

TERAKREDITASI

SK No. 134/DIKTI/Kep/2001

ISSN: 0852-6834

Berkala **PENELITIAN**  
**HAYATI**

*(Journal of Biological Researches)*

FEB 2012

Vol. 12

No. 2

DAFTAR ISI VOL. 12 NO. 2 (2007)

KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS *Bacillus* spp SEBAGAI AGENSIA PENGENDALIAN HAYATI PENYAKIT LINCAT PADA TEMBAKAU TEMANGGUNG  
Triwidodo Arwiyanto, YMS Maryudani, Agus Eko Prasetyo

PENGARUH KONSENTRASI NITROGEN DAN FOSFOR TERHADAP POTENSI *Pseudomonas* PENDEGRADASI ALKIL BENZEN SULFONAT LINIAR LAS  
J Suharjono, I Subagja, C Sembiring, Retnaningdyia Retnaningdyia, IKJW Putra

RAPID ASSESSMENT ON MACROMOTH FAUNA AT NUSA BARONG NATURE RESERVE: A LOW DIVERSITY  
Hari Sutrisno

ISOLASI DAN KARAKTERISASI MIKORIZA VESIKULARARBUSKULAR DI LAHAN KERING MASAM LAMPUNG TENGAH  
Pr Hastuti Pr Hastuti

STUDI PENDAHULUAN DAERAH PENYEBARAN POPULASI DAN HABITAT BETET JAWA  
W. Widodo

KEANEKARAGAMAN PERSEBARAN DAN POTENSI JENIS-JENIS *Garcinia* DI INDONESIA  
Tahan Uji

TRANSFORMASI GEN SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE SoSPS1 MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens* UNTUK MENINGKATKAN SINTESIS SUKROSA PADA TANAMAN TEBU *Saccharum officinarum* L  
Miswar Miswar, Bambang Sugiharto, Joedoro Soedarsono, Sukarti Moeljapawiro

PROPORSI MIKROSPORA UNINUKLEAT PADA EMPAT KLON TEBU *Saccharum* spp  
Suai Suai, Woerjono Mangoendidjojo, P.D.N Mirzawan, Ari Indrianto

EFEK EKSTRAK AKAR GINSENG JAWA DAN KOREA TERHADAP LIBIDO MENCIT JANTAN PADA PRAKONDISI TESTOSTERON RENDAH  
Dwi Winarni

KEMAMPUAN JAMUR TIRAM *Pleurotus ostreatus* SEBAGAI SUPLEMEN UNTUK PENINGKATAN SEKRESI AIR SUSU DAN DIAMETER ALVEOLUS KELENJAR AMBING MENCIT  
I.B. Rai Pidada, Listijani Suhargo

BIOAKTIVITAS INSULIN LIKE GROWTH FACTOR $\alpha$ 1 COMPLEX PLASMA SEMINALIS KAMBING TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA HASIL SENTRIFUGASI  
Suherni Susilowati

STUDI PERTUMBUHAN DAN PERKEMBANGAN KONDROSIT EMBRIO AYAM DALAM KULTUR DENGAN ASAM BORAT  
Nur Ducha, Mammed Sagi, Istriyati Istriyati

UJI PRODUKSI BIOSURFAKTAN OLEH *Pseudomonas* sp PADA SUBSTRAT YANG BERBEDA  
Fatimah Fatimah

PBI  
KOMISARIAT  
JAWA TIMUR

# Digital Repository Universitas Jember

Journal of Biological Researches is a peer-reviewed, open access journal, published by Indonesia Biological Association, East Java, Indonesia. It publishes articles and short communications in biological field. Author whose work is accepted for publication is subjected to pay 1000.000 IDR (100 USD) per printed article up to 5 pages. Additional page will be charged 50.000 IDR (5 USD) per printed page without photo(s). Color photo(s) page will be charged 100.000 (10 USD) per printed page.

Information about Indonesia Biological Association membership, please contact PBI board.

## **Indonesia Biological Association, East Java Board:**

Chairman: Prof. Sutiman B. Sumitro, M.Sc., D.Sc

Secretary: Dra. Herawati Susila, M.Sc., Ph.D

Treasurer: Dr. dr. Tjandrakirana M. Sjaifullah Noer, M.Sp. And

## **EDITORIAL BOARD**

Editor in chief : Prof. Sutiman B. Sumitro, M.Sc., D.Sc

Member : Prof. Dr. Bambang Irawan

Prof. Dr. Hitoshi Sawada

Prof. Roger Price

Prof. Fatchiyah, Ph.D

Prof. Wolfgang Nellen

Dr. Paul Kessler

Dr. Bagyo Yanuwadi

Dr. Akira Kikuchi

## **Editorial Officer:**

Romaidi, M.Si

Roudlotul Jannah, S.Si

## **Office:**

Jl, Surakarta No. 5 Malang

East Java, Indonesia 65114

Telp / Fax: (0341) 570631

Website: [www.berkalahayati.org](http://www.berkalahayati.org)

Email: [berkalahayati@yahoo.com](mailto:berkalahayati@yahoo.com)

## **Indexed by:**



## MANUSCRIPT FORMATTING GUIDE

- 1 Please provide the manuscript with no authors identity.
- 2 Manuscript is written in 12 point Times New Roman font **double space** in A4 paper. Margins on all four sides are 2 cm with **left alignment** and do not split it into double-columns (**should be single-column**).
- 3 Page numbers are located at the right bottom.
- 4 Use Line numbers. In Microsoft Word program, to add the line numbers, go to the "Layout" menu in the "Page Setup" main menu. Click Line Numbers, make a tick in "Add line numbering" and choose "Continuous" option.
- 5 **Figures** and **Tables** are uploaded separately in other file. Provide figure in jpeg/jpg and compile in pdf format, while tables are provided and compiled in Ms. Excel

\***Title Page** is provided in separated documents either in Ms. Word or pdf format. It consists of authors' full name (no abbreviation), e-mail address and affiliation (full address with postcode).

\***Cover Letter** is sent by email after submission. It contains an introduction stating the title of the manuscript, the reason of the study is important and relevant to Journal of Biological Researchers Berkala Penelitian Hayati field, major experimental results and overall findings, short conclusion, statement explains that the manuscript has not been published and is not under consideration for publication in any other journal, and statement that all authors approved the manuscript and its submission to the journal.

\***Plagiarism form** should be filled by the authors. In this document, author should attach no plagiarism prove.

**Title** consists no more than 20 words. Authors have to give a running title (maximum of 50 characters includes spaces) which is short title used as page header.

**Abstract.** Abstract is around 150-250 words without references and numbers, abbreviation, acronym or measurement unless essential. Abstract should commence with clear introduction of two or three sentences mentioning the research background. Subsequently, state the general problem of the research. Results are the main findings that directly answer the research problem(s). One or two sentence(s) discuss the finding(s) or prospective(s). Editor has the right to edit the Abstract for reason of clarity.

**Key Words.** Maximum 6 words and written in alphabet order.

**INTRODUCTION.** Write down the research background and mention the previous studies that had been done. State the problem(s) that are needed to be answered through your work. Give a short description (local and scientific name) about the organism of interest.

**METHODS.** The method section need to be brief and detailed enough to allow reviewers to answer some or all of the following questions: (i) Is the study an experimental or an exploration? (ii) Are the methods described in sufficient detail so that the study can be replicated? (iii) If your research uses the previous researcher method, please describe briefly that method. If you make any modification, describe the modified part (iv) Name the number of the samples, give courtesy to whom you obtain the samples (v) State seasonal variation of the habitat (if applicable) or date of sampling (vi) Human materials should be collected in conformation to standard ethics and got with informed consent, provide the department that approved your ethical clearance for the research.

**RESULTS.** Results are written separately with discussion. All data given in Result should be stated in the tables, graph, or figures. See Figures and Tables criteria below. State the obtained

results based on methods. Do not present the same data in both table and graph format. Do not state references in Result section. Means should be given standard deviation.

**DISCUSSION.** Discuss your data by comparing with current related reports. Highlight the similarities, as well as the differences and the uniqueness of your findings. Explain why your result(s) is coming to be. End the discussion by giving a conclusion and future research in that particular topic.

**ACKNOWLEDGEMENT.** State the grant source (Institution, year of the contract) and the person to whom the grant was given. Name the person(s) that help your work.

**REFERENCES.** Journal of Biological Researchers Berkala Penelitian Hayati follows the name-year citation style. They should be referred to in the text by the name(s) of the first author and the year of publication in parentheses, using the following format: (Brower & deSalle 1998) or Brower and deSalle (1998). Use the first author's name and "et al." when there are more than two authors. The order for references within parentheses in the text should be typed start from the oldest year (Monteiro & Pierce 2001; Morinaka et al. 2002; Rubinoff & Sperling 2002). If the references have the same year, place them alphabetically.

### Journal article

Author AB, Author CD, Author EF. 2001. Title of article. *Journal* 60:128-132.

Example: Bagnara JT., and Fernandes PJ., 1993. Hormonal Influences on the Development of Amphibian Pigmentation patterns. *Zoological Science* 10: 733-748.

### Book

Author GH, Author IJ. 2006. Title of Book. City of publication: Publisher's name.

Example: Brown TA., 1993. Genetics a Molecular Approach, 2nd ed. Chapman & Hall, London, 270,302-303.

### Chapter in a book

Author KL, Author MN. 1999. Title of a chapter: a subtitle. In: Editor MN, Editor OP (eds). *Title of Book*. 2nd ed. City of publication: Publisher's name. p 200-235.

Example: Templeton AR.,1989. The Meaning of Species and Speciation; A Genetics Prespective dalam Otte D., dan Endler, JA. (Ed.) *Speciation and its Consequences*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 1-27.

### Thesis or Dissertation

Author MN. 2002. Title [Dissertation]. Location of university: Name of university.

Example: Widayanti KA. 2006. Color perception of L4M5 gene carrier female *Macaca fascicularis* [Thesis]. Bogor: Bogor Agricultural Univ.

**FIGURES** are uploaded in pdf (combined with the title and explanation) and separately in jpeg/jpg format that are compiled in ppt/word (original image and big size or clear enough). For pdf, present graph in maximum width of 8.5 cm. Numbers and title are written in 8 point. Add measurement scale if needed. Arrows should be given to point certain objects.

**STATISTICAL GRAPHS.** Give standard deviation to every mean value. Authors that used Microsoft Excel Program need to give the raw data.

**TABLES.** Give standard deviation to every mean value. Table titles should be concise. Explanatory material, notes on measurements, and other general information that applies to the whole table should be included as the first, unnumbered footnote and not in the table title. Numbers and table title are written in 8 point Times New Roman font. Please provide an editable files.

## DAFTAR ISI VOL. 12 NO. 2 (2007)

KARAKTERISASI DAN UJI AKTIVITAS *Bacillus* spp SEBAGAI AGENSIA PENGENDALIAN HAYATI PENYAKIT LINCAT PADA TEMBAKAU TEMANGGUNG  
**Triwidodo Arwiyanto, YMS Maryudani, Agus Eko Prasetyo**

PENGARUH KONSENTRASI NITROGEN DAN FOSFOR TERHADAP POTENSI *Pseudomonas* PENDEGRADASI ALKILBENZEN SULFONAT LINIAR LAS  
**J Suharjono, L Subagja, C Sembiring, Retnaningdy Retnaningdy, IKJW Putra**

RAPID ASSESSMENT ON MACROMOTH FAUNA AT NUSA BARONG NATURE RESERVE: A LOW DIVERSITY  
**Hari Sutrisno**

ISOLASI DAN KARAKTERISASI MIKORIZA VESIKULARBUSKULAR DI LAHAN KERING MASAM LAMPUNG TENGAH  
**Prihastuti Prihastuti**

STUDI PENDAHULUAN DAERAH PENYEBARAN POPULASI DAN HABITAT BETET JAWA  
**W. Widodo**

KEANEKARAGAMAN PERSEBARAN DAN POTENSI JENISJENIS *Garcinia* DI INDONESIA  
**Tahan Uji**

TRANSFORMASI GEN SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE SoSPS1 MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens* UNTUK MENINGKATKAN SINTESIS SUKROSA PADA TANAMAN TEBU *Saccharum officinarum* L  
**Miswar Miswar, Bambang Sugiharto, Joedoro Soedarsono, Sukarti Moeljapawiro**

PROPORSI MIKROSPORA UNINUKLEAT PADA EMPAT KLON TEBU *Saccharum* spp  
**Suai Suai, Woerjono Mangoendidjojo, P.D.N Mirzawan, Ari Indrianto**

EFEK EKSTRAK AKAR GINSENG JAWA DAN KOREA TERHADAP LIBIDO MENCIT JANTAN PADA PRAKONDISI TESTOSTERON RENDAH  
**Dwi Winarni**

KEMAMPUAN JAMUR TIRAM *Pleurotus ostreatus* SEBAGAI SUPLEMEN UNTUK PENINGKATAN SEKRESI AIR SUSU DAN DIAMETER ALVEOLUS KELENJAR AMBING MENCIT  
**I.B. Rai Pidada, Listijani Suhargo**

BIOAKTIVITAS INSULIN LIKE GROWTH FACTOR $\alpha$ -I COMPLEX PLASMA SEMINALIS KAMBING TERHADAP KUALITAS SPERMATOZOA HASIL SENTRIFUGASI  
**Suherni Susilowati**

STUDI PERTUMBUHAN DAN PERKEMBANGAN KONDROSIT EMBRIO AYAM DALAM KULTUR DENGAN ASAM BORAT  
**Nur Ducha, Mammed Sagi, Istriyati Istriyati**

UJI PRODUKSI BIOSURFAKTAN OLEH *Pseudomonas* sp PADA SUBSTRAT YANG BERBEDA  
**Fatimah Fatimah**

POTENSI ANTIBODI SPERMATOZOA TERHADAP SPERMATOGENESIS DAN FERTILISASI PADA TIKUS PUTIH  
**Indah Norma Triana**

HIDROLISIS BEBERAPA JENIS XILAN DENGAN ENZIM XILANOLITIK TERMOFILIK REKOMBINAN  
Ni Nyoman Tri Puspaningsih, Hery Suwito, Sri Sumarsih, Ali Rohman, One Asmarani



# TRANSFORMASI GEN SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE (SoSPS1) MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens* UNTUK MENINGKATKAN SINTESIS SUKROSA PADA TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.)

Miswar,\* Bambang Sugiharto,\*\* Joedoro Soedarsono\*\*\* dan Sukarti Moeljapawiro\*\*\*\*

\* Puslit Biologi Molekul dan Fakultas Pertanian Universitas Jember, Jember

\*\* Puslit Biologi Molekul dan Fakultas MIPA Universitas Jember, Jember

\*\*\* Faklutas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta

\*\*\*\* Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Jogjakarta

## ABSTRACT

*Sucrose phosphate synthase (SPS; EC 2.3.1.14) plays an important role in partition of assimilated carbon in most plants. SPS catalyses the penultimate reaction in the pathway of sucrose synthesis, in which sucrose-6-phosphate (Suc6P) is synthesized from UDP-glucose (UDPG) and fructose-6-P (Fru6P). To increase the capacity of sugarcane in sucrose synthesis, spindle leaves of sugarcane cv R579 were transformed with cDNA SoSPS1 from sugarcane under the control of constitutive promoter (35S CaMV) that constructed in pBI 121 (pKYS) using Agrobacterium tumefaciens. Based on PCR analysis, we have detected the existence of SPS transgene in some lines of transformed sugarcane, called line 4, 5, 6, and 7. The SPS transgene in transformed sugarcane could be expressed into translation level and increased the amount of leaves SPS protein, so the activity of leaves SPS was higher than wild type sugarcane as control. The transformed sugarcane line 4, 5, 6, and 7 showed 1.4–2.9 fold increases in SPS activity and 1,76–2,2 fold increases in leaves sucrose content. Increasing in SPS activity in transgenic sugarcane was coupled by the increase in invertase activity and ratio between sucrose and starch content.*

**Key words:** *SoSPS1, sugarcane, CaMV, Agrobacterium tumefaciens, pBI121*

## PENGANTAR

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) banyak dibudidayakan di daerah tropis dan subtropis untuk kepentingan industri gula dan kertas serta pakan ternak. Ploidi yang tinggi (*high ploidy*), fertilitas yang rendah (*low fertility*), genom yang besar (*large genome*) dan interaksi dengan lingkungan yang kompleks menyebabkan pemuliaan secara konvensional untuk memperbaiki genetik tebu sulit dilakukan (Gallo-Meagher dan Irvine, 1996). Perkembangan yang pesat dalam bidang biologi molekuler dan transformasi genetik memungkinkan untuk mengidentifikasi, mengisolasi, dan memindahkan gen yang dikehendaki ke dalam tanaman tebu (Manickavasagam *et al.*, 2004). Penggunaan *Agrobacterium tumefaciens* dalam transformasi tanaman lebih menguntungkan dibandingkan dengan metode lain (Arencibia *et al.*, 1998). Jumlah kopi gen yang diintegrasikan ke genomik tanaman relatif sedikit, lebih stabil dan tanaman transgenik bersifat fertil (Le *et al.*, 2001) serta pewarisannya mengikuti sistem Mendel (Rhodora dan Thomas, 1996) merupakan kelebihan penggunaan *Agrobacterium* dalam proses transfer gen dibandingkan menggunakan gene gun.

Sukrosa dalam tanaman mempunyai fungsi yang sangat penting, tidak hanya menyediakan energi tetapi juga merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Fung *et al.*, 2003). Selain itu sukrosa juga berperan sebagai pengatur ekspresi gen-gen fotosintetik (Koch, 1996; Jang dan Sheen, 1994) dan gen-gen nonfotosintetik seperti gen yang terlibat dalam pembelahan dan diferensiasi sel. Dalam sel sukrosa disintesis di sitosol yang dikatalisis oleh sucrose phosphate synthase (SPS; E.C. 2.3.1.14). SPS merupakan enzim utama yang menentukan kemampuan tanaman dalam sintesis sukrosa (Komatsu *et al.*, 1999; Langenkamper *et al.*, 2002). Pada tanaman aktivitas SPS memengaruhi partisi karbon hasil fotosintesis di daun (Lunn dan Hatch, 1997).

Enzim SPS mengkatalisis reaksi terakhir kedua (*penultimate reaction*) yang menghasilkan *Sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dan phosphate kemudian dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) menghasilkan sukrosa, seperti tampak pada Gambar 1. Pada tanaman aktivitas kedua enzim tersebut saling terkait, peningkatan aktivitas SPS akan meningkatkan ketersediaan substrat (*sucrose-6-phosphate*) bagi enzim SPP, sehingga aktivitasnya meningkat (Echeverria *et al.*, 1997).



Gambar 1. Jalur sintesis sukrosa yang dikatalisis oleh enzim SPS

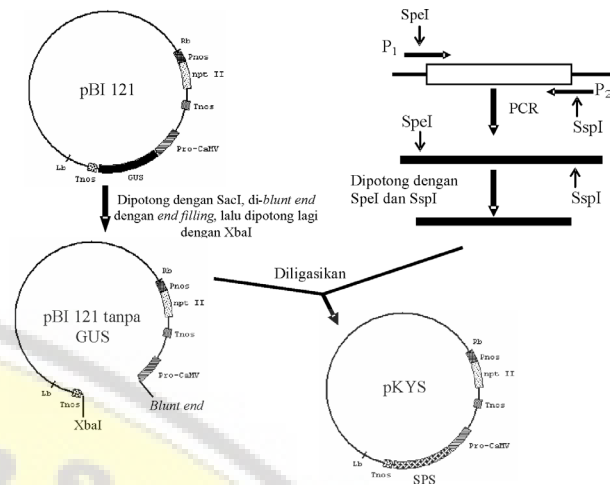
Sampai saat ini telah berhasil diisolasi gen SPS dari jagung (Worrell *et al.*, 1991), spinach (Sonnewald *et al.*, 1993) dan bit gula (Hesse *et al.*, 1995). Pada tanaman tebu berhasil diisolasi dua gen (cDNA) SPS (SoSPS1 dan SoSPS2) dengan jumlah asam amino masing-masing 1.047 dan 963 (Sugiharto *et al.*, 1997). Lebih lanjut dijelaskan bahwa gen SoSPS1 mengkode SPS yang terdapat pada jaringan fotosintetik, sedangkan gen SoSPS2 mengkode SPS yang diekspresikan secara konstitutif.

Transformasi gen SPS jagung di bawah kontrol promoter *rbcS* pada tanaman tomat dapat meningkatkan aktivitas SPS dan kandungan sukrosa daun, sebaliknya kandungan pati menurun (Worrell *et al.*, 1991). Pada tembakau transgenik yang mengekspresikan gen SoSPS1 tebu di bawah kontrol promoter 35S CaMV dapat meningkatkan aktivitas SPS dan kandungan sukrosa daun (Miswar dkk., 2005). Tanaman tomat yang ditransformasi dengan gen SPS jagung di bawah kontrol promoter CaMV 35S, aktivitas SPS pada daun muda dan akar muda meningkat masing-masing sebesar 2–3 kali dan 10–20 kali, tetapi pada buah muda tidak terjadi peningkatan SPS (Laporte *et al.*, 1997). Pada *Arabidopsis thaliana* yang mengandung gen SPS jagung dengan promoter *rbcS* dapat meningkatkan aktivitas SPS daun sampai tiga kali (Signora *et al.*, 1998). Pentingnya peran SPS pada biosintesis sukrosa mendorong penelitian transformasi gen SPS pada tanaman tebu. Data awal menunjukkan bahwa tinggi rendahnya aktivitas SPS pada beberapa kultivar tebu berkorelasi positif dengan hasil gula tebu (Sugiharto *et al.*, 1996). Tujuan penelitian ini adalah untuk meningkatkan aktivitas SPS dan sintesis sukrosa pada daun tebu melalui transformasi gen SoSPS1 yang dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens*.

**BAHAN DAN CARA KERJA**

**Bahan**

Pucuk tebu cv. R579 diambil dari tebu berumur 4–5 bulan dan disterilisasi untuk digunakan sebagai bahan untuk transformasi gen SoSPS1. *Agrobacterium tumefaciens* galur LBA4404 ditumbuhkan pada media YEP yang mengandung (per liter) 10 g yeast ekstrak, 10 g bacto peptone, 5 g NaCl



Gambar 2. Strategi pembuatan konstruk pKYS untuk transformasi cDNA SoSPS1 pada tanaman tebu dengan bantuan *Agrobacterium*

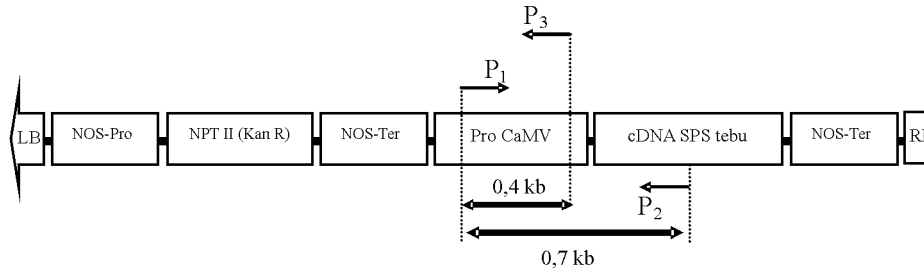
dan 15 g agar, pH 7,0. Konstruk cDNA SoSPS1 pada pBI 121 tanpa gen GUS (pKYS) didapat dari Dr. Keiko Yonekura (RIKEN-Plant Science Center, Japan), seperti tampak pada Gambar 2.

**Transformasi *Agrobacterium* dengan Konstruk pKYS**

*Agrobacterium* ditransformasi dengan konstruk pKYS menggunakan *direct transformation method* dari An *et al.* (1988). Seratus mikroliter kultur *Agrobacterium* yang telah dibuat kompeten dengan 10 mM CaCl<sub>2</sub> ditambah 1 µg DNA pKYS, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Campuran DNA-bakteri ditambah dengan 1 ml larutan YEP dan dikocok dengan shaker incubator pada suhu 28 °C selama 2 jam. *Agrobacterium* diambil dengan menggunakan sentrifugasi (10.000 rpm, 4 °C) selama 2 menit, supernatan dibuang dan endapan bakteri disuspensikan dengan 100 µl larutan YEP. Lima puluh mikroliter (50 µl) suspensi *Agrobacterium* ditumbuhkan pada media YEP agar yang mengandung antibiotik 100 µg ml<sup>-1</sup> kanamisin, 100 µg ml<sup>-1</sup> Rifampisin dan 25 µg ml<sup>-1</sup> gentamisin. *Agrobacterium* yang tumbuh dianalisis dengan menggunakan PCR untuk memastikan keberadaan cDNA SoSPS1 tebu.

**Analisis Polymerase Chain Reaction (PCR)**

DNA plasmid (konstruk pKYS) diisolasi dari *Agrobacterium transforman* dengan menggunakan metode mini prep (Sambrook *et al.*, 1989). Untuk konfirmasi keberadaan cDNA SoSPS1 tebu pada plasmid hasil isolasi dari *Agrobacterium* transformasi dilakukan analisis PCR dengan program sebagai berikut: *predenaturation* pada



**Gambar 3.** Posisi macam primer ( $P_{1,2,3}$ ) yang digunakan dalam analisis PCR

94 °C selama 2 menit, *denaturation* pada 94 °C selama 1 menit, *annealing* pada 55 °C selama 1 menit dan *extension* pada 72 °C selama 2 menit. Primer yang digunakan untuk analisis PCR didesain berdasarkan sekuen promotor CaMV- SoSPS1 ( $P_1$  dan  $P_2$ ), sekuen CaMV-CaMV ( $P_1$  dan  $P_3$ ) seperti tampak pada Gambar 3. Sekuen primer yang digunakan sebagai berikut:

$P_1$  : 5'- GGACCTAACAGAACTCGCCG -3' (*forward primer*);

$P_2$  : 5'- CACCTCCTCGACGAAGTAGTG - 3' (*reverse primer*)

$P_3$  : 5'- CGTCATCCCTTACGTCAGTGG- 3' (*reverse primer*)

### Transformasi Tanaman Tebu dengan *Agrobacterium*

Eksplan steril berupa potongan daun tebu yang menggulung diinfeksi dengan *Agrobacterium*: pKYS dalam media MS cair yang mengandung 3 ppm 2,4-D (MS-1) dan 100 ppm *acetosyringone*. Eksplan dipindah ke media MS-1 padat yang mengandung 100 ppm *acetosyringone* dan diinkubasi pada suhu 28 °C dalam keadaan gelap selama 3 hari untuk ko-kultivasi. Eksplan dicuci 3 kali dengan MS-1 cair yang mengandung 500 ppm *cefotaxime*, lalu ditanam pada media MS-1 padat yang mengandung 500 ppm *cefotaxime* untuk mematikan *Agrobacterium*. Eksplan yang telah bebas *Agrobacterium* ditanam pada media MS-1 yang mengandung 500 ppm *cefotaxime* dan 50 ppm kanamisin untuk pembentukan kalus selama 3 minggu. Kalus yang terbentuk diregenerasikan untuk membentuk tunas pada media MS padat yang mengandung 2 ppm IAA, 59 ppm dalapon dan 50 ppm kanamisin. Subkultur dilakukan setiap 3 minggu sampai tunas menjadi tanaman sempurna (*plantlet*), lalu aklimatisasi.

### Analisis Tebu Hasil Transformasi dengan PCR

DNA genomik tebu hasil transformasi diisolasi dengan menggunakan metode SDS (Ainsworth *et al.*, 1995). Untuk mengetahui keberhasilan proses transformasi pada tebu dilakukan analisis PCR dengan menggunakan DNA genomik dari tebu hasil transformasi sebagai template. Primer yang digunakan untuk analisis PCR adalah  $P_1$ ,  $P_2$ , dan  $P_3$ .

### Analisis Western Blot Protein SPS

Protein daun tebu sebanyak 50  $\mu$ g dipisahkan dengan SDS-PAGE pada konsentrasi akrilamide 12%, kemudian protein dipindahkan ke membran nitroselulosa dengan elektroblotting selama 2 jam. Protein SPS pada membran direaksikan dengan antibodi SPS1 (Sugiharto *et al.*, 1997) dan kemudian membran dicuci 3 kali dengan PBS (*phosphate buffer saline*). Membran lalu direndam dalam alkaline phosphatase-IgG conjugate yang telah diencerkan 1/3000 kali dengan blocking reagent. Untuk visualisasi protein SPS, membran direndam dalam bufer alkaline phosphatase yang mengandung BCIP dan NBT.

### Ekstraksi Protein Daun Tebu Hasil Transformasi

Sampel daun sebanyak 1 g dibekukan dengan nitrogen cair dalam mortar, lalu digerus menjadi tepung. Tepung dihomogenasi dengan 3 ml bufer ekstraksi yang mengandung 50 mM Mops-NaOH (pH 7,4), 20 mM MgCL<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 5 mM DTT dan 10% PVP-25 dan 1 mM PSMF. Homogenat disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm, 4 °C selama 15 menit. Supernatan dilewatkan (gel filtrasi) pada kolom sephadex-G25 yang telah diekuilibrasikan. Enzim hasil filtrasi ditampung dan kandungan protein diukur dengan metode Bradford (1976) menggunakan protein bovine serum albumin (BSA) sebagai standar.



**Pengukuran Aktivitas SPS dan Acid Invertase (AI)**

Aktivitas SPS diukur berdasarkan jumlah sukrosa yang terbentuk selama reaksi berdasarkan metode yang dilakukan Sugiharto *et al.* (1996). Larutan pereaksi yang digunakan mengandung 85 mM Mops-NaOH (pH 7,5) dan 26 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µl 0,1 M *fructose-6-phosphate*, 10 µl 0,1 M *glucose-6-phosphate* dan 10 µl 0,1 M *UDP-glucose*. Reaksi dihentikan dengan penambahan 70 µl 0,5 N NaOH dan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 10 menit. Jumlah sukrosa yang terbentuk selama reaksi ditentukan dengan menggunakan resorcinol.

Aktivitas AI diukur berdasarkan jumlah gula reduksi yang dihasilkan dari pemecahan sukrosa selama reaksi berdasarkan metode Arai *et al.* (1991). Larutan pereaksi yang digunakan mengandung bufer 25 mM Mops-NaOH (pH 5,5) dan 100 mM sukrosa. Jumlah gula reduksi yang terbentuk selama reaksi ditentukan dengan menggunakan DNS.

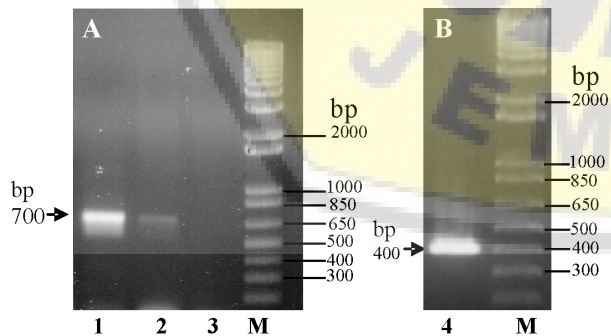
**Pengukuran kandungan sukrosa daun**

Sukrosa daun tebu diekstraksi dengan menggunakan 80% etanol, hasil ekstraksi dikeringkan dengan menggunakan rotary evaporation dan dilarutkan dengan air distilasi (Botha dan Black, 2000). Kandungan sukrosa diukur dengan menggunakan resorcinol.

**HASIL**

**Analisis gen SoSPS1 pada Agrobacterium**

*Agrobacterium* yang telah ditransformasi dengan konstruk pKYS dianalisis dengan PCR untuk memastikan



**Gambar 4.** Hasil elektroforesis produk PCR dengan menggunakan pasangan primer CaMV-SoSPSI (A): (1,2) template pKYS dari *Agrobacterium* transforman, (3) plamid pBI 121, (M) marker 1 kb invitrogen. PCR menggunakan pasangan primer CaMV-CaMV (B): (4) template pKYS dari *Agrobacterium* transforman

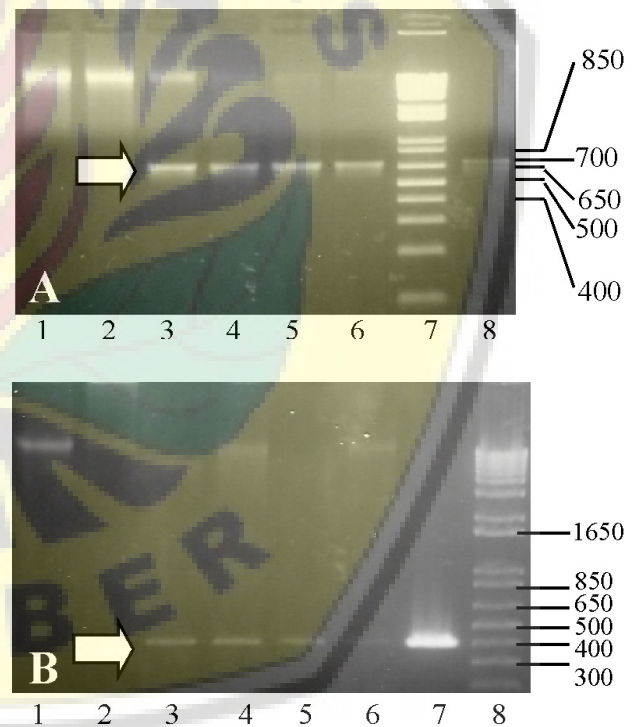
keberadaan gen SoSPS1 tebu. Hasil analisis menunjukkan bahwa *Agrobacterium* positif membawa gen SoSPS1 tebu, seperti tampak pada Gambar 4.

**Analisis Tebu Hasil Transformasi**

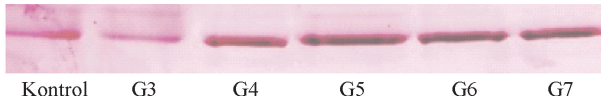
Keberadaan SPS transgen pada tebu hasil transformasi dengan menggunakan *Agrobacterium* dianalisis dengan metode PCR, seperti tampak pada Gambar 5. Pada Gambar 5 terlihat bahwa pada tebu hasil transformasi galur 4, 5, 6 dan 7 telah mengandung gen SoSPS1 di bawah kontrol promoter 35S CaMV.

**Deteksi protein SPS daun tebu T0**

Hasil analisis western blot menunjukkan bahwa jumlah protein SPS pada tebu T0 galur 4, 5, 6 dan 7 lebih banyak dibandingkan kontrol, sedangkan pada galur 3 jumlah protein SPS lebih sedikit dibandingkan tebu T0 yang lain, seperti tampak pada Gambar 6.



**Gambar 5.** Hasil PCR tebu yang diduga transgenik, (A) menggunakan pasangan primer (CaMV-SoSPSI): (1) kontrol, (2) galur 3, (3) galur 4, (4) galur 5, (5) galur 6, (6) galur 7, (7) Marker invitrogen, (8) DNA pKYS. (B) pasangan primer (CaMV-CaMV): (1) kontrol, (2) galur 3, (3) galur 4, (4) galur 5, (5) galur 6, (6) galur 7, (7) DNA pKYS, (8) Marker invitrogen. Tanda panah menunjukkan fragmen DNA hasil amplifikasi



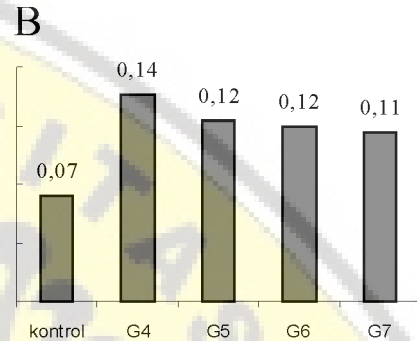
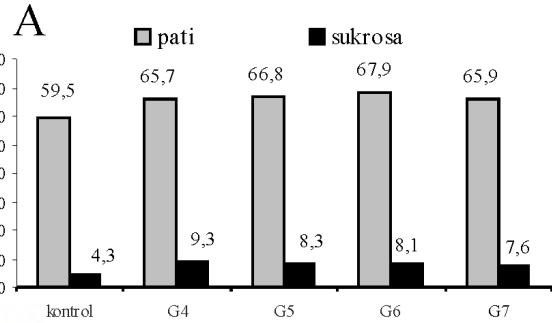
**Gambar 6.** Hasil analisis *western blot* protein SPS daun tebu hasil transformasi. Tanaman kontrol, (G3-G7) tanaman tebu hasil transformasi galur 3, 4, 5, 6, dan 7

**Aktivitas SPS dan AI daun tebu T0**

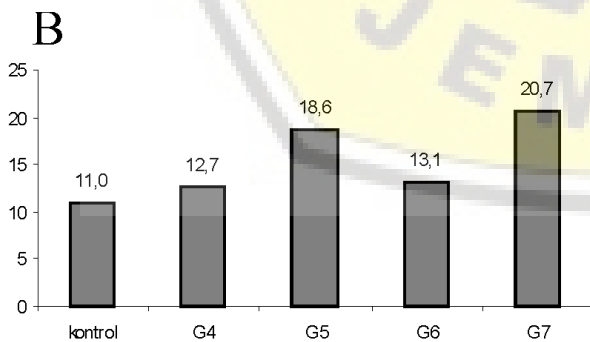
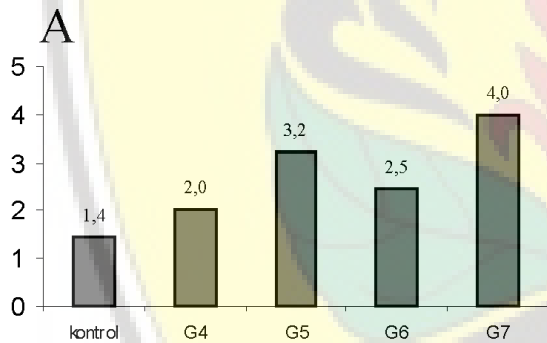
Aktivitas SPS dan AI tanaman tebu hasil transformasi dengan bantuan *Agrobacterium* lebih tinggi dibandingkan dengan tebu kontrol dan bervariasi antara galur, seperti tampak pada Gambar 7.

**Kandungan sukrosa daun tebu**

Kandungan sukrosa pada daun tanaman tebu hasil transformasi lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol, seperti tampak pada Gambar 8.



**Gambar 8.** (A) Kandungan sukrosa dan kandungan pati (mg g<sup>-1</sup> berat segar daun), (B) Rasio sukrosa: pati daun tanaman tebu hasil transformasi



**Gambar 7.** (A) Aktivitas SPS (mg sukrosa menit<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein) dan (B) invertase (µg sukrosa menit<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein) daun tebu hasil transformasi dengan bantuan *Agrobacterium*

**PEMBAHASAN**

*Agrobacterium tumefaciens* merupakan bakteri tanah yang secara genetik dapat memindahkan (mentransfer) gen ke tanaman. Pada awalnya bakteri ini hanya digunakan untuk mentransfer gen ke tanaman dikotil, sedangkan tanaman monokotil masih sangat jarang karena dianggap bukan sel inangnya. Akhir-akhir ini telah digunakan *Agrobacterium* untuk mentransfer gen ke tanaman monokotil seperti padi (*Oryza sativa*). Pada penelitian ini cDNA SoSPS1 berhasil ditransfer ke tanaman tebu (monokotil) menggunakan *Agrobacterium*. Berdasarkan analisis PCR terhadap tebu hasil transformasi didapat 4 galur (galur 4, 5, 6 dan 7) yang positif mengandung SPS transgen. Dari ke-4 galur tebu tersebut berhasil diamplifikasi fragmen cDNA SoSPS1 dan promoter CaMV dengan panjang masing-masing 700 bp dan 400 bp, seperti terlihat pada Gambar 5. Hasil PCR pada Gambar 5 sama dengan hasil PCR yang menggunakan pKYS yang disolasi dari *Agrobacterium transformans* sebagai template, seperti terlihat pada Gambar 4. Hal ini menunjukkan bahwa *Agrobacterium* dapat digunakan untuk proses transformasi cDNA SoSPS1 ke tanaman monokotil, dalam hal ini tanaman tebu.

Keberhasilan dalam transfer gen SPS ke sel target harus dapat diekspresikan sehingga menghasilkan protein atau enzim yang secara fungsional dapat aktif. Berdasarkan analisis western blot (Gambar 6) tampak intensitas band protein SPS pada tebu transgenik galur 4, 5, 6, dan 7 lebih tebal dibandingkan tanaman kontrol yang berarti galur-galur tersebut menghasilkan protein SPS lebih banyak. Hal ini menunjukkan gen SoSPS1 yang ditransfer ke tanaman tebu dengan menggunakan *Agrobacterium* dapat diekspresikan sampai tingkat translasi sehingga dihasilkan protein SPS.

Jumlah protein SPS yang meningkat pada tebu hasil transformasi galur 4, 5, 6, dan 7 mengakibatkan peningkatan aktivitas SPS yang lebih tinggi dibandingkan tebu kontrol, seperti tampak pada Gambar 7A. Peningkatan aktivitas SPS pada galur 4, 5, 6, dan 7 masing-masing mencapai 142,8%; 178,6%; 228%; 285,7% dari kontrolnya. Hasil ini hampir sama dengan hasil penelitian Laporte *et al.* (1997), di mana aktivitas SPS pada tomat yang ditransformasi dengan gen SPS jagung yang dikendalikan oleh promoter 35S-CaMV meningkat rata-rata dua kali dari tanaman tomat kontrol. Tingginya aktivitas SPS pada galur 7 juga diikuti dengan tingginya aktivitas AI yang menghidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa sehingga kandungan sukrosanya menjadi lebih kecil. Pada Gambar 7B tampak bahwa ada kesamaan pola antara aktivitas SPS dengan aktivitas invertase dari tebu hasil transformasi, semakin tinggi aktivitas SPS semakin tinggi juga aktivitas AI. Aktivitas SPS daun yang lebih tinggi pada tebu transgenik, menyebabkan kandungan sukrosa daun lebih tinggi dibandingkan kontrolnya (Gambar 8A). Namun di antara tebu transgenik, aktivitas SPS yang lebih tinggi menghasilkan kandungan sukrosa yang lebih rendah. Menurut Laporte *et al.* (2001) bahwa aktivitas SPS yang tinggi menyebabkan ketidakseimbangan antara sintesis sukrosa dan sintesis asam amino. Pada tanaman yang mempunyai aktivitas SPS tinggi, sintesis asam amino akan menurun, terutama asam amino yang berperan dalam pembentukan *rubisco*. Terjadinya peningkatan sintesis sukrosa menyebabkan penurunan sintesis pati, sehingga rasio antara kandungan sukrosa dengan pati lebih tinggi pada tebu transgenik dibandingkan kontrol (Gambar 8B). Demikian pula pada tanaman *Arabidopsis thaliana* yang ditransformasi dengan gen SPS dari jagung terjadi peningkatan rasio sukrosa: pati sekitar 0.03–0.17 (Signora *et al.*, 1998). Peningkatan rasio ini terjadi karena alokasi penggunaan fotosintat (triosa phosphat) untuk sintesis sukrosa di sitosol lebih besar dibandingkan untuk sintesis pati di kloroplas.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek RUT VIII atas nama Dr. Bambang Sugiharto. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Purnama Oktavia yang telah membantu penelitian ini. Makalah ini merupakan sebagian hasil penelitian untuk mendapatkan Derajat Doktor di Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada (UGM) Jogjakarta.

## KEPUSTAKAAN

- Ainsworth C, Beynon J, dan Wollaston VB, 1995. Techniques in plant molecular biology, the practical manual, University of London, UK.
- An G, Ebert P, Mitra A dan Ha S 1988 In Plant Molecular Biology Manual ed. By SB. Gelvin dan Schilperoort KA (1995) Kluwer Academic Pub., Netherlands.
- Arai M, Mori H dan Imaseki H, 1991. Roles of Sucrose4-Metabolizing Enzymes in Growth Seedlings, Purification of Acid Invertase from Growing Hipocotyls of Mung Bean Seedlings. *Plant Cell Physiol* 32: 1292–1298.
- Arencibia AD, Carmona ER, Tellez P, Chan MS, Yu SM, Trujillo LE dan Oramas P, 1998 An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Trans. Res.* 7: 213–222.
- Botha FC, dan Black KG, 2000. Sucrose phosphate synthase and sucrose synthase activity during maturation of internodal tissue in sugarcane. *Aust. J. Plant Physiol.* 27: 81–85.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Echeverria E, Salvucci ME, Gonzales P, Paris G dan Salerno G, 1997 Physical and kinetic evidence for an association between sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase. *Plant Physiol.* 115: 223–227.
- Fung, RWM, Langenkamper G, Gardner RC dan MacRae, E 2003. Differential expression within an SPS gene family. *Plant Sci.* 164: 459–470.
- Gallo-Meagher M, dan Irvine, 1996. Herbicide resistant sugarcane containing the bar gene. *Crop Sci.* 36: 1367–1374.
- Hesse H., Sonnewald U, dan Willmitzer L. 1995 Cloning and expression analysis of sucrose phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Mol. Gen. Genet.* 247: 515–520.
- Jang JC dan Sheen J, 1994. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665–1679.
- Koch KE, 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* 47: 509–540.
- Komatsu A, Y. Takanokura Y, Moriguchi T, Omura M dan Akihama T. 1999. Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoforms during sucrose accumulating in citrus fruits (*Citrus unshiu* Marc). *Plant Sci.* 140: 169–178.

- Langenkamper G, Fung RWM, Newcomb RD, Atkinson RG, Gardner RC dan MacRae EA, 2002. Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *J. Mol. Evol.* 54: 322–332.
- Laporte MM, Galagan JA, Shapiro JA, Boersig MR, Shewmaker CK, dan Sharkey TD, 1997. Sucrose phosphate synthase activity and yield analysis of tomato plants transformed with maize sucrose phosphate synthase. *Planta* 203: 253–259.
- Laporte, MM, Galagan JJ, Prash AL, Vanderveer PJ, Hanson DT, Shewmaker CK dan Sharkey TD, 2001. Promoter strength and tissue specificity effect on growth of tomato plants transformed with maize sucrose phosphate synthase. *Planta* 212: 817–822.
- Le VQ, Belles-Isles J, Dusabenyagasani M, dan Tremblay FM, 2001. An improved procedure for production of white spruce (*Picea glauca*) transgenic plants using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Exp. Bot.* 52: 2089–2095.
- Lunn JE dan Hatch MD, 1997. The role of sucrose phosphate synthase in the control photosynthate partitioning in *Zea mays* leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* 24: 1–8.
- Manickavasagam M, Ganapathi A, Anbazhagan VR, Sudhakar B, Selvaraj N, A. Vasudevan A, dan Kasthuriangan S, 2004. *Agrobacterium* mediated genetic transformation and development of herbicide resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Rep.* 23: 134–143.
- Miswar B, Soedarsono J dan S. Moeljapawiro S, 2005. Transformasi gen sucrose phosphate synthase (SoSPS1) tebu (*Saccharum officinarum*) untuk meningkatkan sintesis sukrosa pada daun tembakau (*Nicotiana tabacum*). *Berkala Ilmiah Biologi.* 4: 337–348.
- Rhodora RA, dan Thomas KH, 1996. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of Japonica and Indica rice varieties. *Planta* 199: 612–617.
- Sambrook J, Fritsch EF dan Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Signora, L, Galtier N, Skot L, Lucas H dan Foyer CH, 1998. Over-expression of sucrose phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* result in increased foliar sucrose/starch ratios and favour decreased foliar carbohydrate accumulation in plant after prolonged growth with CO<sub>2</sub> enrichment. *J. Experiment. Bot.* 49: 669–680.
- Sonnewald U, Quick WP, MacRae E, Krause KP, dan Stitt M, 1993. Purification, cloning and expression of spinach leaf sucrose phosphate synthase in *Escherichia coli*. *Planta* 189: 174–181.
- Sugiharto B, Sakakibara H, Sumadi, Sugiyama T, 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.* 38: 961–965.
- Sugiharto B, Handoyo T, dan Sumadi, 1996. Variation and correlation in photosynthetic and sucrose metabolism enzymes in some genotype of sugarcane. *Zuriat* 7: 76–85.
- Worrell AC, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersig M, dan Voelker T, 1991. Expression of maize sucrose phosphate synthase in tomato alter leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* 3: 112–1130.

Reviewer: **Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih, MSI.**