

Seminar Nasional “Optimalisasi Potensi Hayati untuk Mendukung
Agroindustri Berkelanjutan”

**PEWARISAN GEN *SoSUT1* PADA TEBU
PRODUK REKAYASA GENETIK (PRG) GENERASI
T₁**

Parawita Dewanti^{1,3)}, Purnama Okviandari^{2,3)}, Anna Sofyana^{1,3)}, Fadrian Ramadhan^{1,3)}
dan Bambang Sugiharto^{2,3)}

¹⁾Fakultas Pertanian, ²⁾Fakultas MIPA dan CDAST (Center for Development Advance of
Sciences Technology) Universitas Jember

E-mail : parawita65@gmail.com

ABSTRAK

Tanaman Tebu PRG generasi T₁ merupakan tanaman Produk Rekayasa Genetik yang diperoleh dengan cara transformasi gen *SoSUT1* ke tanaman tebu var. Bulu Lawang (BL) melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Menurut beberapa referensi menyatakan bahwa tidak semua tanaman PRG generasi T₁ dapat mewarisi gen dari tanaman induknya. Oleh karena itu perlu dilakukan pengujian tentang pewarisan gen *SoSUT1* pada tebu PRG generasi T₁. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tebu PRG yang membawa gen *SoSUT1* seperti pada induknya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 6 tanaman tebu PRG generasi T₁ yang sudah dikonfirmasi dan dinyatakan telah mewarisi gen *SoSUT1* seperti induknya.

Kata Kunci: Tebu (*Saccharum officinarum*), gen *SoSUT1*, Produk Rekayasa genetik (PRG),
Pewarisan gen

ABSTRACT

Genetically Modified Product (GMP) Sugarcane T₁ generation crop obtained by genetic transformation of SoSUT1 gene to sugarcane var. Bulu Lawang (BL) via Agrobacterium tumefaciens. According to some references that not all GMP plants T₁ generation can inherit the genes from the mother plant. Therefore, it is necessary to test the inheritance of SoSUT1 genes in GMP sugarcane T₁ generation. This study aims obtained GMP sugarcane carrying SoSUT1 gene as the parent.

The results showed that there were 6 GMP sugarcane T₁ generation has been confirmed and found to have inherited the gene SoSUT1 as its parent.

Keywords: Sugarcane (*Saccharum officinarum*), gene *SoSUT1*, Genetically Modified Product (GMP), gene inheritance

PENDAHULUAN

Tanaman tebu Produk Rekayasa Genetik (PRG) merupakan tanaman tebu yang diperoleh melalui transformasi gen *SoSUT1*. Tanaman ini memiliki daya transport dan akumulasi sukrosa di batang meningkat (Sugiharto, 2013). Menurut beberapa referensi, gen yang diinsersikan pada tanaman produk rekayasa genetik (PRG) generasi T₁ tidak semuanya diwariskan (Choffnes, *et al.*, 2001; Hart *et al.*, 1992; Peng *et al.*, 1995; Robbins *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1996). Oleh karena itu, perlu dilakukan skrining secara invitro dan dikonfirmasi keberadaan gen yang diinsersikan untuk mendapatkan tanaman tebu produk rekayasa genetik (PRG) yang mewarisi gen dari tetuannya.

Tebu merupakan tanaman berbiji yang mampu melakukan penyerbukan sendiri, namun untuk mendapatkan biji membutuhkan waktu lebih dari 1 tahun. Tizaoui, K and Kchouk, ME (2012) menyatakan bahwa tanaman tebu akan mewarisi gen dari tetuannya

Seminar Nasional “Optimalisasi Potensi Hayati untuk Mendukung Agroindustri Berkelanjutan”

jika dilakukan *selfing* (penyerbukan sendiri) hingga generasi ke-3 (T_3). Oleh karena itu, untuk mendapatkan tebu PRG generasi T1 dalam jumlah banyak secara singkat perlu dilakukan mikropropagasi.

Tanaman hasil mikropropagasi diskriming pada media yang mengandung antibiotik higromisin, karena pada tanaman tebu PRG mengandung konstuk gen penanda *hptII*. Gen *hptII* merupakan sistem marker ketahanan antibiotik *hygromycin* yang digunakan sebagai penanda dalam konfirmasi keberadaan gen yang telah diinsersikan pada tanaman PRG. Adanya gen *hptII* menandakan bahwa tanaman PRG generasi T1 telah mewarisi gen *SoSUT1* dari tetuannya. Tujuan penelitian adalah mendapatkan tanaman tebu PRG generasi T1 yang mewarisi gen *SoSUT1* dari tetuanya (T_0).

METODE PENELITIAN

Bahan Tanam

Bahan tanam berupa tunas aksilar dan tunas lateral tebu PRG *SoSUT1* generasi T1 yaitu event B1.1, C1.1, C 2.1 (Sugiharto, 2011) dan tebu varietas BL berasal dari PTPN XI kebun Jatiroto.

Media Kultur

Media untuk mikropropagasi terdiri dari media tanam A: MS0 + BA 2mgL^{-1} , kinetin $0,5\text{mgL}^{-1}$, glutamin 100mgL^{-1} , dan vitamin 2 kali jumlah vitamin MS, pH 6,2. Media tanam B: MS0 + GA3 $0,1\text{mgL}^{-1}$, BA $1,5\text{mgL}^{-1}$ dan glutamin 100mgL^{-1} . Media skrining (M1) : MS0 + higromisin 20mgL^{-1} + phytigel $2,5\text{mgL}^{-1}$ dan M2: MS0 + higromisin 25mgL^{-1} + phytigel $2,5\text{ mgL}^{-1}$. Sterilisasi media menggunakan *autoclave* pada temperatur 121°C , tekanan 15-17,5 psi dengan waktu 20 menit.

Sterilisasi eksplan dan mikropropagasi

Tunas pucuk diambil dengan cara melewatkannya pada api buncen 3 kali, kemudian membuka pelepah daun satu per satu hingga didapatkan tunas pucuk dengan panjang kira-kira 20 mm untuk digunakan sebagai eksplan tunas aksilar. Pengambilan tunas samping dilakukan dengan cara membuka pelepah daun, memotong daerah sekitar tunas, kemudian disemprot alkohol 70%. Pengambilan mata tunas samping dilakukan dengan cara mengambil lapisan yang menutupi mata tunas menggunakan skalpel. Tunas samping disterilisasi menggunakan larutan klorok dengan pengenceran 1 : 3 (klorok : *aquadest* steril) selama 5 menit. Setelah itu, direndam pada *aquadest* steril selama 5 menit sebanyak 2 kali dan ditiriskan

Eksplan untuk mikropropagasi adalah tunas aksilar dan tunas lateral. Tunas aksilar dikulturkan pada media A dan tunas lateral dikulturkan pada media B. Tunas yang mempunyai tinggi kira-kira 5 cm siap di skrining.

Skrining tunas tebu

Skrining dilakukan sebanyak 3 kali dengan interval 3 minggu. Skrining pertama dilakukan pada media M1 dan skrining kedua dan ketiga dilakukan pada media M2.

Isolasi DNA

Daun 0,1 g digerus dengan menambahkan N_2 cair. Serbuk yang didapatkan dipindah ke *microtube* (1,5 ml) dan ditambahkan 600 μl *Nucle lysis*, kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 3 μl *RNAse Solution*, dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan *microtube* (*swirling*) 2-5 kali. Setelah homogen, diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, didinginkan pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan 200 μl *Protein Precipitation Solution*, divortex, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang telah didapat dipindah pada *microtube* 1,5 ml dan ditambahkan 600 μl isopropanol, kemudian di *swirling*. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 13.000

Seminar Nasional “Optimalisasi Potensi Hayati untuk Mendukung Agroindustri Berkelanjutan”

rpm selama 1 menit. Pellet yang didapatkan ditambah 600 µl ethanol 70%, disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Pellet yang dihasilkan diambil dan dikeringkan selama 3 menit, ditambahkan 100 µl DNA *Rehydration Solution* dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam. Selanjutnya DNA disimpan pada suhu 20°C.

Konfirmasi keberadaan gen *SoSUT1*

Analisis DNA dilakukan dengan menggunakan *Promega Master Mix*. Primer yang digunakan, untuk mengetahui keberadaan gen *hptII* digunakan primer *forward* (5'CCGCAAGGAATCGGTCAATA-3) dan *reverse* (5'CCCAAGCTGCATCATCGAAA-3) dari *hptII* (*hygromycin phosphotransferase*).

Elektroforesis menggunakan marker 1 Kb Ladder (iNtRON BIOTECHNOLOGY). Hasil elektroforesis dilihat di *gel operating system* dan didokumentasikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik Mikropropagasi bertujuan untuk mendapatkan planlet secara cepat dan banyak. Hasil mikropropagasi pada tebu PRG generasi T1 dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil mikropropagasi tebu PRG *SoSUT1* dan wildtype

Event	Jumlah tunas		Jumlah Tunas Baru yang dihasilkan	
	Tunas Pucuk	Tunas Samping	Tunas Pucuk	Tunas Samping
wildtype	1	3	23	0
B1.1	1	4	0	53
B4.4	1	2	0	0
C1.1	1	4	11	10
C2.1	1	3	53	204

Tabel 1. menunjukkan bahwa dari 4 event yang dikulturkan, hanya 3 event tebu PRG yaitu B1.1 ; C1.1 ; C2.1 yang berhasil tumbuh. *Event* C2.1 mempunyai jumlah tunas baru paling banyak yaitu 204 tunas, kemudian diikuti oleh event B1.1 sebanyak 53 tunas dan event C1.1 sebanyak 21 tunas. Pada varietas BL diperoleh 23 tunas.

Adanya perbedaan jumlah tunas yang dihasilkan pada masing-masing *event* menunjukkan bahwa eksplan yang digunakan memiliki tingkat juvenilitas dan meristematik sel yang berbeda satu dengan yang lainnya (Azwin *et al.*, 2006). Tunas yang diperoleh pada saat mikropropagasi akan di skringing pada media M1 dan M2.

Skrining dilakukan dengan menambahkan antibiotik higromisin, karena dalam konstruk gen terdapat gen *hptII*. Gen *hptII* merupakan gen yang mempunyai ketahanan terhadap higromisin. Planlet yang mengandung gen *hptII* akan tumbuh pada media yang mengandung higromisin yaitu media M1 dan M2. Planlet tebu PRG yang mampu tumbuh pada media M1 dan M2 diduga mewarisi gen *SoSUT1* dari tetuanya. Sedangkan planlet yang tidak mengandung gen *hptII* apabila di tanam pada media M1 dan M2 akan mati, seperti pada tebu var BL.

Hasil skrining 1 menunjukkan bahwa planlet masih mampu tumbuh dengan baik, terlihat segar dan perakarannya lebat. Pada hasil skrining 2, planlet tampak kurang segar, batang planlet remah, warna daun hijau pucat dan perakarannya sedikit. Pada skrining 3, planlet tampak lebih segar dan akarnya juga lebih lebat dibandingkan pada skrining 2.

Planlet tebu var.BL pada skrining 1 belum mengalami kematian, hanya menunjukkan gejala pencoklatan pada batang. Planlet masih mampu bertahan hidup pada media antibiotik. Pada skrining 2, planlet mulai menunjukkan gejala kematian. Batang

Seminar Nasional “Optimalisasi Potensi Hayati untuk Mendukung Agroindustri Berkelanjutan”

mencoklat, daun mengalami klorosis, bahkan ada juga yang mati. Pada skrining 3 mengalami kematian semua.

Hasil skrining tebu PRG *SoSUT1* dan *wildtype* menggunakan antibiotik *hygromycin* dapat dilihat pada Tabel 2 :

Tabel 2. Hasil skrining antibiotik *hygromycin* 3 event tebu PRG *SoSUT1* generasi T1 dan *wildtype*

Event	Rata-Rata Σ Tan. Awal	Skrining 1	% Tan. Hidup	Skrining 2	% Tan. Hidup	Skrining 3	% Tan. Hidup
<i>Wildtype</i>	5	5	100	4	80	0	0
B1.1	20	13	65	7	54	3	42.9
C1.1	20	12	60	11	92	4	36.4
C2.1	30	23	77	13	57	3	23.1

Tabel 2 menunjukkan bahwa sebagian planlet PRG yang ditumbuhkan secara *in vitro* tidak semua mengandung gen *hptII* sehingga planlet mengalami kematian saat berada pada media yang mengandung antibiotik (M1 dan M2). Akhir skrining hanya diperoleh 3 tunas event B1.1, 4 tunas event C 1.1 dan 3 tunas event C2.1.

Adanya peningkatan konsentrasi antibiotik pada media dimaksudkan untuk menghindari terjadinya *chimera* dan *escape*. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Wiyono (2012) dan Dwinianti (2013), antibiotik dengan konsentrasi rendah (10 mgL^{-1}) pada media MS kurang efektif dalam menyeleksi planlet non transforman dan mulai dikatakan efektif pada konsentrasi 20 mgL^{-1} . Oleh karena itu, dalam penelitian ini konsentrasi antibiotik pada awal skrining adalah 20 mgL^{-1} dan meningkat menjadi 25 mgL^{-1} pada skrining 2 dan 3. Konsentrasi antibiotik pada media tidak ditingkatkan lagi karena dikhawatirkan planlet tebu yang mati bukan karena tidak mengandung gen *hptII*, tetapi akibat terlalu tingginya konsentrasi antibiotik *hygromycin*. Tingginya konsentrasi antibiotik *hygromycin* dapat menghambat pertumbuhan planlet dengan menghambat proses sintesis protein yaitu pada proses translokasi tRNA dan mRNA, berikatan dengan faktor elongasi sehingga menyebabkan jaringan planlet mengalami gejala *browning* dan mati (Gritz and Davies, 1983). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Hazmi (2009), persentase kematian tunas tebu *in vitro* pada media MS0 dengan penambahan antibiotik *hygromycin* 30, 40 dan 50 mgL^{-1} mencapai 100% pada hari ke-28 setelah tanam sehingga pada penelitian ini digunakan konsentrasi *hygromycin* sampai 25 mgL^{-1} . Planlet PRG mampu bertahan hidup dalam media antibiotik dengan konsentrasi yang meningkat pada setiap siklusnya disebabkan planlet tersebut mampu mendegradasi antibiotik *hygromycin* sehingga tidak toksik baginya.

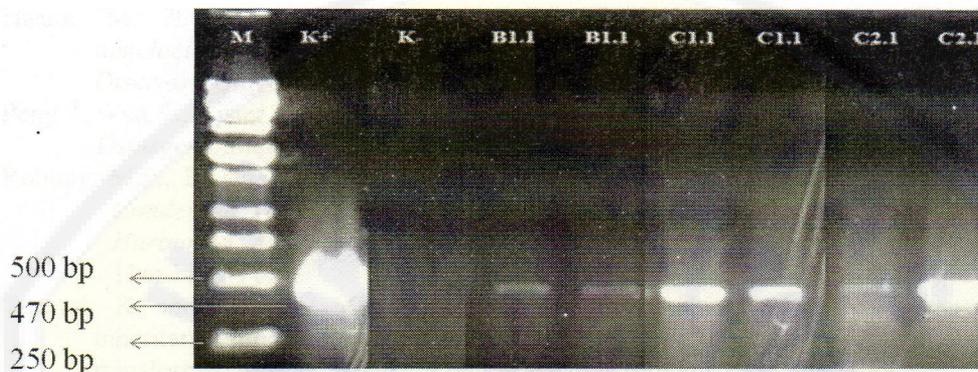
Planlet hasil skrining 3 tampak segar kembali bila dibandingkan dengan kondisi saat lolos dari skrining 2 menunjukkan sel planlet yang lolos skrining 2 merupakan sel transforman yang sudah homogen sehingga ketika ditumbuhkan di media skrining selanjutnya tampak lebih segar karena pertumbuhannya tidak terganggu antibiotik. Kondisi ini berbeda dengan planlet yang berasal dari *event wildtype* yang mati semua pada akhir skrining 3. Matinya semua planlet pada skrining 3 menunjukkan bahwa planlet *wildtype* tidak terinsersi gen *hptII* sehingga pada saat ditumbuhkan pada media yang mengandung antibiotik *hygromycin*, planlet mengalami kematian.

Terjadinya variasi penurunan jumlah planlet yang ditumbuhkan pada media skrining 2 dan 3 diduga plantlet pada media seleksi 1 terhindar (*escape*), artinya ada bagian planlet yang tidak langsung menyentuh permukaan media dan tetap tumbuh,

Seminar Nasional "Optimalisasi Potensi Hayati untuk Mendukung Agroindustri Berkelanjutan"

sehingga seolah-olah planlet tersebut tahan tumbuh di media seleksi 1, akan tetapi pada saat ditumbuhkan di media seleksi 2 planlet tidak mampu bertahan hidup. Faktor lain yang menyebabkan variasi penurunan jumlah planlet pada media skrining 2 dan 3 diduga gen yang diwariskan ke generasi berikutnya belum stabil karena transgen tidak terintegrasi dengan stabil di dalam kromosom planlet inang (Christou *et. al.*, 1992).

Planlet yang lolos skrining *hygromycin* pada tahap sebelumnya merupakan sampel analisis DNA menggunakan *termocycle*. Hasil analisis DNA menggunakan *termocycle* tampak pada gambar di bawah ini :



Gambar 1. Hasil elektroforesis 1% gel agarose DNA 6 tanaman Tebu PRG *SoSUT1* dengan pasangan primer *hptII*-1F/1R dan *template* sampel DNA genom planlet tebu. M: Marker, K+: DNA plasmid pAct, K-: planlet kontrol (*wildtype*).

Gambar 1. menunjukkan bahwa planlet tebu PRG *SoSUT1* yang terdiri dari *event* B1.1 ; B3.1 ; C1.1 ; C1.2 ; C2.1 dan C2.3 yang dianalisis menunjukkan bahwa planlet tersebut positif PRG dengan terdeteksinya pita DNA dengan ukuran 470 bp pada gel agarose yang merupakan gen *hptII*.

KESIMPULAN

1. Telah dikonfirmasi 6 tanaman tebu PRG *SoSUT1* yang lolos skrining antibiotik *hygromycin*, yaitu *event* B1.1 ; C1.1 ; C2.1 masing-masing 2 tanaman.
2. Enam tanaman Tebu PRG *SoSUT1* T₁ yang dikonfirmasi keberadaan gennya merupakan planlet yang mewarisi gen *SoSUT1* dari induknya, terbukti dengan munculnya pita DNA *hptII* pada ukuran 470 bp.

DAFTAR PUSTAKA

- Azwin, Iskandar z. Siregar, dan Supriyanto. 2006. *Penggunaan Bap dan Tdz Untuk Perbanyak Tanaman Gaharu (Aquilaria malaccensis Lamk.)*. *Media Konservasi* 11(3) : 98 – 104.
- Choffnes D.S., Philip R., Vodkin L.O. 2001. *A Transgenic Locus In Soybean Exhibits A High Level of Recombination In vitro cell*. *Dev. Biol. Plant* 37(6) : 756-762.
- Christou, P., P. Vain, A. Kohli, M. Leech, J. Oard and S. Linscombe. 1992. *Introduction Of Multiple Genes Into Elite Rice Varieties : Evaluation Of Transgene Stability, Gene Expression, and Field Performance Of Herbicide-Resistant Transgenic Plant*. *Annal Of Botany* 77 : 223-235.
- Dwinianti, Edia F. 2013. "Transformasi gen *sosut1* pada tanaman tebu (*saccharum officinarum* l var. B1) menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain gv 3101

Seminar Nasional "Optimalisasi Potensi Hayati untuk Mendukung
Agroindustri Berkelanjutan"

- dan Eksplan pangkal tunas tebu *in vitro*." Tidak Diterbitkan. *Skripsi*. Fakultas MIPA UNEJ. Jember.
- Gritz, L. and Davies J. 1983. *Plasmid-encoded Hygromycin B Resistance: The Sequence of Hygromycin B Phosphotransferase Gene and Its Expression in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 25 (2-3): 179-188.
- Hart C.M., Fischer B., Neuhaus J.M., Meins F.J. (1992). *Regulated Inactivation of Homologous Gene Expression In Transgenic Nicotiana sylvestris Plants Containing A Defense Related Tobacco Chitinase Gene*. *Mol. Gen. Genet.* 235: 179-188.
- Hasmi, M. 2009. "Pengembangan Metode Transformasi Melalui *Agrobacterium tumefaciens* Pada Eksplan Pangkal Tunas Tebu *In Vitro*." Tidak Diterbitkan. *Disertasi*. Universitas Brawijaya. Malang.
- Peng J., Wen F., Lister R.L., Hodges T.K. 1995. *Inheritance of gusA and neo Genes In Transgenic Rice*. *Plant Mol. Biol.* 27: 91-104.
- Robbins M.P., Bavage A.D., Strudwicke C., Morris P. 1998. *Genetic Manipulation Of Condensed Tannins In Higher Plants II. Analysis of Birdsfoot Trefoil Plants Harboring Antisense Dihydroflavonol Reductase Constructs*. *Plant Physiol.* 116: 1133-1144.
- Tizaoui, K and Kchouk, ME., 2012. Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. *Genetics and Molecular Biology* 35(3) : 640-649.
- Wiyono, A. G. 2012. "Transformasi Gen *SoSUT1* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Lateral pada Tanaman Tebu (*Saccharum* spp. Hybrid)." Tidak Diterbitkan. *Skripsi*. FAPERTA UNEJ. Jember.
- Wu, G., H. Cui, G. Ye, Y. Xia, R. Sardana, X. Cheng, Y. Li, I. Altosaar, and Q. Shu. 2002. *Inheritance and Expression Of The CryIAb Gene In BT (Bacillus Thuringiensis) Transgenic rice*. *Theor. Appl. Genet.* 104 : 727-734.
- Zhang S., Warkentin D., Sun B., Zhong H., Sticklen M. (1996). *Variation In The Inheritance of Expression Among Subclones For Unselected (uidA) and Selected (bar) Transgenes In Maize (Zea mays L.)*. *Theor. Appl. Genet.* 92: 752-761