

KARAKTERISASI TANAMAN TEBU PRODUK REKAYASA GENETIKA OVEREKSPRESI GEN *SoSUT1* GENERASI KEDUA

Characterization of Transgenic Sugarcane Overexpression of *SoSUT1* Gene in the Second Generation

Nurul Mufitdhah¹, Bambang Sugiharto^{1*}, Didik Pudji Restanto²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember

²Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember

Jln. Kalimantan 37, Jember 68121

*E-mail: sugiharto.fmipa@unej.ac.id

Abstrak

Tebu produk rekayasa genetika (PRG) overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua merupakan tanaman tebu hasil transformasi gen *SoSUT1* pada penelitian sebelumnya. Overekspresi gen *SoSUT1* diharapkan dapat meningkatkan kandungan protein *Sucrose Transporter* (SUT1) sehingga akumulasi sukrosa pada organ batang juga dapat mengalami peningkatan. Penelitian ini ditujukan untuk karakterisasi pertumbuhan, ekspresi gen SUT1, serta kandungan sukrosa daun dan batang pada tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua. Karakterisasi tebu PRG diawali dengan analisis PCR menggunakan pasangan primer *F/R HptII*. Hasil konfirmasi gen *SoSUT1* pada 42 tanaman PRG generasi kedua memiliki kestabilan genetik sebesar 92,8%. Analisis western blot dengan menggunakan antibody SUT1 menunjukkan bahwa tanaman tebu PRG memiliki pita protein SUT1 lebih tebal dibandingkan dengan *wildtype*. Analisis pertumbuhan berupa rata-rata jumlah anakan menunjukkan tebu PRG secara umum memiliki jumlah anakan lebih sedikit daripada tebu non-PRG (kontrol).

Kata Kunci: Overekspresi, *SoSUT1*, *Sucrose Transporter*, Westernblot

Abstract

Transgenic sugarcane overexpression of SoSUT1 gene in the second generation is the results of previous research. Overexpression of SoSUT1 gene expected to increase the content of Sucrose Transporter (SUT1) protein so that accumulation of sucrose in the stem organs can also be increased. This research aimed at characterizing growth, expression of SoSUT1 gene, and sucrose content in leaf and stem of transgenic sugarcane overexpression of SoSUT1 gene the second generation. Characterization of sugarcane begins with the confirmation of the presence of SoSUT1 genes with a PCR analysis using a pair of primer hptII. The results of the confirmation of SoSUT1 gene in 42 second generation there have genetic stability 92,8%. Western blot analysis using SUT1 antibody shows that transgenic sugarcane having thick ribbons SUT1 protein than wildtype. Growth analysis shows the average number of saplings of transgenic sugarcane have a little more than the number of saplings control.

Keywords: Overexpression, *SoSUT1*, *Sucrose Transporter*, Westernblot

PENDAHULUAN

Tebu merupakan tanaman utama penghasil gula sukrosa dan sukrosa merupakan produk utama fotosintesis tanaman yang dihasilkan melalui proses asimilasi karbon [1]. Pada tanaman, enzim SPS merupakan enzim kunci yang menentukan biosintesis sukrosa dalam jaringan mesofil daun. Sukrosa yang dihasilkan digunakan sebagai sumber karbon dan sumber energi, serta ditranslokasi ke organ penyimpanan (*sink tissue*) [2], oleh *Sucrose Transporter* (SUT) yang disandikan oleh gen *SoSUT1* [3].

Transformasi gen *SoSUT1* ke dalam tanaman tebu merupakan salah satu upaya peningkatan rendemen tebu. Pada dasarnya, di dalam tanaman tebu telah terdapat gen *SUT1*, tetapi dengan adanya transformasi gen *SoSUT1* diharapkan tanaman tebu mengalami overekspresi atau peningkatan ekspresi gen *SUT* sehingga diharapkan dapat

menghasilkan tanaman tebu yang memiliki nilai rendemen tinggi.

Pada penelitian yang dilakukan Dwinianti [4], telah diperoleh tanaman tebu PRG varietas BL overekspresi gen *SoSUT1* event T 1.1, T 1.4, T 1.7, T 2.1, T 2.2, T 2.4, T 3.2, T 3.5, hasil transformasi Sugiharto dan Safitri [5] T 2, 1 event hasil transformasi Wiyono [6] yaitu T 20, dan 4 event hasil transformasi dari Hardjo [7] yaitu TB 16, TB 17, TB 18, dan TB 20. Tanaman tebu tersebut sebelumnya telah dikonfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* dengan analisis PCR. Selanjutnya tanaman yang telah ada tersebut ditanam kembali menggunakan stek batang/bagal tebu. Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua belum dikarakterisasi dan masih memerlukan beberapa pengujian untuk mengetahui ekspresi gen *SoSUT1* yang telah diinsersikan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakter tanaman tebu PRG overekspresi gen

SoSUT1 generasi kedua, terutama pada ekspresi protein SUT1, serta keberadaan gen *SoSUT1* untuk mengetahui stabilitas genetiknya. Sehingga hasil penelitian ini dapat memberikan gambaran tentang stabilitas genetik tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* dalam hubungannya dengan ekspresi gen *SoSUT1* pada tebu. Serta dapat memberi informasi tentang karakter tanaman tebu PRG generasi kedua.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Divisi Biomolekuler dan Bioteknologi, Laboratorium Center for Development Advance Science and Technology (CDAST), Universitas Jember pada Bulan Juli 2014 sampai Desember 2014.

Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun dilakukan pada 14 *event* tanaman PRG yang ditumbuhkan pada pot percobaan dengan masing-masing 3 ulangan. Pengambilan sampel daun untuk analisis DNA genom dan protein dilakukan pada daun pertama yang membuka sempurna (dihitung dari pucuk).

Konfirmasi Gen *SoSUT1* dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

DNA genom tebu diisolasi dengan cara menggerus 0,3 gram daun sampai halus menggunakan mortar-stamper dengan menambahkan N_2 cair [8]. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya dengan nanodrop dari *Nanovue* pada panjang gelombang 260 nm dan digunakan untuk analisis PCR.

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan PCR Kit dari *KAPABIOSYSTEMS* dan primer forward primer *hpt-F* (5' *CCGCAAGGAATCGGTCAATA-3*) dan reverse *hpt-R* (5' *CCCAAGCTGCATCATGGAAA-3*) dari *hptII* (*hygromycin phospho transferase*). Dalam satu kali reaksi memiliki total volume 20 μ l dengan larutan yang terdiri dari 2X PCR Master Mix 10 μ l, masing-masing primer (forward dan reverse) 10 pmol sebanyak 1 μ l, template DNA genom 1,25 μ l (konsentrasi 0.25 μ g/ μ l) dan ddH₂O 6,75 μ l.

PCR dilakukan sebanyak 40 siklus meliputi tahapan predenaturasi 94 °C selama 3 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, annealing 58 °C selama 20 detik, elongation 72 °C selama 1 menit dan final elongation 72 °C selama 5 menit. DNA yang telah teramplifikasi oleh PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa 1% dengan marker 1 Kb Ladder (intron biotechnology). Hasil elektroforesis dilihat dengan alat *gel imagine system* dari *Major Sciences*.

SDS-PAGE dan *Western Blot*

Ekstraksi protein dilakukan dengan menggerus 1 gram daun tebu sampai halus kemudian ditambahkan buffer ekstraksi SUT1 (250 mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 30% sukrosa, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, dan 5 %, PVP). Pellet yang didapatkan ditambah dengan 150 μ l buffer solubilisasi (50 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 2% SDS, dan 5 mM DTT).

Total protein terlarut ditentukan dengan metode Lowry [9] menggunakan 500 μ l Follin 1 N dan diukur

absorbansinya pada 660 nm. Nilai absorbansi yang didapat kemudian dihitung dengan rumus yang terdapat pada kurva standart BSA. Sampel yang didapatkan dari ekstraksi protein SUT1 dengan konsentrasi protein 30 μ g ditambah *buffer loading* dengan perbandingan 1 : 1, setelah itu didenaturasi pada suhu 100°C selama 3 menit. Sampel yang telah dicampur *buffer loading* kemudian dielektroforesis menggunakan SDS-PAGE dengan konsentrasi *akrilamide* 12,5 %.

Analisis *western blot* dilakukan setelah protein SUT1 dipisahkan dengan SDS-PAGE dan gel hasil SDS-PAGE telah ditransfer ke membran nitroselulosa. Membran direndam dalam TBS yang mengandung *skim milk* 4% selama 30 menit untuk bloking. Setelah itu, ditambahkan 20 μ l antibodi I (antibodi poliklonal spesifik SUT1) yang telah mengandung NaN_3 0,02 % dalam 40 ml TBS + *skim milk* 0,5 % dan diinkubasi pada *shaker* selama 24 jam. Membran dicuci dengan TBS sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit, lalu ditambah antibody II (*Goat Anti-Rabbit IgG Phosphatase Conjugated*) dalam TBS + *skim milk* dan diinkubasi selama 1 jam. Pewarnaan dilakukan dengan pemberian 100 μ l BCIP dan 50 μ l NBT yang dilarutkan dalam 10 ml bufer alkalin pospat [10].

HASIL PENELITIAN

Hasil PCR tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua

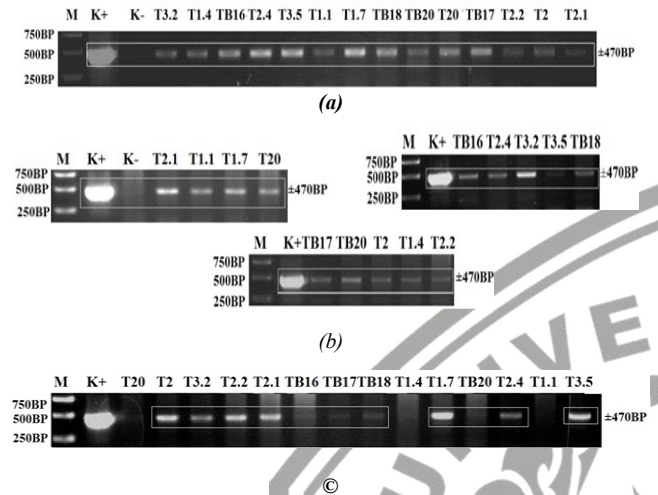
Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer *hpt-F/R* pada 14 *event* tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua dengan masing-masing 3 ulangan. Hasil analisis PCR pada semua sampel genom tanaman ulangan 1 dan 2 menunjukkan positif transgenik *SoSUT1*, sedangkan pada ulangan 3 terdapat 11 tanaman positif transgenik *SoSUT1* dan 3 tanaman negatif yaitu event T20, T1.4, dan T1.1.

Tabel 1. Tabulasi hasil analisa PCR pada 14 *event* tanaman tebu PRG dengan masing-masing 3 ulangan

Event tebu PRG	Ulangan		
	1	2	3
T2.4	+	+	+
T3.2	+	+	+
TB16	+	+	+
T1.4	+	+	-
T3.5	+	+	+
T1.7	+	+	+
T2.2	+	+	+
T1.1	+	+	-
T.2.1	+	+	+
TB20	+	+	+
TB17	+	+	+
TB18	+	+	+
T2	+	+	+
T20	+	+	-

Keterangan: Tanda (+) menandakan bahwa event tanaman PRG yang diuji positif mengandung gen *hptII*, sedangkan tanda (-) untuk tanaman PRG yang tidak mengandung gen *hptII*.

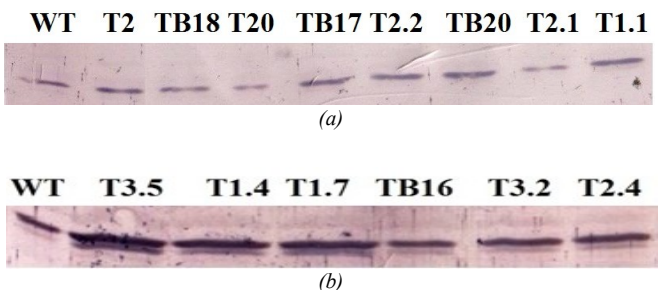
Tanaman tebu positif transgenik *SoSUT1* ditunjukkan pada Gambar 1. dengan terbentuknya pita DNA dengan ukuran ±470 bp sesuai dengan ukuran DNA yang teramplifikasi dengan cetakan plasmid *pAct-SoSUT1* sebagai kontrol positif.



Gambar 1. Elektroforesis gel agarose 1% hasil PCR dengan pasangan primer *hptI- F/R* dan template DNA genom dari tanaman (a) Ulangan 1; (b) Ulangan 2; (c) Ulangan 3. M: Marker; K+: kontrol positif (Plasmid *pAct-SoSUT1*); K-: kontrol negative (*wildtype*); dan 14 tanaman PRG overekspresi gen *SoSUT1*.

Hasil Analisis Western Blot Protein SUT1

Analisis *western blot* protein SUT1 dilakukan menggunakan antibodi poliklonal spesifik untuk protein SUT1. Hasil analisis *western blot* dapat dilihat pada Gambar 2. Secara kualitatif, *event* tanaman tebu PRG yang menunjukkan pita protein lebih tebal dari *wildtype* Gambar 4.2 (a) yaitu pada TB17, T2.2, TB20, T1.1, sedangkan pada Gambar 4.2 (b) yaitu T3.5, T1.4, T1.7, T3.2, dan T2.4.

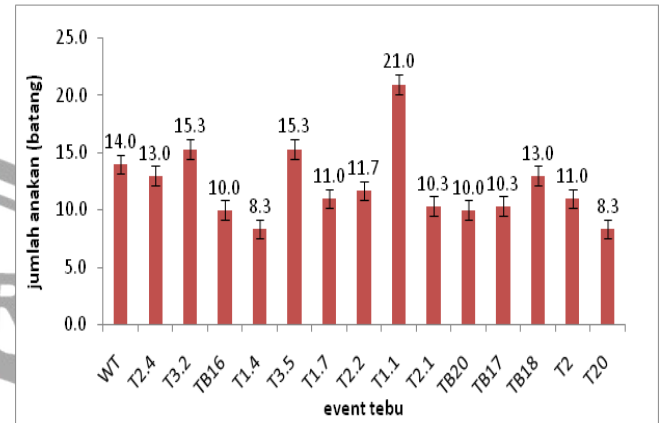


Gambar 2. Hasil analisis *western blot* protein SUT1 pada tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* (a), (b) dan kontrol dengan konsentrasi protein 30 µg, menggunakan antibodi poliklonal spesifik SUT1 dan antibodi 2 *Goat Anti-Rabbit Igg Phosphatase Conjugate*

Rata-rata Jumlah Anakan pada saat Tebu Umur 6 Bulan

Sukrosa hasil fotosintesis tidak semua diakumulakan pada organ penyimpanan, beberapa dari sukrosa tersebut di digunakan sebagai energi untuk pertumbuhan dan perkembangan.

Overekspresi gen *SoSUT1* diduga juga berpengaruh pada pertumbuhan tanaman tebu, sehingga dilakukan analisis pertumbuhan dengan hasil perhitungan jumlah anakan tanaman tebu PRG (Gambar 3.).



Gambar 3. Hasil perhitungan rata-rata jumlah anakan tanaman PRG overekspresi gen *SoSUT1* dan tanaman kontrol (*wildtype*) umur 6 bulan.

PEMBAHASAN

Hasil PCR tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua

Berdasarkan data analisa PCR (Tabel 1), tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua sebanyak 42 tanaman didapatkan 39 tanaman positif transforman mengadung gen *hptII*, dan 3 tanaman tidak mengandung gen target. Dari hasil tersebut tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua memiliki kestabilan genetik lebih dari 92,8%.

Terbentuknya pita DNA *hptII* dengan ukuran ±470 bp pada Gambar 1. menunjukkan bahwa gen target *SoSUT1* yang berada dalam satu kaset T-DNA bersama gen *hptII* sebagai *selectable marker* telah terinsersi ke dalam genom tanaman. Sedangkan pada tanaman yang negatif tidak terbentuk pita DNA pada ukuran 470 bp dikarenakan tidak terintegrasinya gen *SoSUT1* ke dalam genom tanaman.

Kejadian tersebut diduga karena tanaman uji mengalami *chimera*, yaitu penyebaran gen target yang ditransformasikan tidak merata pada seluruh jaringan [11]. *Chimera* menyebabkan gen target tidak diwariskan pada generasi berikutnya, sehingga pada tebu PRG generasi kedua ini masih terdapat tanaman yang tidak mengandung gen yang ditransformasikan.

Hasil Analisis Western Blot Protein SUT1

Tebalnya pita protein pada beberapa *event* tebu pada Gambar 2. menunjukkan adanya overekspresi dari gen

SoSUT1 yang ditransformasikan pada tanaman tebu dapat diekspresikan pada tingkat translasi membentuk protein, sehingga terjadi peningkatan kandungan protein *SUT1*. Namun pada event T20 dan T2.1 terlihat bahwa pita protein lebih tipis daripada tanaman kontrol. Hal ini kemungkinan karena terjadi *gen silencing* yang mengakibatkan terhalangnya proses translasi sehingga sintesis protein (ekspresi gen) terganggu. Menurut Malik [12] proses penghambatan ekspresi gen dapat terjadi pada beberapa tahap diantaranya pada tahap translasi yaitu dengan mengganggu proses translasi pada molekul mRNA.

Peningkatan protein *SUT1* pada tanaman PRG merupakan hasil akumulasi ekspresi gen penyandi *SUT1* endogen dan *SUT1* eksogen. Banyaknya protein yang disintesis disebabkan oleh bertambahnya jumlah copi gen penyandi *SUT1* yang menyebabkan terjadinya peningkatan laju transkripsi [13]. Peningkatan kandungan protein *SUT1* pada tanaman tebu PRG diharapkan dapat meningkatkan translokasi dan akumulasi sukrosa pada organ penyimpanan.

Rata-rata Jumlah Anakan pada saat Tebu Umur 6 Bulan

Pada Gambar 3, rata-rata jumlah anakan tanaman tebu PRG lebih sedikit jika dibandingkan dengan tanaman kontrol. Tetapi juga terdapat 3 event tanaman PRG yang lebih tinggi daripada kontrol, yaitu event T1.1, T3.2, dan T3.5. Banyaknya jumlah anakan tidak terlepas dari jumlah sukrosa yang tersedia. Semakin banyak jumlah sukrosa yang disintesis kemungkinan akan memperbaiki pertumbuhan maupun pertumbuhan tanaman. Sukrosa digunakan oleh tanaman sebagai sumber karbon untuk proses metabolisme. Overekspresi gen *SoSUT1* yang dilakukan mampu meningkatkan translokasi sukrosa hasil fotosintesis, sehingga semakin sedikit sukrosa yang dapat didegradasi oleh *invertase*. Semakin sedikit sukrosa yang terdegradasi oleh *invertase* maka semakin sedikit jumlah anakan yang dihasilkan pada tiap tanaman tebu PRG.

Pada kejadian yang lain, kemungkinan biosintesis sukrosa tinggi sehingga jumlah sukrosa yang diakumulasi pada organ batang lebih tinggi serta jumlah sukrosa yang didegradasi untuk pertumbuhan juga lebih banyak. Pengamatan jumlah anakan dilakukan pada umur 6 bulan dikarenakan pada umur tersebut pertunasan tanaman tebu telah terhenti dan diteruskan pada fase pemanjangan batang. Menurut Wahyudi [14], pada usia 1-3 bulan tanaman tebu mengalami fase pertunasan dan pertumbuhan, kemudian mengalami pemanjangan batang pada usia 3-9 bulan.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa hampir semua tanaman tebu PRG (lebih dari 92.8%) stabil terinsersi gen target *SoSUT1*. Overekspresi gen *SoSUT1* juga menghasilkan protein *SUT1* dan aktif secara fungsional. Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* secara umum menghasilkan jumlah anakan lebih sedikit dibandingkan tanaman tebu kontrol.

Saran

Perlu adanya karakterisasi pada generasi berikutnya untuk menghasilkan tanaman PRG overekspresi gen *SoSUT1* yang stabil, serta perlu dilakukan uji ekspresi gen pada tingkat transkripsi dan uji aktivitas enzim invertase yang mempunyai fungsi dalam pendegradasi sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Masterplan Percepatan dan Perkembangan Pembangunan Ekonomi Indonesia (MP3EI) dan PT. Perkebunan Nusantara XI yang telah memberikan dukungan finansial atas nama Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr., Sc. tahun 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Campbell, N. A., J. B. Reece dan L. G. Mitchell. 2000. *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- [2] Lakitan, B. 2010. *Dasar-dasar Fisiologi Tumbuhan*. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- [3] Reismeier, 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.
- [4] Dwinianti, Edia Fitri. 2013. Transformasi Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) menggunakan *Agrobacterium Tumefaciens* Strain GV 3101 dan Eksplan Pangkal Tunas Tebu *In Vitro*. *Skripsi*. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- [5] Sugiharto, B dan H. Safitri. 2011. A Comparison Study for *Agrobacterium*-Mediated Transformation Method in Sugarcane (*Saccharum* spp L.). *Jurnal Ilmu Dasar*. Vol. 12 (2): 140 – 147
- [6] Wiyono, A. G. 2012. Transformasi Gen *SoSUT1* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Lateral pada Tanaman Tebu (*Saccharum* spp. Hybrid). *Skripsi*. FAPERTA Universitas Jember. Jember.
- [7] Hardjo, Popy Hartatie, 2014. Overekspresi Gen *SoSUT1* untuk Meningkatkan Translokasi Sukrosa Pada Tanaman Tebu (*Saccharum* spp. hybrids). Undergraduate Airlangga University. <http://adln.lib.unair.ac.id/> (diakses 8 Januari 2015)
- [8] Zheng, K., Huang, N., Bennet P., and Khush G. S. 1995. PCR Based Marker Assisted Selection in Rice Breeding. *IRRI news lett* 2.
- [9] Lowry, Rosebrough, Farr, Randall. 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J.Biol.Chem.* 75 : 265-276.
- [10] Sambrook *et al.*, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- [11] Christou, P., Ford, and Kofron. 1991. Production of Transgenic Rice (*Oryza sativa* L.) Plants from Agronomically Important Indica and Japonica Varieties via Electric Discharge Particle Acceleration of

Exogenous DNA into Immature Zygotic Embryos.
Bio/Technology 9: 957-962.

- [12] Malik, Amarlia. 2005. RNA Therapeutic, Pendekatan Baru dalam Terapi Gen. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Vol. II (2): 51-61
- [13] Sugiharto, B. 2003. Overekspresi Gen Sucrose Phosphate Synthase untuk Peningkatan Biosintesis Sukrosa pada Tanaman Tebu. *Laporan Riset Biologi Unggulan Terpadu VII Bidang Bioteknologi*. LIPI, Jakarta.
- [14] Wahyudi, Yudi. 2014. Optimalisasi Teknik Budidaya pada Fase Perkecambahan dan Pertunasan Tanaman Tebu. <http://ditjenbun.pertanian.go.id> (diakses 14 Januari 2015 pukul 19.16 WIB).

