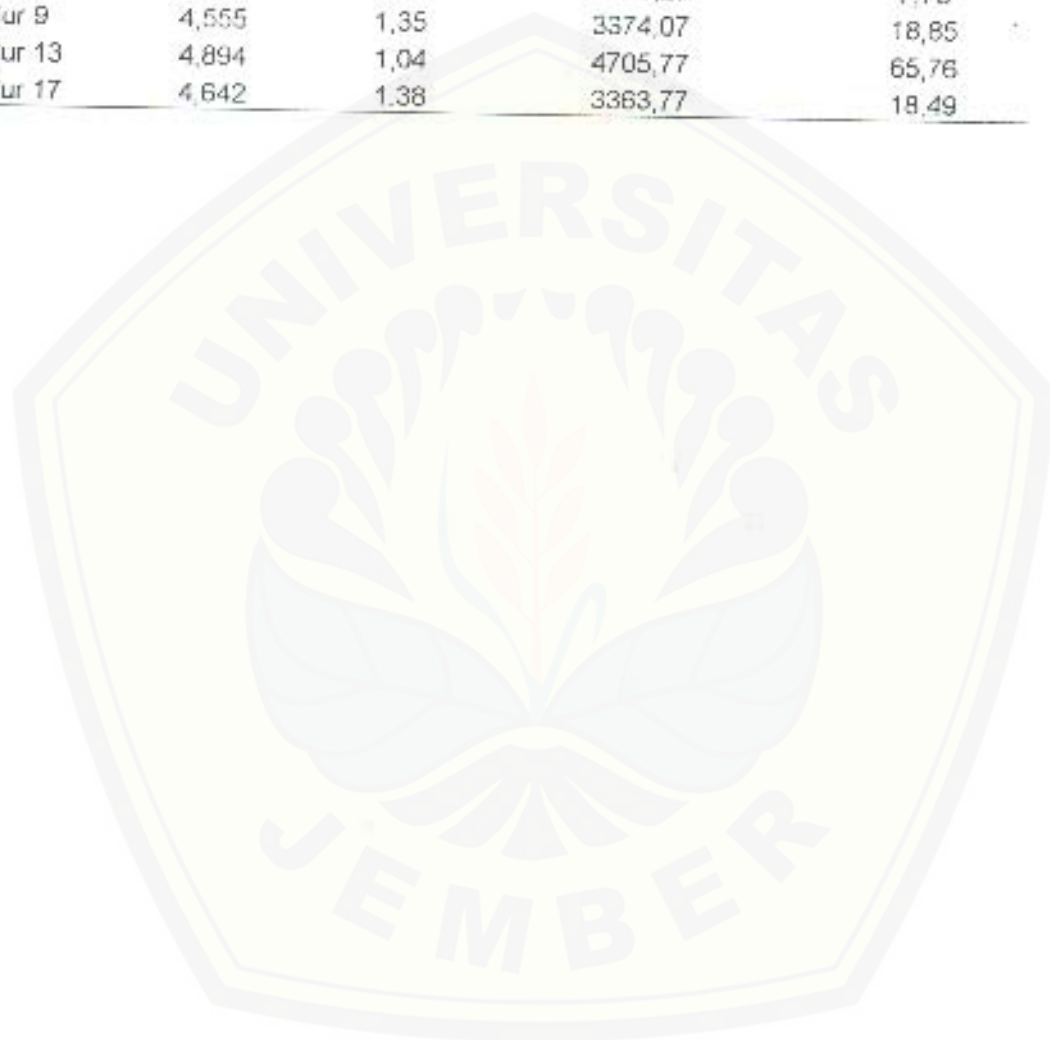
Untuk membuat larutan hara Hoagland 2 liter (setengah strength), larutan stok yang diperlukan adalah:

- Larutan I : 15mL  
Larutan II : 1ml.  
Larutan III : 0,5ml.  
Larutan IV : 2mL.  
Larutan V : 2mL.

Setelah masing-masing larutan stok ditambahkan, pH diatur menjadi 6,5 dengan menambahkan NaOH.

**Lampiran 2. Data aktivitas enzim SPS tembakau transgenik dan *wild type***

	Aktivitas relatif ( $\mu\text{g}$ sukrosa/menit)	TPT ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Aktivitas spesifik ( $\mu\text{g}$ sukrosa/menit/mg TPT)	% peningkatan aktivitas spesifik
wild type	3,577	1,26	2838,89	
galur 2	4,245	1,34	3167,91	11,59
galur 3	4,471	1,37	3263,5	14,96
galur 7	3,884	1,27	3058,27	7,73
galur 9	4,555	1,35	3374,07	18,85
galur 13	4,894	1,04	4705,77	65,76
galur 17	4,642	1,38	3363,77	18,49



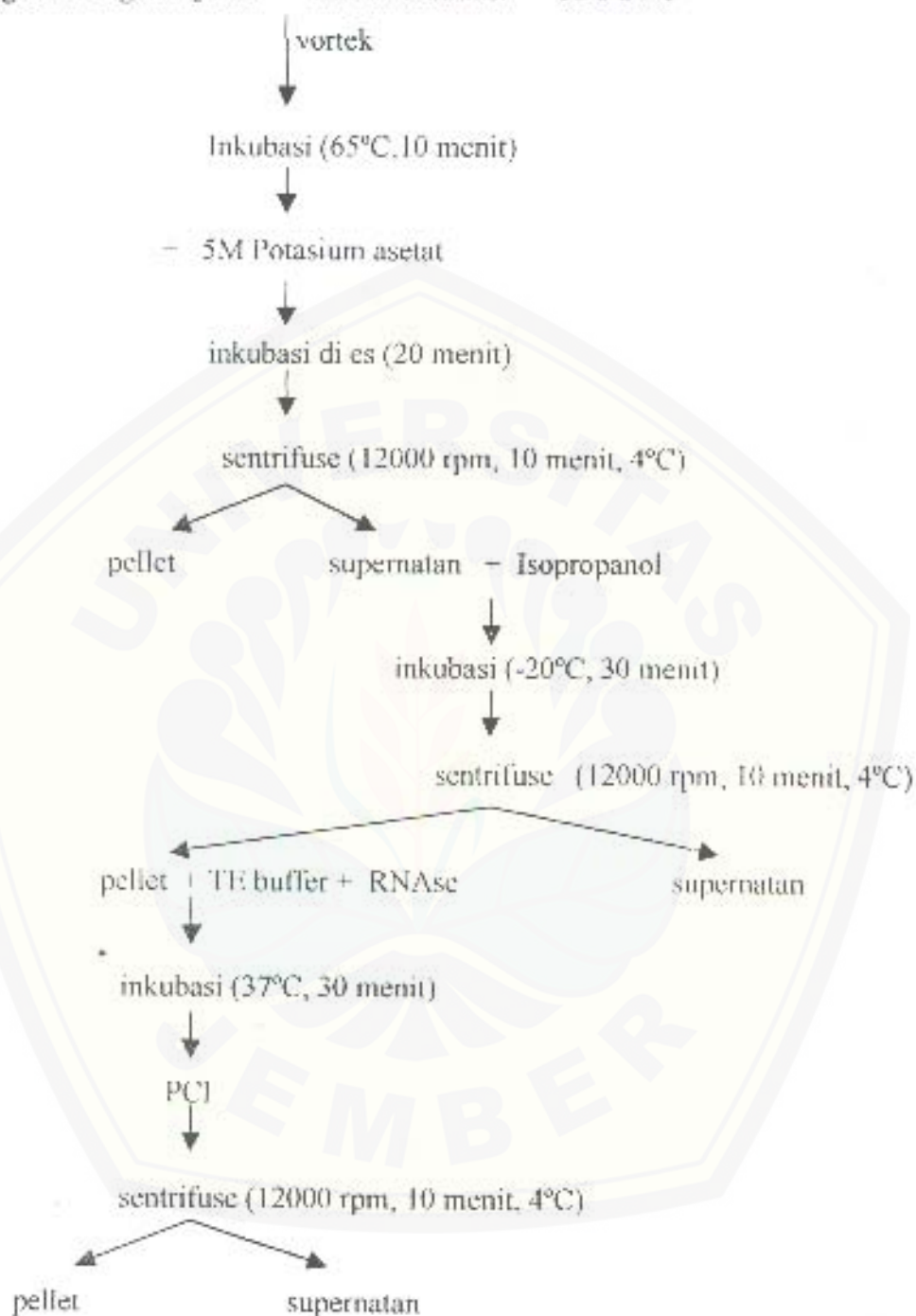
Lampiran 3. Data kandungan sukrosa tembakau transgenik dan *wild type*

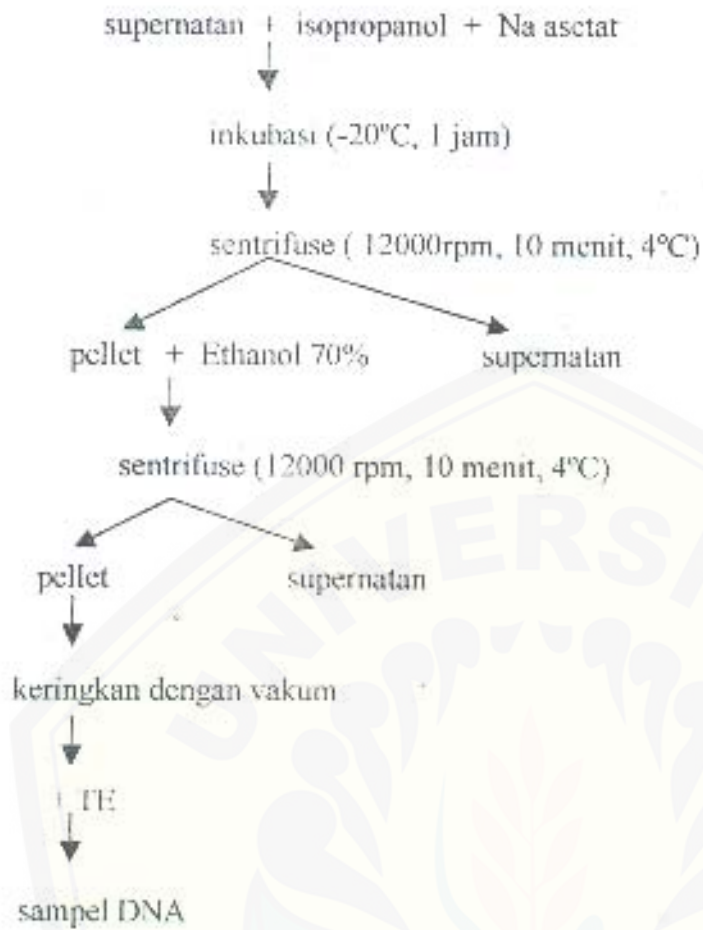
	Total larutan		Berat basah		Konsentrasi		Kand. sukrosa ( $\mu\text{g}/\text{gr}$ berat basah)		% peningkatan kandungan sukrosa
	(mL)	sampel (gr)	s=50 $\mu\text{L}$	s=100 $\mu\text{L}$	s=50 $\mu\text{L}$	s=100 $\mu\text{L}$	rata-rata	standar deviasi	
wild type	5	1,9	17,54	28,25	928,42	743,42	835,92		
galur 2	5	2	16,01	37,6	800,5	840	870,25		4,11
galur 3	5	2	18,64	39,96	982	989	990,5		18,49
galur 7	5	2	18,5	41,39	925	1034,75	979,88		17,22
galur 9	5	2	12,69	43,03	634,5	1075,75	855,13		2,3
galur 13	5	1,55	20,55	49,23	1332,26	1588,26	1450,26		74,69
galur 17	5	2	13,41	35,8	670,5	695	782,75		-6,38

Ket: s= sampel larutan yang digunakan

**Lampiran 4. Skema kerja Isolasi DNA**

Sampel digerus dengan  $N_2$  cair + Buffer ekstraksi + SDS 20%



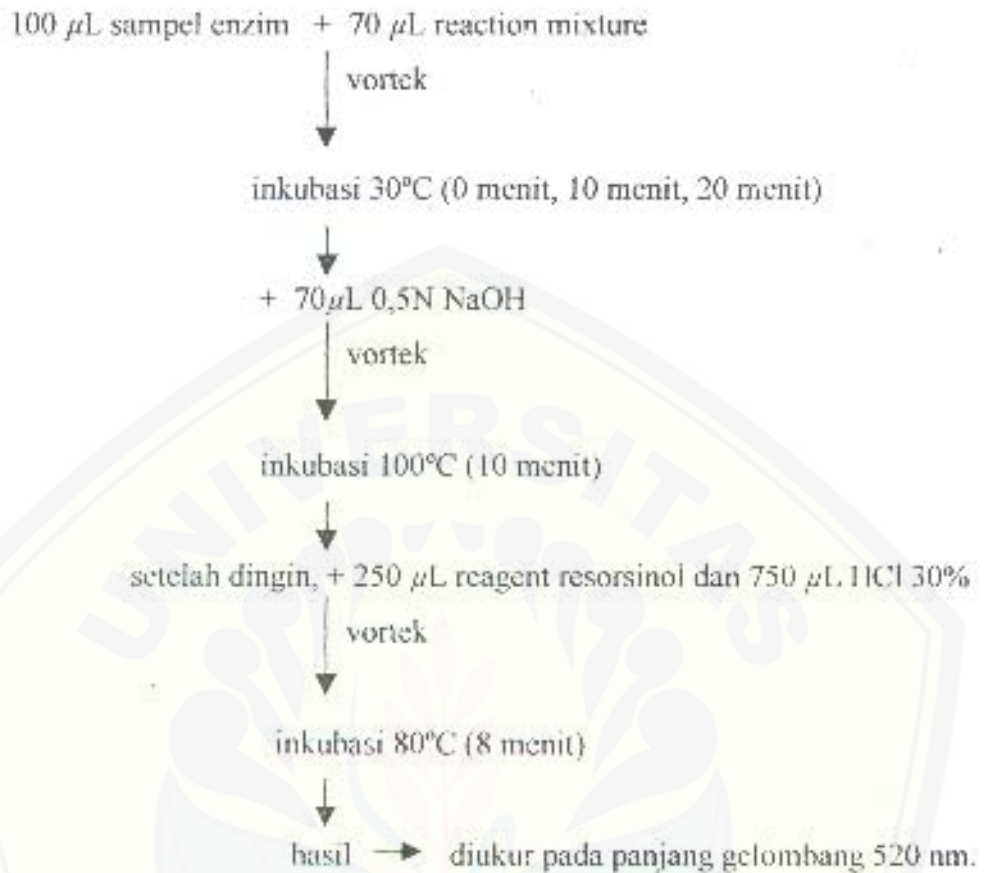




**Lampiran 5. Skema kerja ekstraksi enzim**

Sampel digerus dengan  $N_2$  cair + buffer ekstraksi



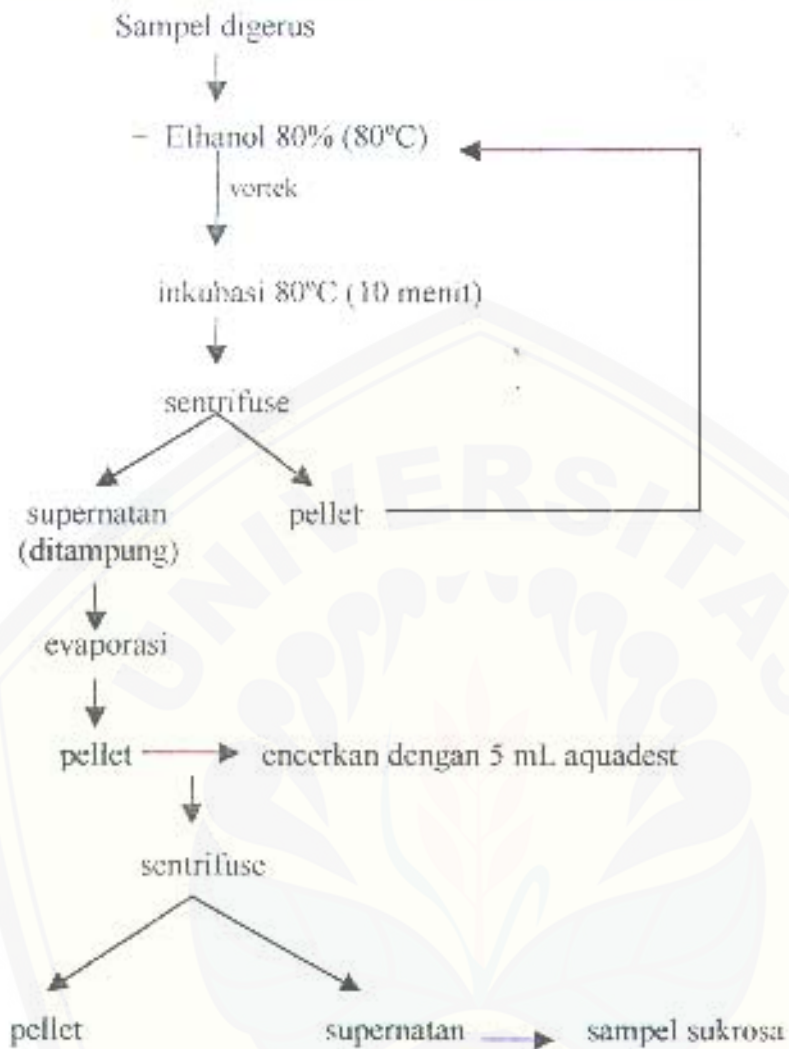
**Lampiran 6. Skema kerja pengukuran aktivitas enzim SPS dan TPT****Pengukuran aktivitas enzim SPS****Pengukuran TPT (Total Protein Terlarut)**

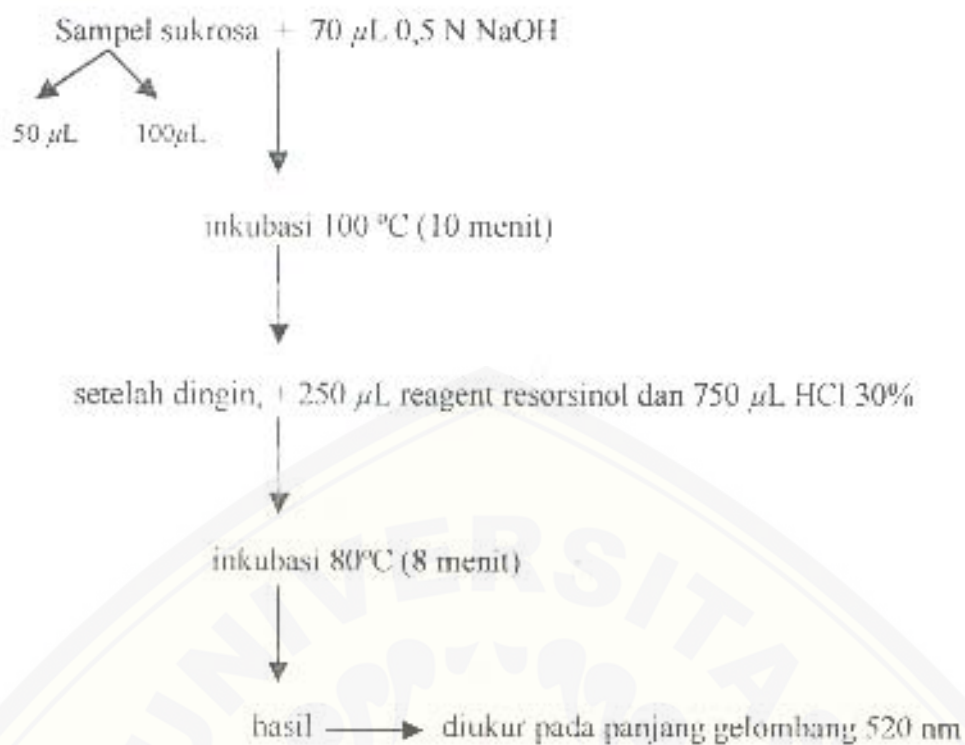
5  $\mu\text{L}$  sampel enzim + 15  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O + 1 mL Bradford

↓  
vortek

diukur pada panjang gelombang 595 nm  
dengan standar BSA 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

## Lampiran 7. Skema kerja pengukuran kandungan sukrosa





Lampiran 8. Skema kerja analisis *western blot*