



ANALISIS EKSPRESI GEN MmCu/Zn-SOD DAN KETAHANAN TANAMAN KENTANG KULTIVAR IPB CP3 TRANSGENIK TERHADAP CEKAMAN HERBISIDA PARAKUAT

ANALYSIS OF MmCu/Zn-SOD GENE EXPRESSION AND RESISTANCE OF TRANSGENIC POTATO CULTIVAR IPB CP3 TO PARAQUAT HERBICIDE

Muhammad Akbar Velayati^{1,2}, Suharsono^{1,2,3*}, Miftahudin^{1,3}

¹Program Bioteknologi, Jl. Kamper, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

²Pusat Bioteknologi, LPPM IPB, Jl. Kamper, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

³Departemen Biologi, FMIPA IPB, Jl. Agathis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

*Corresponding author: miftahudin@apps.ipb.ac.id

Naskah Diterima: 1 Agustus 2022; Direvisi: 22 Oktober 2022; Disetujui: 21 Agustus 2023

Abstrak

Penggunaan herbisida parakuat untuk mengendalikan pertumbuhan gulma telah menjadi metode yang paling umum. Namun, penggunaan herbisida juga dapat menyebabkan kematian sel tanaman kentang yang sedang dibudidayakan, karena herbisida parakuat dapat menginduksi pembentukan senyawa *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dapat merusak sel tanaman. Ekspresi berlebih dari gen MmCu/Zn-SOD diharapkan dapat memberikan ketahanan tanaman terhadap cekaman herbisida parakuat. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis ekspresi gen MmCu/Zn-SOD pada kentang transgenik IPB CP3 kultivar dan ketahanannya terhadap cekaman herbisida parakuat. Perlakuan herbisida parakuat dengan konsentrasi 75 μ M pada tanaman transgenik (P3SOD6, P3SOD9, P3SOD17) dan non-transgenik (NT) secara *in vitro* menunjukkan bahwa semua tanaman transgenik lebih tahan terhadap cekaman parakuat dibandingkan tanaman non-transgenik. Klon P3SOD9 paling tahan terhadap herbisida parakuat, dengan perbandingan 10 tanaman hidup dari 12 tanaman yang diuji. Ekspresi gen MmCu/Zn-SOD pada galur transgenik lebih tinggi dibandingkan galur non-transgenik. Ekspresi relatif gen MmCu/Zn-SOD pada P3SOD9, P3SOD6, dan P3SOD17 secara berturut-turut lebih tinggi 233,22; 127,62; dan 3,18 kali dibandingkan ekspresi gen tersebut pada NT. Semakin tinggi ekspresi gen *MmCu/ZnSOD*, semakin tinggi ketahanan terhadap cekaman herbisida parakuat.

Kata Kunci: Ekspresi gen; Herbisida parakuat; MmCu/Zn-SOD

Abstract

The use of paraquat herbicide to control weed growth has become the most common method. However, using the herbicide can also cause cell death in potato plants that are being cultivated because it can induce the formation of Reactive Oxygen Species (ROS) compounds that can damage plant cells. Overexpression of the MmCu/Zn-SOD gene is expected to provide resistance to paraquat herbicide stress. The study aimed to analyze the expression of the MmCu/Zn-SOD gene in transgenic potato cultivar IPB CP3 and its resistance to paraquat herbicide stress. In vitro treatment of transgenic (P3SOD6, P3SOD9, P3SOD17) and non-transgenic (NT) potato with 75 μ M paraquat herbicide showed that all transgenic plants were more resistant to paraquat stress than that non-transgenic plants. The P3SOD9 clone was the most resistant to paraquat herbicide, with a ratio of 10 surviving plants of the 12 tested plants. The expression of MmCu/Zn-SOD in transgenic lines was higher than that in non-transgenic lines. The relative expressions of MmCu/Zn-SOD gene in P3SOD9, P3SOD6, and P3SOD17 were 233.22; 127.62; and 3.18 times higher than that of NT, respectively. The expression level of MmCu/ZnSOD correlates with the level of resistance to paraquat herbicide stress.

Keywords: Gene expression; MmCu/Zn-SOD; Paraquat herbicide

Permalink/DOI: <http://dx.doi.org/10.15408/kauniyah.v16i2.27468>

PENDAHULUAN

Kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan salah satu tanaman pangan utama dunia selain padi dan gandum. Umbi kentang memiliki kandungan pati yang tinggi, sehingga kentang dapat dijadikan sebagai sumber makanan alternatif. Selain itu, umbi kentang juga banyak dimanfaatkan industri untuk diolah menjadi produk kentang yang memiliki cita rasa tinggi, seperti *french fries* dan *potato chips*, sehingga permintaan pasar dunia untuk tanaman ini cukup tinggi. Namun, produksi kentang di Indonesia dalam beberapa tahun terakhir tidak mengalami peningkatan yang signifikan atau cenderung stagnan. Sementara kebutuhan terhadap kentang terus meningkat seiring dengan pertambahan jumlah penduduk terus meningkat dari tahun ke tahun.

Produksi tanaman kentang yang tidak mampu mengimbangi permintaan pasar mengakibatkan ketergantungan yang tinggi terhadap kentang impor. Berdasarkan data statistik, jumlah impor kentang terus meningkat, dari 106.230 ton pada tahun 2016, menjadi 133.564 ton pada tahun 2020 (Badan Pusat Statistik, 2021). Oleh karena itu, perlu adanya upaya untuk meningkatkan produksi kentang agar mampu mengimbangi permintaan pasar, sehingga ketergantungan terhadap impor dapat dikurangi.

Gulma merupakan salah satu faktor penghambat produksi kentang. Penggunaan herbisida untuk mengontrol pertumbuhan gulma telah menjadi metode yang paling umum dilakukan. Salah satu herbisida yang paling umum digunakan adalah herbisida parakuat (PQ). Herbisida parakuat merupakan herbisida tipe kontak yang cukup efektif dalam membasmi gulma dalam waktu singkat. Penggunaan herbisida ini tidak hanya dapat menyebabkan kerusakan sel pada gulma. Bahkan, juga dapat menyebabkan kerusakan sel pada tanaman kentang yang sedang dibudidayakan, sehingga perlu metode yang tepat untuk meminimalisir kerusakan tersebut.

Herbisida parakuat dapat merusak sel dengan cara menginduksi pembentukan senyawa *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) pada sel tanaman (Bonneh-Barkay et al., 2005). Pembentukan senyawa ROS pada tanaman dapat diminimalisir dengan mengaktifkan enzim superoksida dismutase (SOD). Enzim SOD dapat mengubah senyawa ROS, seperti $O_2^{\cdot-}$ dan OH^{\cdot} , menjadi senyawa H_2O_2 , dimana senyawa ini dapat dengan mudah didetoksifikasi menjadi O_2 dan H_2O dengan bantuan enzim katalase (CAT) (Sharma et al., 2012) atau askorbat peroksidase (APX) (Radwan et al., 2010). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa overekspresi enzim SOD berbanding lurus dengan ketahanan tanaman terhadap cekaman yang menginduksi ROS, seperti ketahanan terhadap cekaman kekeringan pada alfalfa (McKersie et al., 1996), cekaman suhu rendah pada kentang (Che et al., 2020), dan cekaman aluminium pada kanola (Basu et al., 2001). Introduksi gen yang memperkuat ekspresi SOD diharapkan mampu meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman herbisida.

Puteri (2022) telah berhasil mengintroduksi gen MmCu/Zn-SOD dengan promoter kuat 35S CaMV ke dalam tanaman kentang kultivar IPB CP3. Analisis resistensi secara *in vitro* menunjukkan bahwa tanaman kentang kultivar IPB CP3 transgenik tersebut dapat meningkatkan ketahanan terhadap beberapa cekaman seperti cekaman kekeringan, cekaman garam, dan cekaman pH rendah (Puteri 2022), namun analisis resistensi tanaman kentang transgenik terhadap cekaman herbisida parakuat serta analisis ekspresi dari gen MmCu/Zn-SOD pada tanaman kentang kultivar IPB CP3 masih belum dilakukan.

MATERIAL DAN METODE

Bahan Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah stek *in vitro* dari tanaman kentang kultivar IPB CP3 transgenik klon P3SOD6, P3SOD9, dan P3SOD17 yang mengandung gen MmCu/Zn-SOD (Puteri, 2022) dan klon non-transgenik (NT) kultivar IPB CP3 sebagai kontrol. Herbisida parakuat dengan merek Gramoxone (Syngenta, USA) digunakan untuk uji ketahanan terhadap herbisida parakuat.

Perbanyakan Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Transgenik secara *In Vitro*

Bagian tanaman yang akan digunakan untuk perbanyakan adalah ruas batang (*internode*). Potongan *internode* dari tanaman kentang dikultur dalam media Murashige and Skoog (MS)

(Murashige & Skoog, 1962) yang terdiri dari MS instan merk caisson (Caisson Lab., USA) 4,33 g/L, myo-inositol (Phyto Technology Lab, USA) 0,1 g/L, vitamin 5 mL/L, gula 30 g/L, dan agar 7 g/L. Eksplan ditumbuhkan di ruang kultur selama 3 minggu dengan kondisi suhu 20 °C, kondisi pencahayaan 2.000–3.000 lux dan fotoperiode 16 jam terang.

Isolasi DNA Genom Tanaman

Isolasi DNA genom dilakukan menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) yang telah dimodifikasi (Suharsono, 2002). Untuk persiapan awal, *buffer* CTAB (600 µL CTAB + PVP 1% dan 1 µL β-merkaptotanol 0,2%) ditambahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml dan dipanaskan hingga suhu 65 °C. Sampel sebanyak 0,1 g digerus dengan mortar dengan menambahkan N₂ cair hingga membentuk serbuk halus. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro yang berisi *buffer* CTAB yang sebelumnya telah dipanaskan, kemudian divortex, dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 40 menit (dibolak-balik setiap 10 menit), lalu didinginkan di suhu ruang selama 5 menit. Sampel lalu ditambahkan 600 µL PCI (*phenol:chloroform:isoamyl alcohol*) (25:24:1) v/v), dicampur dengan dibolak-balik, dan selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 12.000 g selama 10 menit. Sampel lalu akan membentuk 3 fase, yaitu fase atas (fase *aqueous*), fase tengah (fase *intermediate*), dan fase bawah (fase kloroform). Fase *aqueous* selanjutnya dipindahkan ke tabung mikro yang baru dan ditambahkan isopropanol sebanyak 2–3 kali volume larutan fase *aqueous*, dibolak-balik, dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama semalam. Setelah inkubasi, larutan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 g di suhu 4 °C selama 25 menit. Supernatan dibuang dan pelet DNA yang terbentuk selanjutnya dicuci dengan menambahkan 500 µL etanol 70%, dibolak-balik, dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 g di suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet DNA dikering-anginkan selama 15–20 menit. Setelah kering, pelet DNA ditambahkan sebanyak 15–20 µL akuabides (ddH₂O) dan RNase sebanyak 0,2 kali volume larutan DNA, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 10 menit dan disimpan pada suhu -20 °C.

Analisis Integrasi Gen MmCu/Zn-SOD

Untuk memastikan adanya insersi (sisipan) gen MmCuZn-SOD ke dalam DNA genom, uji integrasi dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), dengan DNA genom sebagai *template* menggunakan pasangan primer 35S-F (5'-AAACCTCCTCGGATTCCATT-3') dan primer MmSOD-R2 (5'-ATATTGTTGTATACCTGACCTC-3'). PCR juga dilakukan menggunakan primer aktin kentang Act-F (5'-GAAAATCCTGACCGAAAGAGG-3') dan Act-R (5'-CAAGTGATGGCTGGAATAAGA-3') sebagai kontrol internal dari DNA kentang. Hasil PCR diperiksa dengan elektroforesis menggunakan 1% agarosa gel dalam larutan 1x *buffer* TAE (40 mM Tris-asetat, 1 mM EDTA) pada 100 V selama 30 menit. DNA divisualisasi menggunakan sinar UV setelah merendam gel dalam 0,5 µg/mL *ethidium bromide* (EtBr) selama 10 menit.

Isolasi RNA Total

Isolasi RNA total dilakukan pada tanaman kentang in vitro kultivar IPB CP3 transgenik dan non-transgenik dengan menggunakan TRIzol® *Reagent* (Invitrogen, USA). Sebanyak 800 µL TRIzol® dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml dan disimpan di dalam es. Sampel tanaman kentang sebanyak 0,1 g digerus dengan mortar dengan menambahkan N₂ cair hingga berbentuk serbuk, lalu selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung mikro yang sebelumnya telah berisi TRIzol®, dihomogenkan, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. TRIzol® berisi sampel selanjutnya ditambahkan 200 µL kloroform, dibolak-balik, dan diinkubasi di suhu ruang selama 3 menit. Setelah inkubasi, sampel di sentrifugasi pada kecepatan 12.000 g pada suhu 4 °C selama 10 menit. Setelah sentrifugasi, sampel akan terbagi menjadi 3 bagian, yaitu fase atas, fase tengah, dan fase bawah. Fase atas selanjutnya diambil dan dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru dan ditambahkan 500 µL isopropanol, dibolak-balik, dan diinkubasi pada suhu ruang, selama 10 menit. Selanjutnya, sampel disentrifugasi pada kecepatan 12.000 g pada suhu 4 °C selama 10 menit sehingga membentuk endapan. Supernatan dibuang dan endapan dicuci dengan 500 µL etanol 75%

yang telah diperlakukan dengan 0,1% dietil pirokarbonat (DEPC), lalu disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 g di suhu 4 °C selama 5 menit. Supernatan dibuang dan endapan dikeringkan di suhu ruang selama 10 menit. Endapan yang telah kering ditambahkan dengan akuabides (ddH₂O) yang telah diperlakukan dengan DEPC dan diinkubasi pada suhu 60 °C selama 10 menit.

Sintesis cDNA Total

Sintesis cDNA dilakukan dengan menggunakan Kit cDNA (Toyobo, Japan) dengan primer Oligo-dT. Sebanyak 1 µL (1 µg) sampel RNA total dimasukkan ke dalam tabung mikro PCR, lalu selanjutnya ditambahkan 2 µL 4x DN Master Mix dan 5 µL *nuclease-free water* sehingga total menjadi 8 µL. Suspensi yang telah diberi perlakuan selanjutnya diinkubasi pada suhu 25 °C selama 5 menit. Setelah inkubasi, suspensi ditambahkan dengan 5x RT Master Mix sebanyak 2 µL sehingga total volume sebanyak 10 µL. Suspensi selanjutnya diinkubasi berturut-turut pada suhu 37 °C selama 15 menit, 50 °C selama 5 menit, dan 98 °C selama 5 menit. Keberhasilan sintesis cDNA dikonfirmasi dengan PCR menggunakan primer aktin (Tact-qF: 5'-ACA TCG TCC TTA GTG GTG GA-3' dan Tact-qR: 5'-GTG GAC AAT GGA AGG ACC AG-3'). Kondisi PCR adalah pra-denaturasi pada suhu 95 °C selama 5 menit, dan dilanjutkan dengan 35 siklus PCR yang masing-masing terdiri atas tahap denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 57 °C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 45 detik.

Analisis Ekspresi Gen dengan *Quantitative Real-Time PCR* (qRT-PCR)

Analisis ekspresi gen MmCu/Zn-SOD secara kualitatif dilakukan dengan metode PCR menggunakan pasangan primer forward MmCuZn-SOD-F1 (5'- ATG GTG AAG GCT GTG GTT GT-3') dan primer reverse MmCuZn-SOD-R2 (5'-CAT CTC CAA CGG TGA CAT TG-3'). Komposisi untuk volume reaksi PCR yaitu sebanyak 10 µL dengan komposisi 1 µL cDNA (50 ng), masing-masing 0,25 µL primer *forward* dan primer *reverse* (10 pmol), 5 µL *Dream TaqTM Green PCR Master Mix*, dan 3,5 µL *nuclease free water*. Program *thermal* yang digunakan antara lain pra-denaturasi pada 95 °C selama 5 menit, diikuti oleh denaturasi pada 95 °C selama 1 menit, *annealing* pada 57 °C selama 45 detik, dan elongasi pada 72 °C selama 1 menit. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus. Hasil PCR selanjutnya dilakukan elektroforesis dalam gel agarosa 2% pada tegangan 50 V selama 45 menit.

Analisis secara kuantitatif gen MmCu/Zn-SOD dilakukan menggunakan alat *Quantitative Real-Time PCR* (qRT-PCR) *QuantStudio 5* (Thermo Fisher, USA). Sepasang primer spesifik yang sama dengan yang digunakan untuk analisis kualitatif digunakan untuk mengamplifikasi gen MmCuZn-SOD dengan target berukuran 270 bp (MmCuZn-SOD-F1: 5'- ATG GTG AAG GCT GTG GTT GT-3'; MmCuZn-SOD-R2 : 5'-CAT CTC CAA CGG TGA CAT TG-3'). Untuk standar ekspresi menggunakan primer spesifik aktin (Forward, Tact-qF: 5'-ACA TCG TCC TTA GTG GTG GA-3'; reverse, Tact-qR: 5'-GTG GAC AAT GGA AGG ACC AG - 3'). Reaksi PCR yang digunakan adalah 1 µL cDNA (50 ng), 5 µL ThunderbirdTM SYBRTM qPCR Mix, 2,5 pmol *forward* primer, 2,5 pmol *reverse* primer, dan 3,5 µL *nuclease-free water*. Perangkat qRT-PCR menggunakan program termal pra-denaturasi pada 95 °C selama 30 detik, diikuti oleh denaturasi pada 95 °C selama 10 detik, *annealing* pada 57 °C selama 30 detik, dan elongasi pada 72 °C selama 40 detik, dan diulang sebanyak 45 siklus. Data yang diperoleh dari analisis qPCR adalah kurva amplifikasi, kurva leleh, dan nilai *cycle threshold* (CT). Nilai CT yang akan digunakan untuk penghitungan ekspresi relatif diperoleh dari tiga ulangan biologis dan tiga ulangan teknis. Tiga ulangan biologis adalah data CT yang diambil dari 3 tiga individu tanaman yang berbeda dari genotipe (klon) yang sama, sedangkan tiga ulangan teknis adalah data CT yang diambil dari tiga reaksi qPCR yang berbeda dari individu tanaman yang sama, sehingga secara keseluruhan diperoleh 72 data CT.

Uji Resistensi Tanaman Kentang Transgenik terhadap Cekaman Herbisida Parakuat

Pengujian tanaman kentang transgenik dengan cekaman herbisida parakuat dilakukan secara *in vitro*. Tanaman ditumbuhkan pada media MS0 selama 2 minggu, setelah itu tanaman disemprot

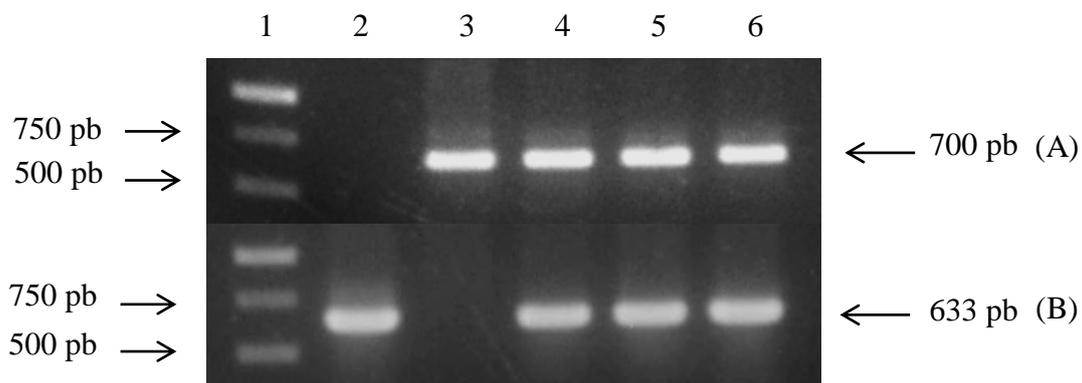
dengan herbisida parakuat merek Gramoxone dengan konsentrasi 25 μM . Percobaan dilakukan dengan menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dengan lima ulangan dan satu faktor perlakuan yaitu klon. Penelitian ini menggunakan tiga klon tanaman kentang transgenik, yaitu P3SOD6, P3SOD9 dan P3SOD17, dan satu klon tanaman kentang kultivar IPB CP3 non-transgenik yang digunakan sebagai kontrol. Pengamatan terhadap persentase tanaman resisten (hidup) dilakukan selama 7 hari.

Analisis Data

Analisis data resistensi tanaman kentang IPB CP3 transgenik terhadap herbisida parakuat dan analisis data ekspresi gen MmCu/Zn-SOD pada tanaman transgenik dilakukan dengan *Analysis of Variance* (Anova) dan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada program SPSS versi 25. Data ekspresi gen dianalisis dengan menggunakan metode *comparative CT* ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) (Livak & Schmittgen, 2001). Rumus yang digunakan sebagai berikut, $\Delta\text{CT}_{\text{Tr}} = \text{CT}_{\text{SOD}} - \text{CT}_{\text{Act}}$; $\Delta\text{CT}_{\text{NT}} = \text{CT}_{\text{SOD}} - \text{CT}_{\text{Act}}$; $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Tr}} - \Delta\text{CT}_{\text{NT}}$. Keterangannya adalah CT= jumlah siklus amplifikasi pada saat amplikon yang mengandung *fluorescence* mencapai nilai suatu ambang tertentu; ΔCT = perbedaan nilai CT antara gen target (SOD) dengan gen kontrol (Aktin); $\Delta\Delta\text{CT}$ = perbedaan nilai CT antara ΔCT transgenik dan ΔCT non-transgenik; CT_{SOD} = nilai CT dari gen target (SOD); CT_{Act} = nilai CT dari gen kontrol (Aktin); Tr= klon transgenik; NT= klon non-transgenik

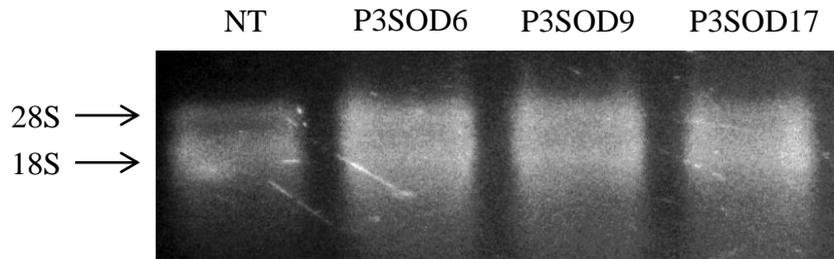
HASIL

Amplifikasi gen aktin dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Primer yang digunakan yaitu Act-F dan Act-R, yang dapat menghasilkan amplikon berukuran 700 pb (Gambar 3). Amplifikasi gen target dilakukan dengan menggunakan primer *forward* 35S-F dan primer *reverse* MmSOD-R2 yang didesain berdasarkan sekuen plasmid ekspresi pGWB-MmCu/Zn-SOD dan menghasilkan amplikon berukuran 633 pb. Hasil amplifikasi aktin membentuk pita amplikon berukuran 700 pb dan tidak ditemu-nya pita amplikon pada kontrol negatifnya yaitu plasmid pGWB5-MmCu/Zn-SOD. Amplikon gen 35S-SODR2 berhasil teramplifikasi pada genom tanaman transgenik PSOD6, PSOD9, dan PSOD17, sedangkan pada kontrol yaitu non-transgenik tidak mengandung amplikon (Gambar 1).



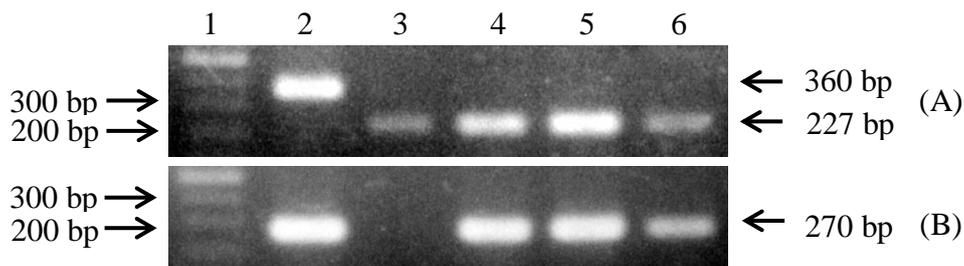
Gambar 1. Hasil PCR gen aktin (A) dan gen MmCu/Zn-SOD (B) dari tanaman kentang kultivar IPB CP3. 1= marker DNA Ladder 1 kb, 2= plasmid pGWB5-MmCu/Zn-SOD, 3= non-transgenik IPB CP3, 4–6= klon transgenik secara berurutan P3SOD6, P3SOD9, dan P3SOD17

Isolasi RNA dilakukan dengan metode TRIzol®, yaitu menggunakan reagen TRIzol® sebagai salah satu bahan dalam proses isolasi RNA. Reagen TRIzol® merupakan larutan yang terdiri dari senyawa fenol dan guanidin isothiosianat. Hasil elektroforesis dari RNA total menunjukkan adanya 2 pita yang jelas pada masing masing sampel (Gambar 2).



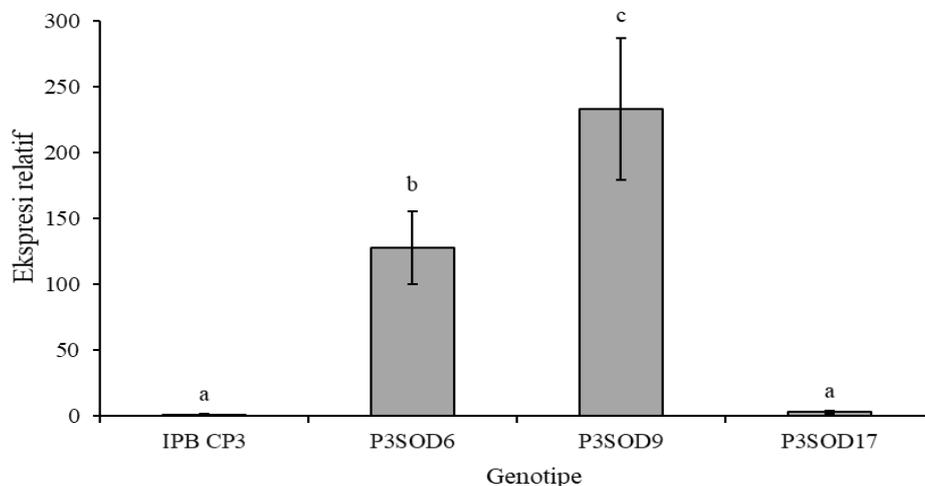
Gambar 2. Hasil Isolasi RNA total non-transgenik (NT) dan transgenik (P3SOD6, P3SOD9, dan P3SOD17)

Uji kualitas cDNA yang telah berhasil disintesis dilakukan dengan mengamplifikasi aktin menggunakan pasangan primer spesifik aktin Tact-qF dan Tact-qR, yang menghasilkan amplicon sebesar 360 bp pada DNA dan 227 bp pada cDNA. Uji kualitatif ekspresi dari gen MmCu/Zn-SOD dilakukan dengan mengamplifikasi gen MmCu/Zn-SOD dengan pasangan primer *forward* MmSOD-F1 dan primer *reverse* MmSOD-R2 dengan cDNA utuh sebagai cetakan. Amplifikasi menggunakan sepasang primer ini menghasilkan amplicon sebesar 270 bp.



Gambar 3. Hasil amplifikasi gen aktin dengan Tact-qF-Tact-qR (A) dan MmSOD-F1-MmSOD-R2 (B) pada cDNA tanaman kentang kultivar IPB-CP3; 1= Marker 100 bp; 2A= DNA genom non-transgenik; 2B= plasmid pGWB5-MmCuZn-SOD; 3= cDNA non-transgenik; 4, 5, 6= cDNA transgenik secara berurutan P3SOD6, P3SOD9, dan P3SOD17

Uji ANOVA ($\alpha = 0,05$) menunjukkan bahwa klon transgenik berbeda nyata dengan klon non-transgenik. Uji lanjut DMRT menunjukkan bahwa nilai ekspresi klon P3SOD6 dan klon P3SOD9 berbeda nyata dengan kontrol yaitu klon IPB CP3 non transgenik, sedangkan P3SOD17 tidak berbeda nyata dengan kontrol. Nilai rata-rata ekspresi gen tertinggi ditemukan pada klon P3SOD9 dengan (Gambar 4).

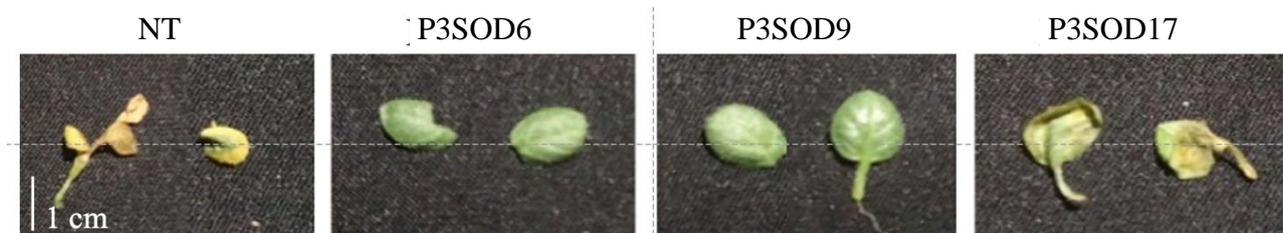


Gambar 4. Ekspresi relatif gen MmCu/Zn-SOD pada klon non-transgenik (IPB CP3) dan klon transgenik (P3SOD6, P3SOD9, dan P3SOD17); Bar= standar deviasi diagram batang yang diberi label dengan huruf yang berbeda menunjukkan nilai yang berbeda nyata pada uji lanjut DMRT, $\alpha = 0,05$

Ketahanan tanaman transgenik terhadap cekaman herbisida parakuat berbanding lurus dengan tingkat ekspresi gen MmCu/Zn-SOD. Setelah hari ke 5 pasca penyemprotan parakuat, jumlah total klon P3SOD9 yang bertahan yaitu sebanyak 10 planlet, klon P3SOD6 sebanyak 8 planlet, klon P3SOD17 sebanyak 5 planlet dan klon IPB CP3 sebanyak 4 tanaman (Tabel 1). Hasil rata rata menunjukkan bahwa klon transgenik lebih tahan terhadap cekaman herbisida dibandingkan dengan non-transgenik (Gambar 5).

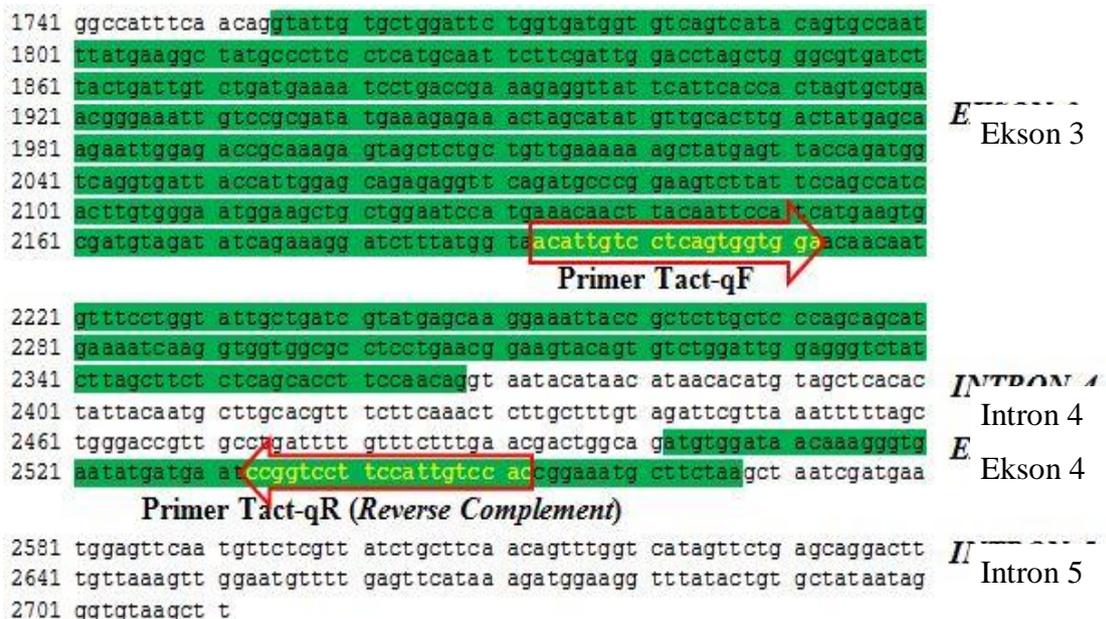
Tabel 1. Jumlah tanaman yang bertahan hidup sebelum dan setelah 5 hari perlakuan herbisida parakuat

Klon	Jumlah tanaman yang resisten		Persentase (%)
	Awal	Akhir	
IPB CP3	12	4	33,33
P3SOD6	12	8	66,67
P3SOD9	12	10	83,33
P3SOD17	12	5	41,67



Gambar 5. Hasil pengamatan morfologi daun tanaman kultivar IPB CP3 non-transgenik dan transgenik setelah 5 hari pemberian herbisida parakuat

Pengecekan kemurnian cDNA dilakukan dengan mengamplifikasi gen aktin pada cDNA lalu dibandingkan hasilnya dengan aktin pada genom/DNA sebagai kontrol. Pasangan primer spesifik aktin yang digunakan, yaitu Tact-qF dan Tact-qR, didesain berdasarkan gen aktin pada mRNA tanaman tembakau. Primer Tact-qF menempel pada daerah ekson 3 pada gen aktin, sedangkan primer Tact-qR menempel pada daerah ekson 4, yang menghasilkan amplikon sebesar 360 bp pada DNA dan 227 bp pada cDNA (Gambar 6).



Gambar 6. Situs penempelan pasangan primer Tact-qF dan Tact-qR pada sekuens gen aktin kentang

PEMBAHASAN

Penyisipan gen MmCu/Zn-SOD ke dalam genom tanaman kentang kultivar IPB CP3 telah berhasil dilakukan dengan menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* sebagai perantaranya. Bakteri *A. tumefaciens* yang digunakan mengandung vektor ekspresi biner pGWB5-MmCu/Zn-SOD dengan promotor kuat 35S-CaMV, yang berfungsi untuk meningkatkan ekspresi dari gen MmCu/Zn-SOD yang diintroduksi ke dalam tanaman target (Hannum, 2012). Rekayasa genetika terhadap tanaman dikatakan berhasil jika gen sisipan (transgen) yang terintegrasi dalam genom tanaman tersebut tetap stabil dan dapat diwariskan ke generasi selanjutnya.

Analisis integrasi gen MmCu/Zn-SOD dalam tanaman kentang transgenik diawali dengan mengamplifikasi gen aktin untuk melihat integrasi (keutuhan) dari DNA genom yang telah diisolasi. Gen aktin merupakan gen yang selalu terekspresi secara konstitutif dan keberadaannya selalu ada di dalam genom tanaman (*housekeeping gene*), sehingga gen aktin dapat dijadikan sebagai indikator keutuhan genom. Keberhasilan amplifikasi aktin menunjukkan bahwa DNA genom hasil isolasi dalam keadaan baik. Pada plasmid tidak muncul pita amplikon, yang menunjukkan tidak terjadi kontaminasi pada saat proses preparasi PCR, karena vektor ekspresi tidak membawa gen aktin pada urutan sekuensnya. Amplikon gen 35S-SODR2 berhasil teramplifikasi pada genom tanaman transgenik PSOD6, PSOD9, dan PSOD17, sedangkan pada kontrol negatif yaitu non-transgenik tidak membentuk pita (Gambar 3). Hasil tersebut menunjukkan bahwa gen target MmCuZn-SOD telah tersisipkan pada genom ketiga tanaman transgenik dan tidak terjadi kontaminasi pada saat preparasi PCR.

Reagen TRIzol® merupakan larutan yang terdiri dari senyawa fenol dan guanidin isothiosianat, yang berfungsi menjaga integritas RNA dan melarutkan komponen-komponen sel secara bersamaan (Simms et al., 1993). Pemisahan RNA dan komponen sel dilakukan dengan menambahkan larutan kloroform, yang berfungsi memisahkan larutan non-*aqueous* yang mengandung komponen pengotor dari fase *aqueous* yang mengandung RNA (Green & Sambrook, 2018). RNA dalam fase *aqueous* selanjutnya dipresipitasi dengan menambahkan larutan isopropanol. Kelarutan isopropanol terhadap air lebih tinggi dibandingkan air terhadap asam nukleat, sehingga kelarutan RNA terhadap air menjadi berkurang dan presipitasi lebih mudah dilakukan. Hasil presipitasi dilarutkan dengan menggunakan larutan akuabides yang telah diberi perlakuan dietil pirokarbonat (*DEPC-treated* akuabides). Dietil pirokarbonat (DEPC) berfungsi menghilangkan RNase yang mungkin terkandung di dalam larutan akuabides, sehingga resuspensi pelet RNA dengan menggunakan akuabides yang telah diberi perlakuan DEPC lebih aman dilakukan. Hasil isolasi RNA total dapat dilihat pada Gambar 2. Metode *quantitative Real-Time* PCR menggunakan cDNA yang disintesis dari RNA total sebagai *template* untuk mengukur ekspresi gen target berdasarkan gen referensinya, sehingga kualitas RNA sangat berpengaruh dalam menganalisis ekspresi suatu gen dengan metode qPCR. Integritas RNA yang baik dapat dilihat dari hasil elektroforesis yang menunjukkan adanya pola 2 pita yang jelas (tidak terjadi *smear*), yaitu 28S dan 18S. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya 2 pita yang jelas pada masing-masing sampel, yang menjadi indikasi awal bahwa sampel RNA tidak terdegradasi. Primer Oligo-dT mensintesis cDNA melalui penempelan pada ekor Poli-A yang ada pada mRNA, yang berarti produk cDNA yang dihasilkan spesifik berasal dari mRNA sehingga dapat digunakan untuk menguji ekspresi suatu gen secara akurat dengan melihat jumlah mRNA hasil transkripsi dari gen tersebut.

Perbedaan ukuran amplikon disebabkan adanya intron pada hasil amplifikasi pada DNA genom, sedangkan hasil amplifikasi cDNA tidak mengandung intron (Gambar 6). Hilangnya intron pada cDNA terjadi pada proses pascatranskripsi, dimana terjadi proses pembuangan intron terjadi pada *heterogenous nuclear* RNA (hnRNA), yang merupakan prekursor mRNA (Berk, 2016). Molekul cDNA yang disintesis dari mRNA tidak mengandung intron, sehingga amplikon yang dihasilkan lebih pendek dibandingkan amplikon dari DNA genom. Hasil elektroforesis menunjukkan adanya perbedaan antara aktin DNA genom dan aktin cDNA, menunjukkan bahwa cDNA tidak terkontaminasi DNA genom (Gambar 3).

Analisis ekspresi diawali dengan merubah mRNA menjadi cDNA, lalu selanjutnya dilakukan amplifikasi pada instrumen *Real-time* PCR dengan primer spesifik MmCu/Zn-SOD. Hasil yang

diambil yaitu berupa nilai *Cycle Threshold* (CT), yaitu nilai eksponensial dari jumlah akumulasi fluoresens pada siklus tertentu. Semakin kecil nilai CT, semakin tinggi nilai ekspresi pada sampel, karena semakin cepat instrumen mendeteksi amplifikasi berdasarkan akumulasi sinyal fluoresens. Perhitungan analisis ekspresi gen dilakukan dengan menggunakan metode perhitungan $2^{-\Delta\Delta CT}$. Ekspresi gen tertinggi diperoleh pada klon P3SOD9 dan yang terendah adalah P3SOD17. Perbedaan ekspresi gen MmCu/Zn-SOD pada klon tanaman transgenik dapat disebabkan oleh perbedaan posisi penyisipan gen pada daerah tertentu pada genom (Dong et al., 2008) pada saat proses penyisipan T-DNA yang dilakukan bakteri *A. tumefaciens* secara acak pada genom tanaman. Penyisipan T-DNA pada daerah genom dengan struktur eukromatin lebih banyak terekspresi dibandingkan dengan daerah genom dengan struktur heterokromatin, karena struktur eukromatin memiliki kerapatan yang lebih rendah jika dibandingkan dengan struktur heterokromatin, sehingga faktor ekspresi serta protein yang berkaitan dengan proses transkripsi akan lebih mudah untuk mengakses DNA yang berada pada struktur tersebut, menghasilkan ekspresi yang lebih banyak (Springer et al., 2016). Selain itu, perbedaan tingkat ekspresi juga dapat disebabkan karena jumlah salinan gen yang tersisipkan berbeda. Jumlah salinan gen yang lebih banyak, akan memberikan tingkat ekspresi gen yang lebih tinggi. Hal ini masih memerlukan pembuktian lebih lanjut.

Ketahanan tanaman transgenik terhadap cekaman herbisida parakuat berbanding lurus dengan tingkat ekspresi gen MmCu/Zn-SOD. Herbisida parakuat merupakan herbisida tipe kontak yang dapat mematikan gulma dalam waktu singkat. Parakuat dapat terserap dengan cepat ke dalam sel tanaman dan menyebabkan kerusakan pada sel tanaman dengan cara menerima elektron dari *Photosystem I* (PS I) (Qian et al., 2009), menghalangi terbentuknya NaDPH (Ananieva et al., 2004), lalu menginduksi terbentuknya *Reactive Oxygen Spesies* (ROS) (Bonneh-Barkay et al., 2005). Secara umum, enzim SOD berperan dalam sistem pertahanan tanaman terhadap cekaman oksidatif yang menghasilkan ROS. Enzim SOD mengkatalisis senyawa ROS menjadi H₂O₂ dan O₂ pada semua bagian subseluler sel tanaman. Selanjutnya, enzim katalase (CAT) dan enzim askorbat peroksidase (APX) melakukan dismutasi terhadap senyawa H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂ (Anjum et al., 2014). Mekanisme ini yang menyebabkan tanaman transgenik menunjukkan ketahanan terhadap pemberian parakuat.

SIMPULAN DAN SARAN

Gen MmCu/Zn-SOD terintegrasi dengan stabil pada genom tanaman transgenik kultivar IPB CP3. Klon P3SOD9 mempunyai ekspresi gen MmCu/Zn-SOD tertinggi, lalu diikuti oleh P3SOD6 dan P3SOD17. Semakin tinggi ekspresi gen MmCu/Zn-SOD, maka ketahanan tanaman transgenik terhadap herbisida parakuat semakin baik. Tanaman transgenik yang diintroduksi oleh gen MmCu/Zn-SOD sangat berpotensi dalam menghadapi cekaman herbisida parakuat, sehingga diperlukan pengujian cekaman parakuat lebih lanjut di lapangan pada generasi G1, G2, dan G3. Analisis kestabilan gen MmCu/Zn-SOD juga perlu dilakukan pada beberapa generasi. Analisis integrasi transgen menggunakan metode *southern blot* juga perlu dilakukan untuk mengetahui jumlah salinan transgen yang terintegrasi di dalam genom kentang transgenik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) Institut Pertanian Bogor, Laboratorium Biotechnology Research Indonesia-the Netherland (BIORIN) dan Laboratorium Terpadu Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

- Ananieva, E. A., Christov, K. N., & Popova, L. P. (2004). Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. *Journal of Plant Physiology*, 161(3), 319-328.
- Anjum, N. A., Gill, S. S., Gill, R., Hasanuzzaman, M., Duarte, A. C., Pereira, E., ... Tuteja, N. (2014). Metal/metalloid stress tolerance in plants: role of ascorbate, its redox couple, and associated enzymes. *Protoplasma*, 251(6), 1265-1283.

- Badan Pusat Statistik. (2021). *Statistik tanaman sayuran dan buah-buahan semusim Indonesia*. Jakarta: BPS.
- Basu, U., Good, A., & Taylor, G. (2001). Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminium-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminium. *Plant, Cell & Environment*, 24(12), 1278-1269.
- Berk, A. J. (2016). Discovery of RNA splicing and genes in pieces. *Proceeding of the National Academy of Science*, 113(4), 801-805.
- Bonneh-Barkay, D., Reaney, S. H., Langston, W. J., & Di Monte, D. A. (2005). Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures. *Molecular Brain Research*, 134(1), 52-56.
- Che, Y., Zhang, N., Zhu, X., Li, S., & Wang, S., Si, H. (2020). Enhanced tolerance of the transgenic potato plants overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase to low temperature. *Scientia Horticulturae*, 261, 108949.
- Dong, S., Shew, D. H., Tredway, L. P., Lu, J., Sivamani, E., Miller, E. S., & Qu, R. (2008). Expression of the bacteriophage T4 lysozyme gene in tall fescue confers to gray leaf spot and brown patch disease. *Transgenic Research*, 17, 47-57.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). A single-step method for the simultaneous preparation of DNA, RNA, and protein from cells and tissues. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(1), 64-67
- Hannum, S. (2012). Isolasi, pengklonan, dan analisis ekspresi gen penyandi *copper/zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD)* dari *Melastoma malabathricum* L. (Disertasi doctoral). Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat, Indonesia
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- McKersie, B. D., Bowley, S. R., Harjanto, E., & Leprince, O. (1996). Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 111(4), 1177-1181.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.
- Puteri, M. P. (2022). Perakitan tanaman kentang transgenik kultivar IPB CP3 dengan gen MmCu/Zn SOD (Tesis master). Institut Pertanian Bogor, Jawa Barat, Indonesia
- Qian, H., Chen, W., Sun, L., Jin, Y., Liu, W., & Fu, Z. (2009). Inhibitory effects of paraquat on photosynthesis and the response to oxidative stress in *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology*, 18(5), 537-543.
- Radwan, D. E. M., Fayez, K. A., Mahmoud, S. Y., & Lu, G. (2010). Modifications of antioxidant activity and protein composition of bean leaf due to Bean yellow mosaic virus infection and salicylic acid treatments. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(5), 891-904.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botani*, 7(12),1-26.
- Simms, D., Cizdziel, P. E., & Chomczynski, P. (1993). TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*, 15(4), 532-535.
- Springer, M. N., Lisch, D., & Li, Q. (2016). Creating order from chaos: Epigenome dynamics in plants with complex genomes. *The Plant Cell*, 28, 314-325
- Suharsono. (2002). Konstruksi pustaka genom kedelai kultivar slamet. *Hayati*, 9(3), 67-70.