

EFISIENSI EKSPRESI GEN GUS MENGGUNAKAN PROMOTER CaMV35S DAN RUBQ2 PADA TEBU TRANSGENIK

Efficiency of Gene GUS Expression by Using Promoter CaMV35S and RUBQ2 on Transgenik Sugarcane

Oleh:

Eko Hary Pudjiwati
Fakultas Pertanian Universitas Borneo

Alamat korespondensi: Eko Hary Pudjiwati (ekohari_p@yahoo.com)

ABSTRAK

Promoter adalah salah satu faktor penting yang harus dipertimbangkan dalam transformasi genetik, karena promoter menentukan tingkat ekspresi gen yang ditransfer. Gen Gus merupakan gen pelapor yang banyak digunakan dalam proses transformasi genetik untuk mengetahui aktivitas suatu promoter. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efisiensi ekspresi transien gen GUS pada tebu transgenik menggunakan promoter CaMV35 S dan RUBQ2. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi transien GUS hanya terdeteksi pada tebu transgenik menggunakan promoter RUBQ2 dengan efisiensi 14%.

Kata kunci: GUS, promoter, CaMV35S, RUBQ2

ABSTRACT

Promoter is one of important factor which must be considered in genetic transformation, because promoter determine level of the transferred gene expression. GUS gene is the reporter gene which is a lot of used in genetic transformation to know the activity of an promoter. This research aim to to know the efficiency of transient GUS expression in transgenic sugarcane use CaMV35 S and RUBQ2 promoter. Result of research show transient GUS expression only detected in transgenic sugarcane use the RUBQ2 promoter with the efficiency 14%.

Key words: GUS, promoter, CaMV35S, RUBQ2

PENDAHULUAN

Agrobacterium tumefaciens telah secara rutin digunakan sebagai vektor untuk transformasi genetik tanaman. Hal ini disebabkan kemampuannya secara alami dapat memindahkan sepotong DNA yang disebut T-DNA ke genom inti sel tanaman. Potensi tersebut telah dimanfaatkan untuk memasukkan DNA asing ke genom tanaman baik untuk tujuan penelitian dasar maupun untuk tujuan penelitian terapan.

Keberhasilan transformasi gen tidak hanya terbatas pada integrasi gen target ke

dalam genom (kromosom) tanaman, tetapi juga tingkat ekspresi yang tinggi dari gen target tersebut. Ekspresi suatu gen target sangat dipengaruhi oleh aktivitas promoter. Menurut Rooke *et al.* (2000), pengetahuan yang baik tentang aktivitas promoter sangat penting untuk mendesain percobaan transformasi dan mempelajari stabilitas ekspresi gen. Ekspresi gen GUS dapat digunakan untuk mempelajari aktivitas suatu promoter. Basu *et al.* (2003) menyatakan, gen *uidA* yang mengkode β -glucuronidase (GUS) adalah salah satu gen pelapor (reporter gene) yang banyak

digunakan dalam transformasi tanaman untuk menduga aktivitas promoter.

Promoter adalah DNA kunci yang mengatur pola dan jumlah yang tepat dari ekspresi gen dalam cara khusus atau konstitutif, karena itu memainkan peranan penting dalam keberhasilan transformasi (Liu *et al.*, 2003). Promoter yang mampu mengendalikan aktivitas gen yang tinggi dapat digunakan untuk mendesain konstruk dengan berbagai gen yang mengendalikan sifat-sifat yang menguntungkan. Sehingga pemilihan promoter yang mengendalikan ekspresi transgen adalah salah satu faktor penting yang harus dipertimbangkan dalam proses transformasi genetik.

Promoter CaMV35S adalah promoter untuk analisis tanaman transgenik, kebanyakan digunakan sebagai kontrol untuk pembandingan untuk menguji promoter lainnya atau untuk memberi tingkat ekspresi tinggi dari gen tertentu (Venter *and* Botha, 2004). Promoter CaMV35S sering digunakan dalam transformasi baik pada tanaman dikotil maupun monokotil, karena CaMV35S merupakan promoter konstitutif yang aktif di semua jaringan dan pada semua spesies. Tetapi Basu *et al.* (2003) menyatakan bahwa promoter spesifik monokotil lebih cocok untuk transformasi spesies monokotil. Beberapa promoter yang sering digunakan untuk mengekspresikan transgen pada tanaman monokotil adalah

rice Rubisco small subunit (rbcS), actin (Act1), ubiquitin (RUBQ1 and RUBQ2), cytochrome c (OsCc1) (Koyama *et al.*, 2005). Liu *et al.* (2003) melaporkan bahwa RUBQ2 memberikan tingkat ekspresi transgen yang tinggi pada tebu.

Gen GUS (β -glucuronidase) termasuk dalam golongan *screenable marker* dan berfungsi sebagai gen *reporter*, dimana produk gen ini yaitu enzim, aktifitasnya mudah diuji tidak hanya untuk mendeteksi transforman, tetapi juga untuk mengestimasi tingkat ekspresi gen asing (gen introduksi) dalam jaringan transgenik. Salah satu pendekatan untuk mempelajari gen asing di dalam jaringan tanaman yang ditransformasi yaitu dengan mengukur jumlah atau aktivitas produk gen yang dikode oleh transgen. Beberapa promoter sudah dianalisis dengan cara difusikan dengan gen reporter (Rao *and* Rohini, 2005).

Transformasi genetik dan ekspresi transgen pada tebu masih belum optimal, sehingga dilakukan penelitian transformasi genetik menggunakan gen GUS sebagai gen repoter dengan promoter yang berbeda untuk mengetahui aktivitas promoter dalam mengekspresikan gen introduksi.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Pusat Penelitian Biologi Molekul Universitas

Jember, menggunakan tanaman tebu varietas POJ, *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 yang membawa vektor pCL4 dan pCAMBIA 1301 yang berbeda promoter untuk mengendalikan ekspresi GUS, media MS, zat pengatur tumbuh. Sedangkan peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah LAF, sentrifuge, shaker, pH meter, timbangan digital, autoclave, stirer, bunsen, alat-alat diseksi, hand spayer dan alat-alat gelas standard.

Perbanyakan Tanaman In Vitro

Tanaman tebu in vitro varietas POJ berasal dari propagasi primary shoot dan secondary shoot axillary buds. Perbanyakan tanaman in vitro dilakukan dengan cara melakukan subkultur pada media MS padat + 0,1 mg l⁻¹ BA, setiap 3 minggu sekali, yang ditumbuhkan pada

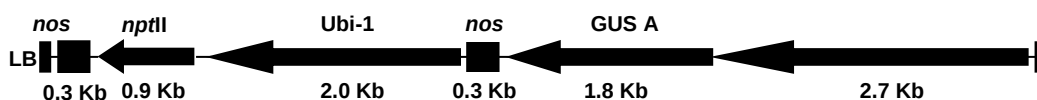
suhu 24°C dengan intensitas cahaya 1500 – 2000 lux.

Persiapan Eksplan

Eksplan diambil dari tanaman in vitro yang pertumbuhannya sehat dan berumur ± 1 bulan, dengan cara memotong bagian pangkal tanaman invitro ± 3 mm. Bagian pangkal tanaman inilah yang akan digunakan dalam proses transformasi.

Persiapan Inokulum

Kultur sel bakteri dimulai dengan menumbuhkan single colony *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 yang membawa vektor pCL4 dan pCAMBIA 1301 kedalam 3 ml medium YEP cair yang mengandung 50 mg l⁻¹ kanamisin dan 100 mg l⁻¹ rifampisin dalam inkubator 150 rpm, 28°C selama 2 hari. Setiap kultur bakteri diambil 1 ml, kemudian masing-masing ditambahkan kedalam 50 ml medium YEP cair yang



Gambar 1. Peta Konstruksi Gen GUS pada Daerah T-DNA dari Plasmid pCL4 (Liu *et al.*, 2003). LB (*left border*); nos (sekuen polyadenil gen nopaline synthetase); nptII (gen neomycin phosphotransferase); Ubi-1 (promoter ubiquitin jagung); GUS A (gen GUS); RUBQ2 (promoter ubiquitin padi); RB (*right border*).



Gambar 2. Peta Konstruksi Gen GUS pada Daerah T-DNA dari Plasmid pCAMBIA1301 (Kumar *et al.*, 2005). LB (*left border*); CaMV35S Poly A (polyadenil gen CaMV35S); hpt (gen hygromycin phosphotransferase); CaMV35S (promoter CaMV35S); MCS (*multiple cloning site*); GUS A (gen GUS); nos Poly A (polyadenil gen nopaline synthetase).

mengandung antibiotik yang sama dan diinkubasikan dalam kondisi yang sama, sampai mencapai OD₆₀₀ 0,5-1,0. Selanjutnya disentrifuge pada 5000 rpm selama 10 menit dan disuspensikan dalam 2 ml medium LB cair.

Infeksi *Agrobacterium* dan Kokultivasi

Jumlah eksplan untuk setiap kali transformasi sebanyak 50 eksplan. Bagian dasar eksplan ditusuk-tusuk dengan jarum steril 4 – 5 kali, dimasukkan kedalam 50 ml medium MS cair yang mengandung 100 mg l⁻¹ acetosyringone dan suspensi *Agrobacterium* dengan OD₆₀₀ 0,5. Selanjutnya diinkubasi di dalam shaker pada suhu 28°C, 150 rpm selama 15 menit, agar terjadi proses infeksi *Agrobacterium*. Eksplan disaring dan ditiriskan diatas kertas saring steril selama 20 menit dan ditanam pada medium MS padat yang mengandung 100 mg l⁻¹ acetosyringone pada kondisi gelap selama 3 hari.

Pengujian Ekspresi Transien GUS

Ekspresi transien GUS didasarkan pada aktivitas enzim β -glucuronidase yang diuji secara histokimia dengan metode menurut Jefferson *et al.* (1987) dengan beberapa modifikasi. Pengujian ekspresi transien GUS dilakukan terhadap eksplan setelah kokultivasi.

Sample dicuci satu kali dengan larutan 0,1 M buffer potassium phosphate (pH 7,0), kemudian diinkubasi dengan buffer yang sama, yang mengandung 2%

methanol, 0,3% Triton X-100, 0,5 mM pottasium ferrocyanide, 0,5 mM potassium ferricyanide dan 0,5 mg ml⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronic acid pada suhu 37°C semalam. Setelah inkubasi, klorofil dicuci dengan campuran 95% (v/v) ethanol, 1% (v/v) asam acetat glacial dan 4% aquadest. Pengamatan terhadap spot atau bercak berwarna biru pada eksplan yang menunjukkan ekspresi gen GUS dilakukan menggunakan stereo mikroskop.

Analisis Data

Analisis data hanya dengan membandingkan persentase eksplan yang mengekspresikan GUS dan tingkat ekspresi gus (intensitas spot biru) yang dikendalikan oleh promotor CaMV35S dan RUBQ2.

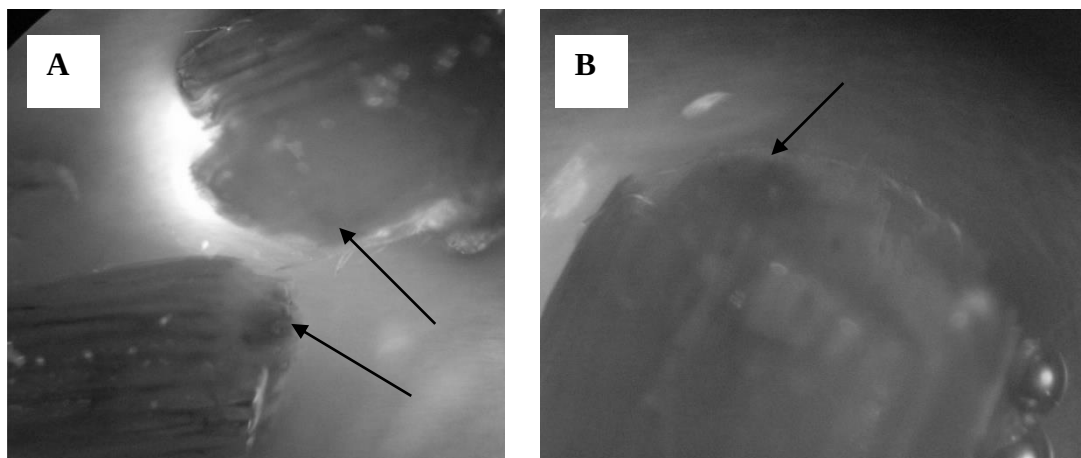
HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji GUS dapat dilakukan pada tahap awal setelah kokultivasi maupun setelah gen terintegrasi dengan stabil. Pada penelitian ini uji GUS dilakukan pada eksplan setelah 3 hari kokultivasi menggunakan uji histokimia. Pengamatan dilakukan dengan pengecatan menggunakan substrat X gluc dan menghitung jumlah eksplan yang menampakkan spot biru. Hasil uji GUS menunjukan bahwa ekspresi transien GUS terdeteksi pada eksplan (Gambar 3) dengan promotor RUBQ2, sedangkan ekspresi transien GUS dengan promotor CaMV

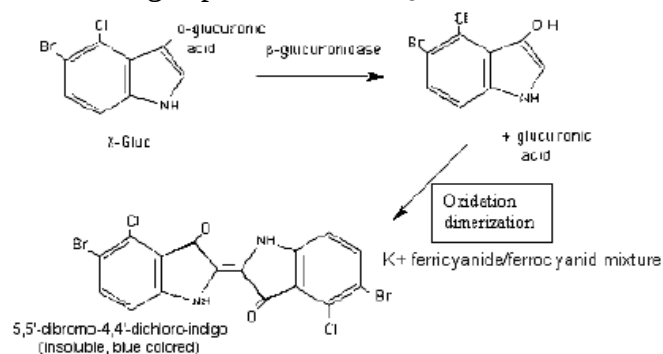
35S tidak terdeteksi. Jumlah eksplan yang menunjukkan spot biru 7 eksplan dari 50 eksplan yang ditransformasi. Transformasi gen GUS dengan promoter RUBQ2 menunjukkan efisiensi ekspresi transien 14%.

Ekspresi gen pada eukaryote meliputi beberapa tahap yaitu transkripsi, post transkripsi, translasi dan post translasi. Promoter merupakan daerah DNA dimana RNA polimerase melekat dan mengawali transkripsi. Bagian-bagian tertentu suatu promoter sangat penting untuk pengikatan RNA polimerase. Adanya ekspresi Gus (*spot biru*) yang dikendalikan oleh promoter RUBQ2

menunjukkan bahwa promoter tersebut aktivitasnya lebih tinggi dari promoter CaMV35S dalam mengekspresikan gen GUS. Aktivitas promoter RUBQ2 menyebabkan dimulainya proses transkripsi gen GUS yang dilanjutkan dengan translasi, sehingga terbentuk protein (enzim) β -glucuronidase. Aktivitas enzim β -glucuronidase menyebabkan hidrolisis substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -Dglucuronide (X-gluc) menjadi glucuronic acid, produk yang *soluble* dan tidak berwarna, selanjutnya produk tersebut dioksidasi dan didimerized selama inkubasi membentuk 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo, produk berwarna biru



Gambar 3. (A dan B) hasil Uji Histokimia, tanda panah menunjukkan spot biru pada eksplan yang ditransformasi dengan *Agrobacterium* strain GV3101 yang membawa gen GUS dengan promoter RUBQ2.



Gambar 4. Reaksi kimia dalam uji GUS dengan metode histokimia

yang *insoluble*, yang dapat dideteksi dalam larutan campuran K^+ ferricyanide/ferrocyanide (Chang *et al.*, 1987), seperti yang terlihat pada Gambar 4. Tingginya aktivitas promotor RUBQ2 dibandingkan promotor CaMV35S dalam mengendalikan ekspresi GUS pada tebu dalam penelitian ini sama seperti yang dilaporkan oleh Liu *et al.* (2003) juga Basu *et al.* (2003) yang menyatakan bahwa promotor spesifik monokotil lebih cocok untuk transformasi spesies monokotil.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa aktivitas promotor RUBQ2 dalam mengendalikan ekspresi gen lebih tinggi daripada promotor CaMV35S dengan efisiensi 14%.

DAFTAR PUSTAKA

Basu C., A. P. Kausch, H. Luo and J. M. Chandlee. 2003. Promoter analysis in transient assays using a GUS reporter gene construct in creeping bentgrass (*Agrostis palustris*). *Plant Physiol.*, 160: 1233-1239.

Chang, Liu, Wang, Juang and Pan. 1987. Using fluorometric and histochemical methods to detect the gene expression in plant. *The Embo Journal*, 6: 3901-3907.

Jefferson R.A., T.A. Kavanagh and M.W. Bevan. 1987. GUS fusions: β -

glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6, 13: 3901-3907.

Koyama T., T. Ono, M. Shimizu, T. Jinbo, R. Mizuno, K. Tomita, N. Mitsukawa, T. Kawazu, T. Kimura, K. Ohmiya and K. Sakka. 2005. Promoter of arabidopsis thaliana phosphate transporter gene drives root specific expression of transgene in rice. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(1): 38-42.

Kumar, Maruthasalam, Loganathan, Sudhakar and Balasubramanian. 2005. An improved agrobacterium-mediated transformation protocol for recalcitrant elite indica rice cultivars. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23: 67-73.

Liu, D., S.V. Oard, and J.H. Oard. 2003. High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. *Plant Sci.*, 165: 743-750.

Rao, S and F.K. Rohini. 2005. *Plant transformation and genetic marker*. (on-line). <http://www.aqbioresources.com>. diakses 3 Juli 2006.

Rooke, L., D. Byrne and S. Salgueiro. 2000. Marker gene expression driven by the maize ubiquitin promoter in transgenic wheat. *Ann.appl. Biol.*, 136: 167-172.

Venter, M and F.C. Botha. 2004. Promoter analysis and transcription profiling: integration of genetic data enhances understanding of gene expression. *Physiologia Plantarum*, 120: 74-83.