



## **Transformasi Gen *SoSPS1* dengan Menggunakan *enhancer OsADH* dan Eksplan Kalus Somatik Embriogenis pada Tanaman Tebu**

*Transformation of *SoSPS1* Gene by using *enhancer OsADH* and Somatic Embryogenic Callus of Sugarcane*

Author(s): Zaiyin Rizky Ageng Maulidia<sup>(1)</sup>; Ahdatu Uli Khikamil Maulidiya<sup>(1)</sup>; Tri Handoyo<sup>(1)</sup>; Bambang Sugiharto <sup>(1)\*</sup>

<sup>(1)</sup> Universitas Jember

\*Corresponding author: [sugiharto.fmipa@unej.ac.id](mailto:sugiharto.fmipa@unej.ac.id)

Submitted: 30 Jun 2022

Accepted: 28 Aug 2022

Published: 30 Sep 2022

### **ABSTRAK**

Transformasi genetik adalah metode alternatif untuk mendapatkan bibit unggul tanaman tebu dengan kandungan sukrosa tinggi. Kandungan sukrosa dalam tanaman tebu dipengaruhi oleh keberadaan enzim SPS yang dikode oleh gen *SoSPS1*. Enzim SPS berperan penting dalam proses pembentukan dan akumulasi sukrosa pada tanaman. Transformasi genetik *SoSPS1* diharapkan dapat meningkatkan konsentrasi dan aktivitas enzim SPS pada tanaman. Konstruksi plasmid untuk gen *SoSPS1* ditambahkan *enhancer OsADH* yang berperan saat proses translasi protein. Adanya *OsADH* membantu proses penerjemahan asam amino ketika proses translasi sehingga kemampuan tanaman mengekspresikan gen tidak terganggu oleh cekaman abiotik. Konstruksi gen target disisipkan ke dalam T-plasmid *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3103 kemudian diinfeksi pada kalus somatik embriogenik (SE) tanaman tebu varietas Buluh Lawang. Setelah proses transformasi, kalus diseleksi secara invitro menggunakan kanamisin 50 ppm. Media dasar setiap tahap menggunakan formulasi Murashige and Skoog. Calon tunas yang lolos hingga seleksi kelima kemudian diaklimatisasi dan dilakukan analisis PCR untuk mendeteksi adanya gen target. Hasil penelitian menunjukkan dengan eksplan kalus SE mampu menghasilkan tanaman transgenik dengan tingkat efisiensi transformasi sebesar 2,4% dan memiliki kemampuan regenerasi menjadi tanaman dengan organel lengkap.

### **Kata Kunci:**

enhancer  
5'*OsADH*;  
*SoSPS1*;  
Tanaman tebu;  
Transformasi.

### **ABSTRACT**

#### **Keywords:**

enhancer  
5'*OsADH*;  
*SoSPS1*;  
Sugarcane;  
Transformation.

*Genetic transformation is an alternative method to get high-sucrose sugarcane. Sucrose accumulation was influenced by SPS (Sucrose Phosphate Synthase) enzyme which is encoded by *SoSPS1* gene. SPS enzyme plays an important role in the formation and accumulation of sucrose in plants. *SoSPS1* genetic transformation will increase the concentration and activity of the SPS enzyme. The plasmid construct of *SoSPS1* was added with *enhancer OsADH* which acts on protein synthesis. *OsADH* helps at the part of amino acids translation so genetic expression is not disturbed by abiotic stress. The gene construct was inserted into the T-plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 and then infected to Somatic Embryogenic (SE) callus. Explants callus from meristematic spindle leaf of Buluh Lawang sugarcane. After transformation, they were selected in-vitro and used 50 ppm kanamycin. The basic medium for all stages used is the Murashige and Skoog (MS) formulation. Prospective shoots that passed through the fifth selection were acclimatized and PCR analyzed to detect the presence of the target gene. The results showed that SE callus explants can use to produce transgenic plants with a transformation efficiency of 2,4% and could regenerate into plants.*



## PENDAHULUAN

Berdasarkan data statistik, konsumsi gula nasional terus meningkat pada tahun 2019-2021 sebesar 0,1 juta ton setiap tahun. Pada tahun 2019, konsumsi gula mencapai 5,1 juta ton dan berturut-turut naik menjadi 5,2 dan 5,3 juta ton pada tahun 2020 dan 2021 (Badan Pusat Statistik, 2021). Namun, produksi dalam negeri hanya dapat mencukupi setengah dari kebutuhan gula nasional dikarenakan keterbatasan produktivitas tanaman tebu sebagai komoditas utama penghasil gula di Indonesia. Tanaman tebu melakukan proses fotosintesis menghasilkan sukrosa yang dapat digunakan sebagai sumber energi dalam proses metabolismenya. Sukrosa berperan dalam pengaturan ekspresi gen fotosintetik, gen-gen yang terlibat dalam pembelahan serta deferensiasi sel, dan sebagai substrat enzim tanaman. Sukrosa yang tersisa dari proses metabolisme tanaman akan disimpan di dalam sel-sel batang sebagai cadangan makanan, dan cadangan makanan tersebut akan menjadi sumber gula untuk manusia. Tanaman tebu dengan kandungan sukrosa yang tinggi menjadi harapan utama dalam usaha pemenuhan kebutuhan gula nasional dan overekspresi gen dapat menjadi solusi untuk menghasilkan tanaman tebu tinggi sukrosa.

Overekspresi merupakan teknik peningkatan ekspresi gen tertentu yang telah diketahui fungsinya ke dalam suatu organisme seperti tanaman tebu. Tujuan overekspresi untuk meningkatkan ekspresi gen target dalam tanaman dan mengetahui pengaruhnya apabila terjadi ekspresi gen secara berlebihan. Pada tanaman tebu, sintesis sukrosa melibatkan beragam jenis enzim antara lain SPS (*Sucrose Phosphate Synthase*) yang dikode oleh gen *SoSPS1* dan *SoSPS2*. *SoSPS1* mengkode SPS pada jaringan fotosintetik sedangkan *SoSPS2* mengkode SPS yang terekspresi secara konstitutif. Menurut Annur *et al.*, 2020 penambahan gen *SoSPS1* pada tanaman

tebu melalui proses transformasi membuktikan bahwa overekspresi gen dapat dilakukan dan dapat menghasilkan tanaman dengan konsentrasi sukrosa yang tinggi. Enzim SPS mengkatalis *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine diphosphate glucose* (UDP-G) menjadi *sucrose-6-phosphate* (*Suc-6-P*). *Suc-6-P* akan dihidrolisis oleh enzim *Sucrose Phosphate Phosphatase* (SPP) menjadi sukrosa. Semakin besar aktivitas enzim SPS, maka semakin besar substrat *Suc-6-P* yang dihasilkan, sehingga meningkatkan aktivitas enzim SPP dan dihasilkan sukrosa dalam jumlah besar (Miswar *et al.*, 2007; Sawitri and Sugiharto, 2018).

Pada tanaman overekspresi *SoSPS1*, gen target terekspresi dalam pembentukan protein dan menunjukkan kandungan sukrosa yang tinggi ketika berada dalam kondisi lingkungan yang stabil. Setiap perubahan kondisi lingkungan yang terjadi akan menjadi inhibitor bagi tanaman dalam proses sintesis protein. Pada kondisi yang terprediksi tidak, ekspresi gen target akan terganggu sehingga tanaman overekspresi tidak berhasil mensintesis protein. Apabila protein tidak terbentuk, maka tanaman overekspresi tidak dapat mensintesis sukrosa dalam jumlah besar. Hal ini telah dibuktikan dalam penelitian sebelumnya, menurut Yamasaki *et al.* (2018) tekanan abiotik di sekitar tanaman dapat mengganggu proses ekspresi gen target untuk membentuk protein. Untuk itu, dalam penelitian ini ditambahkan *OsADH* pada sekuens gen yang akan ditransformasikan. *OsADH* merupakan sekuens gen yang berasal dari tanaman padi. Gen ini dapat membantu penerjemahan susunan genetik pada tahap translasi, dan dapat berfungsi di semua jenis tanaman baik dikotil maupun monokotil (Matsui *et al.*, 2015). Menurut Sugio *et al.* (2008), *OsADH 5'UTR* memiliki efisiensi translasi mRNA pada tanaman dikotil dan monokotil. Adanya penambahan gen *OsADH (5'UTR)* akan

membantu penerjemahan gen target pada tahap translasi sehingga kemungkinan terekspresinya gen target menjadi protein akan lebih besar meskipun dalam kondisi lingkungan yang kurang stabil. Nukleotida 5'UTR dimulai dari susunan AUG (-3 sampai -1). Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa 5'UTR membantu inisiasi penerjemahan dalam proses translasi untuk  $\beta$ -glukuronidase (*GUS*) dan menghasilkan protein *GUS* sebanyak 4 kali lipat (Matsui et al., 2012). Penggunaan 5'UTR dikombinasikan dengan promoter yang kuat mendukung keberhasilan ekspresi gen asing dalam sel tanaman (Sugio et al., 2008).

Pada penelitian ini, juga digunakan kalus somatik embriogenik sebagai eksplannya. Kalus somatik embriogenik merupakan kalus yang memiliki sel aktif yang mampu membentuk embrio dari bagian somatik yang tidak termasuk dalam sel zigotik (proses somatik embriogenesis). Menurut Debnath et al. (2012) potensi regenerasi sel secara *in-vitro* didapatkan dari dua jalan morfogenesis yaitu organogenesis dan somatik embriogenesis. Penggunaan kalus somatik embriogenik diharapkan dapat menghasilkan sel-sel transforman yang mampu beregenerasi

menjadi tanaman tebu dengan organ yang lengkap dan sifat yang hampir seragam. Penggunaan *enhancer OsADH* dan kalus embriogenik diharapkan dapat menjadi salah satu strategi untuk mendapatkan tanaman tebu transforman dengan kandungan sukrosa tinggi dan menghindari pengaruh lingkungan terhadap proses translasi ketika ekspresi gen dalam tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberhasilan transformasi gen *SoSPS1* dengan penambahan *enhancer OsADH* pada kalus embriogenik tanaman tebu.

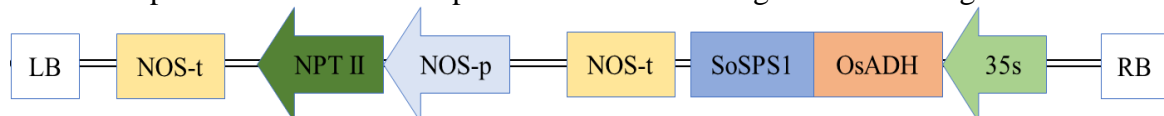
## METODOLOGI

### Bahan dan Metode

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Biomolekuler dan Bioteknologi, UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Jember. Eksplan induksi kalus menggunakan pucuk daun meristematik (*meristematic spindle leaf*) tanaman tebu Buluh Lawang yang didapat dari kebun bibit PG. Jatiroto, PT. Perkenunan Nusantara XI. Beberapa bahan dan peralatan yang dibutuhkan antara lain pucuk tanaman tebu, kompeten sel *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101, dan plasmid pRI 101-ON *SoSPS1*.

### Transformasi Plasmid ke *Agrobacterium tumefaciens*

Peta plasmid biner konstruk pRI 101-ON *SoSPS1* digambarkan sebagai berikut:



Gambar 1. Peta plasmid pRI 101-ON *SoSPS1*. LB: left border, NOS-t: *Nopaline Synthase terminator*, NPT II: *Neomisin fosfotransferase*, NOS-p: *nopaline synthase promoter*, *OsADH*: 5'-UTR of Rice ADH, 35S: 35S promoter dari CaMV RB: right border.

Figure 1. Map of pRI 101-ON *SoSPS1* plasmid. LB: left border, NOS-t: *Nopaline Synthase terminator*, NPT II: *Neomisin fosfotransferase*, NOS-p: *nopaline synthase promoter*, *OsADH*: 5'-UTR of Rice ADH, 35S: 35S promoter dari CaMV RB: right border.

Plasmid ditransformasikan ke dalam sel kompeten *A.tumefaciens* dengan metode elektroporasi (kejut listrik).

Sebanyak 50  $\mu$ L volume kompeten sel ditambahkan 5  $\mu$ L plasmid (konsentrasi plasmid 20-200 ng) dan dimasukkan dalam

kuvet elektroporasi. Sesudah dilakukan kejut listrik sebesar 2000 volt, kemudian kompeten sel ditumbuhkan pada media *Yeast Extract Peptone* (YEP) padat mengandung 50 ppm kanamisin, 12,5 ppm gentamisin, dan 100 ppm rifampisin, inkubasi 2-3 hari, suhu 28°C. Koloni *A.tumefaciens* dianalisis PCR mengikuti metode Chakraborty et al. (2016).

### Transformasi Gen *SoSPSI* pada Eksplan

Eksplan untuk induksi kalus adalah pucuk daun meristematik (*meristematic spindle leaf*) tanaman tebu menggunakan MS mengandung 3 ppm 2,4-D, 500 ppm Casein Hidrolisat (CH). Setelah disubkultur 2x, dipilih kalus somatik embriogenik (SE) sebagai eksplan kalus transformasi. *A. tumefaciens* transforman diinokulasikan dalam 50 mL media YEP cair mengandung *selectable marker*, ditumbuhkan dengan penggojok (*shaker*) pada kecepatan 150 rpm, suhu 28°C hingga kerapatan sel sesuai ( $OD_{600}=0,3-0,5$ ). Kemudian disentrifugasi 12.000 rpm, 10 menit, suhu 4°C. Pellet *A.tumefaciens* diresuspensi dalam 50 mL media MS dengan penambahan 100 ppm acetosyringone untuk induksi virulensi *A. tumefaciens*, kemudian ditambahkan eksplan kalus embriogenik yang telah dilukai dan diinkubasi pada *shaker* 50 rpm selama 30 menit dengan suhu 28°C. Kemudian eksplan kalus ditumbuhkan pada media kokultivasi selama 2-3 hari, suhu 28°C. Media kokultivasi menggunakan Media induksi dengan penambahan 100 ppm acetocyringon.

Tahap eliminasi, *A.tumefaciens* dieliminasi menggunakan cefotaxime 500 ppm untuk mencegah infeksi berlebih. Eksplan dimasukkan dalam 50 mL larutan cefotaxime, dikocok pelan selama 10 menit. Eksplan disaring dan disiram aquades, kemudian ditiriskan; ditumbuhkan pada media eliminasi (media induksi dengan penambahan 500 ppm

cefotaxime) selama 14 hari dalam kondisi terang. Seleksi secara invitro sebanyak 5 kali subkultur pada media MS mengandung 1 ppm NAA dan 50 ppm kanamisin dengan penyinaran 1000-2000 lux. Tanaman yang berhasil bertahan hingga seleksi terakhir disebut tanaman putatif transforman.

### Analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Planlet putatif transforman dengan organel lengkap dan lolos hingga seleksi kelima, diambil sampel daun untuk analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR menggunakan primer penanda *NPTII* dan *CaMV-SPS*. Urutan nukleotida *NPTII* sebagai berikut *forward* (F): 5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3' dan *reverse* (R): 5'-GTCGCTTGGTTCGGTCATTTCC-3'.

Urutan nukleotide *CaMV-SPSI* sebagai berikut *forward* (F): 5'-GAAGACGTTCCAACCACG-3' dan *reverse* (R): 5-ACACGGTATGCGACAATGTA-3'. Sebanyak 0,5 gram daun tanaman tebu putatif transforman diekstraksi DNA genom menggunakan metode yang dilakukan oleh Apriasti et al. (2018). Hasil ekstraksi kemudian dilakukan analisa PCR menggunakan kit master mix (Roche, Jerman) dan primer sesuai susunan gen yang diharapkan. Reaksi PCR dilakukan dalam *termal cycle* T100 (Bio-Rad, USA) dengan suhu pre-denaturasi 95°C, 3 menit; kemudian 34 siklus denaturasi pada suhu 95°C, 30 detik, suhu anealing 56°C, 30 detik, suhu ekstensi 72°C, 1 menit, dan ekstensi terakhir pada suhu 72°C, 5 menit. Hasil dari PCR divisualisasi dengan gel agarose 1 % mengandung *ethidium bromide* pada GelDoc (Apriasti et al., 2018). Tanaman positif transforman diaklimatisasi. Planlet dibersihkan dari sisa agar media dan direndam dengan larutan fungisida (Dithane 0,1%), 30 menit. kemudian ditanam pada pasir steril.

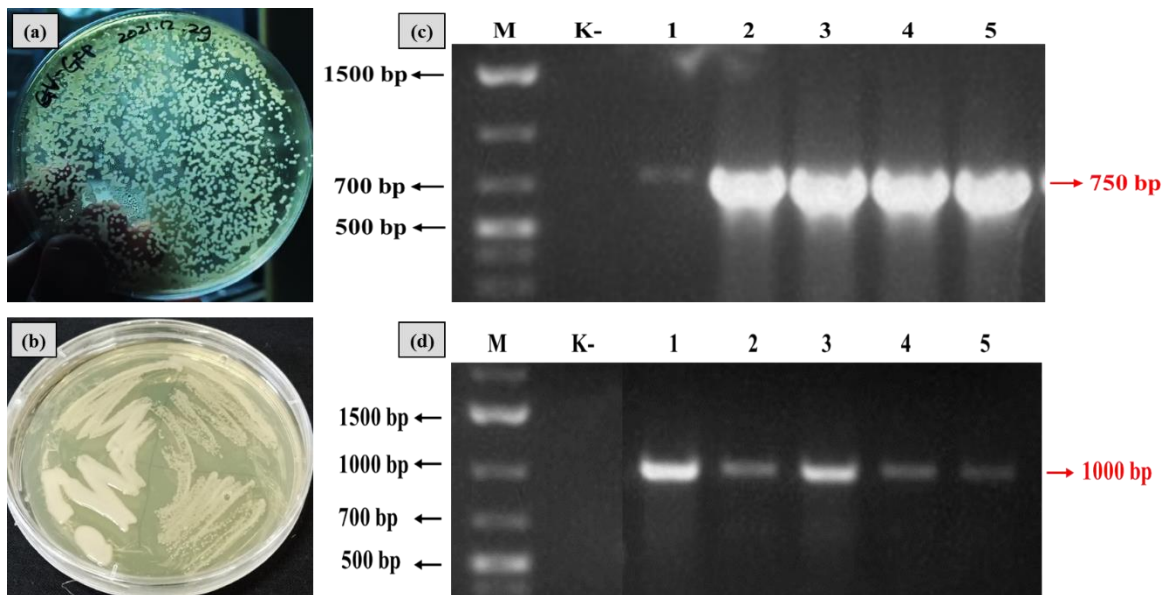
Tanaman disiram larutan AB mix di sekitar perakaran, volume penyiraman menyesuaikan kondisi tanah agar tidak kering ataupun tergenang.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Transformasi plasmid pRI 101-ON *SoSPS1* pada sel kompeten *A.tumefaciens*

Plasmid pRI 101-ON *SoSPS1* ditransformasikan ke dalam sel kompeten *A.tumefaciens* dan ditumbuhkan pada media YEP dengan penambahan *selectable marker*. *A.tumefaciens* diinkubasi pada suhu 28°C selama 3-4 hari dan kemudian tumbuh koloni-koloni tunggal bakteri

seperti pada gambar 2a. Beberapa koloni bakteri diambil dan ditumbuhkan dalam YEP cair. Biakan bakteri digunakan sebagai sampel ekstraksi plasmid untuk analisis PCR dan juga streak pada media YEP padat seperti pada gambar 2b. Analisis PCR bertujuan untuk konfirmasi *A.tumefaciens* memiliki gen target yang akan ditransformasikan ke dalam sel tanaman. Hasil PCR ditunjukkan pada gambar 2c dan 2d dengan primer yang berbeda. Gambar 2c menggunakan primer *NPTII* sebagai gen penanda ketahanan terhadap kanamisin, sedangkan hasil pada gambar 2d menggunakan primer *camv-sps* sebagai penanda gen *SoSPS1*.



Gambar 2. *A.tumefaciens* pada Media YEP Padat dengan Penambahan *Selectable Marker*. a) Kultur Kloning *A.tumefaciens SoSPS1* setelah Transformasi pada Sel Kompeten, b) Subkultur *A.tumefaciens SoSPS1* setelah Konfirmasi PCR, c) Hasil analisis PCR Koloni dengan Primer *NPTII*, d) Hasil analisis PCR koloni dengan crimer *CaMV-SPS*, dan lin 1, 2, 3, 4, 5 adalah nomor koloni yang diambil untuk analisis.

Figure 2. *A.tumefaciens* on YEP medium with addition of *Selectable Marker*. a) Clone Culture of *A.tumefaciens SoSPS1* after Transformation to Competent Cell, b) Clone Subculture *A.tumefaciens* after PCR Confirmation, c) Clone PCR Analysis Results with *NPTII* Primer, d) Clone PCR Analysis Results with *CaMV-SPS* Primer and 1, 2, 3, 4, 5 lines representing number of colony for analysis.

Gambar 2c dan 2d menunjukkan bahwa *A.tumefaciens* yang mengandung konstruk pRI 101-ON yang memiliki gen

target *SoSPS1* dan gen untuk ketahanan terhadap *canamycin* (*NPTII*). Primer *NPTII* memiliki ukuran sekitar 750 bp,

sedangkan primer camv-sps memiliki ukuran 1.000 bp. Perbedaan ukuran primer ditentukan oleh jumlah basa yang ada di dalam primer tersebut. Prinsip dasar PCR adalah penggunaan DNA polimerase yang berasal dari replikasi in-vitro suatu DNA spesifik untuk menghasilkan salinan fragmen DNA tertentu yang diharapkan ada dalam sampel (Kadri, 2020) dengan jumlah amplifikasi yang besar. Primer bertindak sebagai penentu urutan basa yang akan disalin dari sampel. Jadi, berdasarkan gambar 2c dan 2d maka dapat disimpulkan pRI 101-ON-SoSPS1 berhasil ditransformasikan ke dalam sel kompeten *A.tumefaciens* dengan adanya gen *NPTII* dan *SoSPS1*.

Infeksi *A.tumefaciens* sebagai vektor akan meningkatkan keberhasilan insersi DNA target pada sel sehingga replikasi DNA dapat terjadi hampir di semua sel penyusun jaringan. Hal ini dikarenakan *A.tumefaciens* mentransfer DNA dalam T-DNA ke dalam nukleus tanaman (Keshavareddy et al., 2018). Menurut Rivera et al. (2012), ada beberapa keuntungan menggunakan *A.tumefaciens* sebagai vektor transformasi antara lain:

- a) Integrasi gen bersifat presisi, insersi gen sederhana dengan *defined ends* dan jumlah kopi yang rendah, integrasi dan pewarisan sifat yang stabil serta ekspresi gen bersifat konsisten di generasi seterusnya.
- b) Jenis sel yang berbeda dapat digunakan dalam transformasi gen, atau dalam arti lain gen yang ditransformasikan dapat berasal dari spesies tanaman yang berbeda atau makhluk hidup lain bukan tanaman.
- c) Protokol pelaksanaannya efisien dan mudah dilaksanakan untuk mengembangkan banyak tanaman dikotil dan beberapa jenis tanaman monokotil.
- d) Efisiensinya keberhasilannya tinggi.

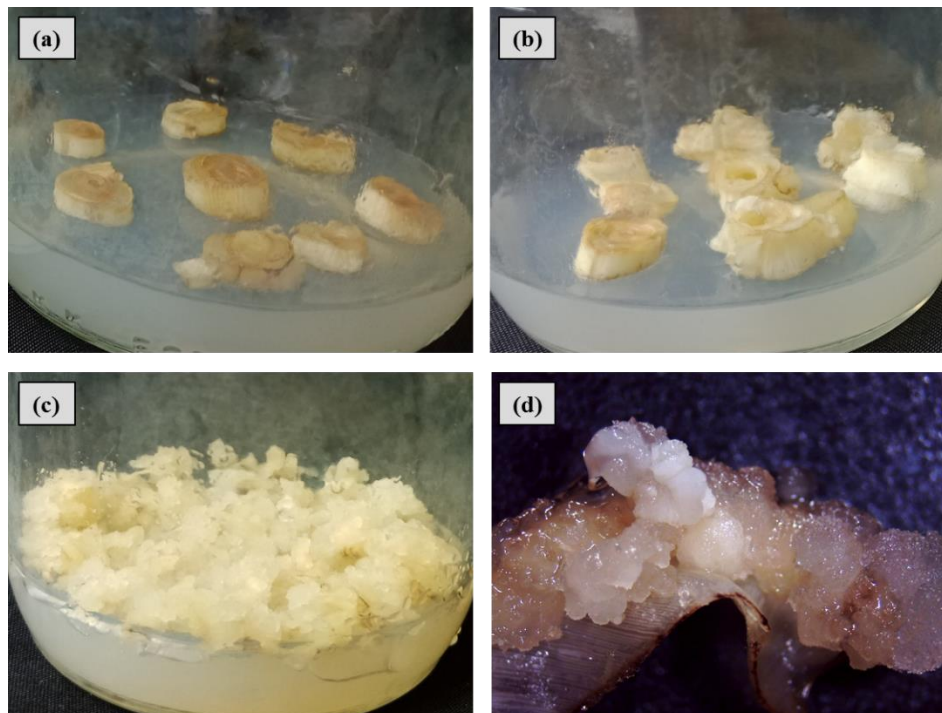
### **Induksi Kalus Somatik Embriogenik (SE) dan Transformasi *SoSPS1* pada Eksplan Kalus Somatik Embriogenik (SE) menggunakan *A.tumefaciens***

Transformasi *SoSPS1* dilakukan dengan menggunakan *A.tumefaciens* sebagai vektor dan kalus somatik embriogenik (SE) sebagai eksplan. Induksi kalus dilakukan dengan menggunakan jaringan *meristematic spindle leaf* yang dipotong melintang seperti pada gambar 3a. Eksplan akan berubah warna menjadi semakin terang setelah beberapa hari dan pada minggu ke 3 dan 4 gulungan daun muda menjadi berwarna putih kekuningan. Eksplan mulai terbuka diikuti pembentukan jaringan-jaringan muda di tepi potongan daun seperti ditunjukkan gambar 3b. Jaringan kalus akan terus berkembang dan bertambah jumlahnya selama masa inkubasi. Setelah subkultur kedua, jaringan kalus akan terus bertambah hingga *meristematic spindle leaf* tidak terlihat seperti pada gambar 3c. Media induksi merupakan faktor utama untuk mendapatkan kalus SE. Media MS dengan penambahan 2,4-D dan kasein hidrolisat merupakan media optimum untuk induksi kalus tebu. Menurut Alcantara et al. (2014), persentase kalus embriogenik tanaman tebu kultivar RB855156 dan RB72454 terbesar didapatkan dengan penggunaan 2,4-D tanpa penambahan jenis auksin atau sitokinin yang lain dalam media MS. Hormon 2,4-D juga dapat digunakan dalam media induksi kalus hampir di setiap kultivar tanaman tebu. Persentase jumlah kalus dapat ditingkatkan dengan penambahan kasein hidrolisat. Penambahan kasein hidrolisat ke dalam media induksi yang mengandung auksin dapat meningkatkan pembentukan kalus karena kasein hidrolisat berperan sebagai prekursor pembentukan asam nukleat dan proses eluler lainnya (Purnamaningsih et al., 2021).

Kalus embriogenik memiliki beberapa ciri antara lain kalus kompak,

keras, berwarna kekuningan dengan permukaan yang halus dan struktur globular (Di Pauli et al., 2021). Ciri kalus embriogenik juga ditemukan pada gambar 3c dan dibuktikan secara mikroskopik pada gambar 3d. Beberapa hal yang tidak dapat dipastikan dalam persiapan eksplan transformasi antara lain waktu inkubasi dalam pembentukan kalus oleh sel-sel *meristematik spindle leaf*. Hal ini disebabkan setiap eksplan memiliki

kondisi sel yang berbeda dan spesifik dalam merespon kondisi in-vitro. Sel-sel tanaman terutama bagian daun merupakan sel-sel tunggal yang dapat terdeferensiasi penuh, terspesialisasi jaringan dan merespon beragam kondisi kultur in-vitro. Gen-gen yang terlibat dalam deferensiasi sel erat kaitannya dengan respon cekaman, metabolisme primer, pembelahan sel, dan juga sintesis dinding sel (Fehér et al., 2003).



Gambar 3. Persiapan Eksplan Kalus Somatik Embriogenik (SE). a) Pemotongan Melintang *Meristemtic Spindle Leaf* pada Media Induksi, b) Awal Pembentukan Jaringan Kalus, c) Kalus SE, d) Kalus SE berdasarkan Pengamatan Mikroskop.

Figure 3. Preparation of Somatic Embryogenic (SE) Callus for Explant. a) Transverse Cutting of Meristemtic Spindle Leaf for Induction, b) Early Callus Tissue Formation, c) SE Callus, d) SE Callus based on Microscope Observation.

Infeksi oleh *A.tumefaciens* transforman ke dalam sel kalus somatik embriogenik dilakukan dengan inkubasi keduanya bersama-sama dalam satu media MS ditambahkan asetosiringon (proses kokultivasi). Asetosiringon berperan sebagai penginduksi potensi gen virulen yang tidak dimiliki oleh tanaman monokotil. Pada tanaman dikotil, penginduksi gen virulen muncul sebagai

respon terhadap luka, hal tersebut adalah penanda bagi *A.tumefaciens* di alam liar untuk menginfeksi tanaman dikotil (Sawant et al., 2018). Asetosiringon yang ditambahkan secara eksogen akan masuk ke dalam kalus dan menginisiasi *A.tumefaciens* untuk menginfeksi. Inkubasi bersama akan memberikan kesempatan bakteri agar lebih optimal dalam proses infeksi eksplan.

*Agrobacterium tumefaciens* merupakan vektor untuk memasukkan gen target ke dalam sel tanaman. Transformasi gen menggunakan *A.tumefaciens* memungkinkan produksi tanaman transgenik dengan target keberhasilan tingkat jaringan tanaman sehingga gen dan diekspresikan di hampir semua sel, dan meminimalisir kemungkinan ekspresi gen target lokal di beberapa bagian tanaman saja. *A.tumefaciens* menginfeksi eksplan kalus SE. Ketika introduksi DNA dimasukkan ke dalam sel yang mampu beregenerasi, maka tingkat keberhasilan transformasi menjadi lebih tinggi (Keshavareddy et al., 2018). Ketika ditumbuhkan pada media YEP padat dengan penambahan *selectable marker*, hanya *A.tumefaciens* transforman yang dapat tumbuh karena karena gen ketahanan terhadap kanamisin yang hanya dimiliki oleh *A.tumefaciens* transforman. Selain itu, PCR koloni bakteri juga dilakukan untuk membuktikan bahwa bakteri yang tumbuh pada media adalah *A.tumefaciens* transforman yang memiliki konstrak gen target. *A.tumefaciens* memiliki gen ketahanan terhadap *canamycin* yang dikode oleh *NPTII*, oleh karena itu hasil PCR dengan primer *NPTII* menunjukkan hasil positif.

### **Seleksi Kalus dan Analisis PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Eksplan kalus SE yang telah ditransformasi masuk dalam tahap kokultivasi kemudian diseleksi secara *in-vitro*. Pada tahap kokultivasi bakteri transforman akan tumbuh bersama, dan populasinya tidak berlebihan (*overgrowth*). Gambar 4a menunjukkan tahap kokultivasi dimana eksplan kalus SE dan *A.tumefaciens* ditumbuhkan bersama. Kokultivasi bertujuan untuk memaksimalkan infeksi oleh *A.tumefaciens*. Meskipun ditumbuhkan bersama, pertumbuhan populasi *A.tumefaciens* tidak boleh menutupi

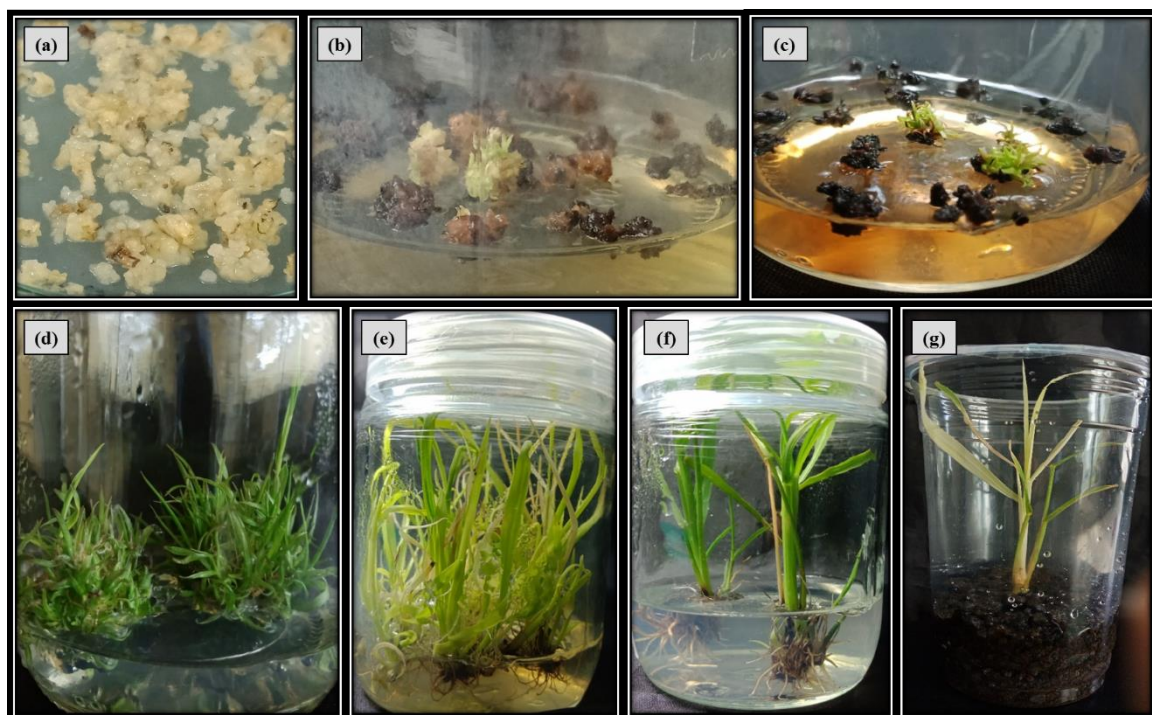
permukaan kalus sepenuhnya, cukup di sekitar kalus seperti ditunjukkan gambar 4a. Hal ini bertujuan untuk mencegah stress berlebihan yang dapat mengakibatkan kematian sel-sel dalam eksplan. Setelah tahap kokultivasi, dilakukan tahap eliminasi. Eliminasi dilakukan untuk menghentikan pertumbuhan bakteri agar infeksi tidak terjadi terus menerus dan membunuh sel di dalam kalus. Pertumbuhan bakteri dihentikan menggunakan cefotaxime dalam media eliminasi. Cefotaxime merupakan antibiotik dengan spektrum luas. Cefotaxime memiliki kemampuan penetrasi dinding sel dan menunjukkan produksi  $\beta$ -laktam yang stabil dan memiliki afinitas tinggi terhadap enzim penting dalam bakteri (Schrinner et al., 1980). Menurut Padda & Nagalli (2022), cefotaxime mengikat protein pengikat penisilin (PBPs) melalui cincin  $\beta$ -laktam kemudian menghambat aktivitas definitif transpeptidasi ketika proses pembentukan dinding sel peptidoglikan pada bakteri. Hal ini menyebabkan sel bakteri tidak mampu membentuk dinding sel dan mengalami autolisis. Penggunaan cefotaxime juga dilanjutkan hingga tahap seleksi 3 untuk mencegah kemungkinan adanya pertumbuhan *Agrobacterium* sewaktu-waktu, karena bakteri berkemungkinan dapat bersembunyi di dalam gerombolan kalus.

Perkembangan kalus dimulai pada tahap eliminasi, pada tahap ini cekaman biotik dari bakteri akan berkurang seiring waktu. Sel-sel di dalam kalus mulai beregenerasi dan memproduksi sel baru untuk memperbaiki kerusakan karena infeksi *A.tumefaciens*. Pada tahap ini T-plasmid telah menyisipkan gen target pada komosom tanaman. T-DNA yang telah dimasukkan ke dalam sel tanaman akan ikut serta dalam proses pembelahan sel yang terjadi. Salinan gen tunggal dari transformasi bersegregasi mengikuti hukum pola pewarisan Mendel



(Rahmawati, 2006). Pada gambar 4b menunjukkan adanya perkembangan kalus baru sekaligus deferensiasi sel yang mulai membentuk calon daun. Kalus menunjukkan titik-titik hijau sebagai respon adanya cahaya, sel kalus berkembang mengikuti tahapan fase globular, skutelar, torpedo, hingga *heart* dan terbentuk calon daun. Ketika memasuki tahap seleksi 1 terlihat tunas kecil yang masih bergerombol dan belum terpisah. Pada tahap ini, kalus-kalus yang telah melalui tahap eliminasi akan diseleksi

menggunakan kanamisin sebagai *selectable marker* DNA. pRI 101-ON *SoSPSI* memiliki gen *NPTII* sebagai gen penanda ketahanan terhadap kanamisin, dan gen tersebut tidak dimiliki secara alami dalam sel tanaman. Oleh karena itu, hanya tanaman positif transforman yang dapat hidup pada media seleksi. Kalus yang tidak berhasil terinfeksi akan mati ditandai dengan perubahan warna kalus menjadi coklat hingga kehitaman, sedangkan kalus yang lolos seleksi akan terus berkembang dan beregenerasi menjadi calon tunas.



Gambar 4. Perkembangan Eksplan Kalus SE pada Tahapan Transformasi hingga Aklimatisasi Planlet Putatif Transforman. a) Kalus SE pada Tahap Kokultivasi, b) Deferensiasi Sel membentuk Calon Daun, c) Perkembangan Calon Daun, d) Pembentukan Calon Tunas Bergerombol, e) Pembentukan Perakaran, f) Planlet Putatif Transforman In-vitro, g) Aklimatisasi Tanaman.

*Figure 4. Development of Callus Explants on Transformation Stage to Putative Plant Acclimatization. a) SE Callus on Co-Cultivation, b) Cell Deferensiasi to be Leaf, d) Leaf Development, e) root formation, f) Transformasn Putative Planlet in-vitro, g) Plant Acclimatization.*

Gambar 4b merupakan awal munculnya calon tunas. Kemunculan tunas diawali dengan munculnya titik hijau sebagai respon sel karena adanya cahaya. Titik hijau mulai muncul ketika eksplan di

tahap eliminasi. Sel-sel kemudian berdeferensiasi membentuk calon-calon daun, dan setiap gerombol kalus memiliki beberapa calon daun. Calon daun semakin membesar dan berwarna hijau muda

hingga gambar 4d menunjukkan pembentukan daun yang sempurna. Daun berwarna hijau tua dan terlihat seperti golongan rerumpunan (*Graminae*). Pertumbuhan daun semakin besar dan semakin tinggi hingga terbentuk seperti tunas muda, namun belum terbentuk akar dan single plant (tumbuh bergerombol). Gambar 4e menunjukkan pertumbuhan daun dengan tinggi 6-8 cm setiap calon tunas, dan mulai terlihat pembentukan akar tanaman. Pada gambar 4d beberapa calon tunas belum bisa dipisahkan atau membentuk single plant. Hingga memasuki tahap seleksi berikutnya, calon daun semakin tinggi dan belum terpisah seperti pada gambar 4e, namun mulai

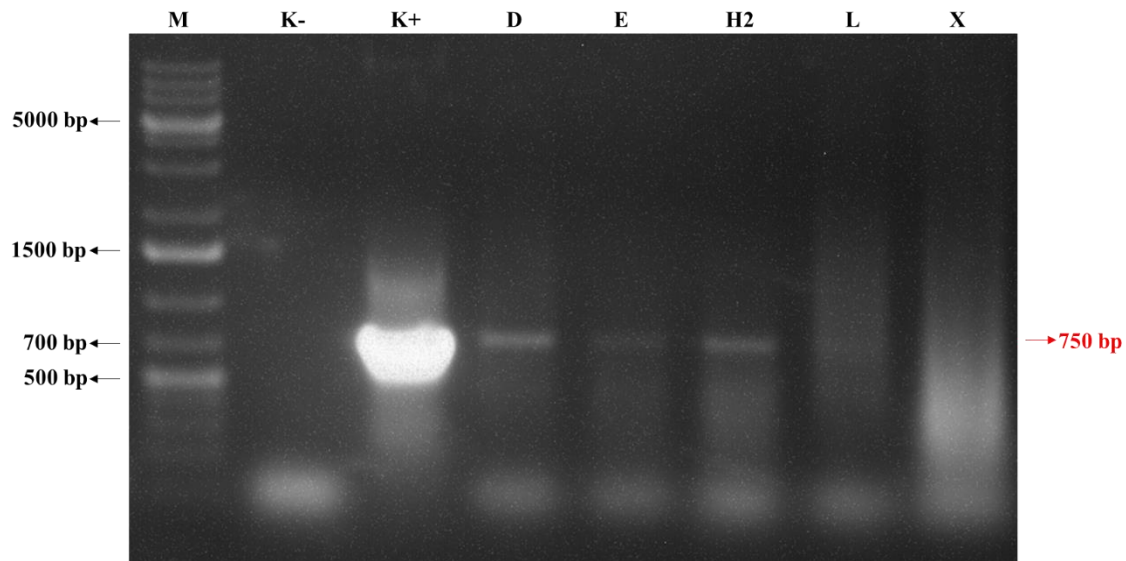
terlihat pembentukan perakaran. Sistem perakaran semain banyak dan panjang. Pada gambar 4f tanaman dapat dipisahkan menjadi *single plant*. Ketika bisa dipisahkan, tanaman ditumbuhkan terpisah untuk memaksimalkan pertumbuhan akar. Planlet putatif yang memiliki perakaran maksimal diaklimatisasi pada pasir steril seperti pada gambar 4g. Beberapa kondisi yang menunjukkan planlet siap diaklimatisasi antara lain memiliki perakaran yang panjang, sehat, dan bergerombol banyak. Kondisi aklimatisasi harus dipantau terus menerus untuk mencegah munculnya jamur atau kondisi yang terlalu kering.

Tabel 1. Persentase Efisiensi Transformasi Setiap Tahap dan Jumlah Planlet Putatif  
 Table 1. Percentage of Transformation Efficiency on Every Stage and Number of Putative Planlets

Transformasi	Eksplan	Eliminasi		Seleksi 1		Seleksi 2		Seleksi 3		Seleksi 4		Seleksi 5		Planlet Putatif
		Σ	%	Σ	%	Σ	%	Σ	%	Σ	%	Σ	%	
1	125	0	0	4	3,2	5	4	5	4	3	2,4	3	2,4	3
2	170	0	0	6	3,5	7	4,1	7	4,1	4	2,4	3	2,4	3

Tabel 1 menunjukkan persentase efisiensi transformasi. Efisiensi transformasi merupakan persentase keberhasilan eksplan beregenerasi membentuk tunas baru setelah diinfeksi oleh *Agrobacterium* pada media seleksi. Proses transformasi *SoSPSI* pertama dan kedua menunjukkan efisiensi sebesar 2,4%. Penggunaan kalus SE merupakan hal penting dalam proses transformasi karena kalus SE memiliki kemampuan beregenerasi membentuk tunas baru,

sehingga setelah diinfeksi sel-sel dalam kalus dapat memperbaiki diri dengan cepat dan berdeferensiasi untuk membentuk organ-organ tanaman menjadi tunas baru. Tanaman putatif yang dihasilkan setelah tahap seleksi 5 sebanyak 6 tanaman. Seluruh tanaman putatif kemudian dianalisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) untuk memastikan keberadaan gen *SoSPS* dalam tanaman putatif transforman.



Gambar 5. Hasil Analisis PCR menggunakan Genom Daun Tanaman Putatif Transforman dengan Primer NPTII . M adalah marker DNA; K-, kontrol negative tanaman *wild type*; K+, kontrol positif DNA plasmid, dan D, E, H2, L, X merupakan 5 sample genom daun tanaman putative transforman.

Figure 5. PCR Analysis Result of Transformant Putative Plant with NPTII Primer. M, DNA marker; K-, negative control of wild type plant; K+, positive control of plasmid DNA; and D; E; H2; L; X representing 5 samples of leaves genome of putative transformant.

Tanaman putatif transforman memiliki perakaran yang baik dan lolos hingga seleksi kelima dilanjutkan pada tahap aklimatisasi dan analisis PCR untuk membuktikan tanaman telah tersisipi gen target. PCR (*Polymeration Chain Reaction*) merupakan metode untuk mereplikasi sekuen gen menggunakan primer tertentu dan divisulisasikan pada gel agarose dengan elektroforesis. Gambar 5 adalah hasil PCR yang divisualisasikan pada GelDoc. Hasil dari PCR dimasukkan dalam gel agarose dan dielektroforesis untuk menunjukkan ukuran gen dengan visualisasi pendaran. Gen yang berpendar pada gambar 5 menunjukkan adanya gen berukuran 750 bp di dalam sampel tanaman yang diuji sama dengan ukuran kontrol positif (plasmid *A.tumefaciens*). Hal ini menunjukkan bahwa 4 dari 6 sampel tanaman yang dianalisis, memiliki gen target yang ditransformasikan dan dinyatakan sebagai tanaman positif transforman.

## KESIMPULAN

Transformasi gen *SoSPS1* pada eksplan kalus somatik embriogenik tanaman tebu dapat dilakukan dengan vektor *A.tumefaciens*. Tahapan transformasi antara lain kokultivasi, eliminasi dan seleksi menggunakan media *Murashige and Skoog* dan perkembangan kalus ditunjukkan pada setiap tahap. Fase perkembangan kalus mengikuti fase perkembangan seperti pada umumnya yaitu globular, skutelar, torpedo, *heart*, dan berdeferensiasi menjadi planlet. Planlet putatif transforman tumbuh dengan organ tanaman lengkap dan berwarna hijau tua.

Efisiensi transformasi sebesar 2,4% dan menghasilkan 6 tanaman tebu in-vitro.

#### DAFTAR PUSTAKA

Alcantara, G. B. de, Dibax, R., Besspalhok Filho, J. C., & Daros, E. (2014). Plant regeneration and histological study of the somatic embryogenesis of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivars RB855156 and RB72454 - doi: 10.4025/actasciagrion.v36i1.16342.

*Acta Scientiarum. Agronomy*, 36(1), 63.

Apriasti, R., Widyaningrum, S., Hidayati, W. N., Sawitri, W. D., Darsono, N., Hase, T., & Sugiharto, B. (2018). Full sequence of the coat protein gene is required for the induction of pathogen-derived resistance against sugarcane mosaic virus in transgenic sugarcane. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2749–2758.

Badan Pusat Statistik. (2021). *Distribusi Perdagangan Komoditas Gula Pasir Indonesia*. BPS RI.

Chakraborty, M., Sairam Reddy, P., Laxmi Narasu, M., Krishna, G., & Rana, D. (2016). Agrobacterium-mediated genetic transformation of commercially elite rice restorer line using nptII gene as a plant selection marker. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22(1), 51–60.

Debnath, S. C., Vyas, P., Goyali, J. C., & Igamberdiev, A. U. (2012). Morphological and molecular analyses in micropropagated berry plants acclimatized under ex vitro condition. *Canadian Journal of Plant Science*, 92(6), 1065–1073.

Di Pauli, V., Fontana, P. D., Lewi, D. M., Felipe, A., & Erazzú, L. E. (2021). Optimized somatic embryogenesis and plant regeneration in elite Argentinian sugarcane (*Saccharum*

spp.) cultivars. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 171.

Fehér, A., Pasternak, T. P., & Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(1), 1065–1073.

Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. In *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen.


Keshavareddy, G., Kumar, A. R. V., & S. Ramu, V. (2018). Methods of Plant Transformation- A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(07), 2656–2668.


Matsui, T., Matsuura, H., Sawada, K., Takita, E., Kinjo, S., Takenami, S., Ueda, K., Nishigaki, N., Yamasaki, S., Hata, K., Yamaguchi, M., Demura, T., & Kato, K. (2012). High level expression of transgenes by use of 5'-untranslated region of the Arabidopsis thaliana arabinogalactan-protein 21 gene in dicotyledons. *Plant Biotechnology*, 29(3), 319–322.


Matsui, T., Sawada, K., Takita, E., & Kato, K. (2015). Compatibility of translational enhancers with various plant species. *Plant Biotechnology*, 32(4), 309–316.


Miswar, M., Sugiharto, B., Soedarsono, J., & Moeljapawiro, S. (2007).


TRANSFORMASI GEN SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE (SoSPS1) MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens* UNTUK MENINGKATKAN SINTESIS SUKROSA PADA TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.). *Berkala Penelitian Hayati*, 12(2), 137–143.

Padda, I. S., & Nagalli, S. (2022).  *Cefotaxime*.


Purnamaningsih, R., Sukmadjaja, D.,  Suhesti, S., & Rahayu, S. (2021). In vitro propagation of six selected sugarcane mutant clones through leaf explants. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 883(1), 012075.


Rahmawati, S. (2006). Status  Perkembangan Perbaikan Sifat Genetik Padi Menggunakan Transformasi *Agrobacterium*. *Jurnal AgroBiogen*, 2(1), 36.


Rivera, A. L., Gómez-Lim, M., Fernández,  F., & Loske, A. M. (2012). Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews*, 9(3), 308–345.


Sawant, G., Sawardekar, S., Bhave, S., &  Kshirsagar, J. (2018). Effect of acetosyringone and age of callus on *agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa*

L.) calli. *International Journal of Chemical Studies*, 6(3Pt.B), 1–7.

Sawitri, W. D., & Sugiharto, B. (2018).  Rekayasa *Sucrose Phosphate Synthase* untuk Meningkatkan Sukrosa sebagai Sumber Karbon dan Energi bagi Pertumbuhan Tanaman. In *Bunga Rampai Forum Peneliti Muda Indonesia* (pp. 173–180). ITB Press.

Schrinner, E., Limbert, M., Penasse, L., &  Lutz, A. (1980). Antibacterial activity of cefotaxime and other newer cephalosporins (in vitro and in vivo). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 6(suppl A), 25–30.

Sugio, T., Satoh, J., Matsuura, H.,  Shinmyo, A., & Kato, K. (2008). The 5'-untranslated region of the *Oryza sativa* alcohol dehydrogenase gene functions as a translational enhancer in monocotyledonous plant cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(3), 300–302.

Yamasaki, S., Suzuki, A., Yamano, Y.,  Kawabe, H., Ueno, D., Demura, T., & Kato, K. (2018). Identification of 5'-untranslated regions that function as effective translational enhancers in monocotyledonous plant cells using a novel method of genome-wide analysis. *Plant Biotechnology*, 35(4), 365–373.