



**TRANSFORMASI GEN *SoSUTI* PADA TANAMAN TEBU  
(*Saccharum officinarum* L var. BL) MENGGUNAKAN  
*Agrobacterium tumefaciens* STRAIN GV 3101 DAN  
EKSPLAN PANGKAL TUNAS TEBU *IN VITRO***

**SKRIPSI**

Oleh :

**Edia Fitri Dwinianti  
NIM 081810401016**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**



**TRANSFORMASI GEN *SoSUTI* PADA TANAMAN TEBU  
(*Saccharum officinarum* L var. BL) MENGGUNAKAN  
*Agrobacterium tumefaciens* STRAIN GV 3101 DAN  
EKSPLAN PANGKAL TUNAS TEBU *IN VITRO***

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh :

**Edia Fitri Dwinianti  
NIM 081810401016**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2013**

## PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang serta Nabi Muhammad S.A.W junjungan seluruh umat manusia, kupersembahkan skripsi ini kepada:

1. Ibunda Sudarti dan Ayahanda Sunali, terima kasih yang tidak terhingga atas kasih sayang, pengorbanan, dan doa yang tiada henti;
2. Kakak tersayang Moch. Choiri, S.E dan Anda Suharyati atas motivasi dan dukungan semangat yang mengiringi setiap langkahku;
3. keluarga besar yang telah begitu banyak memberikan dukungan dalam menuntut ilmu;
4. para guru sejak Taman Kanak-Kanak sampai Perguruan Tinggi yang telah mendidik, membimbing dengan penuh ikhlas dan sabar, terima kasih atas ilmu yang telah diberikan;
5. Almamater Universitas Jember.

## MOTTO

“Sesungguhnya Allah tidak akan merubah keadaan suatu kaum kecuali kaum itu sendiri yang merubah apa-apa yang ada pada diri mereka”

(Ar’rad: 11)

---

Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. Al-Qur’an dan Terjemahan. Bandung: CV. Aljumanatul ‘Ali-art

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama: Edia Fitri Dwinianti

NIM : 081810401016

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: “Transformasi Gen *SoSUT1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* Strain GV 3101 dan Eksplan Pangkal Tunas Tebu *In Vitro*” adalah benar-benar karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh MP3EI tahun 2012 dan PT. Perkebunan Nusantara XI atas nama Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr., Sc. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 24 Mei 2013

Yang menyatakan

Edia Fitri Dwinianti  
NIM 081810401016

## SKRIPSI

# TRANSFORMASI GEN *SoSUTI* PADA TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L var. BL) MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens* STRAIN GV 3101 DAN EKSPLAN PANGKAL TUNAS TEBU *IN VITRO*

Oleh

**Edia Fitri Dwinianti**

**NIM 081810401016**

**Pembimbing**

**Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc**

**Dosen Pembimbing Anggota : Esti Utarti, S.P, M.Si**

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Transformasi Gen *SoSUT1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* Strain GV 3101 dan Eksplan Pangkal Tunas Tebu *In Vitro*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Jember pada:

Hari, tanggal :

Tempat : Fakultas MIPA Universitas Jember

Tim Penguji,

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc  
NIP 19551022198212001

Esti Utarti, S.P, M.Si  
NIP 197003031999032001

Anggota

Penguji I,

Penguji II,

Dra. Dwi Setyati, M.Si  
NIP 196404171991032001

Kahar Muzhakar S.Si, Ph.D  
NIP 196805031994011001

Mengesahkan  
Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA. Ph.D  
NIP 196101081986021001

## RINGKASAN

**Transformasi Gen *SoSUT1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* Strain GV 3101 dan Eksplan Pangkal Tunas Tebu *In Vitro* :** Edia Fitri Dwinianti, 081810401016; 2013, 30 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Sukrosa merupakan produk akhir asimilasi karbon selama proses fotosintesis yang terjadi pada organ daun. Sukrosa sebagai produk akhir asimilasi karbon ditranslokasikan dari daun (*source*) ke organ penyimpanan (*sink*) untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Proses translokasi sukrosa pada tanaman dari *source* ke *sink* difasilitasi oleh protein *sucrose transporter* (SUT). Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa overekspresi gen SUT dapat meningkatkan transportasi sukrosa pada tanaman. Penghambatan ekspresi gen SUT1 pada tanaman dengan RNA *antisense* dapat menghambat proses translokasi sukrosa. Hal tersebut mengindikasikan bahwa SUT1 berperan penting dalam proses transportasi sukrosa. Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman yang mengakumulasi sukrosa pada organ batang. Proses akumulasi sukrosa dari organ daun menuju organ batang tanaman tebu membutuhkan peran protein *sucrose transporter*. Telah dilakukan kloning cDNA SUT pada tanaman tebu yaitu *SoSUT1*. Gen *SoSUT1* sebagai *gene of interest* ditransformasikan pada tanaman tebu menggunakan vektor *A. tumefaciens* dengan eksplan transformasi berupa pangkal tunas tebu *in vitro* untuk meningkatkan efektifitas transformasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu transforman melalui proses transformasi menggunakan vektor *A. tumefaciens* yang membawa gen *SoSUT1*. Metode penelitian meliputi persiapan eksplan, pengkulturan *A. tumefaciens*, isolasi DNA plasmid untuk mengkonfirmasi keberadaan konstruk *pAct-SoSUT1*,



transformasi menggunakan vektor *A. tumefaciens* meliputi tahap infeksi, kokultivasi, eliminasi, seleksi dan aklimatisasi. Tanaman putatif transforman yang telah berhasil diaklimatisasi, dilakukan isolasi DNA genom untuk kemudian dianalisis PCR.

Hasil analisis PCR dengan primer *hpt II* menunjukkan bahwa dari 24 tanaman tebu putatif transforman yang berhasil diaklimatisasi, didapatkan 15 tanaman tebu transforman yang positif mengandung gen ketahanan antibiotik hygromycin, sehingga dapat dikatakan juga mengandung gen target *SoSUT1*. Efektifitas rata-rata transformasi gen *SoSUT1* menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* sebesar 6,8% dengan persentase efektifitas transformasi pada transformasi pertama, kedua dan ketiga berturut-turut sebesar 10,34 % ; 4,6% dan 5,45%. Kode T1.1, T1.2, T1.3, T1.4, T1.6, T1.7, T1.8, T1.9, T1.10 dari transformasi pertama, kode T2.1, T2.2, T2.4 dari transformasi kedua dan kode T3.2, T3.5, T3.6 dari transformasi ketiga. Dari 24 tanaman putatif transforman yang dianalisis, terdapat 9 tanaman yang dinyatakan sebagai tebu non transforman dengan tidak terdeteksi adanya pita DNA *hptII*. Hal ini disebabkan karena adanya perlindungan sel non transforman (*escape*) oleh sel transforman sehingga sel tanaman tersebut bersifat *chimera* (belum homogen).

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Transformasi Gen *SoSUT1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L var. BL) Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* Strain GV 3101 dan Eksplan Pangkal Tunas Tebu *In Vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc, selaku dosen pembimbing utama dan Esti Utarti, S.P., M.Si selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, saran dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
2. Dra. Dwi Setyati, M.Si dan Kahar Muzhakar S.Si, Ph.D selaku dosen penguji atas masukan dan saran guna kesempurnaan penulisan skripsi ini;
3. Drs. Moh. Imron Rosyidi, M.Sc selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
4. seluruh keluarga besarku yang telah begitu banyak memberikan, kasih sayang, doa, dukungan dan motivasi untuk lebih bersemangat dalam menggapai cita-cita.
5. Purnama Oktaviandari, S.P., M.P atas pengarahan dan bimbingan dalam menyelesaikan penelitian ini;
6. rekan-rekan kerja di Lab. Biologi Molekuler: Rinda, Hidayah S.Si, Frengky S.P, kakak senior Anandang, S.P; Adji, S.P; Ahmad Fudhaili, S.Si; Nina, S.Si; Triliani, S.Si; Mutik, S.Si; Aditya, S.Si; Anzi, S.Si; Nurul, S.Si; dan adek lab (Dina, Anna,

Eni, Wimbuh, Novita, Obam, Fadrian) atas seluruh perhatian, dukungan dan bantuan dalam menyelesaikan penelitian ini;

7. keluarga besar biologi 2008 “Omfalomesenterika” Fakultas MIPA yang telah memberi warna hidup selama kuliah;
8. para sahabat seperjuangan TBV Group (Ika Agus, Imam Hanafy, Syubbanul) Bacterial Group (Dewi, Arif, Azizah, Niar, Lutfya) dan Luluk, Rasit, Wisnu, Ria, Adifa, Lia atas kebersamaan, kekompakan dan keceriaan selama mengikuti kuliah;
9. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu dan memberi dukungan selama berjuang dikampus.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan karya ilmiah tertulis ini masih banyak kekurangan, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi penyempurnaan karya ilmiah tertulis ini. Semoga karya ilmiah tertulis ini bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi pengembangan ilmu biologi.

Jember, Mei 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	<b>xvii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Tujuan</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat</b> .....	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1 Tanaman Tebu (<i>Saccharum officinarum</i>. L) dan Biosintesis     Sukrosa</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2 Sucrose Transporter (SUT) Pada Tanaman</b> .....	<b>5</b>

2.3	<b>Transformasi Genetik Menggunakan Vektor <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b> .....	6
2.4	<b>Eksplan Pangkal Tunas Tebu <i>In Vitro</i></b> .....	9
<b>BAB 3. METODOLOGI</b> .....		11
3.1	<b>Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	11
3.2	<b>Alat dan Bahan</b> .....	11
3.3	<b>Metode Penelitian</b> .....	11
3.3.1	Persiapan Eksplan .....	11
3.3.2	Pengkulturan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	12
3.3.3	Isolasi DNA Plasmid .....	12
3.3.4	Infeksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Pada Eksplan Tanaman Tebu .....	13
3.3.5	Kokultivasi .....	13
3.3.6	Eliminasi .....	13
3.3.7	Seleksi Eksplan Putatif Transforman .....	14
3.3.8	Efektifitas Transformasi .....	14
3.3.9	Aklimatisasi Tanaman Putatif Transforman .....	14
3.3.10	Isolasi DNA Genom Tanaman Transforman .....	14
3.4.11	Analisis Polimerase Chain Reaction (PCR) .....	15
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....		17
4.1	<b>Konfirmasi Keberadaan Plasmid <i>Actin</i> Dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b> .....	17
4.2	<b>Transformasi Gen <i>SoSUTI</i> Pada Tanaman Tebu</b> .....	18
4.3	<b>Aklimatisasi Planlet Tebu <i>In Vitro</i></b> .....	22
4.4	<b>Analisis PCR Tanaman Tebu Putatif Transforman Gen <i>SoSUTI</i></b> .....	23
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....		26
5.1	<b>Kesimpulan</b> .....	26

<b>5.2 Saran .....</b>	<b>26</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>27</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>31</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Efektifitas transformasi dalam bentuk persentase jumlah planlet yang mampu tumbuh pada tiap tahapan seleksi.....	22

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Ti plasmid bakteri <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	7
Gambar 2.2 Mekanisme transformasi genetik ke dalam sel tanaman oleh vektor <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	9
Gambar 3.1 Konstruksi plasmid <i>pAct-SoSUT1</i> .....	12
Gambar 4.1 Hasil elektroforesis DNA plasmid <i>A. tumefaciens</i> GV 3101 <i>pAct-SoSUT1</i> menggunakan primer 1F/1R <i>hptII</i> .....	17
Gambar 4.2 Perbanyakan planlet tebu <i>in vitro</i> pada media MS <sub>0</sub> dan pangkal tunas tebu <i>in vitro</i> sebagai eksplan transformasi .....	19
Gambar 4.3 Pertumbuhan eksplan pada media kokultivasi dan media eliminasi .....	20
Gambar 4.4 Pertumbuhan eksplan pada media seleksi yang mengandung antibiotik <i>hygromycin</i> .....	21
Gambar 4.5 Aklimatisasi tanaman putatif transforman .....	23
Gambar 4.6 Elektroforesis gel agarose DNA hasil PCR menggunakan primer 1F/1R <i>hpt II</i> dengan template sampel DNA genom putatif transforman <i>SoSUT1</i> .....	24



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Larutan Stock MS ( <i>Murashige and Skoog</i> ) dan <i>Hoagland</i> .....	31
B. Komposisi Media YEP.....	33

## DAFTAR SINGKATAN

bp	: basepair
cDNA	: <i>Complementary deoxyribose nucleic acid</i>
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
PCI	: <i>Phenol Chloroform Isoamylalcohol</i>
<i>pAct-SoSUT1</i>	: <i>pActin Saccharum officinarum Sucrose Transporter 1</i>
SDS	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TE	: <i>tris-EDTA</i>
UV	: <i>Ultra Violet</i>
vir	: <i>virulence</i>

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sukrosa merupakan produk akhir asimilasi karbon selama proses fotosintesis yang terjadi pada organ daun tanaman (Buchanan *et al.*, 2000). Sukrosa sebagai produk akhir asimilasi karbon ditranslokasikan dari daun (*source*) ke organ penyimpanan (*sink*) untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Campbell *et al.*, 2002). Proses translokasi sukrosa pada tanaman dari *source* ke *sink* difasilitasi oleh protein transport yang dikenal sebagai *sucrose transporter* (SUT) (Rae *et al.*, 2005).

Protein SUT telah diteliti pada hampir semua tanaman yang memiliki manfaat penting seperti padi (Aoki *et al.*, 2003), kentang (Krugel *et al.*, 2008) dan tebu (Rae *et al.*, 2005). Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa overekspresi gen SUT dapat meningkatkan transportasi sukrosa pada tanaman. Sedangkan penghambatan ekspresi gen SUT1 pada tanaman dengan RNA *antisense* dapat menghambat proses translokasi sukrosa. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kuhn *et al.* (2003) penghambatan ekspresi SUT1 menggunakan teknik RNA *antisense* pada tanaman kentang berpengaruh pada pengurangan akumulasi berat segar selama tahap awal perkembangan umbi. Hal tersebut mengindikasikan bahwa SUT1 berperan penting dalam proses transportasi sukrosa.

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman yang mengakumulasi sukrosa pada organ batang. Proses akumulasi sukrosa dari organ daun menuju organ batang tanaman tebu membutuhkan peran protein *sucrose transporter*. Telah dilakukan kloning cDNA SUT pada tanaman tebu yaitu *SoSUT1* dan *SoSUT2* (Sugiharto *et al.*, 2008, tidak dipublikasikan). Berdasarkan karakteristiknya, cDNA *SoSUT1* mengkode protein SUT1 yang memiliki afinitas

tinggi terhadap sukrosa (Kuhn, 2003). Pada penelitian ini digunakan gen *SoSUT1* sebagai *gene of interest* yang akan ditransformasikan pada tanaman tebu.

Proses transformasi genetik pada tanaman dapat dilakukan secara langsung menggunakan *particle bombardment* dan *electroporation*, maupun secara tidak langsung menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Proses transformasi menggunakan vektor *A. tumefaciens* merupakan metode yang umum digunakan dalam rekayasa genetik tanaman tebu. Keuntungan menggunakan *A. tumefaciens* sebagai vektor transformasi tanaman adalah relatif murah, efisien dan jumlah *copy* gen yang terintegrasi ke dalam kromosom tanaman lebih rendah (Lessard *et al.*, 2002).

Transformasi genetik pada tanaman tebu dapat menggunakan eksplan berupa kalus maupun eksplan hasil regenerasi dari tunas *axilar* dan tunas apikal. Berdasarkan penelitian sebelumnya transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu dengan menggunakan eksplan kalus keberhasilan transformasi hanya berkisar 1% (Purnamasari, 2011). Selain itu penggunaan kalus sebagai eksplan rentan terhadap variasi somaklonal (Nadar and Heinz, 1977). Sedangkan penggunaan pangkal tunas tebu *in vitro* sebagai eksplan transformasi mampu meminimalisasi tingkat variasi somaklonal dan pangkal tunas tebu *in vitro* mampu langsung membentuk tunas baru tanpa fase pengkalusan (Hazmi, 2009). Berdasarkan uraian tersebut, pada penelitian ini dilakukan transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* hasil regenerasi tunas *axiler* untuk meningkatkan efektifitas transformasi.

## 1.2 Perumusan Masalah

Proses translokasi sukrosa pada tanaman dari *source* ke *sink* difasilitasi oleh protein *sucrose transporter* (SUT). Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa overekspresi gen SUT dapat meningkatkan transportasi sukrosa pada tanaman. Transformasi gen *SoSUT1* diharapkan dapat menghasilkan tanaman tebu transforman overekspresi gen *sucrose transporter*, sehingga meningkatkan

ekspresi gen SUT dan translokasi sukrosa. Selain itu, perlu dilakukan peningkatan efisiensi transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu dengan menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro*.

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu transforman melalui transformasi genetik menggunakan vektor *A. tumefaciens* yang membawa gen *SoSUT1*.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai sumber informasi mengenai transformasi gen *SoSUT1* menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum*. L) dan Biosintesis Sukrosa

Tebu (*Saccharum officinarum*. L) termasuk tanaman dari famili Poaceae (keluarga rumput) yang telah banyak dibudidayakan pada daerah tropis dan subtropis untuk menghasilkan gula (sukrosa) (Raza *et al.*, 2010). Tebu merupakan tanaman yang mengakumulasi sukrosa pada organ batang yang disintesis pada organ daun selama proses fotosintesis.

Sukrosa disintesis di dalam sitosol dari empat molekul triosa-P hasil asimilasi karbon dalam proses fotosintesis. Empat molekul triosa-P dikonversikan menjadi 2 molekul 2-glyceraldehyde-3-P dan 2 molekul 2-dihydroxyacetone oleh enzim *triose-P-isomerase*. Kemudian dari molekul ini dibentuk *fructose-1,6-biphosphat* yang dikatalisis oleh *aldolase*. Dua molekul *fructose-1,6-biphosphat* selanjutnya dikonversi menjadi *fructose-6-phosphat* (F6P) yang dikatalisis oleh *cyt-FBPase*. F6P yang terbentuk sebagian dikonversi menjadi UDP-glucose yang merupakan substrat untuk sintesis sukrosa. Sintesis sukrosa dilakukan oleh enzim *Sucrose phosphate synthase* (SPS) yang mengkatalisis reaksi pembentukan *sucrose-6-phosphat* (S-6-P) dari *fructose-6-phosphate* (F-6-P) dan *uridin-5-diphospho glucose* (UDP-glucose). Selanjutnya fosfat pada S-6-P dihidrolisis oleh enzim *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) sehingga menghasilkan sukrosa dan fosfat anorganik (Pi). Sukrosa yang dihasilkan kemudian ditranslokasikan dari jaringan asal (*source tissue*) melalui floem menuju berbagai macam jaringan penyimpan (*sink tissue*) untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Truernit, 2001).

Akumulasi sukrosa pada batang tanaman tebu ditentukan oleh selisih antara proses biosintesis dan degradasi sukrosa yang terjadi di daun. Meningkatnya biosintesis sukrosa yang dikatalisis oleh SPS akan meningkatkan jumlah sukrosa yang dapat diakumulasi jika proses degradasinya tetap (Rose and Botha, 2000).

Selain itu, besarnya sukrosa yang dapat diakumulasikan pada batang juga sangat ditentukan oleh transportasi sukrosa dari daun (*source*) menuju batang (*sink*). Proses transportasi sukrosa difasilitasi oleh protein transport yang dikenal sebagai *sucrose transporter* (Rae *et al.*, 2005).

## 2.2 *Sucrose Transporter* (SUT) Pada Tanaman

Sukrosa merupakan produk akhir asimilasi karbon (C) pada proses fotosintesis yang terjadi di daun (Kim *et al.*, 2000) dan bentuk karbohidrat yang mudah ditransportasikan ke jaringan simpan atau *sink tissues* (Cheng *et al.*, 1996). Proses transportasi sukrosa dari *source* ke *sink* atau yang disebut dengan *long distance transport* secara umum digolongkan menjadi dua tahapan yaitu *loading* dan *unloading* sukrosa. Proses *loading* dan *unloading* sukrosa menuju batang difasilitasi oleh protein *sucrose transporter* (SUT) (Truernit, 2001). Translokasi sukrosa oleh protein SUT merupakan bentuk pengangkutan aktif yang disebut sebagai sukrosa H<sup>+</sup> *symporter* (*sucrose proton symport*) (Reismier *et al.*, 1993). Pengangkutan aktif merupakan pemindahan zat terlarut melawan gradien konsentrasi, melintasi membran plasma dari satu sisi yang konsentrasi zat terlarutnya rendah menuju ke sisi yang konsentrasi zat terlarutnya tinggi (Champbell *et al.*, 2002).

Pada sebagian besar tanaman, translokasi hasil fotosintesis dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpanan terjadi secara simplasmik dan apoplasmik. Secara simplasmik, translokasi sukrosa terjadi dari sel melalui plasmodesmata yang terjadi pada jaringan meristem dan organ tanaman yang masih muda. Secara apoplasmik sukrosa ditranslokasikan melewati dinding sel dan ruang interselular jaringan, proses ini terjadi dalam *sieve element* (pembuluh tapis) / *companion cell* (sel pengiring) (Lalonde *et al.*, 2003).

Pada tanaman terdapat lebih dari satu gen yang mengkode *sucrose transporter* (SUT). Terdapat tiga famili protein SUT berdasarkan homologi sekuensi dan afinitas substrat. SUT1 mempunyai afinitas yang tinggi, tetapi daya muat pengangkutannya rendah. SUT2 mempunyai afinitas yang rendah, tetapi daya muat

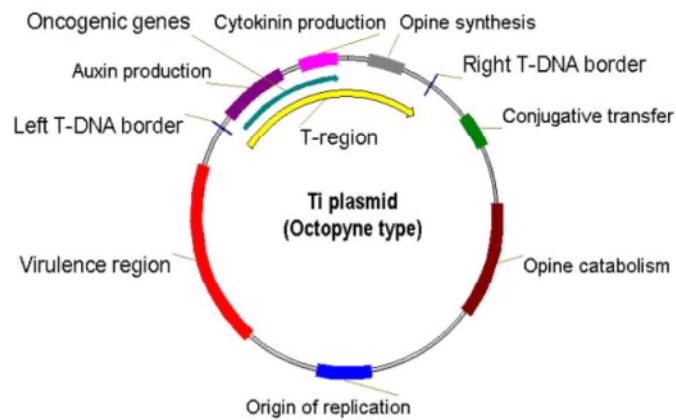
pengangkutannya tinggi. Sedangkan SUT4 mempunyai afinitas yang rendah dan daya pengangkutannya sangat rendah bahkan hampir tidak terdeteksi aktivitas pengangkutannya. Sementara SUT3 hanya terdapat pada tanaman tembakau dan menurut sekuensi homologinya termasuk dalam famili SUT1 (Kuhn, 2003). Pada tanaman tebu terdapat dua gen yang mengkode SUT yaitu *SoSUT1* dan *SoSUT2* (Sugiharto *et al.*, 2008, tidak dipublikasikan). Berdasarkan karakteristik dari sub famili gen SUT maka dipilih gen *SoSUT1* sebagai *gene of interest* (goi) dalam proses transformasi genetik pada tanaman tebu.

### 2.3 Transformasi Genetik Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* merupakan bakteri tanah yang memiliki karakter morfologi sel berbentuk batang, tidak berspora, bersifat Gram negatif, respirasi secara aerob, tumbuh pada kisaran suhu 18 - 28<sup>0</sup>C dan bersifat fitopatogen pada tanaman. Secara alami *A. tumefaciens* menyebabkan terbentuknya *crown gall* pada tanaman dikotil dan secara genetik dapat memindahkan (mentransfer) gen ke tanaman (Bins and Thomashow, 1988). Keberhasilan transformasi menggunakan vektor *A. tumefaciens* pada awalnya hanya terbatas pada kelompok tanaman dikotil. Penelitian secara intensif telah membuahkan pemahaman mekanisme transfer gen *A. tumefaciens*. Sehingga ditemukan dari beberapa penelitian bahwa *A. tumefaciens* efisien untuk transformasi gen pada tanaman monokotil (Rahmawati, 2006).

*A. tumefaciens* mempunyai DNA plasmid yang terdapat di dalam sitoplasma yang disebut Ti (*Tumor inducing*) plasmid. Menurut de la riva *et al.* (1998) ada tiga komponen genetik penting yang terlibat dalam proses pembentukan tumor. Pertama, gen virulen kromosom (*chromosomal virulence*) yang terdapat pada kromosom *A. tumefaciens* yang berfungsi dalam pelekatan bakteri dengan sel tanaman. Kedua, sekelompok gen virulen (*vir*) yang terdapat dalam plasmid Ti yang berperan dalam menginduksi transfer dan integrasi T-DNA. Komponen ketiga adalah daerah T-DNA yang juga terletak pada plasmid Ti. Daerah T-DNA mengandung gen penting bagi *A. tumefaciens*, dibatasi oleh dua daerah yaitu LB (*Left Border*) dan RB (*Right Border*).





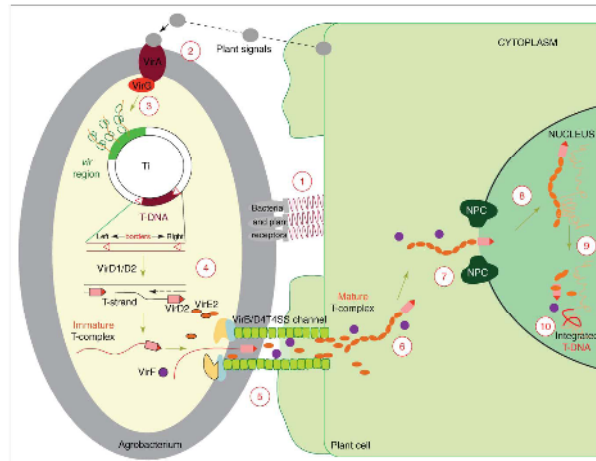
Gambar 2.1 Struktur Ti plasmid bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (Kakkar and Verma, 2011).

Pada T-DNA terdapat gen *oncogenic* yang menyandikan enzim-enzim penting dalam biosintesis auksin dan sitokinin yaitu hormon yang berperan untuk pembelahan sel, sehingga terjadi pembelahan sel yang tidak terkontrol dan menyebabkan terbentuknya tumor. Bagian T-DNA juga mengandung gen yang berperan dalam sintesis dan sekresi *opine* yang penting untuk dikonsumsi oleh *Agrobacterium*. Bakteri *Agrobacterium* masuk ke dalam jaringan tanaman melalui jaringan yang terluka. Jaringan tanaman dikotil yang terluka menghasilkan senyawa fenolik *acetosyringone* dan monosakarida (glukosa, galaktosa) yang menginduksi transkripsi sederetan gen *vir* dan berakhir dengan penyisipan gen-gen yang ada pada daerah T-DNA (de la Riva *et al.*, 1998).

Kemampuan *Agrobacterium* ini kemudian dimanfaatkan untuk menyisipkan gen bermanfaat ke dalam tanaman. Selanjutnya gen-gen yang berperan dalam sintesis hormon dan *opine* dihilangkan dan diganti dengan gen bermanfaat untuk perbaikan sifat tanaman (Rahmawati, 2006). Penggunaan *A. tumefaciens* dalam transformasi tanaman lebih menguntungkan dibandingkan dengan metode lain. Keunggulan transformasi menggunakan *A. tumefaciens* adalah teknis yang mudah, meminimalkan pembentukan kembali genom tanaman transforman dan mempunyai jumlah *copy* DNA yang terintegrasi ke dalam kromosom tanaman lebih rendah (Lessard *et al.*,

2002). Semakin banyak jumlah copy gen yang disisipkan maka ekspresi gen kurang stabil akibat dari adanya pembungkaman gen dan proses penyusunan kembali (*rearrangement*) semakin tinggi yang mengakibatkan ekspresi gen kurang stabil (Dai *et al.* 2001).

Dasar transformasi pada sel tanaman dengan menggunakan *A. tumefaciens* adalah pemindahan bagian T-DNA yang terintegrasi ke dalam genom tanaman, sehingga menginduksi terbentuknya tumor. Proses transfer dari T-DNA ke dalam sel tanaman dijalankan oleh produk dari *vir region* (daerah virulensi) yang berada pada Ti plasmid. *virA* mendeteksi adanya senyawa fenolik yang dihasilkan karena pelukaan bagian tanaman yaitu *acetosyringone*. Adanya senyawa fenolik dari sel tanaman terluka akan menginduksi terjadinya ekspresi gen virulensi yang lain. Selanjutnya *virA* memfosforilasi *virG* untuk melaksanakan proses transkripsi gen virulensi. Setelah terjadi induksi gen virulensi, hasil dari transfer gen dimulai dengan terbentuknya T-strand yang merupakan *copy* dari T-DNA. *VirD1* dan *virD2* adalah kompleks protein yang melaksanakan proses terbentuknya untai T-strand. Setelah T-strand terbentuk, kompleks protein *virE2* digunakan oleh T-strand sebagai media untuk sampai pada inti sel tanaman. Selain itu *virE2* juga digunakan sebagai pelindung T-DNA ketika memasuki sel tanaman. T-strand dan *virE2* sebagai satu kesatuan yang disebut dengan kompleks T-DNA. Kompleks T-DNA keluar dari sel bakteri. Kemudian menembus membran dan dinding sel tanaman melalui perangkat yang disusun protein *virB*. Kompleks T-DNA masuk ke inti sel tanaman melalui *nuclear pore complex* (NPC). *VirD2* dan *virE2* memiliki *nuclear localisation signal* (NLS) yang mampu mengenali NPC. Setelah menembus membran inti, kompleks T-DNA berintegrasi dengan kromosom tanaman (Zupan *et al.*, 1995). Tahapan proses transformasi genetik pada tanaman menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* seperti yang ditampilkan pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Mekanisme transformasi genetik ke dalam sel tanaman oleh vektor *Agrobacterium tumefaciens* (Tzfira and Citovsky, 2006).

## 2.4 Eksplan Pangkal Tunas Tebu

Transformasi gen pada tanaman tebu menggunakan vektor *A. tumefaciens* dapat menggunakan eksplan berupa kalus maupun eksplan hasil regenerasi dari tunas *axilar* dan tunas apikal. Masing-masing eksplan tersebut memiliki kelebihan dan kelemahan dalam proses regenerasi eksplan.

Regenerasi eksplan transformasi melalui fase kalus berupa potongan-potongan gulungan daun muda berukuran  $\pm 0,5$  cm yang ditumbuhkan pada media pengkalusan atau langsung pada media inisiasi tunas. Keuntungan menggunakan gulungan daun muda yaitu mudah mendapatkan eksplan dalam jumlah banyak. Sepotong gulungan daun muda dapat dipotong menjadi 9 eksplan. Jumlah eksplan tersebut jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah eksplan hasil regenerasi tunas apikal. Kelemahan ekplan dari gulungan daun muda adalah harus melalui fase kalus untuk menjadi tunas (Hazmi, 2009).

Regenerasi eksplan tanpa melalui fase kalus dapat diperoleh dari tunas aksiler (*axillary bud*) dan tunas apikal yang merupakan titik tumbuh pada ujung batang atau di dalam pangkal pucuk. Tunas aksiler dan tunas apikal dapat meregenerasi tunas tanpa fase kalus sehingga relatif terhindar dari variasi somaklonal.

Kelemahan tunas aksiler adalah peka terhadap kontaminasi, teknik sterilisasinya sulit dan pertunasannya lambat, sehingga untuk mendapatkan eksplan yang sehat relatif terbatas. Sedangkan tunas apikal tidak efisien untuk dijadikan eksplan transformasi karena jumlahnya terbatas. Setiap batang tebu hanya ada satu tunas apikal, sehingga dibutuhkan banyak tebu sebagai sumber eksplan. Kelemahan tersebut diatasi dengan melakukan induksi dan multiplikasi tunas untuk menyediakan eksplan transformasi. Penggunaan pangkal tunas tebu *in vitro* sebagai eksplan transformasi memiliki beberapa keuntungan yaitu sumber eksplan dapat tersedia dalam jumlah banyak, meminimalisasi tingkat variasi somaklonal dan memungkinkan untuk melakukan infeksi secara intensif (Hazmi, 2009).

## **BAB 3. METODOLOGI**

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Dasar Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember pada bulan Juli 2012 sampai April 2013.

### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan adalah alat standart laboratorium seperti yang disebutkan pada metode penelitian. Bahan yang digunakan yaitu tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) var. Bulu Lawang (BL) *in vitro*, biakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 yang membawa konstruk plasmid *pAct-SoSUT1*, dan bahan-bahan kimia yang diperoleh dari Sigma, E.merck serta Roche.

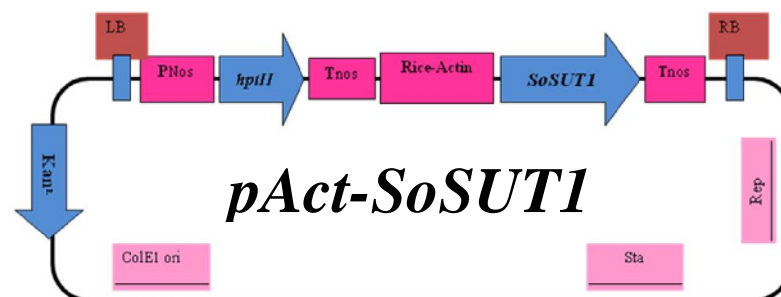
### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Persiapan Eksplan Transformasi**

Planlet tebu (*Saccharum officinarum* L.) var. Bulu Lawang (BL) *in vitro* yang telah tersedia di Laboratorium Biologi Dasar disubkultur setiap 4 minggu sekali dengan cara membersihkan bagian yang mengering dan memindahkan planlet ke media MSo yang baru. Planlet ditempatkan pada ruang inkubasi dan diberi penyinaran dengan lampu TL dengan intensitas cahaya antara  $\pm 2000$  lux. Planlet hasil kultur, bagian pangkalnya digunakan sebagai eksplan untuk transformasi. Dalam satu tahapan transformasi dibutuhkan 50-100 eksplan.

### 3.3.2 Pengkulturan *Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* strain GV 3101 yang digunakan merupakan biakan murni yang sebelumnya sudah diinsersi gen *SoSUT1* dalam plasmid *pAct-SoSUT1*. Plasmid *pAct-SoSUT1* mengandung bagian LB: *left border*, RB: *right border* sebagai batas bagian T-DNA, P-Nos: *promoter nopaline synthetase*, *hptII*: *hygromycin phospho transferase gene*, T-Nos: *terminator nopaline synthetase*, *Promoter Rice actin*, *SoSUT1*: *Saccharum officinarum sucrose transporter* (Gambar 3.1). Bakteri *A. tumefaciens* tersebut didapatkan dari *gliserol stock* yang diambil 50  $\mu\text{l}$  untuk diinokulasi ke dalam media YEP selektif (kanamycin 50  $\text{mgL}^{-1}$ , rifampycin 100  $\text{mgL}^{-1}$ , streptomycin 30  $\text{mgL}^{-1}$ ) cair 2 ml dan diinkubasi shaker 150 rpm, suhu 28<sup>0</sup>C selama 24 jam. Selanjutnya biakan bakteri diinokulasi sebanyak satu ose dengan cara streak kuadran pada media YEP selektif padat dan diinkubasi pada suhu 28<sup>0</sup>C selama 48 jam.



Gambar 3.1 Konstruk plasmid *pAct-SoSUT1* (Sumber: Sugiharto, 2010).

### 3.3.3 Isolasi DNA Plasmid

Isolasi DNA plasmid bertujuan untuk melakukan konfirmasi keberadaan gen target pada plasmid yang diinsersikan pada *A. tumefaciens*. Teknik isolasi DNA plasmid menggunakan metode yang disebutkan dalam Sambrook *et al.* (1989).

Pellet DNA yang didapatkan dilarutkan dalam 20  $\mu\text{l}$  buffer TE dan diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. DNA plasmid hasil isolasi digunakan sebagai *template* untuk analisis dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan divisualisasi pada 1% gel elektroforesis.

### 3.3.4 Infeksi *Agrobacterium tumefaciens* Pada Eksplan Tanaman Tebu

Single koloni biakan *A. tumefaciens* pada media YEP selektif padat diinokulasikan pada media YEP selektif cair 2 ml dan diinkubasi shaker 150 rpm, 28<sup>0</sup>C selama 48 jam. Starter dituang ke dalam YEP selektif cair 50 ml, diinkubasi shaker 150 rpm, 28<sup>0</sup>C hingga mencapai kerapatan sel ( $OD_{600} = 0,4-0,6$ ).

Sebanyak 50-100 eksplan, diambil bagian pangkal dari planlet tebu  $\pm 0,5$  cm dari media prekultur, ditampung pada cawan petri yang berisi MS<sub>0</sub> cair. Kemudian ditusuk-tusuk menggunakan *syringe* steril. Eksplan dipindahkan ke dalam media YEP cair yang telah diinokulasi *A. tumefaciens* dan ditambah *acetosyringone* 100 mgL<sup>-1</sup>, diinkubasi shaker 150 rpm, suhu 28<sup>0</sup>C, selama 15 menit. Eksplan dibilas dengan akuades steril 50 ml, dikeringkan diatas cawan petri yang telah diletakkan tisu dan kertas saring steril diatasnya. Selanjutnya eksplan ditumbuhkan pada media kokultivasi.

### 3.3.5 Kokultivasi

Kokultivasi dilakukan setelah proses infeksi bertujuan untuk menumbuhkan *A. tumefaciens* bersama dengan eksplan. Kokultivasi dilakukan dengan menumbuhkan eksplan pada media kokultivasi (MS + *acetosyringone* 100 mgL<sup>-1</sup>). Kemudian eksplan diinkubasi pada kondisi gelap, suhu 25<sup>0</sup>C, selama 3 hari.

### 3.3.6 Eliminasi

Eliminasi *A. tumefaciens* dilakukan dengan tujuan mencegah ledakan pertumbuhan (*overgrowth*) bakteri pada eksplan. Eksplan dari media kokultivasi dicuci dengan larutan *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> sebanyak 3 kali, dibilas dengan akuades steril setiap setelah pencucian dengan larutan *cefotaxime* dan dikeringkan di atas kertas saring steril selama  $\pm 15$  menit. Eksplan dipindahkan pada media eliminasi (MS + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup>) dan inkubasi pada suhu 25<sup>0</sup>C selama 7 hari dalam kondisi terang.

### 3.3.7 Seleksi Eksplan Transformasi

Tahapan seleksi eksplan transforman dilakukan sebanyak 5 kali. Seleksi 1 ditumbuhkan pada media (MS + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> + *hygromycin* 10 mgL<sup>-1</sup>), seleksi 2-3 pada media (MS + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> + *hygromycin* 20 mgL<sup>-1</sup>) dan seleksi 4-5 pada (MS + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> + *hygromycin* 25 mgL<sup>-1</sup>) masing-masing tahapan seleksi membutuhkan waktu inkubasi selama 21 hari dalam kondisi terang. Planlet yang telah melewati seleksi 5 ditumbuhkan pada media MS tanpa penambahan antibiotik (MS<sub>0</sub>) selama 4 minggu untuk induksi pembentukan akar.

### 3.3.8 Efektifitas Transformasi

Efektifitas transformasi dihitung berdasarkan jumlah planlet yang mampu tumbuh pada tiap tahapan transformasi yaitu selama tahap kokultivasi, eliminasi dan lima periode seleksi. Perhitungan efektifitas transformasi bertujuan untuk mengetahui persentase keefektifan proses transformasi genetik. Efektifitas transformasi selama lima periode seleksi dihitung berdasarkan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah planlet yang tumbuh pada tiap tahapan transformasi}}{\text{Jumlah eksplan awal}} \times 100\%$$

### 3.3.9 Aklimatisasi Tanaman Putatif Transforman

Aklimatisasi bertujuan untuk mengadaptasikan tanaman dari kondisi *in vitro* ke kondisi *in vivo*. Aklimatisasi dilakukan pada planlet tebu dengan tinggi ± 3-5 cm dan telah memiliki cukup akar. Planlet dibersihkan dari sisa-sisa media agar dengan air mengalir dan direndam dalam larutan fungisida (*Dithane* 0,1%) selama 1 menit, kemudian ditanam pada media pasir steril. Pemeliharaan saat aklimatisasi dilakukan dengan penyemprotan akuades dan pemberian larutan nutrisi *Hoagland*. Aklimatisasi dilakukan bertahap dengan meletakkan tanaman dalam ruangan dan di *green house* masing-masing selama 6 hari. Selanjutnya tanaman tebu ditanam pada polybag yang berisi campuran tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1 dan diletakkan di *green*



*house* tanpa naungan dan tanaman tebu yang telah berumur  $\pm$  1,5 bulan diambil bagian daunnya untuk dilakukan isolasi DNA genom.

### 3.3.10 Isolasi DNA Genom Tanaman Putatif Transforman

Proses isolasi DNA genom tanaman dilakukan dengan menggerus 0,5 gram daun tanaman tebu dengan Nitrogen cair menggunakan *mortar* dan *pastle* sampai halus. Serbuk daun dipindah ke dalam *microtube* 2 ml yang telah berisis 1 ml buffer ekstraksi pH 8 (100 Mm Tris, 50 Mm EDTA, 500 Mm NaCl), 50  $\mu$ l SDS 20% dan 1,25  $\mu$ l *-mercaptoetanol*, divortex sampai homogen, diinkubasi pada suhu 65<sup>0</sup>C, 10 menit. Kemudian ditambahkan 500  $\mu$ l *Potassium acetate* 5 M, tube dibolak-balik perlahan (*swirling*), diinkubasi dalam es selama 10 menit. Selanjutnya, disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4<sup>0</sup>C selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke *microtube* baru, ditambahkan 625  $\mu$ l isopropanol, diswirling dan dipresipitasi dengan diinkubasi -20<sup>0</sup>C, selama 1 jam. Setelah proses presipitasi, dilakukan sentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4<sup>0</sup>C, selama 10 menit untuk mendapatkan pellet. Pellet yang didapatkan ditambah 500  $\mu$ l buffer TE dan 15  $\mu$ l RNase, diinkubasi pada 37<sup>0</sup>C selama 1 jam. Proses pemurnian DNA dilakukan dengan penambahan larutan PCI 500  $\mu$ l, divortex dan disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4<sup>0</sup>C, selama 10 menit. Supernatan yang didapatkan, dipindahkan ke *microtube* baru, ditambah chloroform equal volume supernatan, divortex dan disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4<sup>0</sup>C, selama 10 menit. Lapisan bagian atas dipindah ke *microtube* baru, ditambah 0,8 x isopropanol dan 0,2 x NaAC, diswirling, diinkubasi pada -20<sup>0</sup>C selama 1 jam. Setelah proses presipitasi, disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4<sup>0</sup>C, selama 10 menit. Pellet dicuci dengan 1 ml etanol 70%, disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4<sup>0</sup>C selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet dikeringkan dengan *vacum dry* dan ditambahkan 30  $\mu$ l buffer TE.

DNA genom hasil isolasi diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. DNA genom divisualisasi dengan elektroforesis pada 1% *agarose gel* untuk mengetahui kualitas

DNA. Kemudian dilakukan analisis menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

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

Analisis PCR dilakukan untuk konfirmasi keberadaan gen target pada plasmid yang diinsersikan pada *A. tumefaciens* dan mendeteksi keberadaan gen target pada genom tanaman yang telah ditransformasi. PCR dilakukan menggunakan primer *forward* dengan sekuen primer hpt-F (5'-CCGCAAGGAATCGGTCAATA-3') dan *reverse* dengan sekuen primer hpt-R (5'-CCCAAGCTGCATCATCGAAA-3') dari *hptII* (*hygromycin phosphotransferase*) berukuran 470 bp.

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan *Intron Master Mix* yang komposisinya terdiri dari *i-Taq DNA Polymerase*, dNTPs, *PCR Reaction Buffer*, *Gel loading buffer*, *distilled water*. Dalam satu kali reaksi memiliki total volume 20 µl dengan larutan yang terdiri dari 2X *PCR Master Mix* 10 µl, masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) 1 µl, *DNA template* 2 µl dan ddH<sub>2</sub>O 6 µl. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus yang meliputi tahapan antara lain *predenaturation* 94<sup>0</sup>C selama 2 menit, *denaturation* 94<sup>0</sup>C selama 20 detik, *annealing* 59<sup>0</sup>C selama 10 detik, *elongation* 72<sup>0</sup>C selama 50 detik dan *final elongation* 72<sup>0</sup>C selama 5 menit.

DNA yang telah teramplifikasi oleh PCR dipisahkan dengan 1% *agarose gel* elektroforesis yang mengandung 3 µl *ethidium bromide* dengan tegangan 100 V selama 25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* (iNtRON BIOTECHNOLOGY) sebanyak 4 µl untuk melihat pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat di *UV mini transiluminator* dan didokumentasikan dengan kamera.

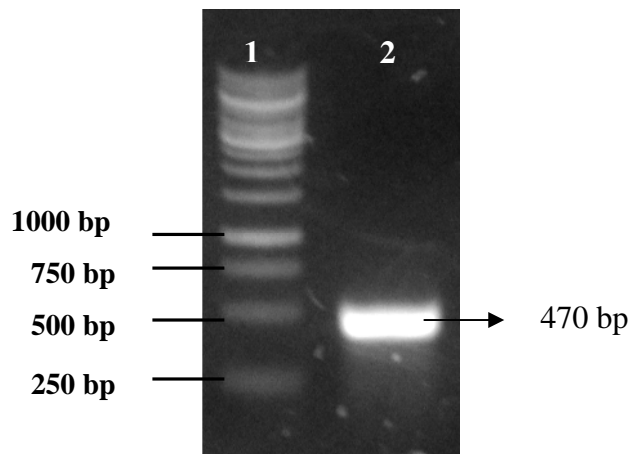
Pada tanaman yang telah dianalisis PCR dan dinyatakan positif transforman, dilakukan perhitungan efektifitas transformasi tanaman positif transforman. Efektifitas transformasi tanaman positif transforman dihitung berdasarkan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah tanaman yang positif transforman}}{\text{Jumlah eksplan awal}} \times 100\%$$

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Konfirmasi Keberadaan Plasmid *pAct-SoSUT1* Dalam *Agrobacterium tumefaciens*

Konfirmasi keberadaan plasmid *pAct-SoSUT1* dalam *A. tumefaciens* strain GV 3101 dilakukan melalui analisis PCR dengan menggunakan *template* DNA plasmid dan primer 1F/1R *hptII*. Berdasarkan hasil elektroforesis DNA plasmid *pAct* dibandingkan dengan Marker 1 kb DNA *Ladder*, terlihat pita DNA berukuran 470 bp sesuai dengan panjang DNA *hpt II* yang teramplifikasi dengan primer *foward* dan *reverse hpt II* (Gambar 4.1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa konstruk *pAct-SoSUT1* telah terinsersi di dalam sel *A. tumefaciens* strain GV 3101.



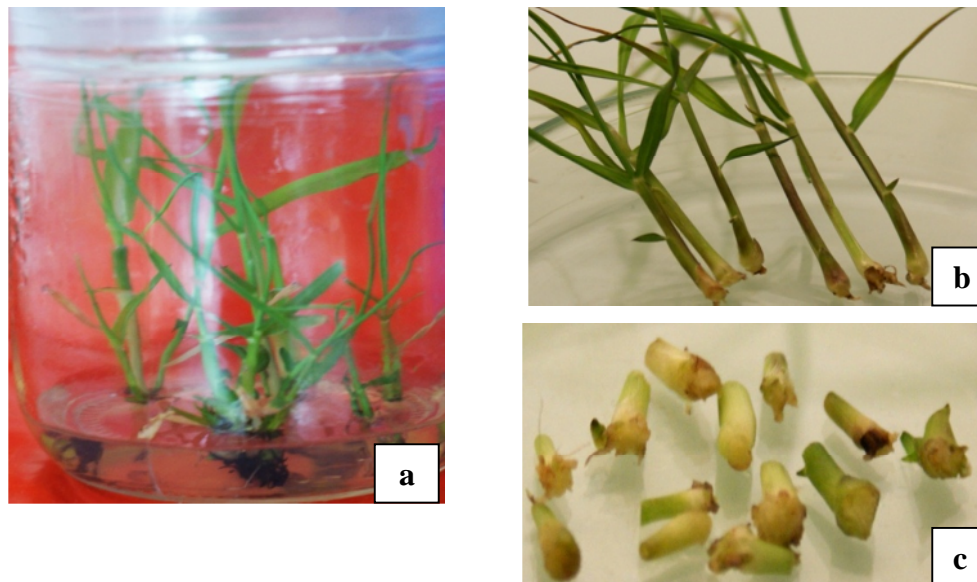
Gambar 4.1 Elektroforesis DNA plasmid *A. tumefaciens* GV 3101 *pAct-SoSUT1* hasil PCR menggunakan primer 1F/1R *hptII*. Baris 1 Marker 1 kb Ladder; 2 DNA plasmid

Konstruk plasmid tersebut tersusun atas gen *SoSUT1* sebagai *gene of interest* (goi) yang dikendalikan oleh promoter untuk gen *rice actin*. Promoter *rice actin* merupakan promoter konstitutif yang menghasilkan produk transgen dengan target

ekspresi di seluruh jaringan tanaman (McElroy *et al.*, 1991). Selain gen target terdapat gen *hpt II* (*hygromycin phosphotransferase*) sebagai *selectable marker* untuk menyeleksi tanaman transforman dengan mengkode ketahanan terhadap antibiotik hygromicin dan gen *nptII* (*neomycin phosphotransferase*) sebagai gen ketahanan *A. tumefaciens* terhadap antibiotik kanamycin.

#### 4.2 Transformasi Gen *SoSUTI* Pada Tanaman Tebu

Proses transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* meliputi beberapa tahapan yaitu infeksi, kokultivasi, eliminasi dan seleksi. Eksplan yang digunakan dalam transformasi genetik pada tanaman tebu adalah bagian pangkal tunas tebu *in vitro*. Perbanyak planlet tebu pada media MS<sub>0</sub> dilakukan untuk mendapatkan jumlah eksplan yang dibutuhkan selama proses transformasi. Pertumbuhan eksplan pada media MS<sub>0</sub> ditampilkan pada Gambar 4.2a. Planlet yang dipilih sebagai eksplan transformasi merupakan planlet yang memiliki pertumbuhan yang baik dengan diameter batang planlet  $\pm 3$ mm (Gambar 4.2b) dan bagian pangkal tunas tebu *in vitro* diambil dengan ukuran panjang  $\pm 5$  mm digunakan sebagai eksplan transformasi yang ditampilkan pada Gambar 4.2c.

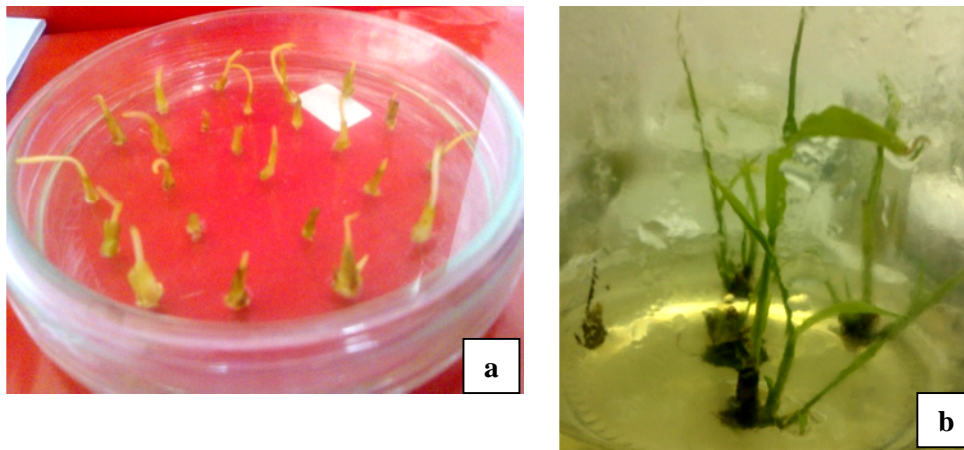


Gambar 4.2 a. Perbanyak planlet tebu *in vitro* pada media MS<sub>0</sub>; b. Planlet yang telah dipisahkan dari rumpun sebelum diambil bagian pangkal tunasnya; c. Pangkal tunas tebu *in vitro* berukuran panjang  $\pm 5$  mm sebagai eksplan transformasi.

Proses infeksi eksplan bertujuan untuk menarik *A.tumefaciens* dalam menginfeksi tanaman inang dengan penambahan senyawa fenolik *acetosyringone*. Senyawa fenolik *acetosyringone* merupakan sinyal transkripsi gen *vir* yang berperan dalam mekanisme transfer gen (Rahmawati, 2006). Setelah tahap infeksi eksplan memasuki tahapan kokultivasi yang bertujuan untuk menumbuhkan bersama antara eksplan dan *A.tumefaciens*. Selama tahapan tersebut terjadi integrasi T-DNA ke dalam tanaman. Gambar 4.3a menunjukkan tumbuhnya tunas selama eksplan ditumbuhkan pada media kokultivasi.

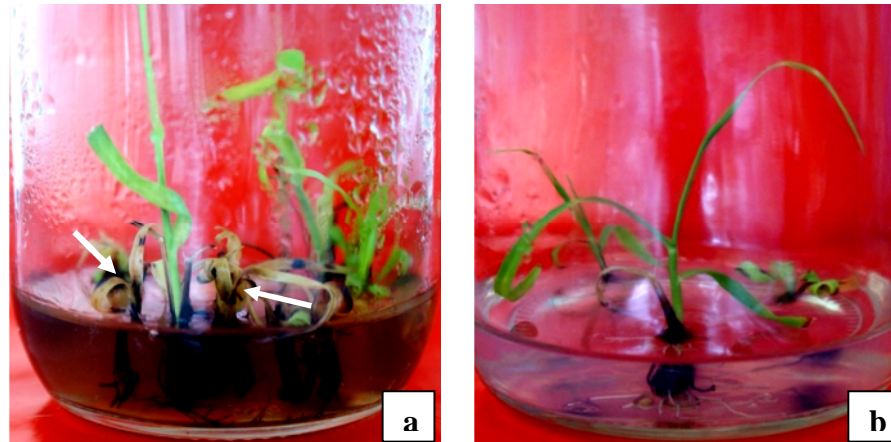
*A. tumefaciens* yang telah ditumbuhkan bersama eksplan pada tahap kokultivasi harus dihilangkan agar tidak menghambat pertumbuhan eksplan yang tertransformasi. Gambar 4.3b menunjukkan eksplan transformasi mampu tumbuh pada media eliminasi yang mengandung antibiotik *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> dan tidak terjadi pertumbuhan berlebih (*overgrowth*) *A. tumefaciens* disekitar eksplan. *Cefotaxime* merupakan salah satu antibiotik dari golongan sefalosporin yang sangat

aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri terutama Gram negatif dengan menghambat sintesis peptidoglikan dinding sel bakteri (Mathias and Boyd, 1986).



Gambar 4.3 Tahapan transformasi: a. Pertumbuhan eksplan pada media kokultivasi (MS + acetosyringone  $100 \text{ mgL}^{-1}$ ) umur 3 hari; b. Pertumbuhan eksplan pada media eliminasi (MS + cefotaxime  $500 \text{ mgL}^{-1}$ ) umur 7 hari.

Seleksi tanaman transforman dan non transforman dilakukan dengan menumbuhkan eksplan pada media yang mengandung antibiotik *hygromycin* sebagai *selectable marker*. Proses seleksi dilakukan 5 kali untuk meminimalisasi *chimera* dan *escape* (Manickasavagam *et al.*, 2004). Konsentrasi *hygromycin* digunakan secara bertingkat yaitu  $10$ ,  $20$  dan  $25 \text{ mgL}^{-1}$  untuk meningkatkan efektifitas antibiotik *hygromycin* dalam menyeleksi tanaman yang telah ditransformasi. Kematian tunas *in vitro* lebih lambat pada media MS dengan konsentrasi antibiotik yang rendah dan lebih cepat pada media MS dengan konsentrasi antibiotik yang tinggi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hazmi (2009) persentase kematian tunas *in vitro* pada media MS dengan penambahan antibiotik *hygromycin*  $30$ ,  $40$  dan  $50 \text{ mgL}^{-1}$  mencapai  $100\%$  pada hari ke-28 setelah tanam, sehingga pada penelitian ini digunakan konsentrasi higromycin sampai  $25 \text{ mgL}^{-1}$ . Pertumbuhan planlet pada media seleksi ditunjukkan pada Gambar 4.4.



Gambar 4.4 a. Pertumbuhan eksplan pada media seleksi 3 (MS + *hygromycin* 20 mgL<sup>-1</sup>) tampak beberapa planlet tebu mengalami pencoklatan dan mati; b. Eksplan yang mampu bertahan sampai seleksi 5 ( media MS + *hygromycin* 25 mgL<sup>-1</sup>).

Eksplan yang mengalami pencoklatan (*browning*) dan mati pada media seleksi merupakan eksplan non transforman (Gambar 4.4a). *Hygromycin* dapat menghambat pertumbuhan tanaman dengan menghambat proses sintesis protein yaitu pada proses translasi tRNA dan mRNA dengan berikatan dengan faktor elongasi. Sehingga menyebabkan jaringan tanaman mengalami gejala *browning* dan mati (Gritz and Davies, 1983). Berbeda dengan eksplan yang telah terintegrasi gen *hpt II* yang merupakan gen ketahanan antibiotik *hygromycin* akan mampu bertahan pada media seleksi (Gambar 4.4b). Interaksi antara enzim fosfatase yang dihasilkan gen *hpt II* dengan antibiotik penyeleksi *hygromycin* menghasilkan ketahanan eksplan terhadap antibiotik tersebut. Gen *hpt II* mengkode enzim *hygromycin 4'-phosphotransferase* yang berperan dalam fosforilasi gugus *hydroxyl* pada antibiotik *hygromycin*, kemudian menginaktifkannya sehingga antibiotik *hygromycin* tidak bersifat racun bagi tanaman (Arago and Brasileiro, 2002).

Proses transformasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali sebagai ulangan. Tiap tahapan transformasi dihitung jumlah eksplan yang mampu tumbuh pada media kokultivasi, eliminasi dan media seleksi untuk mengetahui persentase tanaman yang mampu tumbuh sampai akhir seleksi 5 (Tabel 4.1).

Tabel 4.1 Efektifitas transformasi dalam bentuk persentase jumlah planlet yang mampu tumbuh pada tiap tahapan seleksi

Transformasi	Jumlah planlet pada tiap tahapan (%)						
	K	E	S 1	S 2	S 3	S4	S 5
1	100%	100%	70,11	70,11	62,06%	37,93%	11,49%
2	100 %	100 %	87,69%	80%	73,85%	49,23%	15,38%
3	100%	94, 54%	61,81%	38,18%	18,18%	14,54%	10,9%

**Keterangan :**

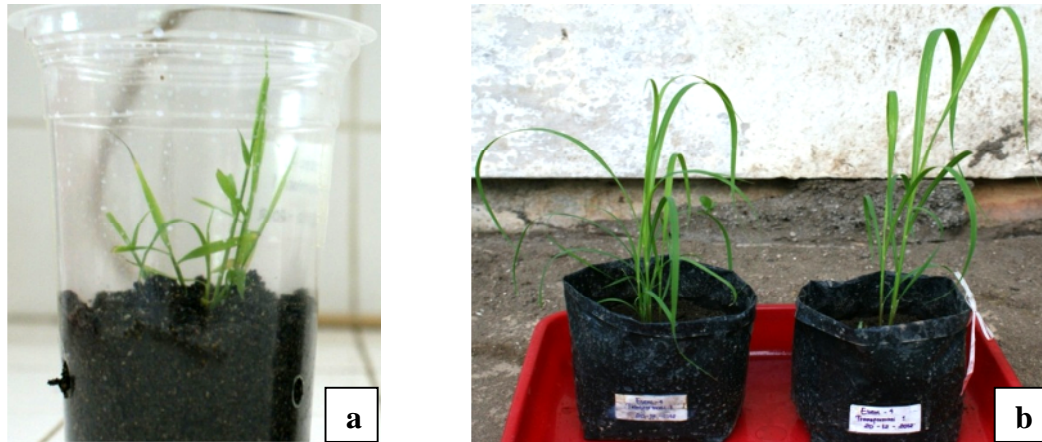
K = Kokultivasi, E = Eliminasi dan S = Seleksi 1 (*hygromycin* 10 mgL<sup>-1</sup>); Seleksi 2 – Seleksi 3 (*hygromycin* 20 mgL<sup>-1</sup>); Seleksi 4 – Seleksi 5 (*hygromycin* 25 mgL<sup>-1</sup>).

Tabel diatas menunjukkan persentase jumlah planlet yang mampu bertahan pada media seleksi yang mengandung antibiotik *hygromicin*. Pada transformasi pertama dihasilkan 11,49%, transformasi kedua 15,38% dan pada transformasi ketiga dihasilkan 10,9% dengan jumlah awal eksplan 87 pada transformasi pertama, 65 pada transformasi kedua dan 55 pada transformasi ketiga dinyatakan dalam 100%. Berdasarkan persentase jumlah planlet dari masing-masing transformasi tersebut, penggunaan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* menghasilkan efektifitas transformasi yang lebih tinggi dibanding menggunakan eksplan kalus yaitu hanya 1% (Purnamasari, 2011).

### 4.3 Aklimatisasi Planlet Tebu *In Vitro*

Aklimatisasi dilakukan pada planlet tebu yang telah berhasil melewati seleksi 5, yang merupakan tanaman putatif transforman. Aklimatisasi bertujuan untuk mengkondisikan tanaman dari kondisi *in vitro* ke lingkungan *in vivo*. Proses aklimatisasi dimulai dengan menumbuhkan tanaman tebu pada media pasir steril (Gambar 4.5a). Pemilihan media pasir karena teksturnya yang mudah menyerap dan melepaskan air agar kelembapan tetap terjaga.



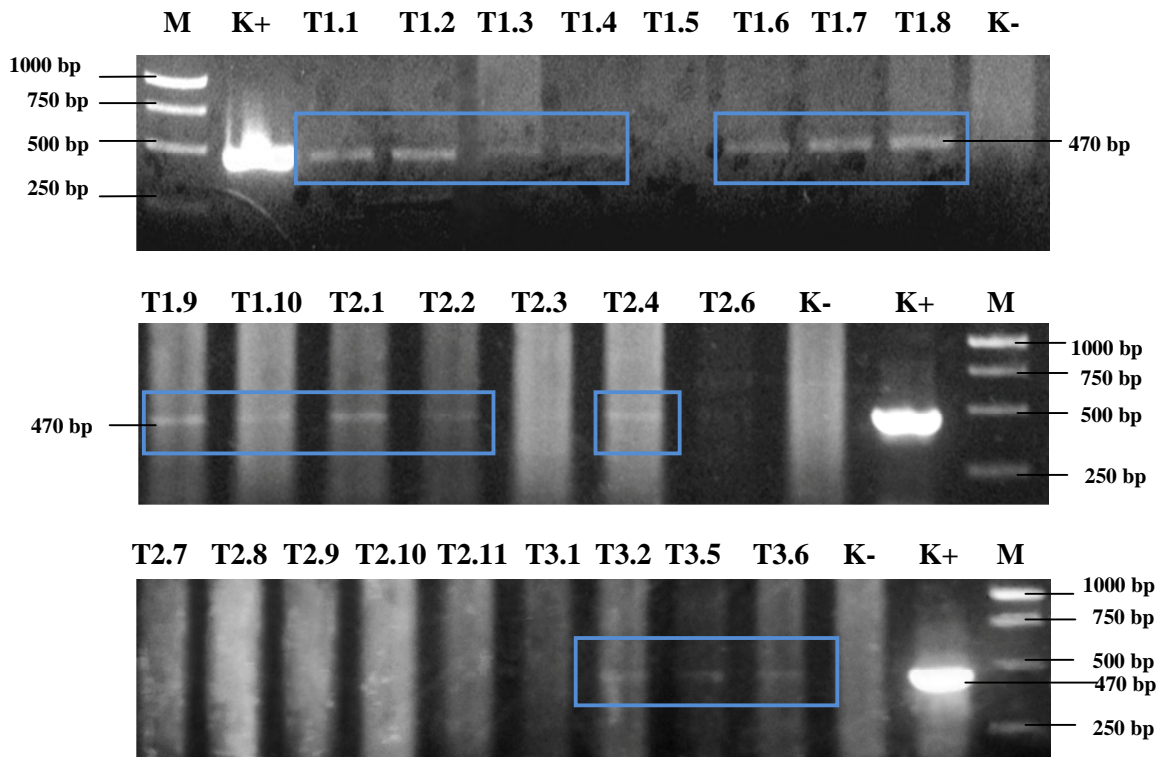


Gambar 4.5 a. Aklimatisasi pada media pasir steril; b. Aklimatisasi pada media tanah

Tanaman putatif transforman yang didapatkan dari transformasi pertama dan kedua seluruhnya berhasil diaklimatisasi, masing-masing sebanyak 10 tanaman. Sedangkan pada transformasi ketiga tidak semua tanaman berhasil diaklimatisasi, hanya 4 tanaman yang berhasil diaklimatisasi. Tanaman tebu yang telah diaklimatisasi pada media pasir steril, ditumbuhkan pada media tanah. Tanaman putatif transforman yang berumur  $\pm 1$  bulan (Gambar 4.5b) dapat diambil bagian daunnya untuk dilakukan isolasi DNA genom.

#### 4.4 Analisis PCR Tanaman Tebu Putatif Transforman Gen *SoSUT1*

Keberhasilan transformasi genetik ditentukan oleh terintegrasinya gen target ke dalam genom tanaman yang dapat dilakukan dengan analisis PCR. Berdasarkan elektroforesis DNA hasil PCR (Gambar 4.6) dari 24 tanaman putatif transforman didapatkan 15 tanaman tebu transforman yang positif mengandung mengandung gen *hptII*, sehingga dapat dikatakan juga mengandung gen target *SoSUT1*. Efektifitas rata-rata transformasi gen *SoSUT1* menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* adalah sebesar 6,8%.



Gambar 4.6 Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer 1F/1R *hpt II*. M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid *pAct-SoSUT1* (kontrol positif); K-: tanaman tebu *wildtype*; T1.1 – T3.6: sampel DNA tanaman tebu yang telah ditransformasi

Pada transformasi pertama didapatkan 9 tanaman positif transforman dan transformasi kedua didapatkan 3 tanaman positif transforman, masing-masing dari 10 tanaman putatif transforman. Sedangkan pada transformasi ketiga didapatkan 3 tanaman positif transforman dari 4 tanaman putatif transforman (Gambar 4.6). Efektifitas pada masing-masing transformasi berturut-turut sebesar 10,34 %, 4,6% dan 5,45%. Kode T1.1, T1.2, T1.3, T1.4, T1.6, T1.7, T1.8, T1.9, T1.10 dari transformasi pertama; kode T2.1, T2.2, T2.4 dari transformasi kedua dan kode T3.2, T3.5, T3.6 dari transformasi ketiga merupakan tanaman tebu positif transforman. Dari 24 tanaman putatif transforman yang dianalisis, terdapat 9 tanaman yang dinyatakan

sebagai tebu non transforman dengan tidak terdeteksi adanya pita DNA *hptII*. Hal ini disebabkan karena adanya perlindungan sel non transforman (*escape*) oleh sel transforman sehingga sel tanaman tersebut bersifat *chimera* (belum homogen) (Dong and Hughen, 1993).

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pada analisis PCR didapatkan 15 tanaman positif transforman mengandung gen *hpt II* dan gen *SoSUT1* dengan efektifitas transformasi dari transformasi pertama sampai ketiga berturut-turut sebesar 10,34% ; 4,6% dan 5,45% dengan kode sampel T1.1, T1.2, T1.3, T1.4, T1.6, T1.7, T1.8, T1.9, T1.10 dari transformasi pertama, kode T2.1, T2.2, T2.4 dari transformasi kedua dan kode T3.2, T3.5, T3.6 dari transformasi ketiga. Efektifitas rata-rata transformasi gen *SoSUT1* dalam konstruk plasmid *pAct-SoSUT1* menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* sebesar 6,8%.

### 5.2 Saran

Pada penelitian ini proses analisis tanaman transforman hanya berdasarkan analisis PCR, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai analisis biokimia untuk mengetahui pengaruh transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu.

## DAFTAR PUSTAKA

### Buku

- Buchanan, B.B., W. Gruissem and R. L. Jones. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. USA: American Society of Plant Physiologist.
- Campbell, N.A., J.B Reece dan L.G. Mithcell. 2002. *Biologi Jilid 1*. Terjemahan oleh Rahayu. Jakarta: Erlangga.
- Sambrook, J., E.F Fritsch and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

### Terbitan Berkala

- Aoki, Hirose, Scofield, Whitfield, and Furbank. 2003. The Sucrose Transporter Gene Family In Rice. *Plant and Cell Physiology*. Vol. 44: 223-232.
- Arago, F. and Brasileo, C. 2002. Positive, Negative and Marker-free Strategies for Transgenic Plant Selection. *Braz. J. Plant Physiol.* Vol. 14 (1): 1-10.
- Binns, A.N. and Thomashow, M.F. 1988. Cell Biology of *Agrobacterium* Infection and Transformation of Plants. *Annual Review of Microbiology*. Vol. 42: 575-606.
- Cheng, W.H., K. H. Im, and P. S. Chourey. 1996. Sucrose Phosphate Synthase Expression at The Cell and Tissue Level is Coordinated With Sucrose Sink to Source Transitions in Maize Leaf. *Plant Physiol*. Vol. 111 : 1021-1029.
- Dai, Zheng, Marmey, Zhang, Tian, Chen, Beachy, and Fauquet. 2001. Comparative Analysis of Transgenic Rice Plants Obtained by *Agrobacterium*-Mediated Transformation and Particle Bombardment. *Mol. Breed*. Vol. 7: 25-33.
- de la Riva, Cabrera, Padron, and Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A Natural Tool for Plant Transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 1 (3) : 1-16.

- Dong, J. And McHughen, A. 1993. Transgenic Flax Plants from *Agrobacterium*-mediated Transformation" Incidence of Chimeric Regenerants and Inheritance of Transgenic Plants. *Plant Science*. Vol. 91: 139-148.
- Gritz,L. and Davies J. 1983. Plasmid-encoded Hygromycin B Resistance: The Sequence of Hygromycin B Phosphotransferase Gene and Its Expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. Vol. 25 (2-3): 179-188.
- Kakkar, A. and Verma, V. 2011. *Agrobacterium* Mediated Biotransformation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 1 (7): 29-35.
- Kim, Mahe, Brangeon and Prioul. 2000. Amaize Vacuolar Invertase IVR2 is Induced By Water Stress. Organ / Tissue Specificity and Diurnal Modulation of Expression. *Plant Physiol*. Vol. 124: 71-84.
- Krugel, Veenhoff, Langbein, Wiederhold, Liesche, Friedich, Grimm, Martioia, Poolman, and Kuhn. 2008. Transport and Sorting of *Solanum tuberosum* Sucrose Transporter SUT1 is Affected by Posttranslational Modification. *Plant Cell*. Vol. 20: 1-17.
- Kuhn, C. 2003. A Comparation of the Sucrose Transporter System of Different Plant Species. *Plant Biol*. Vol. 5: 215-232.
- Kuhn, Hajirezaei, Fernie, Tunali, Czechowski, Hirner and Frommer. 2003. The Sucrose Transporter *StSUT1* Localizes to Sieve Elements in Potato Tuber Phloem and Influences Tuber Physiology and Development. *Plant Physiology*. Vol. 131: 102–113.
- Lalonde, Tegeder, Frommer and Patrick. 2003. Phloem Loading and Unloading of Sugar and Amino Acids. *Plant Cell Environ*. Vol. 5: 37-53.
- Lessard, Kulaveerasingam, York, Strong and Sinskey. 2002. Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants. *Metabolic Engineering*. Vol. 4: 67–79.
- Manickavasagam, Ganapathi, Anbazhagan, Sudhakar, Selvaraj, Vasudevan and Kasthuriengan. 2004. *Agrobacterium* Mediated Genetic Transformation and Development of Herbicide Resistant Sugarcane (*Saccharum Species Hybrids*) Using Axillary Buds. *Plant Cell Rep*. Vol. 23: 134–143.

- Mathias, R.J. and L.A. Boyd, 1986. Cefotaxime Stimulates Callus Growth, Embryogenesis and Regeneration in Hexaploid Bread Wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). *Plant Sci.* Vol. 46:217-223.
- McElroy, Blowers, Jenes and Wu. 1991. Construction of Expression Vectors Based on The Rice actin 1 (*Act1*) 5' Region for Use in Monocot Transformation. *Mol Gen Genet.* Vol. 231 : 150-160.
- Nadar H. M. And Heinz D.J. 1977. Root and Shoot Development from Sugarcane Callus Tissue. *Crop Sci.* Vol. 17: 814–816.
- Rae, A., Perroux, J.M. and Grof, C.P.L. 2005. Sucrose Partitioning Vascular Bundles and Storage Parenchyma In Sugarcane Stem: A Potential Role for *ShSUT1* Sucrose Transporter. *Planta.* Vol. 220: 817-825.
- Rahmawati, S. 2006. Status Perkembangan Perbaikan Sifat Genetik Padi Menggunakan Transformasi *Agrobacterium*. *Jurnal AgroBiogen.* Vol. 2 (1): 36-44.
- Raza, Ali, Mukhtar, Mansoor, Arshad and Asad. 2010. The Response of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Genotypes to Callus Induction, Regeneration and Different Concentrations of The Selective Agent (geneticin-418). *Afr. J. Biotechnology.* Vol. 9 (51): 8739-8747.
- Reismeir, B. Hirner and W.B. Formmer. 1993. Potato Sucrose Transporter Expression in Minor Veins Indicated a Role in Phloem Loading. *The Plant Cell.* Vol. 5: 1591-1598.
- Rose, S. and F.C. Botha. 2000. Distribution Patterns of Neutral Invertase and Sugar Content in Sugarcane Internodal Tissues. *Plant Physiol. Biochem.* Vol. 38 : 819-824.
- Truernit, E. 2001. Plant Physiology: The Importance of Sucrose transporters. *Current Biology.* Vol. 11: 169-171.
- Tzfira, T. and Citovsky, V. 2006. *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation of Plants: Biology and Biotechnology. *Plant Biotechnology.* Vol. 17:147–154.
- Zupan, J.R. and Zambryski, P.C. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to The Plant Cell. *Plant Physiology.* Vol. 107: 1041-1047.

**Tidak Dipublikasikan**

- Hazmi, M. 2009. Pengembangan Metode Transformasi Melalui *Agrobacterium tumefaciens* Pada Eksplan Pangkal Tunas Tebu In Vitro. *Disertasi*. Malang: Progam Pascasarjana Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya.
- Purnamasari, A. 2011. Transformasi Tanaman Tebu Tebu (*Saccharum Officinarum* L. var BL) Dengan Gen *SoSUT1* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 dan Eksplan Kalus. *Skripsi*. Jember: Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Sugiharto, B., Slameto dan Dewanti, P. 2008. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen SPS dan SUT Pada Tanaman Tebu. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi. *Unpublish*.
- Sugiharto, B. 2010. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen *Sucrose Phosphat Synthase* dan *Sucrose Transporter Protein* Pada Tanaman Tebu. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi. *Unpublish*.



## Lampiran A. Komposisi Larutan Stock

### A. 1 Media Stock MS (Murashige and Skoog)

Larutan Stock	Senyawa	Jumlah (g/L)	Pemakaian/ Liter (ml)
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,5	20
B	KNO <sub>3</sub>	95	20
C	CaCl <sub>2</sub>	88	5
D	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,24	5
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34	
	CoCl <sub>2</sub>	0,0124	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,05	
	KI	0,166	
E	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	74	5
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1,72	
	CuSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,0052	
	MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	3,01	
F	Na <sub>2</sub> EDTA	7,44	5
	FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5,56	
Vitamin	Myo-inositol	1 mg/l	5
	Pyridoxine	0,4 mg/l	
	Thiamin	4 mg/l	
	Agar kultur jaringan	14	-
	Phytigel	2,5	-
	Sukrosa	30	-

## A.2 Larutan Stock Hoagland

<b>Solution</b>	<b>Senyawa</b>	<b>Jumlah (g/ml)</b>	<b>Pemakaian/ Liter (ml)</b>
I	500 mM KNO <sub>3</sub>	5,06	15
	150 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3,55	
II	2,5 mM KCl	18,65	1
III	150 mM CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	22,1	0,5
IV	1 M MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	24,7	2
V	1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	15,6	2
	0,3 mM FeEDTA	0,012	
	0,27 mM MnSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,007	
	0,27 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10H <sub>2</sub> O	0,01	

## Lampiran B. Komposisi Media

### B.1 Media YEP (Yeast Extract Peptone)

<b>Komposisi</b>	<b>Jumlah (g/L)</b>
Yeast	10 gram
Peptone	10 gram
NaCl	5 gram
Agar Bacteriologi	14 gram