

## RESPON ENZIM METABOLISME SENYAWA NITROGEN PADA TANAMAN TEMBAKAU TRANSGENIK YANG MEMBAWA GEN SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE (SPS) TEBU (*Saccharum officinarum* L.)

Miswar

Fakultas Pertanian Universitas Jember

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Jember kode pos 68121

E-mail : miswar.faperta@unej.ac.id

### ABSTRAK

Senyawa nitrogen (N) bagi semua tanaman sangat diperlukan untuk pertumbuhan dan produksi, termasuk tanaman tembakau. Metabolisme senyawa N dalam tanaman sangat terkait dengan metabolisme karbohidrat. Proses fotosintesis yang terjadi di daun menyediakan energi untuk proses asimilasi karbon (C) dan Nitrogen (N). Dalam asimilasi N selain memerlukan energi, juga memerlukan kerangka C yang disediakan oleh metabolisme karbohidrat, termasuk sukrosa. Sintesis sukrosa di daun sangat ditentukan oleh besarnya aktivitas enzim sucrose phosphate synthase (SPS). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh transformasi gen SPS pada tanaman tembakau terhadap metabolisme senyawa N. Proses transformasi gen SPS yang telah dikonstruksi pada plasmid pBI121 menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. Hasil penelitian menunjukkan bahwa transformasi gen SPS mempengaruhi aktivitas enzim nitrat reduktase (NR) dan glutamine synthetase (GS). Aktivitas NR dan kandungan nitrat pada tembakau transgenik galur 3, 13 dan 17 lebih rendah dibandingkan kontrol. Sebaliknya aktivitas GS pada ketiga tembakau transgenik lebih besar dibandingkan kontrol.

**Kata kunci :** SPS, Nitrogen, GS, NR, Transformasi.

### PENDAHULUAN

Nitrogen (N) sering kali menjadi faktor pembatas utama terhadap pertumbuhan dan produksi tanaman (Elser *et al.*, 2007). Tanaman menyerap unsur N dari tanah melalui akar dalam bentuk nitrat dan amonium. Selain unsur N, tanaman juga memerlukan unsur Karbon (C) yang didapat melalui fotosintesis. Proses fotosintesis tidak hanya menyediakan sumber energi dan senyawa karbon untuk sintesis karbohidrat, tetapi juga untuk sintesis asam amino (Sahrawy *et al.*, 2004). Koordinasi antara metabolisme N dan C sangat penting, karena dalam asimilasi N diperlukan kerangka C dalam bentuk 2-oxoglutarate, ATP dan reduktan (Lancien *et al.*, 2000). Keberadaan metabolit seperti sukrosa dan asam amino berperan penting untuk pengaturan enzim yang terlibat dalam asimilasi N (Sheen, 1990; Foyer *et al.*, 2002).

Dalam asimilasi senyawa N, nitrate reductase (NR) dan glutamine synthetase (GS) menjadi kunci utama (Sahrawy *et al.*, 2004). Enzim GS mengkatalisis asimilasi amonium menjadi glutamine, sedangkan NR mengkatalisis reduksi nitrat menjadi nitrit. Hasil beberapa penelitian terhadap regulasi NR menunjukkan bahwa aktivitas NR diinduksi oleh  $\text{NO}_3$ , cahaya, sukrosa dan glukosa, tetapi dihambat oleh glutamine (Morcuende *et al.*, 1998; Vincentz *et al.*, 1993). Menurut Sahrawy *et al.* (2004) terjadinya peningkatan sintesis sukrosa akan menginduksi aktivitas GS.

### METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan pada tahun 2010 di Laboratorium Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Jember. Dalam penelitian ini digunakan tanaman tembakau transgenik yang membawa gen SPS tebu galur 3, 13, 17 dan kontrol yang ditanam di media tanah dalam polibag. Umur 2 bulan setelah tanaman, dilakukan sampling daun untuk dianalisis. Satu setengah gram daun tembakau yang telah dibekukan dengan nitrogen cair digerus sampai menjadi tepung, lalu ditambah dengan 10% polyvinylpyrrolidone. Tepung disuspensikan dengan bufer ekstraksi dengan komposisi 50 mM Mops-NaOH pH 7,5; 5 mM NaF; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 5 mM EDTA dan 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Suspensi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1200 rpm, 4°C, ekstrak enzim NR dalam supernatan diambil dan disimpan pada suhu -80°C sampai dianalisis.



Aktivitas Nitrat reduktase ditentukan berdasarkan jumlah nitrit yang terbentuk selama reaksi menggunakan metode Cramer *et al.* (1996). 200  $\mu\text{L}$  ekstrak NR dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah dengan 500  $\mu\text{L}$  0,1 M kalium fosfat, 200  $\mu\text{L}$  0,1 M  $\text{KNO}_3$  dan 100  $\mu\text{L}$  4 mM NADH. Campuran dihomogenkan dengan vortek, lalu di inkubasi pada suhu  $30^\circ\text{C}$  dalam *waterbath* selama 0, 10 dan 20 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 mL 1% Sulfanilamide dan 1 mL 0,2% NED. Intesitas warna diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Jumlah nitrit yang terbentuk dihitung dengan menggunakan kurva standar.

Satu setengah gram daun tembakau yang telah dibekukan dengan nitrogen cair digerus sampai menjadi tepung, lalu ditambahkan 10% polyvinylpolypyrrolidone. Tepung disuspensikan dengan bufer ekstraksi yang terdiri dari 25 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM EDTA dan 14 mM  $\beta$ -mercaptoethanol. Suspensi kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1200 rpm  $4^\circ\text{C}$ , ekstrak enzim GS dalam supernatan diambil dan disimpan pada suhu  $-80^\circ\text{C}$  sampai dianalisis.

Aktivitas GS ditentukan berdasarkan terbentuknya fosfat anorganik selama reaksi sesuai dengan metode dari Srivastava and Dwivedi (2002). 200  $\mu\text{L}$  ekstrak enzim dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambah dengan larutan substrat. Larutan substrat terdiri dari 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5); 0,05 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,02 M ATP; 0,05 M  $\text{MgCl}_2$ ; dan 0,1 M Glutamat. Campuran dihomogenkan, lalu diinkubasikan pada suhu  $30^\circ\text{C}$  selama 0, 10 dan 20 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml larutan pewarna, kemudian diinkubasikan pada suhu  $50^\circ\text{C}$  selama 20 menit. Hasil reaksi disentrifugasi pada kecepatan 12000 rpm pada suhu ruang selama 10 menit. Supernatan diambil dan optical density diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 690 nm.

Daun sebanyak 1,5 g dibekukan dengan nitrogen cair, lalu digerus sampai menjadi tepung. Tepung disuspensikan dengan akuades bebas ion sebanyak 7,5 ml, lalu dimasukkan ke dalam tabung. Tabung dipanaskan pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 10 menit, setelah dingin disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm, suhu ruang, supernatan diambil. Proses ekstraksi diulangi sampai 5 kali, supernatan dikumpulkan jadi satu.

Kandungan sukrosa ditentukan menggunakan metode resorcinol. 50  $\mu\text{L}$  ekstrak sampel dan 70  $\mu\text{L}$  0,5 N NaOH dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu direbus selama 10 menit. Setelah dingin ditambahkan 250  $\mu\text{L}$  reagen resorcinol dan 750  $\mu\text{L}$  30% HCl, lalu diinkubasi pada suhu  $80^\circ\text{C}$  selama 8 menit. Setelah dingin intensitas warna diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Kandungan sukrosa dihitung dengan menggunakan kurva standar sukrosa.

Sampel daun sebanyak 1 gram dibekukan dengan nitrogen cair, lalu digerus sampai menjadi tepung, lalu disuspensikan dengan etanol 80%. Suspensi dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan diinkubasi pada suhu  $80^\circ\text{C}$  selama 10 menit. Setelah dingin lalu disentrifugasi pada kec. 5000 rpm, lalu supernatant diambil. Proses ekstraksi diulang sebanyak 5 kali, lalu supernatant dijadikan satu untuk dianalisis kandungan nitrit dan ammonium.

Kandungan nitrit ditentukan sebagai berikut : 400  $\mu\text{L}$  ekstrak, 100  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 500  $\mu\text{L}$  1% sulfanilamide dan 500  $\mu\text{L}$  0,02 NED dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dihomogenkan. Campuran larutan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, lalu diukur intensitas warna yang terbentuk dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Kandungan nitrit dihitung dengan menggunakan kurva standar nitrit.

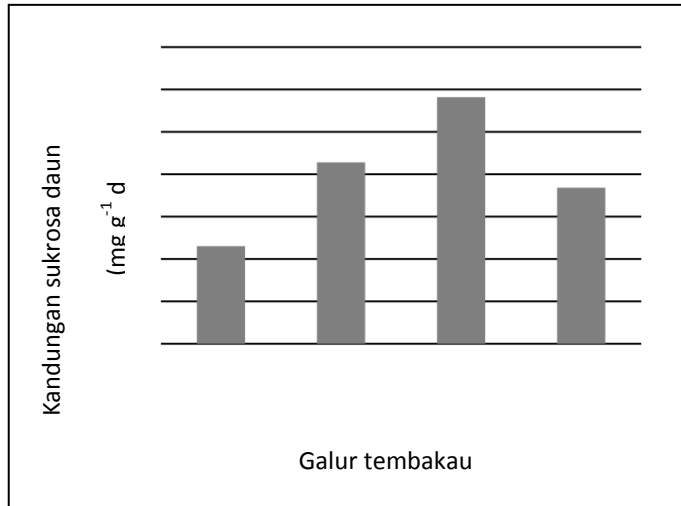
Kandungan ammonium ditentukan dengan menggunakan cawan Conway. Setelah direaksikan pada cawan Conway selama 3 jam pada suhu ruang, lalu ditambah dengan reagen nessler. Intesitas warna yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Kandungan ammonium dihitung dengan menggunakan kurva standar ammonium.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Kandungan Sukrosa

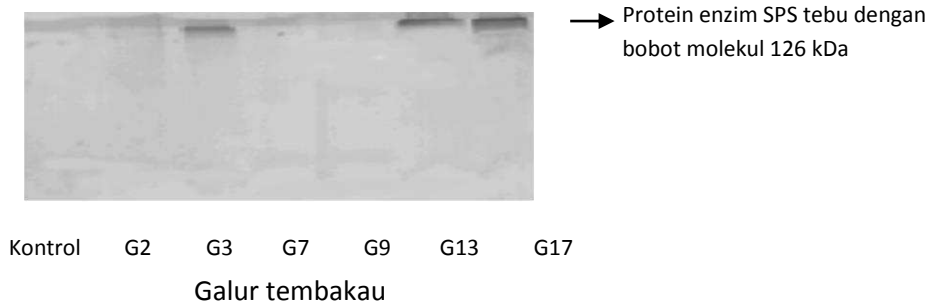
Sukrosa sebagai salah satu hasil akhir dari fotosintesis mempunyai peranan yang sangat penting dalam metabolisme tanaman. Peningkatan jumlah sukrosa melalui transformasi gen SPS tebu, tentu akan mempengaruhi metabolisme senyawa lain, khususnya senyawa yang mengandung N. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan sukrosa tembakau transgenik yang membawa gen SPS tebu lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol, seperti tampak pada Gambar 1.





Gambar 1. Kandungan sukrosa daun tanaman tembakau transgenik (G3,13 dan 17 : tembakau transgenik galur 3, 13 dan 17)

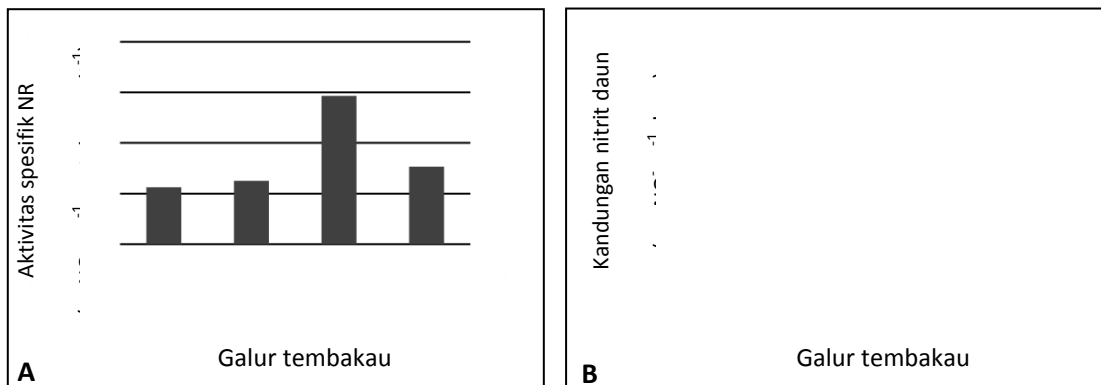
Pada Gambar 1 terlihat bahwa kandungan sukrosa pada ketiga tembakau transgenik lebih tinggi dibandingkan tembakau kontrol (non transgenik), tertinggi pada galur13. Meningkatnya jumlah enzim SPS pada tembakau transgenik, seperti terlihat pada Gambar 2, menyebabkan kemampuan tembakau untuk mensintesis sukrosa juga meningkat.



Gambar 2. Hasil analisis *western blot* protein enzim SPS pada tembakau transgenik

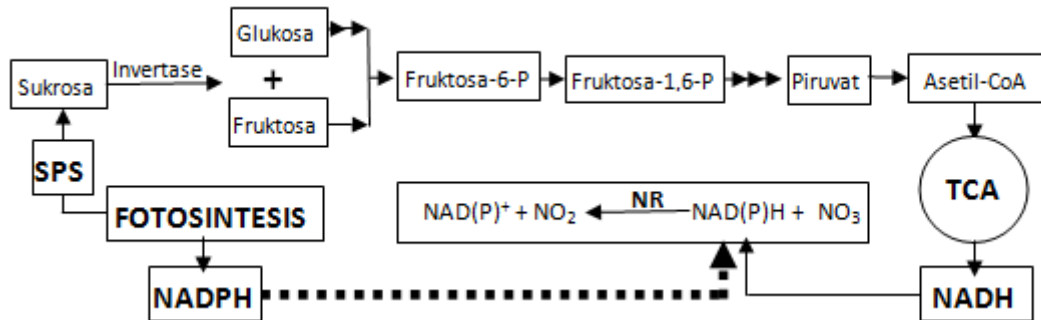
## 2. Aktivitas Nitrat Reduktase (NR)

Nitrat reduktase merupakan enzim yang berperan dalam metabolisme unsur N dalam tanaman yaitu mereduksi nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) menjadi nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ). Hasil analisis menunjukkan bahwa aktivitas spesifik NR pada ketiga tembakau transgenik lebih besar dibandingkan tembakau kontrol, seperti terlihat pada gambar 3a. Tingginya aktivitas spesifik NR menghasilkan nitrit daun yang tinggi pula, seperti tampak pada gambar 3b.



Gambar 3. Aktivitas spesifik NR (A) dan kandungan nitrit (B) daun tembakau transgenik

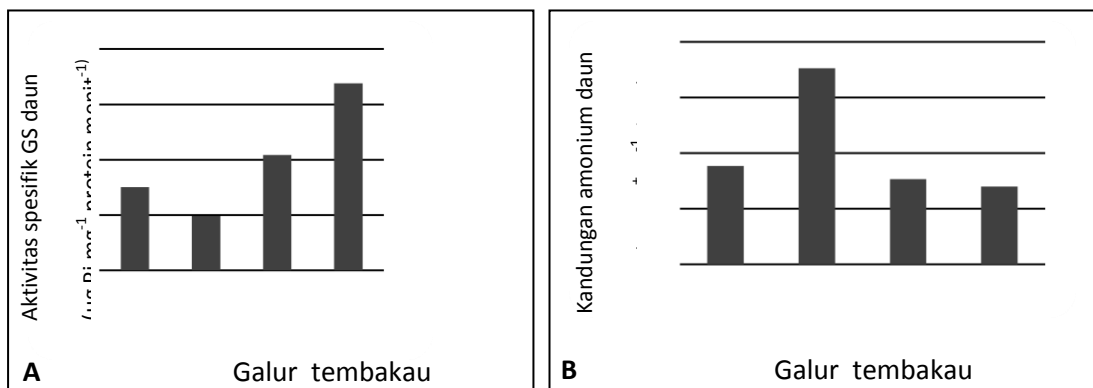
Dalam proses reduksi nitrat menjadi nitrit yang dikatalisis oleh nitrate reduktase (NR) diperlukan energi berupa NADH/NADPH yang dapat berasal dari siklus krebs atau fotosintesis, dalam hal ini pembentukan dan penggunaan sukrosa sebagai substrat, seperti tampak pada Gambar 4. Pada Gambar 4 terlihat dengan jelas bagaimana hubungan metabolisme C (fotosintesis) dengan metabolisme N yang dikatalisis oleh nitrate reduktase (NR). Semakin banyak ketersediaan sukrosa, maka sebanyak pula ketersediaan energi (NADH/NADPH) untuk reduksi nitrat.



Gambar 4. Hubungan antara fotosintesis dengan metabolisme nitrat dalam tanaman

### 3. Aktivitas Glutamine synthetase (GS)

Hasil aktivitas enzim NR berupa nitrit bersifat toksik, sehingga harus segera diubah menjadi amonium. Demikian pula halnya dengan amonium, juga bersifat toksik, maka segera diubah menjadi glutamine yang dikatalisis oleh GS. Hasil analisis menunjukkan bahwa tanaman tembakau transgenik yang membawa gen SPS tebu cenderung mempunyai aktivitas GS lebih tinggi dibandingkn kontrol. Diantara tembakau transgenik, tembakau galur 17 (G17) mempunyai aktivitas tertinggi, seperti terlihat pada Gamabr 5a.



Gambar 5. Aktivitas spesifik GS (A) dan kandungan amonium daun tembakau transgenik.

Seiring dengan tingginya aktivitas GS pada galur 17, maka semakin banyak jumlah amonium yang dikondensasikan dengan glutamat menjadi glutamin, sehingga jumlah amonium dalam daun menjadi lebih rendah (Gambar 5b). Namun tingginya aktivitas GS tidak terkait langsung dengan tingginya kandungan sukrosa. Hal ini bertentangan dengan pendapat Sahrawy *et al.* (2004).

### KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan kandungan sukrosa pada tanaman tembakau transgenik yang membawa gen SPS tebu menginduksi aktivitas nitrat reduksi (NR), tetapi tidak secara langsung menginduksi aktivitas glutamin synthetase. Untuk lebih memperjelas peran sukrosa terhadap aktivitas enzim yang terlibat dalam asimilasi senyawa N (NR dan GS), perlu diteliti pemberian sukrosa dari luar melalui daun dan diamati macam metabolit yang terlibat.



## DAFTAR PUSTAKA

- Cramer, M. D, Savidov, N. A. and Lips, S. H. 1996. The influence of enriched rhizosphere CO<sub>2</sub> on N uptake and metabolism in wild type and N-deficient barley plants. *Physiol. Plant.* 97: 47-54
- Elser, J. J., Bracken, M. E. S., Cleland, E. E., Gruner, D. S., Harpole, W. S., Hillebrand, H., Ngai, J. T., Seabloom, E. W., Shurin, J. B., and Smith, J. E. 2007 Global analysis of nitrogen and phosphorus limitation of primary producers in freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Ecol. Lett.* 10 : 1135–1142,
- Foyer C.H, Parry, M and Noctor, G. 2003. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54 : 585-593
- Lancien M, Gadal P, Hodges M. 2000. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiology* 123, 817–824.
- Sahrawy,M., A´vila,C., Ana-Chueca, Ca´novas, F.M., and George,J.L. 2004. Increased sucrose level and altered nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants expressing antisense chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase. *Journal of Experimental Botany*, 55 :. 2495–2503
- Morcuende R, Krapp A, Stitt M. 1998. Sucrose-feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased rates of a-oxoglutarate synthesis and increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta* 206, 394–409
- Sheen JY. 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell* 2, 1027–1038.
- Srivastava S. And Dwivedi, U.N. 2003. Modulation of key nitrogen assimilation enzymes by NAA and in-vitro culture in *Cuscuta reflexa*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41 : 65-71
- Vincentz M, Moureaux T, Leydecker MT, Vaucheret H, Caboche M. 1993. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *The Plant Journal* 3, 315–324

## DISKUSI

**Penanya 1 : Eko S**

**Pertanyaan :**

Apa ciri khusus tanaman transgenik?

**Jawaban :**

Secara morfologi tidak ada, untuk mengetahuinya harus dianalisis secara laboratoris.

**Penanya 2**

**Pertanyaan :**

Mengapa menggunakan transformasi plasmid PBS 1-21?

**Jawaban :**

Karena paling mudah mendapatkannya

**Penanya 3**

**Pertanyaan :**

Apa kultivar tembakau yang digunakan?

**Jawaban :**

Tembakau naus, kasturi.

