

Isolasi dan karakterisasi gen dehidrin dari tebu (*Saccharum officinarum*L.) yang terlibat dalam respon toleransi cekaman kekeringan

Isolation and characterization of dehydrin gene from sugarcane (Saccharum officinarum L.) involved in drought tolerance response

Hayati MINARSIH^{1*)}, Sony SUHANDONO²⁾, FANIAR²⁾, Tati KRISTIANTI²⁾, Dian M AMANAH¹⁾ & SUSTIPRIJATNO³⁾

¹⁾Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No 1, Bogor 16128, Indonesia

²⁾Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung, Jalan Ganeca No. 10 Bandung 40132, Indonesia

³⁾Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 3A, Bogor 16111, Indonesia

Diterima tanggal 14 Maret 2018/Disetujui tanggal 4 Oktober 2018

Abstract

Nowadays, the development of molecular biology techniques has enabled to engineer drought tolerant sugarcane to accelerate the breeding program. Dehydrin (DHN) that belong to the group II late embryogenesis abundant (LEA) family is known to have an important role in plant response and adaptation to abiotic stresses (drought, high salinity, cold, heat, etc.). Literature study and bioinformatics analysis reported that DHN1 gene on sugarcane showed high homology sequences with sorghum DHN. The expression of DHN1 gene on sugarcane var. PSJT 941 treated with various period of drought stress had been conducted using semi-quantitative reverse transcriptase (RT)-PCR method. The results showed that the expression level of DHN1 gene increased along with the increased period of the treatment. The highest expression level of DHN1 gene was resulted from plants that had been subjected to drought for 25 days. Amplification of DHN1 gene from plants with the highest gene expression, resulted an amplicon with a size of 465 bp which represents a full length coding sequence (CDS) of DHN1. Identification using Blast analysis showed that DHN1 sequences from sugarcane var. PSJT 941 shared high homology with DHN gene on sugarcane and sorghum. The alignment results also revealed a conserved motif that characterized DHN genes.

[Key words: drought stress, dehydrin, DHN1 gene, sugarcane]

Abstrak

Dengan berkembangnya teknik biologi molekuler saat ini, maka perakitan tanaman tebu yang toleran kekeringan lebih diarahkan melalui

teknik rekayasa genetika untuk mempercepat program pemuliaan tanaman. Protein dehidrin (DHN) yang termasuk ke dalam kelompok II famili LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) diketahui berperan penting dalam respon dan adaptasi tanaman terhadap cekaman abiotik (kekeringan, salinitas tinggi, suhu dingin, panas, dll). Studi literatur dan analisis bioinformatika menunjukkan bahwa gen DHN1 pada tanaman tebu memiliki homologi yang tinggi dengan gen DHN pada sorghum. Analisis ekspresi gen DHN1 pada tanaman tebu varietas PSJT 941 yang diberi cekaman kekeringan telah dilakukan menggunakan semi-kuantitatif reverse transcriptase (RT)-PCR dan terlihat bahwa ekspresi gen DHN1 meningkat secara nyata sejalan dengan semakin lamanya waktu pemberian cekaman. Tingkat ekspresi gen DHN1 paling tinggi diperoleh dari tanaman yang mengalami cekaman kekeringan selama 25 hari. Amplifikasi gen DHN1 pada tanaman dengan tingkat ekspresi yang paling tinggi menunjukkan pita dengan ukuran 465 bp yang merepresentasikan *full coding sequence* (CDS) gen DHN1. Identifikasi menggunakan analisis Blast menunjukkan bahwa sekuen gen DHN1 dari tanaman tebu varietas PSJT 941 yang diperoleh memiliki homologi yang tinggi dengan gen DHN pada tanaman tebu dan sorghum. Hasil penjajaran sekuen protein juga menunjukkan adanya motif lestari yang mencirikan gen DHN.

[Kata kunci: cekaman kekeringan, dehidrin, gen DHN1, tebu]

Pendahuluan

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan utama di Indonesia, penghasil gula yang menjadi salah satu kebutuhan pangan dasar. Peningkatan produk-

tivitas tebu saat ini dilakukan, salah satunya dengan ekstensifikasi ke lahan-lahan marjinal. Lahan marjinal didefinisikan sebagai lahan yang memiliki potensi ekonomi yang rendah bahkan sangat rendah untuk dimanfaatkan sebagai lahan pertanian. Lahan marjinal dapat dicirikan dengan lahan atau tanah yang miskin unsur hara, ketersediaan air yang sedikit, curah hujan terbatas, adanya kandungan logam berat dan atau salinitas tinggi (Kang *et al.*, 2013). Untuk itu diperlukan varietas atau klon-klon tanaman yang mampu beradaptasi terhadap kondisi tersebut seperti tahan atau toleran terhadap kekeringan, salinitas tinggi ataupun kandungan logam berat.

Menurut Andrade *et al.* (2014), kekeringan merupakan salah satu faktor pembatas utama yang sangat berpengaruh terhadap produktivitas tebu. Program pemuliaan tebu di hampir setiap negara saat ini diarahkan untuk menghasilkan varietas tebu yang toleran terhadap kondisi kekeringan. Salah satu cara dalam program pemuliaan adalah melalui rekayasa genetik yang terbukti manfaatnya dalam memperbaiki sifat tanaman (Lakshmanan & Robinson, 2014). Dengan demikian studi gen yang berperan penting dalam meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan, perlu dilakukan.

Pada kondisi cekaman osmotik, tanaman dapat menunjukkan respon yang berbeda yang dimulai dengan pengenalan reseptor pada membran plasma, diikuti dengan penyebaran sinyal dari satu sel ke sel lainnya di seluruh bagian tanaman (Mahajan & Tuteja, 2005). Hal tersebut memicu ekspresi gen-gen yang berperan dalam cekaman osmotik dan dapat mempengaruhi metabolisme dan perkembangan tanaman (Osakabe *et al.*, 2014). Secara molekuler, respon tanaman terhadap cekaman kekeringan atau cekaman osmotik bervariasi di antaranya adalah mengakumulasi senyawa osmoprotektan dan protein yang berasosiasi dengan toleransi kekeringan (Osakabe *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2017). Saat ini, sejumlah gen tanaman yang diketahui terinduksi oleh cekaman osmotik telah diidentifikasi dan dikarakterisasi. Fungsi gen-gen tersebut telah diuji dengan analisis ekspresi dan dengan manipulasi gen melalui tanaman transgenik untuk mempelajari peranannya dalam mekanisme toleransi terhadap cekaman (Ferreira *et al.*, 2017).

Famili gen yang mengkode protein dan berperan dalam respon terhadap cekaman osmotik meliputi gen-gen yang berperan dalam biosintesis poliamin, asam amino, gula dan poliols, protein chaperone dan regulator transkripsi (Ferreira *et al.*, 2017). Protein chaperone seperti Hsp (*heat shock protein*), dehidrin dan kelompok LEA (*late embryogenesis abundant*) lainnya diketahui sangat terinduksi oleh adanya cekaman kekeringan (Ingram & Bartels, 1996; Hanin *et al.*, 2011). Jenis protein ini

umumnya berada di sitoplasma dan berperan melindungi protein serta struktur membran dari degradasi dan pengaruh proteinase, memelihara status air dalam sel, serta berperan dalam proses protein folding pada sintesis protein (Ingram & Bartels, 1996;). Kondisi lingkungan yang tidak sesuai sering mengakibatkan timbulnya cekaman oksidatif dan terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) pada tanaman. Protein LEA dapat mereduksi hal tersebut dengan mengikat senyawa ROS. Selain itu, dilaporkan juga bahwa protein LEA berperan dalam ketahanan terhadap logam berat seperti Cadmium (Cd) dan nikel (Cu) (Gao *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012).

Berdasarkan beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap respon kekeringan, gen dehidrin (*DHN*) teridentifikasi sebagai salah satu gen penting yang berhubungan dengan cekaman kekeringan dan terkait dalam pemeliharaan turgor sel (Andrade *et al.*, 2014). Menurut Harb *et al.* (2010), mekanisme toleransi tumbuhan terhadap kekeringan ditandai dengan kemampuan tumbuhan untuk mempertahankan turgor sel dan mengurangi penguapan air melalui akumulasi zat terlarut yang kompatibel. Dehidrin (*DHN*) termasuk dalam kelompok II protein LEA yang berperan penting dalam respon dan adaptasi tanaman terhadap cekaman abiotik (kekeringan, salinitas tinggi, suhu dingin, panas, dan lain-lain) (Gao & Lan, 2015). Pada saat jaringan tanaman mengalami cekaman kekeringan (dehidrasi), protein *DHN* dapat terakumulasi dalam jumlah yang tinggi diseluruh jaringan baik vegetatif maupun generatif (Hanin *et al.*, 2011).

Gen *DHN* telah banyak diteliti di beberapa tanaman seperti pada *Arabidopsis thaliana*, kedelai, gandum, sorghum dan anggur (Brini *et al.*, 2007; Hanin *et al.*, 2011, Savitri *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012). Akan tetapi penelitian gen *DHN* pada level molekuler pada tanaman tebu belum banyak dilaporkan. Penelitian sebelumnya menunjukkan adanya peningkatan ekspresi gen *DHN* yang sangat tinggi pada jaringan batang tebu yang diberi cekaman kekeringan selama 15 hari (Iskandar *et al.*, 2011). Hal tersebut menarik karena ternyata ekspresi gen *DHN* di bawah cekaman kekeringan jauh lebih tinggi dibandingkan dengan beberapa gen yang terinduksi oleh stres (*stress-inducible*) lainnya seperti gen-gen yang berperan dalam biosintesis prolin. Overekspresi gen *DHN* pada *A. thaliana* dan tembakau transgenik telah terbukti meningkatkan toleransi terhadap cekaman osmotik dan salinitas tinggi (Hanin *et al.*, 2011). Beberapa famili gen *DHN* ternyata juga berperan dalam meningkatkan toleransi terhadap cekaman biotik seperti *DHN-5* yang mempengaruhi proses signaling asam jasmonat (JA) dan dapat mengaktivasi protein PR (*pathogenesis related*) (Hanin *et al.*, 2011). Tujuan

penelitian ini adalah untuk melakukan isolasi dan karakterisasi gen *DHNI* dari tanaman tebu varietas PSJT 941 yang sangat berpotensi untuk dapat digunakan baik sebagai penanda molekuler maupun untuk perbaikan tanaman tebu toleran cekaman kekeringan.

Bahan dan Metode

Bahan tanam

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia Jl. Taman Kencana No. 1 Bogor dan di Laboratorium Genetika Molekuler SITH-ITB Bandung. Bahan yang digunakan untuk isolasi gen *DHNI* adalah daun tebu varietas PSJT 941 hasil kultur jaringan berumur ± 7 bulan yang merupakan varietas bina Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia (P3GI), Pasuruan.

Perlakuan cekaman kekeringan

Tanaman tebu diseleksi terlebih dahulu dengan kriteria tidak berbuku, tinggi seragam dan tunggal (tidak memiliki anakan). Selanjutnya, tanaman tebu terpilih ditanam dalam *polybag* berukuran 2 kg dengan media tanam berisi tanah, pasir, dan pupuk kandang dengan perbandingan 3:1:1 (v/v/v). Selama satu minggu, tanaman tebu diadaptasikan dalam rumah kaca dengan penyiraman setiap hari. Perlakuan cekaman kekeringan dilakukan dengan memberhentikan penyiraman selama 0, 4, 8, 12, 16, 20 dan 25 hari. Sementara itu untuk perlakuan kontrol, penyiraman dilakukan dengan interval dua hari. Pada hari ke- 0, 4, 8, 12, 16, 20 dan 25 dilakukan pengambilan sampel daun untuk pengukuran persentase *relative water content* (RWC). Perlakuan diulang sebanyak tiga kali, masing-masing ulangan terdiri dari tiga tanaman tebu. Perhitungan RWC dilakukan dengan mengacu pada metode *relative turgidity* (Barrs & Weatherley, 1962). Sebanyak $\pm 0,05$ gram sampel daun segar (FM) tanpa tulang, direndam dalam cawan petri yang berisi air selama empat jam, kemudian ditimbang berat turgid daun (TM). Selanjutnya, daun dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama tiga sampai lima hari dan ditimbang berat keringnya (DM). Persentase RWC dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ RWC} = \frac{(FM-DM)}{(TM-DM)} \times 100$$

Data yang diperoleh dirata-ratakan untuk diolah dengan analisis keragaman (*analysis of variance* = ANOVA) menggunakan program DASTAAT. Apabila terdapat perbedaan faktor perlakuan yang

nyata, maka perbedaan antar perlakuan diuji dengan uji jarak berganda Duncan's Multiple Range Test (DMRT) dengan tingkat kepercayaan $\alpha \leq 0,05$.

Isolasi RNA total

Isolasi RNA total dilakukan menggunakan *Total RNA Isolation Kit (plant)* (Geneaid, Taiwan). Sampel daun tebu dari perlakuan cekaman kekeringan digerus hingga halus. Sebanyak 200 mg sampel yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam *microtube* 1,5 mL ditambahkan buffer ekstraksi (*RB buffer*) dan β -merkaptoetanol sebanyak 5 μ L, kemudian dipindahkan ke dalam *filtration column* dan disentrifuse dengan kecepatan 3000g selama lima menit. Supernatan yang dihasilkan dipindahkan ke dalam *binding column* dan ditambahkan larutan *binding buffer*. Setelah disentrifuse dengan kecepatan 12000g selama satu menit, supernatan dibuang kemudian ditambahkan *wash buffer* (mengandung etanol) sebanyak 500 μ L dan disentrifuse 12000g selama satu menit. Supernatan dibuang dan pellet RNA disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12000g selama tiga menit. RNA total pada *binding column* kemudian dielusi dengan de-ion DEPC atau *RNAse-free water*. RNA total yang telah dihasilkan, diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer.

Hasil isolasi RNA total dimurnikan dimurnikan dari kontaminan DNA dengan menambahkan DNase. Sebanyak 1000 ng RNA total ditambahkan ke dalam larutan yang mengandung 10X buffer DNase, 1 unit DNase dan air bebas ion dan nuclease (*de-ion nuclease free water*) hingga volume total mencapai 10 μ L. Campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan EDTA sebanyak 1 μ L dan diinkubasi kembali pada suhu 60°C selama 10 menit. Kuantitas RNA ditetapkan secara spektrofotometri pada panjang gelombang (λ) 260 nm, sedangkan kualitasnya ditetapkan berdasarkan rasio $A_{260}/_{280}$ dan rasio $A_{260}/_{230}$ serta dengan elektroforesis pada gel agarose.

Studi bioinformatika dan seleksi pasangan primer untuk isolasi full length CDS DHNI

Studi bioinformatika dilakukan dalam proses pembuatan primer spesifik gen *DHNI* dari tebu dan analisis hasil sekuensing. Disain primer dilakukan menggunakan program Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) dengan gen *reference* adalah gen *DHN* dari *Saccharum sp* atau dari tanaman lain yang sekerabat dengan tebu misalnya sorgum yang didapatkan dari Genbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan analisis BLAST dan dilakukan penjajaran dengan *software* Bioedit v7.0.5 dan ClustalW.

Amplifikasi fragmen CDS cDNA *DHNI* dilakukan dengan RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) menggunakan RNA total yang diisolasi dari daun tebu yang mendapat berbagai perlakuan cekaman kekeringan sebagai cetakan. Utas tunggal dari cDNA disintesis menggunakan *Superscript First Strand cDNA Synthesis* kit (Invitrogen, USA) yang selanjutnya digunakan sebagai cetakan untuk mengamplifikasi gen *DHNI* menggunakan primer yang spesifik untuk gen tersebut. Amplifikasi gen *DHNI* dilakukan dengan menambahkan 1µl DNA template dengan konsentrasi 100 ng ke dalam reaksi PCR yang mengandung 10 µM primer, 12,5 µL buffer Kapa 2G fast Ready mix PCR kit (KapaBiosystems) dan H₂O sampai total volume 25 µL. Kondisi RT-PCR dioptimasi meliputi suhu annealing, jumlah siklus dan konsentrasi ion Mg²⁺. Produk PCR dimurnikan dari gel agarose menggunakan *QIAquick Gel Extraction* kit (Qiagen).

Kloning dan sekuensing fragmen cDNA DHNI

Fragmen cDNA *DHNI* hasil amplifikasi diligasi ke dalam vektor kloning pGEM-T Easy (Promega, USA) dan diklon ke dalam sel *E. coli* strain DH5α kompeten. Seleksi transforman dilakukan pada media Luria Bertani (LB) yang mengandung 50 mg/L kanamisin dan 40 mg/L X-Gal. Sel transforman yang ditandai dengan warna koloni putih dibuktikan dengan analisis PCR menggunakan primer spesifik untuk gen *DHNI*. Plasmid rekombinan terbukti membawa gen *DHNI* selanjutnya diisolasi menggunakan *QIAprep Spin Miniprep* (QIAGEN, Germany) kit diikuti dengan pemotongan menggunakan enzim restriksi *EcoRI*. Fragmen DNA kemudian diverifikasi pada gel agarose, dimurnikan dan selanjutnya disekuensi.

Hasil dan pembahasan

Pengaruh pemberian cekaman kekeringan pada eksplan tebu

Pemberian perlakuan cekaman kekeringan pada tanaman tebu varietas PSJT 941 di rumah kaca dilakukan untuk melihat pengaruh lama waktu cekaman terhadap ekspresi gen *DHN* pada tanaman tebu. Parameter yang digunakan untuk melihat apakah tanaman sudah dalam kondisi stress atau tercekam adalah status RWC nya. Hasil pengukuran RWC dari tebu yang diberi cekaman kekeringan selama 4, 8, 12, 16, 20 dan 25 hari serta kontrolnya ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 1. Sementara itu penampilan tanaman yang mengalami cekaman kekeringan selama 4, 8, 12, 16, 20 dan 25 hari serta kontrolnya dapat dilihat pada Gambar 2.

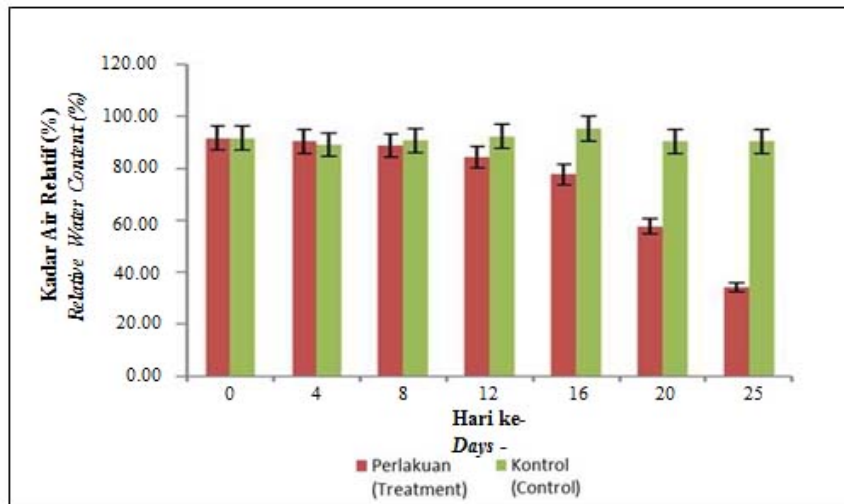
Relative water content (RWC) merupakan parameter penting dalam menentukan resistensi kekeringan pada tanaman (Barrs, 1968). Rampino *et al.*, (2006) juga menyebutkan bahwa nilai RWC digunakan untuk menilai status air daun sehingga dapat digunakan untuk mengetahui respon tanaman terhadap cekaman kekeringan yang diberikan. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa nilai RWC pada tanaman yang mengalami cekaman kekeringan selama 4, 8, 12 dan 16 hari tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol perlakuan. Sementara itu nilai RWC pada tanaman yang mengalami kekeringan selama 20 dan 25 hari menunjukkan perbedaan yang nyata dibandingkan dengan kontrol perlakuan dan perlakuan kekeringan lainnya dengan nilai RWC sebesar 0,58 dan 0,34. Nilai RWC sebesar 0,58 dan 0,34 menunjukkan bahwa tanaman sudah dalam kondisi tercekam (stress) air.

Tabel 1. Pengaruh cekaman kekeringan terhadap perubahan *Relative Water Content* pada tanaman tebu varietas PSJT 941
 Table 1. The effect of drought stress exposure on changes in *Relative Water Content* on sugarcane var. PSJT 941

Perlakuan/ <i>Treatment</i>	Nilai rata-rata <i>Relative Water Content</i> (RWC)/ <i>Average value of Relative Water Content (RWC)</i>
t ₀	0,92a
t ₄	0,90a
t ₈	0,89a
t ₁₂	0,84a
t ₁₆	0,78a
t ₂₀	0,58b
t ₂₅	0,34c

Keterangan: Nilai rata-rata yang ditandai dengan huruf kecil yang sama pada kolom yang sama, dinyatakan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan taraf 5%. t₀ = hari ke-0; t₄= hari ke-4;t₈= hari ke-8;t₁₂= hari ke-12;t₁₆= hari ke-16;t₂₀= hari ke-20;t₂₅= hari ke-25

Notes: Means in the same column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P= 0.05. t₀ = day-0; t₄= day-4;t₈= day-8;t₁₂= day-12;t₁₆= day-16;t₂₀= day-20;t₂₅= day-25



Gambar 1. Pengaruh cekaman kekeringan terhadap persentase perubahan *Relative water content* pada tanaman tebu varietas PSJT 941 selama perlakuan kekeringan dibandingkan dengan kontrol (tanpa perlakuan)

Figure 1. The effect of drought stress exposure on percentage of changes in *Relative water content* on sugarcane var. PSJT 941 during drought treatments compared with the control (without drought treatment)

Data persentase RWC ditampilkan pada Gambar 1. Persentase RWC tanaman tebu tanpa perlakuan dan dengan perlakuan cekaman kekeringan berada pada rentang 34,33 - 95,33%. Persentase RWC tertinggi terlihat pada tanaman kontrol hari ke-16, sedangkan persentase RWC terendah terlihat pada tanaman yang mengalami kekeringan selama 25 hari. Persentase RWC pada tanaman perlakuan terlihat jelas mengalami penurunan dari hari ke-0 hingga hari ke-25, berbeda dengan tanaman kontrol yang memberikan hasil persentase RWC yang tergolong tinggi dan konsisten (Gambar 1). Penurunan serta hilangnya turgiditas akibat kekurangan air, berakibat pada menurunnya proses fisiologi diantaranya, penurunan jumlah stomata yang terbuka, penurunan konsentrasi CO₂, penurunan proses fotosintesis serta karbohidrat cadangan (Widianti *et al.*, 2017; Sevanto *et al.*, 2014). Respon fisiologi dari tanaman yang diberi cekaman kekeringan dan mengalami penurunan RWC berdampak pada fenotipe tanaman tebu di antaranya adalah daun menguning serta mengering dan akhirnya layu. Hal tersebut juga menunjukkan bahwa penurunan RWC dibawah 70% pada tebu (T20 dan T25) berdampak terhadap fenotipe tanaman.

Studi bioinformatika dan seleksi pasangan primer untuk isolasi *full length CDS DHN1* dari tanaman tebu

Dalam upaya untuk isolasi dan kloning gen *DHN1* dari tanaman tebu, analisis bioinformatika untuk mencari sekuen gen *DHN* pada tanaman tebu maupun yang berkerabat dekat dengan tebu telah dilakukan. Berdasarkan hasil *search* dari data

Genbank (NCBI), diketahui bahwa sekuen gen *DHN* pada tebu (Acc no. KF184715) memiliki identitas yang tinggi sebesar 93% dengan gen *DHN* pada *Sorghum bicolor* (Acc no.U11696). Berdasarkan data sekuen tersebut, selanjutnya telah didesain 2 pasang primer untuk mengamplifikasi *full length CDS* dan *full length CDS* plus daerah 5' UTR dari gen *DHN1* dari tanaman tebu varietas PSJT 941 dengan susunan basa yang dapat dilihat pada Tabel 2.

Hasil amplifikasi PCR dari cDNA *DHN1* ditampilkan pada Gambar 2. Terlihat bahwa pasangan primer *DHN1* Forward dan *DHN1* Reverse dapat mengamplifikasi gen *DHN1* dari tanaman tebu varietas PSJT 941, terbukti dengan terbentuknya pita DNA pada ukuran 465 bp yang sesuai dengan ukuran *full length CDS DHN1* pada tebu. Sedangkan pasangan primer *DHN1+* Forward dan *DHN1* Reverse tidak dapat mengamplifikasi *full length CDS DHN1* plus 5' UTR region, sehingga pasangan primer ini tidak digunakan untuk studi selanjutnya. Untuk itu, pada studi ekspresi gen *DHN*, maka pasangan primer *DHN1* Forward dan *DHN1* Reverse yang akan digunakan.

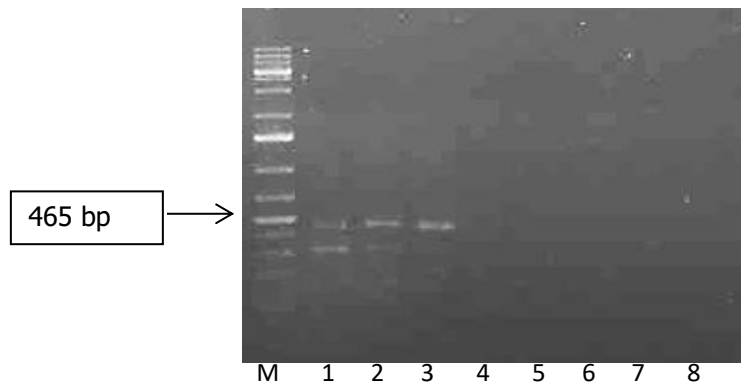
Studi ekspresi dan karakterisasi cDNA *DHN 1*

Studi ekspresi cDNA *DHN1* dilakukan dengan metode RT-PCR menggunakan primer spesifik untuk gen *DHN1* yaitu *DHN1* Forward dan *DHN1* Reverse (Tabel 2). Isolasi RNA dilakukan pada sampel daun tanaman tebu yang telah diberi cekaman kekeringan selama 0, 4, 8, 12, 16, 20, dan 25 hari. Untuk mengetahui kualitas RNA total hasil isolasi, elektroforesis telah dilakukan. Dari hasil

Tabel 2. Daftar primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *DHN1* dari tanaman tebu varietas PSJT 941

Table 2. List of primers used to amplify *DHN1* gene from sugarcane var. PSJT 941

Primer/ Primers	Sekuen primer/ Primers sequence	Keterangan/ Note
DHN1 Forward	ATGGAGTACGGTCAGCAGG	Full length CDS
DHN1 Reverse	TTAGTGCTGTCCGGGCAGCT	
DHN1 +Forward	GGCACGAGACCAATTAAGC	Full length CDS + 5'UTR region



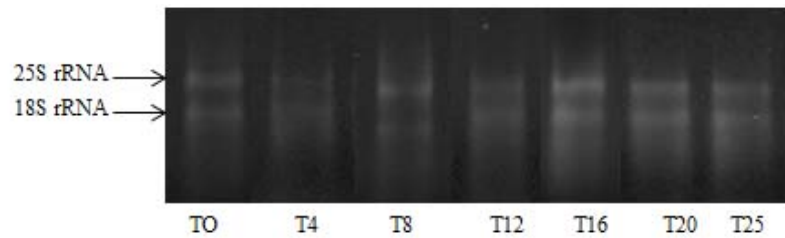
Gambar 2. Elektroforegram hasil amplifikasi cDNA *DHN1* tanaman tebu. Lajur M: Marker 1 kb Plus Ladder; lajur 1-3: menggunakan pasangan primer. *DHN1* forward dan *DHN1* Reverse dengan suhu annealing 55°C, 58°C, 60°C.; lajur 4-7: menggunakan pasangan primer *DHN1* + Forward dan *DHN1* Reverse dengan suhu annealing 52°C, 55°C, 58°C, 60°C lajur 8: kontrol negatif (H₂O)

Figure 2. Electrophoregram of a *DHN1* cDNA amplification using *DHN1* primer pairs. Lane M: Marker 1 kb Plus Ladder; lane 1 - 3= Primer *DHN1*-forward and *DHN1*-reverse with temperature of annealing as 55°C, 58°C, 60°C; lane 4 - 7: lane 4-7: primer *DHN1*+forward and *DHN1*+reverse with temperature of annealing as 52°C, 55°C, 58°C, 60°C; lane 8: negative control (H₂O)

elektroforesis menunjukkan bahwa 250 ng RNA total dari daun tebu baik yang tidak diberi perlakuan maupun yang diberi perlakuan cekaman kekeringan, memperlihatkan dua pita 'intake' yang menandakan RNA tidak terdegradasi (Gambar 3). Dari RNA total yang dihasilkan kemudian dilakukan sintesis cDNA menggunakan metode RT-PCR. Selanjutnya, cDNA yang dihasilkan dijadikan cetakan pada proses PCR untuk mengamplifikasi gen *DHN1* menggunakan primer *DHN1* Forward dan *DHN1* reverse (Tabel 2). Amplifikasi gen *DHN1* dilakukan dengan kondisi RT-PCR sebagai berikut: predenaturasi 95°C: 3 menit 1 siklus, 95°C: 15 detik, 66°C: 15 detik, 72°C: 15 detik selama 35 siklus, dan 72°C: 7 menit selama 1 siklus. Produk PCR dimurnikan dari gel agarose menggunakan *QIAquick Gel Extraction* kit (Qiagen). Hasil amplifikasi gen *DHN1* dapat dilihat pada Gambar 5.

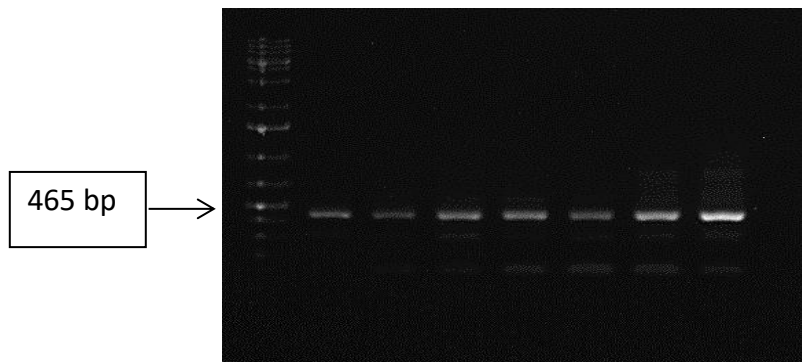
Gambar 4 menunjukkan bahwa dengan menggunakan RT-PCR, keberadaan transkrip dari gen *DHN1* dapat dilihat. Tingkat ekspresi gen *DHN1* pada perlakuan dengan cekaman kekeringan memberikan hasil pita DNA yang semakin tebal

dengan bertambahnya waktu perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi gen *DHN1* pada daun tebu terinduksi dan meningkat seiring dengan bertambahnya waktu cekaman. Dengan demikian *DHN1* diperkirakan merupakan *osmotic/drought inducible gene* dimana ekspresinya dipengaruhi oleh adanya cekaman osmotik atau kekeringan. Dari Gambar 5 terlihat pula bahwa, setelah 25 hari mengalami perlakuan cekaman kekeringan, tingkat ekspresi gen *DHN1* terlihat paling tinggi. Namun demikian pernyataan ini harus dibuktikan dengan menggunakan real-time PCR. Seperti dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Iskandar *et al.* (2011), dengan menggunakan real-time qPCR telah terbukti adanya peningkatan ekspresi gen *DHN* yang sangat tinggi pada jaringan batang tebu yang diberi cekaman kekeringan selama 15 hari. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Iskandar *et al.* (2011), dapat digunakan untuk menduga bahwa ekspresi gen *DHN1* pada daun tebu varietas PSJT 941 akan meningkat seiring dengan lamanya perlakuan cekaman kekeringan yang diberikan.



Gambar 3. Elektroforegram RNA total yang diisolasi dari daun tebu pada berbagai perlakuan cekaman kekeringan (T0, T4, T8, T12, T16, T20 dan T25). Tanda panah menunjukkan subunit rRNA yaitu 25S dan 18S

Figure 3. Electrophoregram of total RNA isolated from sugarcane leaf on various drought treatments (T0, T4, T8, T12, T16, T20 dan T25). Arrows are indicating two sub units of rRNA i.e. 25S and 18S



Gambar 4. Elektroforegram hasil amplifikasi cDNA *DHN1* memperlihatkan akumulasi transkrip gen *DHN1* pada tanaman tebu yang mengalami cekaman kekeringan selama 0,4,8,12,16,20 and 25 hari. M: marka DNA (100 bp ladder marker), T0-T25= sampel tanaman yang diberi cekaman kekeringan selama 0, 4, 8, 12, 16, 20 dan 25 hari; lajur K- : kontrol negatif (H_2O)

Figure 4. Electrophoregram of *DHN1* cDNA amplification showing transcript accumulation of *DHN1* gene at 0,4,8,12,16,20 and 25 days after drought stress exposure. Lane M: DNA marker (100 bp ladder marker); lane T0-T25= plants subjected to drought stress for 0, 4, 8, 12, 16, 20 and 25 days; lane K-: negative control (H_2O)

Kloning cDNA *DHN1* hasil RT-PCR

Dari hasil RT-PCR, tingkat ekspresi gen *DHN1* tertinggi ditandai dengan intensitas fragmen DNA yang tinggi pula ditunjukkan pada sampel tanaman pada hari ke- 20 (T_{20}) dan ke-25 (T_{25}) setelah cekaman kekeringan. Fragmen DNA berukuran 465 bp dari cDNA *DHN1* dengan tingkat ekspresi tertinggi tersebut diklon ke vektor kloning pJET 1.2, dan ditransformasi ke dalam kompeten sel *E. Coli* *DH5a*. Seleksi transforman dilakukan pada media LB yang mengandung antibiotik ampicilin. Positif transforman ditandai dengan tumbuhnya koloni putih dan telah dibuktikan melalui analisis PCR menggunakan primer spesifik untuk gen *DHN1*. Selanjutnya, plasmid rekombinan diisolasi, analisis PCR untuk mengamplifikasi gen *DHN1* telah dilakukan, produk PCR dengan panjang 465 bp dimurnikan dari gel agarose diikuti pemotongan dengan enzim restriksi *EcoRI* dan fragmen yang didapatkan selanjutnya disekuens.

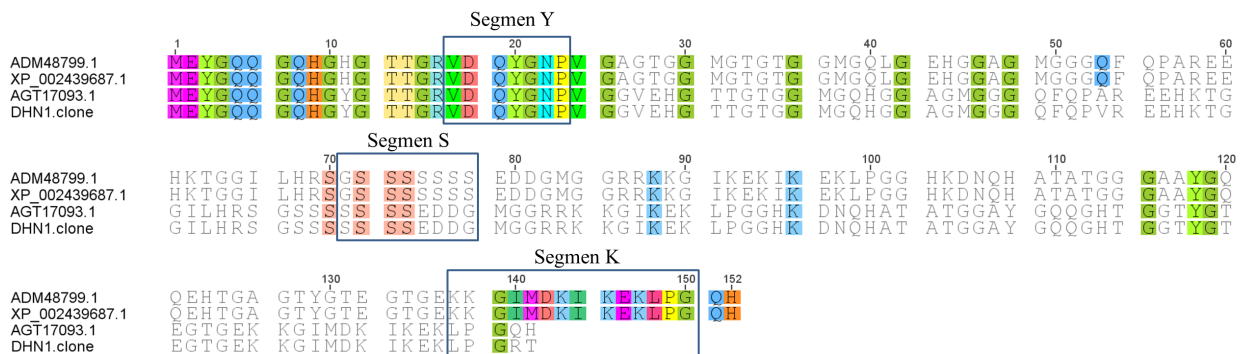
Berdasarkan hasil analisis melalui BLASTx, gen *DHN1* dari tanaman tebu varietas PSJT 941 hasil

sekuensing menunjukkan homologinya dengan gen *DHN* dari berbagai spesies tanaman (Tabel 3). Analisis BLASTx juga menunjukkan bahwa gen *DHN1* dari tanaman tebu memiliki homologi yang tinggi dengan gen *DHN* dari *Sorghum bicolor* yaitu sebesar 93%.

Hasil penjabaran sekuens asam amino (Gambar 5) menunjukkan adanya pola *conserved motif* DHN. Menurut Graether & Boddington (2014), sekuens dehidrin (DHN) memiliki 3 *conserved motif* di antaranya yaitu Segmen Y, Segmen S dan Segmen K. Protein DHN dikenali dengan keberadaan sekuens motif Lys dalam jumlah yang banyak. Motif ini disebut juga sebagai segmen K, dengan urutan sekuens EKKGIMDKIKEKLP (Hara, 2010; Graether & Boddington, 2014). Motif segmen K dalam protein DHN berperan dalam mekanisme biotin dengan membentuk struktur transmembran yang berinteraksi dengan membran sel bakteri untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Motif *conserved* lainnya yaitu segmen Y, dikenal sebagai motif dengan keberadaan residu Tyr. Segmen Y memiliki sekuens motif berupa (V/T)D(E/Q)YGNP, dengan

Tabel 3. Hasil BLASTx sequence gen *DHN1* dari tanaman tebu (*S. officinarum*) dan species tanaman lainnya
 Table 3. BLASTx result of *DHN1* gene from sugarcane (*S. officinarum*) and other plant species

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
□ Sorghum bicolor SPV 462 dehydrin protein (DHN) mRNA, complete cds	518	518	100%	7e-143	88%	HM243499.1
□ Predicted Sorghum bicolor dehydrin (DHN1) (LOC8077913) mRNA	512	512	100%	3e-141	88%	XM_002439642.2
□ Sorghum bicolor cultivar B35dehydrin 1 mRNA, complete cds	512	512	100%	3e-141	88%	KT438253.1
□ Sorghum bicolor cultivarBtx 623dehydrinprotein 1 (DHN1) mRNA, complete cds	512	512	100%	3e-141	88%	KC893318.1
□ Vignamungo cultivar PBG 107 dehydrin (DHN) gene, complete cds	507	507	100%	1e-139	88%	HQ317488.1
□ Sorghum bicolor clone BAC IS 2103 ABA induced RAB17 like gene, partial sequence	497	497	100%	8e-137	88%	AY177889.1
□ Sorghum bicolor dehydrin (DHN2) mRNA, partial cds	431	431	70%	9e-117	92%	U63831.1
□ Panicummiliaceumdehydrin mRNA, complete cds	420	420	100%	2e-113	84%	KT438253.1
□ Saccharum hybrid cultivar R570 clone BAC 051E13 complete sequence	399	777	100%	2e-107	99%	KF184715.1
□ Zea mays mRNA for dehydrin (dhn1 gene)	398	543	99%	9e-107	86%	X15290.1



Gambar 5. Multiple Sequence Alignment (MSA) (penjajaran) protein DHN dari tebu dan sorgum (kotak biru: motif lestari DHN). ADM48799.1 dehydrin protein *Sorghumbicolor*, XP_002439687.1 dehydrin DHN1 *Sorghumbicolor*, AGT17093.1 dehydrin *Saccharum* hybrid cultivar R570, DHN1.clone)
 Figure 5. Multiple sequence alignment of *DHN1* protein from sugarcane and sorghum (blue box: conserved region DHN). ADM48799.1 dehydrin protein *Sorghumbicolor*, XP_002439687.1 dehydrin DHN1 *Sorghumbicolor*, AGT17093.1 dehydrin *Saccharum* hybrid cultivar R570, DHN1.clone)

residu ASP dan Gly-Asn-Pro merupakan residu yang paling *conserved*. Motif *conserved* segmen S tersusun atas 5-7 residu Ser. Saat segmen S dalam protein DHN terfosforilasi, dapat menyebabkan protein DHN berinteraksi dengan *signal peptide* yang diikuti translokasi ke dalam nukleus (Graether & Boddington, 2014).
 Berdasarkan hasil penjajaran pada Gambar 5, dapat dilihat bahwa pola struktur DHN dari *Saccharum* tergolong dalam susunan Y_nSK_n yang

menunjukkan pola YSK. Dari pola tersebut mengindikasikan keberadaan gen *DHN* pada *Saccharum* diduga berada pada daerah sitoplasma atau nukleus. Hal ini disebabkan karena adanya segmen Y pada pola susunan DHN *Saccharum* yang tidak memiliki peranan dalam menjaga atau proteksi terhadap membrane (Graether & Boddington, 2014).
 Selain itu, adanya pola struktur DHN ini memiliki pengaruh terhadap jenis cekaman abiotik

yang berperan dalam ekspresi gen *DHN*. Adanya respon terhadap cekaman stress dapat mempengaruhi sinyal dan kontrol transkripsi dalam sel sehingga menentukan pola ekspresi gen *DHN* dalam merespon cekaman lingkungan (Wang *et al*, 2014; Graether & Boddington, 2014). Untuk pola struktur Y_nSK_n seperti pada *DHN* dari *Saccharum*, kekeringan dan tingkat garam yang tinggi merupakan jenis cekaman lingkungan yang paling dominan dalam meningkatkan ekspresi gen *DHN*. Dalam hal ini segmen Y memiliki peranan penting dalam menjaga sel terhadap kekeringan dan garam tinggi dibandingkan dengan cekaman lingkungan dingin (Graether & Boddington, 2014).

Kesimpulan

Semakin lama tanaman tebu PSJT 941 diberi cekaman kekeringan, semakin besar penurunan nilai RWC dan semakin tinggi tingkat ekspresi gen *DHN1*. Sekuen gen *DHN1* yang diperoleh dari penelitian ini memiliki homologi yang tinggi dengan gen *DHN* pada tebu dan sorghum serta memiliki motif lestari yang mencirikan gen *DHN*, dan dapat menentukan jenis cekaman abiotik yang mempengaruhi perubahan ekspresi gen *DHN*. Dengan demikian gen *DHN* merupakan *stress-related gene* yang sangat potensial digunakan baik sebagai penanda maupun untuk konstruk gen dalam rekayasa genetika tanaman tebu toleran kekeringan.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini terlaksana dengan dana dari Kegiatan Kerja Sama Kemitraan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Nasional (KKP3N) Badan Litbang Pertanian TA 2015-2016 atas kontrak kerjasama dengan Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, PT Riset Perkebunan Nusantara.

Daftar Pustaka

- Andrade LM, TR Benatti, PM Nobile, HG Maria, F Antonio, LA Ana, SB Michael, S Jorge & C Silvana (2014). Characterization, isolation and cloning of sugarcane genes related to drought stress. *BMC Proc* 8 (4), 110-112.
- Barrs HD & PE Weatherley (1962). A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust J Biol Sci* 15, 413-428.
- Brini F, M Hanin, V Lumberras, S Irar, M Pagès & K Masmoudi (2007). Functional characterization of *DHN5*, a dehydrin showing a differential phosphorylation pattern in two Tunisian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) varieties with marked differences in salt and drought tolerance. *Plant Sci* 172, 20-8.
- Ferreira, THS, MS Tsunada, D Bassi, P Araújo, L Mattiello, GV Guidelli, GL Righetto, VR Gonçalves, P Lakshmanan & M Menossi (2017). Sugarcane water stress tolerance mechanisms and its implications on developing biotechnology solutions. *Frontiers in Plant Sci*, 8(1077), 1-18. doi: 10.3389/fpls.2017.01077.
- Gao C, C Wang, L Zheng, L Wang & Y Wang (2012). A LEA gene regulates cadmium tolerance by mediating physiological responses. *Int J Mol Sci* 13, 5468-5481; doi:10.3390/ijms13055468.
- Gao J & T Lan (2015). Functional characterization of the Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein gene family from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in *Escherichia coli*. *Scientific Reports* 6 (19467), 1-10.
- Graether SP & KF Boddington (2014). Disorder and function: A review of the dehydrin protein family. *Frontiers In Plant Science* 5 (576), 1-12.
- Hanin M, F Brini, C Ebel, Y Toda, S Takeda & K Masmoudi (2011). Plant dehydrins and stress tolerance: Versatile protein for complex mechanisms. *Plant Signaling and Behavior* 6(10), 1503-1509.
- Hara M (2010). The multifunctionality of dehydrins. An overview. *Plant Signaling and Behaviour* 5(5), 503-508.
- Harb A, A Krishnan, MR Madana, Ambavaram & Andy Pereira (2010). Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early response leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* 154 (3), 1254-1271.
- Ingram J & DBartels (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 47, 377-403.
- Iskandar HM, RE Casu, AT Fletcher, S Schmidt, J Xu, DJ Maclean, JM Manners & GD Bonnett (2011). Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. *BMC Plant Biology* 11(12), 1-14.
- Kang S, Post, W, J Nichols, D Wang, T West, V Bandaru & Roberto I (2013). Marginal lands:

- concept, assessment and management. *Journal of Agricultural Science* 5(5), 129-139.
- Lakshmanan P & Robinson N (2014). Stress physiology: Abiotic stresses. In: PH Moore & FC Botha (ed), *Sugarcane: physiology, biochemistry, and functional biology*. Chichester, John Wiley & Sons, Inc. p. 411–434.
- Mahajan S & N Tuteja (2005). Cold, salinity and drought stresses, An overview. *Arch Biochem Biophys* 444(2), 139-158.
- Osakabe Y, K Osakabe K, K Shinozaki & Lam-Son P Tran (2014). Response of plants to water stress. *Front Plant Sci* 5 (86), 1-8.
- Rampino P, Pataleo S, Gerardi C, Mita G & Perrotta C (2006). Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant, Cell and Environment* 29, 2143–2152.
- Reis SP, AM Lima & CR de Souza (2012). Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. *Rev Int J Mol Sci* 13, 8628-8647; doi:10.3390/ijms13078628.
- Savitri ES, N Basuki, N Aini & EL Arumingtyas (2013). Identification and characterization of drought tolerance of gene LEA-D11 soybean (*Glycine max* L. Merr) based on PCR-sequencing. *American J Mol Biol* 3, 32-37.
- Sevanto S, McDowell NG, Dickman LT, Pangle R & Pockman WT (2014). How do trees die? A test of the hydraulic failure and carbon starvation hypotheses. *Plant Cell Environ* 37, 153-161.
- Wang Y, H Xu, H Zhu, Y Tao, G Zhang & L Zhang (2014). Classification and expression diversification of wheat dehydrin genes. *Plant Sci*. 214, 113–120. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.10.005
- Widianti Putri, Violita V & Moralita Chatri (2017). Luas dan indeks stomata daun tanaman padi (*Oryza sativa* L.) varietas cisokan dan batang piaman akibat cekaman kekeringan. *Bioscience* 1(2), 77-86.
- Yang Y, M He, Z Zhu, S Li, Y Xu, C Zhang, SD Singer & Y Wang (2012). Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology* 12, 140, 1-17.