

TRANSFORMASI GEN *SOSPS1* PADA TANAMAN TEBU OVEREKSPRESI GEN *SOSUT1* EVENT 2 MENGGUNAKAN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* (TRANSFORMATION OF *SOSPS1* GENE ON SUGARCANE CROP OVEREXPRESSION *SOSUT1* GENE EVENT 2 USING *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*)

Rinda Media Ningtyas, Bambang Sugiharto, Esti Utarti
Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ)
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
E-mail: bbsghrt@yahoo.com

Abstrak

Gen *SoSPS1* (*Saccharum officinarum sucrose phosphate synthase 1*) merupakan gen pengkode enzim SPS yang berperan dalam biosintesis sukrosa pada organ fotosintesis. Gen *SoSUT1* (*Saccharum officinarum sucrose transporter1*) merupakan gen pengkode protein SUT1 yang berperan pada proses transportasi sukrosa dari organ fotosintesis (*source*) ke organ nonfotosintesis (*sink*). Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan tanaman tebu overekspresi ganda yaitu gen *SoSPS1* dan gen *SoSUT1* melalui transformasi gen *SoSPS1* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* menggunakan *A. tumefaciens*. Hasil analisis PCR diperoleh tanaman tebu yang positif overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1* sebanyak 4 tanaman pada transformasi ke-1, 3 tanaman pada transformasi ke-2 dan 4 tanaman pada transformasi ke-3. Efektivitas rata-rata transformasi gen *SoSPS1* menggunakan *A. tumefaciens* yang mengandung konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* dan dikendalikan oleh promotor *RUBQ2* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* sebesar 4,59%.

Kata Kunci: Overekspresi, *Sucrose phosphate synthase* (SPS), *Sucrose transporter* (SUT), Transformasi.

Abstract

SoSPS1 gene (*Saccharum officinarum sucrose phosphate synthase 1*) is gene encoding SPS enzyme that plays a role in biosynthesis of sucrose in photosynthetic organs. *SoSUT1* gene (*Saccharum officinarum sucrose transporter1*) is gene encoding SUT1 protein that play a role in the process of sucrose transport from photosynthesis organ (*source*) to nonphotosynthesis organ (*sink*). The purpose of this study is to obtain double overexpression of *SoSPS1* gene and *SoSUT1* gene on sugarcane crop through transformation *SoSPS1* gene in sugarcane crop overexpression *SoSUT1* genes using *A. tumefaciens*. The results of PCR analysis obtained 4 positive sugarcane plants double overexpression *SoSPS1* gene and *SoSUT1* gene from the first transformation, 3 plants from the second transformation and 4 plants from the third transformation. The average effectiveness of transformation *SoSPS1* gene using *A. tumefaciens* containing a plasmid construct pCL4-*SoSPS1* and controlled by *RUBQ2* promoter in sugarcane crop overexpression *SoSUT1* gene is 4.59%.

Keywords: Overexpression, *Sucrose phosphate synthase* (SPS), *Sucrose transporter* (SUT), Transformation.

PENDAHULUAN

SoSPS1 adalah cDNA/gen yang menyandikan protein SPS (*Sucrose phosphate synthase*), yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman [1]. Enzim SPS mengkatalisis reaksi pembentukan *sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG). *Sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) menghasilkan sukrosa. Sukrosa disintesis pada jaringan daun selama proses fotosintesis dan kemudian ditranslokasikan ke jaringan penyimpanan oleh protein SUT (*Sucrose transporter*) [2]. Protein SUT adalah protein yang berfungsi sebagai translokator sukrosa dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpan.

Gen yang menyandi untuk protein SPS (*SoSPS1*) telah di kloning dari tanaman tebu [3] dan overekspresi gen *SoSPS1* pada tanaman tebu dapat meningkatkan kandungan

sukrosa [4]. Pada *Arabidopsis thaliana* yang mengandung gen penyandi enzim SPS jagung dapat meningkatkan aktivitas enzim SPS daun sampai tiga kali [5]. Rujukan [6] melaporkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim SPS dan akumulasi sukrosa pada daun tomat transgenik yang mengandung gen penyandi enzim SPS jagung.

Pada penelitian sebelumnya, telah diperoleh tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) overekspresi gen *SoSUT1* [7]. Selanjutnya rujukan [8] melaporkan bahwa berdasarkan analisis *western blot* tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* yang mengalami peningkatan kandungan protein SUT1 terdapat pada tanaman transgenik *event 2*. Namun demikian, pada tebu transgenik tersebut tidak terjadi peningkatan biosintesis sukrosa. Oleh karena itu diperlukan overekspresi gen *SoSPS1* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* agar terjadi peningkatan baik biosintesis maupun translokasi sukrosa sehingga dapat meningkatkan kandungan sukrosa lebih tinggi lagi pada batang tanaman tebu. Penelitian ini bertujuan untuk

mendapatkan tanaman tebu overekspresi ganda yaitu gen *SoSPSI* dan gen *SoSUTI* melalui transformasi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUTI* menggunakan *A. tumefaciens*. Analisis yang dilakukan meliputi analisis DNA genom dengan PCR.

METODE PENELITIAN

Persiapan Eksplan

Planlet tebu (*Saccharum officinarum* L.) var. Bulu Lawang (BL) overekspresi gen *SoSUTI event 2* yang ditumbuhkan pada media seleksi (MS + Hygromycin 20 mgL⁻¹) disubkultur setiap 3 minggu sekali. Subkultur dilakukan sampai planlet *in-vitro* berjumlah ± 100 planlet.

Kultur *A. Tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens strain GV 3101 yang mengandung gen *SoSPSI* dalam konstruk plasmid pCL4 diperoleh dari *gliserol stock* yang kemudian diambil 50 µl untuk diinokulasi ke dalam media YEP cair 2 ml yang mengandung antibiotik rifampicin 100 mgL⁻¹, kanamycin 50 mgL⁻¹, dan gentamycin 12,5 mgL⁻¹. Biakan bakteri tersebut diinkubasi dalam *shaker* 150 rpm pada suhu 28°C selama 24 jam. Selanjutnya biakan diinokulasi pada media YEP padat yang mengandung antibiotik yang sama dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam. Koloni tunggal yang diperoleh sesudah dikonfirmasi keberadaan konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* selanjutnya digunakan untuk transformasi. Peta konstruk plasmid pCL4 dijelaskan pada Gambar 1.

Gambar 1. Peta konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* yang tersusun oleh bagian T-DNA. LB: *left border*, RB: *right border*, *nos*: *nopaline synthetase gene*, *nptII*: *neomycin phosphotransferase gene*, *Ubi-1*: *maize ubiquitin promoter*, *SoSPSI*: *Saccharum officinarum sucrose phosphate synthase gene*, *RUBQ2*: *rice ubiquitin promoter*.

Isolasi DNA Plasmid dan PCR

Isolasi DNA plasmid ditujukan untuk melakukan konfirmasi keberadaan konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* yang diinsersikan pada *A. tumefaciens*. Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan menggunakan metode berdasarkan rujukan [9]. DNA yang didapatkan digunakan sebagai *template* untuk analisis PCR menggunakan primer *nptII* F/R dengan sekuen primer *nptII* (*the neomycin phosphotransferaseII gene*)-F (5'-GTC ATC TCA CCT

TGC TCC TGCC-3'), primer *nptII*-R (5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCG-3') dengan ukuran 550 bp. Tahapan pre-denaturasi, denaturasi, *annealing*, elongasi dan *final extention* berturut-turut pada suhu 94°C selama 2 menit, 94°C selama 20 detik, 59°C selama 10 detik, 72°C selama 50 detik dan 72°C selama 5 menit.

Infeksi *A. tumefaciens* pada Eksplan

Pangkal planlet tebu *in-vitro* yang dipotong ± 5 mm direndam dalam 50 ml media YEP cair yang berisi kultur *A. tumefaciens* pada ABS₆₀₀ = 0,5 - 1,0 OD dengan penambahan 100 mgL⁻¹ acetosyringone lalu diinkubasi dalam *shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C selama 15 menit dengan tujuan menginfeksi eksplan dengan *A. tumefaciens*. Kemudian eksplan ditanam pada media ko-kultivasi.

Ko-kultivasi

Ko-kultivasi dilakukan setelah proses infeksi yang bertujuan untuk memberi kesempatan *A. tumefaciens* tumbuh bersama dengan eksplan. Selama tahapan ko-kultivasi, integrasi plasmid ke dalam genom tanaman dapat berlangsung. Media ko-kultivasi yang digunakan yaitu (MS + 100 mgL⁻¹ acetosyringone).

Eliminasi *A. tumefaciens*

Eliminasi dilakukan dengan tujuan menghilangkan bakteri *A. tumefaciens* pada eksplan sesudah ko-kultivasi. Eksplan dari media ko-kultivasi dicuci dengan larutan cefotaxime 500 mg L⁻¹ sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan membilas eksplan menggunakan akuades steril setiap pencucian eksplan. Eksplan kemudian ditanam pada media eliminasi (MS + cefotaxime 500 mg L⁻¹). Pada tahap ini, eksplan diinkubasi selama 7 hari dalam kondisi terang.

Seleksi Eksplan *Putative* Transforman

Tahapan seleksi eksplan *putative* transforman dilakukan sebanyak 5 kali dan masing-masing tahapan seleksi membutuhkan waktu inkubasi selama 21 hari. Media yang digunakan dalam tahapan seleksi yaitu media MS + cefotaxime 500 mg L⁻¹ + kanamycin 50 mgL⁻¹ + hygromycin 10 mgL⁻¹ untuk seleksi ke-1 dan ke-2. Sedangkan untuk seleksi ke-3, ke-4 dan ke-5 media yang digunakan yaitu media MS + cefotaxime 500 mg L⁻¹ + kanamycin 50 mgL⁻¹ + hygromycin 20 mgL⁻¹.

Aklimatisasi Tanaman *Putative* Transforman

Tahap aklimatisasi bertujuan untuk mengadaptasikan tanaman dari kondisi *in-vitro* ke kondisi *in-vivo*. Planlet dibersihkan dari sisa media dengan air mengalir dan direndam dalam larutan fungisida (Dithane 0,1%) ± 30 detik. Selanjutnya planlet ditanam pada media aklimatisasi yaitu tanah yang dimasukkan dalam *polybag* dan diletakkan di *green house*. Pemeliharaan tanaman selama aklimatisasi dilakukan dengan pemberian larutan nutrisi Hoagland (pH 6,5). Tanaman tebu *putative* transforman yang telah berumur ± 1 bulan selanjutnya diambil daunnya untuk isolasi DNA genom.

Isolasi DNA Genom Tanaman *Putative* Transforman

Isolasi DNA genom tanaman dilakukan dengan menggerus 0,5 gram daun tebu menggunakan N_2 cair. Serbuk yang didapatkan ditambahkan 1 ml buffer ekstraksi DNA, 50 μ l SDS 20% dan 1,25 μ l β -Mercaptoethanol. Campuran dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 65 $^{\circ}C$ selama 10 menit. Campuran ditambahkan dengan 500 μ l Kalium acetat 5M, diinkubasi dalam es selama 10 menit kemudian disentrifugasi 12.000 rpm suhu 4 $^{\circ}C$ selama 10 menit. Pada supernatan yang dihasilkan ditambah dengan 625 μ l isopropanol, dihomogenkan kemudian diinkubasi pada suhu -20 $^{\circ}C$ selama 1 jam. Selanjutnya disentrifugasi ulang, supernatan dibuang, pellet yang dihasilkan ditambah dengan 500 μ l buffer TE dan 15 μ l RNA-se (purifikasi DNA). Campuran diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}C$ selama 1 jam.

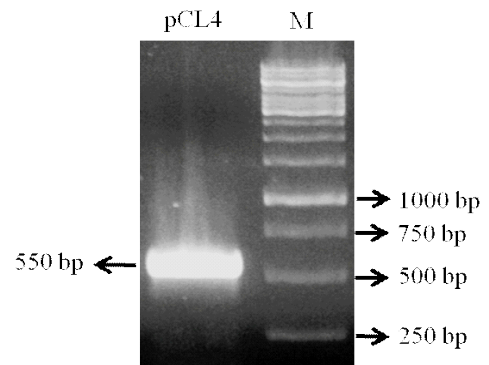
Campuran ditambah dengan PCI 500 μ l kemudian disentrifugasi 12.000 rpm suhu 4 $^{\circ}C$ selama 10 menit. Pada supernatan yang dihasilkan ditambahkan chloroform (*equal volume*), divorteks lalu disentrifugasi kembali. Supernatan ditambahkan isopropanol dan NaAC. Diinkubasi pada suhu -20 $^{\circ}C$ selama 1 jam, disentrifugasi 12.000 rpm, 4 $^{\circ}C$, selama 10 menit. Pellet dicuci dengan ethanol 70 % 1 ml dan disentrifugasi 12.000 rpm, 4 $^{\circ}C$, selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet dikeringkan dengan *vacuum dry* selama 10 menit, kemudian dilarutkan dengan 50 μ l buffer TE. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya dengan menggunakan spektrophotometer pada panjang gelombang 260 nm dan digunakan untuk analisis PCR.

Analisis Polymerase Chain Reaction (PCR)

Untuk mengetahui keberadaan gen target *SoSPSI* dan gen *SoSUT1* dari genom tanaman *putative* transforman dilakukan analisis PCR menggunakan primer *nptII* F/R dengan sekuen sebagai berikut: primer *nptII* (*the neomycin phosphotransferaseII gene*)-F (5'-GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGCC-3'), primer *nptII*-R (5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCG-3') dengan ukuran 550 bp dan primer *hptII* (*the hygromycin phosphotransferaseII gene*)-F (5'-CCG CAA GGA ATC GGT CAA TA -3'), primer *hptII*-R (5'- CCC AAG CTG CAT CAT CGA AA -3') dengan ukuran 470 bp. Tahapan yang dilakukan meliputi pre-denaturasi, denaturasi, *annealing*, elongasi dan *final extention* berturut-turut adalah pada suhu 94 $^{\circ}C$ selama 2 menit, 94 $^{\circ}C$ selama 20 detik, 59 $^{\circ}C$ selama 10 detik, 72 $^{\circ}C$ selama 50 detik dan 72 $^{\circ}C$ selama 5 menit untuk primer *nptII* dan *hptII*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis PCR diperoleh pita DNA dengan panjang 550 bp (Gambar 2). Pita DNA yang diperoleh dari amplifikasi PCR sesuai dengan panjang DNA *nptII* yang teramplifikasi dengan primer *nptII* yang digunakan yaitu 550 bp seperti pada konstruk peta T-DNA (Gambar 1). Berdasarkan hasil ini maka *A. tumefaciens* strain GV 3101 dapat digunakan sebagai vektor transformasi karena terbukti telah mengandung konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* sebagai gen target untuk transformasi pada tanaman tebu.



Gambar 2. Hasil elektroforesis gel agarose 1% DNA hasil PCR dengan pasangan primer F/R *nptII* dan *template* DNA plasmid yang diisolasi dari bakteri *A. tumefaciens* strain GV 3101; (M) DNA marker (1 Kb Ladder).

Pada penelitian ini, transformasi dilakukan sebanyak 3 kali yang masing-masing merupakan penelitian terpisah (*independen experimen*). Persentase planlet *putative* transforman yang mampu tumbuh hingga pada media seleksi ke-5 yaitu 1,81% (1 planlet) pada transformasi ke-1, 41,93% (26 planlet) pada transformasi ke-2, dan 8,92% (5 planlet) pada transformasi ke-3. Pada transformasi ke-1, ke-2 dan ke-3, kematian planlet pada media seleksi diduga karena gen target tidak terinsersi ke dalam genom tanaman sehingga eksplan tidak tahan terhadap antibiotik yang terkandung dalam media seleksi.

Tanaman yang lolos dari media seleksi ke-5 selanjutnya diaklimatisasi. Hasil aklimatisasi menunjukkan bahwa pada proses transformasi ke-1 planlet berhasil diaklimatisasi seluruhnya yaitu berjumlah 6 tanaman yang berasal dari 1 tanaman, begitu pula pada transformasi ke-3 yang berjumlah 5 tanaman. Pada transformasi ke-2, dari 26 tanaman *putative* transforman overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPSI* yang didapatkan, planlet yang berhasil diaklimatisasi yaitu 22 tanaman. Kematian planlet yang dihasilkan pada transformasi ke-2 pada saat tahapan aklimatisasi karena planlet tidak dapat beradaptasi dengan lingkungan. Kondisi tanaman tebu yang telah berhasil di aklimatisasi dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Tanaman tebu yang berhasil di aklimatisasi umur 1 bulan. Planlet tebu dari kondisi *in-vitro* sesudah dibersihkan dari sisa media agar dan diperlakukan dengan fungisida (Dithane 0,1%), kemudian ditanam dalam *polybag* berisi pasir steril.

Berdasarkan hasil analisis PCR menggunakan primer *hptII* dan *nptII*, persentase tanaman tebu *putative* transforman yang positif mengandung gen *SoSUT1* dan gen *SoSPSI* sebesar 1,81% (4 tanaman yang berasal dari 1 tanaman) pada transformasi ke-1, 4,84% (3 tanaman) pada transformasi ke-2 dan 7,14% (4 tanaman) pada transformasi ke-3 sehingga efektivitas rata-rata transformasi gen *SoSPSI* menggunakan konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* yang dikendalikan oleh promotor *RUBQ2* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* sebesar 4,59%. Hasil analisis PCR dari DNA genom sampel nomer 1b, 1c, 1d, dan 1e pada transformasi ke-1 (berasal dari 1 tanaman), sampel nomer 6, 7, dan 12 pada transformasi ke-2 dan sampel nomer 1, 2, 3, dan 4 pada transformasi ke-3 berhasil mengamplifikasi fragmen DNA dengan panjang 470 bp yang sesuai dengan panjang primer *hptII* dan fragmen DNA dengan panjang 550 bp yang sesuai dengan panjang primer *nptII* yang digunakan.

Keberadaan fragment DNA *hptII* sebesar 470 bp dan DNA *nptII* sebesar 550 bp hasil PCR menunjukkan integrasi konstruk pCL4-*SoSPSI* pada genom tebu transforman sehingga dapat dikatakan sebagai tanaman tebu transgenik overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPSI*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis PCR diperoleh tanaman tebu positif overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPSI* sebanyak 4 tanaman pada transformasi ke-1, 3 tanaman pada transformasi ke-2 dan 4 tanaman pada transformasi ke-3. Efektivitas rata-rata transformasi gen *SoSPSI* menggunakan *A. tumefaciens* yang mengandung konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* dan dikendalikan oleh promotor *RUBQ2* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* sebesar 4,59%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis (BS) mengucapkan terimakasih kepada MP3EI dan PT. Perkebunan Nusantara XI tahun 2012 yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] S. C. Huber dan Huber, "Role And Regulation Of Sucrose- Phosphate Synthase In Higher Plants," *Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol, Biol.* Vol. 47 (1996). 431-444.
- [2] L. Barker, C. Kuhn, A. Weise, A. Schulz, C. Gebhardt, B. Himer, H. Hellmann, W. Schulze, J. M. Ward dan W. B. Frommer, "SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements," *Plant Cell.* Vol. 12 (2000). 1153 - 1164.
- [3] B. Sugiharto, H. Sakakibara, Sumadi, dan T. Sugiyama, "Differential Expression of Two Genes for Sucrose Phosphate Synthase in Sugar Cane: Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression," *Plant Cell Physiol.* Vol. 38 (1997). 961 - 965.
- [4] Miswar, B. Sugiharto, J. Soedarsono dan S. Moeljapawiro, "Transformasi Gen Sucrose Phosphate Synthase (*SoSPSI*) Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* untuk Meningkatkan Sintesis Sukrosa pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.)," *Berk. Penel. Hayati.* Vol. 12 (2007). 137 - 143.
- [5] L. Signora, N. Galtier, L. Skot, H. Lucas dan C. H. Foyer, "Overexpression of Sucrose Phosphate Synthase in *Arabidopsis thaliana* Results in Increased Foliar Sucrose/Starch Ratios and Favours Decreased Foliar Carbohydrate Accumulation in Plants After Prolonged Growth with CO₂ Enrichment," *Journal of Experimental Botany.* Vol. 49 (1998). 669 - 680.
- [6] A. C. Worrell, J. M. Bruneau, K. Summerfelt, M. Boersig dan T. Voelker, "Expression of Maize Sucrose Phosphate Synthase in Tomato Alter Leaf Carbohydrate Partitioning," *Plant Cell.* Vol. 3 (1991). 112 - 130.
- [7] B. Sugiharto dan H. Safitri, "Comparison Study for Agrobacterium-Mediated Transformation Method in Sugarcane (*Saccharum spp* L.)," *Jurnal Ilmu Dasar.* Vol. 12 (2011). 140 - 147.
- [8] N. Oktaria, "Metabolisme Sukrosa Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Transgenic Overekspresi Gen *SoSUT1*," *Skripsi.* FMIPA Universitas Jember. Jember (2012).
- [9] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).