



**KLONING GEN UNTUK PROTEIN SUCROSE RANSPORTER
DARI DAUN TEBU (*Saccharum officinarum L.*)
MENGUNAKAN METODE RT-PCR**

*Cloning Gene for Sucrose Transporter Protein from Sugarcane Leaf
(*Saccharum officinarum L.*) by RT-PCR Method*

TESIS

Oleh:

**THERESIA GINTING
NIM 061520101011**

**PROGRAM STUDI AGRONOMI
PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS JEMBER
2008**



**KLONING GEN UNTUK PROTEIN SUCROSE RANSPORTER
DARI DAUN TEBU (*Saccharum officinarum L.*)
MENGUNAKAN METODE RT-PCR**

*Cloning Gene for Sucrose Transporter Protein from Sugarcane Leaf
(*Saccharum officinarum L.*) by RT-PCR Method*

TESIS

Diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Agronomi (S2) dan mencapai gelar Magister Pertanian

Oleh:

**THERESIA GINTING
NIM 061520101011**

**PROGRAM STUDI AGRONOMI
PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS JEMBER**

2008

Kloning Gen Untuk Protein Sucrose Transporter dari Daun Tebu (*Saccharum officinarum* L) Menggunakan Metode RT-PCR. THERESIA GINTING, 061520101011; 2008: 45 halaman; Program Studi Agronomi Program Pascasarjana Universitas Jember.

Ringkasan

Pada tanaman tingkat tinggi daun merupakan organ utama dalam proses fotosintesis, yang menghasilkan sukrosa sebagai produk utamanya. Sukrosa dapat ditranslokasikan ke organ lain untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Translokasi sukrosa dalam tanaman difasilitasi oleh protein *Sucrose Transporter* (SUT). Mengingat pentingnya peranan SUT pada tanaman tebu perlu dilakukan penelitian tentang isolasi DNA SUT. Untuk mengisolasi DNA SUT ini digunakan metode RT-PCR. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengkloning (isolasi) *full lenght* cDNA SUT dari daun tebu. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pusat Penelitian Biologi Molekul Universitas Jember mulai Bulan Oktober 2007 sampai dengan Juni 2008.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *full lenght* DNA SUT tebu belum berhasil diisolasi dengan metode RT-PCR. Fragmen cDNA SUT berhasil diisolasi sekitar 1431 bp dengan menggunakan primer *forward* (IF) 5' AGC CTC GGC AGG CTC ATC CTC-3' dan primer *reverse* (IIR) 5' GGA GAT CTT GGG CAG CAG GAA -3'. Hasil squensi mempunyai homologi dengan *Saccharum officinarum* (*ShSUT1*) (Rae *et al.*, 2005) nomor asesi AY780256.1 sebesar 99%, *Zea mays* (*ZmSUT*) (Aoki *et al.*, 1999) nomor aksesinya NM 001111370.1 sebesar 93 % dan *Oryza sativa* (OsSUT) (Hiroze *et al.*, 1997) nomor aksesinya D87819.1 sebesar 83 %.

Isolasi *full length* cDNA SUT daun dilanjutkan dengan metode RACE (*Rapid Amplification Of cDNA End*) untuk menentukan nukleotida pada ujung 5' dan ujung 3'. Hasil isolasi dengan nukleotida RACE ujung 3' menunjukkan bahwa terdapat fragmen cDNA 250 bp. Sequensi fragmen cDNA tersebut menunjukkan

homologi 98,5% dengan *ShSUT1* Rae *et al.*, 2005, pada bagian ujung 3' yang mengandung *stop codon*. Tetapi isolasi RACE ujung 5' hanya menghasilkan fragmen cDNA SUT ujung 5' yang belum mempunyai *start codon* bila dihomologikan dengan *ShSUT* (Rae *et al.*, 2005). Hasil sekuensi menunjukkan 98,5 % sesuai dengan urutan nukleotida SUT daun tebu (Rae *et al.*, 2005) setelah dihomologikan. Sedangkan hasil cDNA Ujung 5' yang mengandung *start codon* belum dapat diisolasi, diduga karena terputusnya N terminal saat isolasi RNA.

Kata kunci : cDNA, RT-PCR, RACE, *Sucrose Transporter* (SUT), Tebu.

Cloning gen for protein sucrose transporter from *saccharum officinarum* L by using RT-PCR method. THERESIA GINTING NIM. 061520101011; 2008; 45 pages: Study Program of Agronomy. Post Graduate Program Jember University.

SUMMARY

In higher level plant, leaf as the main organ in photosynthesis process that produce sucrose as the prime product. Sucrose can be translocated to another organ for encouraging the growth and development of plant. Sucrose translocation in plant is facilitated by protein sucrose transporter (SUT). Isolating DNA SUT by using RT-PCR method. The purpose of this research is to isolate or cloning *full length* cDNA SUT from the leaf of sugar cane (*saccharum officinarum* L). This research is already done in Biology Molecule Center Research Laboratory Jember University in October 2007 to June 2008.

The results of this research shows that full length of DNA SUT sugar cane can not isolated by using RT-PCR method. The fragmen of cDNA SUT fallen in isolation around 1431 bp by using primer forward (IF) 5' AGCCTCGGCAGGCTCATCCTC-3' and primer *reserve* (IIR) 5' GGAGATCTTGGGCAGCAGGAA-3'. This sequencing has homology with *Saccharum officinarum ShSUT1* (Rae *et al.*, 2005) asesi number AY780256.1 is 99%, *Zea mays* (Aoky, N *et al.*, 1999) aksesi number NM 001111370.1 is 93% and *Oryza satiya* (Hiroze, T *et al.*, 1997) aksesi number D87819.1 is 83%.

Isolating full length of cDNA SUT leaf is continued by using RACE method for nucleotides determine in the top 5' and 3'. The result of this isolation by nucleotide RACE top 3' shows that precence of fragment cDNA 250 bp. Those sequencing of fragment cDNA shows that presence homology 98,5% with *ShSUT1* Rae *et al.*, 2005 in the top 3' contains of *stop codon*, but isolation with

RACE method in the top 5' only show fragment cDNA SUT in the top 5' that does not has *start codon* if it is homologized by *ShSUTI* (Rae *et al.*, 2005). The result of sequencing shows that 98,5% is appropriate with sequence of nucleotides SUT of sugar cane leaf (*saccharum officinarum* L.) Rae *et al.*, 2005 after homologized. Whereas, the result of cDNA in the top 5' or it is unknown start codon clearly because of interrupted N terminal.

Keywords: cDNA, RT-PCR, RACE, Sucrose Tranporter (SUT), sugar cane.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul ***Kloning Gen Untuk Protein Sucrose Transporter dari Daun Tebu (Saccharum officinarum L) Menggunakan Metode RT-PCR***. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata dua (S2) pada Program Studi Agronomi Program Pasca Sarjana Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto MSc, selaku Dosen Pembimbing Utama, Dr.Ir. Didik Pudji Restanto, MS selaku Dosen Pembimbing Anggota I, dan Dr. Tri Handoyo, SP selaku Dosen Pembimbing Anggota II yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam penulisan tesis ini;
2. Orang tua dan saudara-saudaraku yang dengan penuh pengertian, kasih sayang dan semangat selalu mendoakan agar terselesainya tesis ini,
3. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto MSc, sebagai ketua Tim Hibah Pasca XII DIKTI, dan seluruh pihak Laboratorium Biologi Molekul yang telah memberikan kesempatan penulis menimba ilmu.
4. Ir. Slameto, MP sebagai rekan kerjaku yang telah membantu selama penelitian dan slalu memberi masukan serta dorongan semangat.
5. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan tesis ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tesis ini dapat bermanfaat.

Jember, Juni 2008

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Tebu (Sugarcane)	3
2.2 Sukrosa	4
2.3 Sucrose Transporter (SUT)	5
2.4 Complementary DNA (cDNA)	6
2.5 Kloning cDNA sucrose transporter	7
BAB 3. BAHAN DAN METODE	9
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	9
3.2 Bahan dan Alat	9
3.3 Metode Penelitian	9
3.3.1 Isolasi Total RNA	9
3.3.2 Desain Primer	10
3.3.3 Metode RT-PCR	11

3.3.4 Metode RACE untuk mengisolasi cDNA ujung 5' dan ujung 3'	12
3.3.5 Pembuatan sel kompeten Escherichia coli strain XL...	15
3.3.6 Ligasi Hasil RT-PCR dengan vector pGEMT Easy ...	16
3.3.7 Transformasi DNA	16
3.3.8 Isolasi Plasmid DNA	17
3.3.9 Analisis Enzim Retriksi	17
3.3.10 Analisis Sekuensi	18
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1 Hasil	19
4.1.1 Isolasi (kloning) cDNA SUT dengan RT-PCR.....	19
4.1.2 Isolasi Fragmen cDNA SUT ujung 5' dan ujung 3' dengan RACE	29
4.2 Pembahasan	36
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	42
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
1	Prinsip Kerja Metode RT-PCR.....	11
2	Skema Kerja Untuk Mendapatkan cDNA Ujung 5'	13
3	Hasil Elektroforesis Total RNA.....	19
4	Hasil cDNA Menggunakan Primer Start dan Stop codon dengan RT-PCR	20
5	Homologi Asam Amino dari ShSUT1, OsSUT1, HvSUT1 Untuk Desain Primer Forward IF dan Reverse IIR	21
6	Hasil Elektroforesis cDNA 1400 kb dengan RT-PCR dengan Menggunakan desain Primer IF dan IIR	22
7	Hasil Elektroforesis Isolasi Fragmen cDNA	23
8	Hasil Sequensi Fragmen cDNA.....	25
9	Hasil Homologi Fragmen cDNA	27
10	Peta Posisi Primer Untuk RT-PCR Star F, Stop R, IF dan IIR	29
11	Hasil Elektroforesis cDNA Ujung 3' dengan Metode RACE	30
12	Hasil Elektroforesis Isolasi cDNA Ujung 3'.....	31
13	Hasil Sequensi cDNA Ujung 3'	32
14	Hasil Homologi cDNA Ujung 3'	32
15	Hasil PCR dengan Neo 2 dan Neo 3 sebagai Kontrol Reaksi..	34
16	Hasil PCR Sintesis cDNA Ujung 5' Purifikasi.....	34
17	Hasil Elektroforesis Isolasi cDNA Ujung 5' dengan SP2.....	35
18	Hasil Sequensi cDNA Ujung 5' dengan SP2.....	36
19	Hasil Homologi cDNA Ujung 5' dengan SP2.....	36
20	Hasil Sequensi dan Homologi cDNA Ujung 5' dengan SPI...	37

DAFTAR LAMPIRAN

1 Tahap Pelaksanaan Penelitian

Halaman

46