



**TRANSFORMASI GEN *SoSPS1* PADA TANAMAN TEBU (*Saccharum  
offcinarum* L. var. BL) OVEREKSPRESI GEN *SoSUT1 EVENT 2*  
MENGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens***

**SKRIPSI**

Oleh

**Rinda Media Ningtyas  
NIM 081810401021**

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

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Bapak Sumedi dan ibu Sri Wahyuni atas segala dukungan, kasih sayang dan doa yang tiada henti;
2. kakak Rista Eka Wahyu dan adik Tantri Yosica Restu atas sumber motivasinya;
3. para guru sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu, mendidik, membimbing dengan penuh ikhlas dan kesabaran;
4. Almamater Universitas Jember.

## **MOTTO**

“Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan.

Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain.”

(Surat Alam nasyrah, ayat 6 dan 7)<sup>i</sup>

---

i. Yayasan Penyelenggara Penterjemah/Pentafsir Alqur'an. 1971. Al Quran dan Terjemahan. Saudi Arabia

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Rinda Media Ningtyas

NIM : 081810401021

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Transformasi Gen *SoSPSI* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Overekspresi Gen *SoSUTI* Event 2 Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh MP3EI dan PT. Perkebunan Nusantara XI tahun 2012/2013 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 26 Mei 2013

Yang menyatakan,

Rinda Media Ningtyas

NIM 081810401021

## SKRIPSI

### **TRANSFORMASI GEN *SoSPS1* PADA TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L. var. BL) OVEREKSPRESI GEN *SoSUT1 EVENT 2* MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens***

Oleh

Rinda Media Ningtyas

NIM 081810401021

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 *SoSPSI* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Overekspresi Gen *SoSUTI Event 2* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Jember

Tim Penguji :

Dosen Pembimbing Utama,

Prof. Dr. Bambang Sugiharto M. Agr. Sc  
NIP 195510221982121001

Penguji I,

Dra. Dwi Setyati M.Si  
NIP 196404171991032001

Dosen Pembimbing Anggota,

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

Penguji II,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini  
NIP 19750913200002001

Mengesahkan  
Dekan,

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

## RINGKASAN

**Transformasi Gen *SoSPSI* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Overekspresi Gen *SoSUT1* Event 2 Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*; Rinda Media Ningtyas; 081810401021; 2013; 28 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.**

Transformasi genetik pada tanaman adalah suatu upaya memasukkan gen target yang diisolasi dari suatu organisme ke dalam sel tanaman. Metode transformasi secara tidak langsung menggunakan *A. tumefaciens* lebih sering digunakan karena dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium yang sederhana serta jumlah *copy* gen yang diintegrasikan ke genomik tanaman berjumlah sedikit. *SoSPSI* adalah cDNA/gen yang menyandikan protein SPS (*Sucrose phosphate synthase*), yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman. Enzim SPS mengkatalisis reaksi pembentukan *sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG). *Sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) menghasilkan sukrosa. Sukrosa disintesis pada jaringan daun selama proses fotosintesis dan kemudian ditranslokasikan ke jaringan penyimpanan oleh protein SUT. Protein SUT adalah protein yang berfungsi sebagai translokator sukrosa dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpan.

Pada penelitian sebelumnya, telah diperoleh tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) overekspresi gen *SoSUT1*. Namun demikian, pada tebu transgenik tersebut tidak terjadi peningkatan biosintesis sukrosa. Oleh karena itu diperlukan overekspresi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* agar terjadi peningkatan baik biosintesis maupun translokasi sukrosa sehingga dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada batang tanaman tebu. Dalam penelitian ini dilakukan transformasi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1*

menggunakan *A. tumefaciens*. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan tanaman tebu transforman overekspresi ganda yaitu gen *SoSPS1* dan gen *SoSUT1*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi persiapan eksplan untuk transformasi, kultur *A. tumefaciens*, isolasi DNA plasmid dan PCR, infeksi *A. tumefaciens* pada eksplan, ko-kultivasi, eliminasi *A. tumefaciens*, seleksi eksplan *putative* transforman, aklimatisasi, isolasi DNA genom tanaman *putative* transforman, dan analisis *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan hasil analisis PCR diperoleh tanaman tebu yang positif overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1* sebanyak 4 tanaman (yang berasal dari 1 tanaman) pada transformasi ke-1 (1,81%), 3 tanaman pada transformasi ke-2 (4,84%) dan 4 tanaman pada transformasi ke-3 (7,14%). Efektivitas rata-rata transformasi gen *SoSPS1* menggunakan *A. tumefaciens* yang mengandung konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* dan dikendalikan oleh promoter *RUBQ2* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* sebesar 4,59%. Keberadaan fragment DNA *hptII* sebesar 470 bp dan DNA *nptII* sebesar 550 bp hasil PCR menunjukkan integrasi konstruk pCL4-*SoSPS1* pada genom tebu transforman sehingga dapat dikatakan sebagai tanaman tebu transgenik overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1*.



## PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah S.W.T yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Transformasi Gen *SoSPSI* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Overekspresi Gen *SoSUTI Event 2* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari 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 telah meluangkan waktu, pikiran, saran serta motivasi dalam penulisan skripsi ini;
2. Dra. Dwi Setyati M.Si dan Dr. rer. nat. Kartika Senjarini selaku dosen penguji yang telah memberi banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
3. Drs. Moh. Imron Rosyidi M.Sc selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan saran dan bimbingan selama menjadi mahasiswa di Universitas Jember;
4. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan FMIPA Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu penulis selama masa perkuliahan;
5. kedua orang tua, kakak, adik dan keluarga besar yang selalu memberikan semangat dan doa serta segala dukungan kepada penulis demi terselesaikannya skripsi ini;

6. Purnama Okviandari M.P yang telah memberikan masukan, dorongan dan semangat selama menjalankan tugas akhir;
7. para sahabat di Laboratorium Biologi Molekuler, terima kasih atas seluruh perhatian, dukungan dan bantuannya dalam menyelesaikan penelitian ini;
8. teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2008 yang telah memberi dukungan dan motivasi;
9. serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

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

Jember, Mei 2013

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xvi
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan dan Manfaat</b> .....	3
1.3.1 Tujuan.....	3
1.3.2 Manfaat.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Transformasi Gen Melalui <i>A. tumefaciens</i></b> .....	4
<b>2.2 Biosintesis Sukrosa dan <i>Sucrose Phosphat Synthase (SPS)</i></b> .....	6
<b>2.3 <i>Sucrose Transporter (SUT)</i> pada Tanaman</b> .....	8

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan .....</b>	<b>9</b>
<b>3.3 Cara Kerja.....</b>	<b>9</b>
3.3.1 Persiapan Eksplan.....	9
3.3.2 Kultur <i>A. tumefaciens</i> .....	9
3.3.3 Isolasi DNA Plasmid dan PCR .....	10
3.3.4 Infeksi <i>A. tumefaciens</i> pada Eksplan.....	11
3.3.5 Ko-kultivasi .....	11
3.3.6 Eliminasi <i>A. tumefaciens</i> .....	12
3.3.7 Seleksi Eksplan <i>Putative</i> Transforman.....	12
3.3.8 Aklimatisasi Tanaman <i>Putative</i> Transforman.....	12
3.3.9 Isolasi DNA Genom Tanaman <i>Putative</i> Transforman.....	13
3.3.10 Analisis <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	14
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Konfirmasi Gen Target pada <i>A.tumefaciens</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Transformasi Gen <i>SoSPSI</i> pada Tanaman Tebu.....</b>	<b>15</b>
<b>4.3 Aklimatisasi Tanaman Tebu <i>In-vitro</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>4.4 Hasil Analisis PCR Tanaman Tebu <i>Putative</i> Transforman         Gen <i>SoSPSI</i> dan Gen <i>SoSUT1</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>24</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>24</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>25</b>
<b>LAMPIRAN-LAMPIRAN</b>	
<b>A. Komposisi Larutan Hoagland.....</b>	<b>29</b>
<b>B. Komposisi Media <i>Murashige and Skoog</i> (MS).....</b>	<b>30</b>
<b>C. Komposisi Media <i>Yeast Extract Peptone</i> (YEP).....</b>	<b>31</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Efektivitas Transformasi Menggunakan Eksplan Tunas Tebu <i>In-vitro</i> dan <i>A. tumefaciens</i> yang Mengandung Konstruksi Plasmid pCL4- <i>SoSPS1</i> Selama 5 Periode Siklus Seleksi.....	19

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Tumor Inducing</i> Plasmid pada <i>A. tumefaciens</i> .....	5
Gambar 2.2 Mekanisme Interaksi <i>A. tumefaciens</i> dengan Sel Tanaman.	6
Gambar 3.1 Peta Konstruksi Plasmid pCLA- <i>SoSPSI</i> .....	10
Gambar 4.1 Hasil Elektroforesis Gel Agarose 1% DNA Hasil PCR dengan Pasangan Primer F/R <i>nptII</i> dan <i>Template</i> DNA Plasmid Bakteri yang Diisolasi dari Bakteri <i>A. tumefaciens</i> Strain GV 3101.....	15
Gambar 4.2 Eksplan Tanaman Tebu pada Media Ko-kultivasi dan Media Eliminasi.....	17
Gambar 4.3 Planlet Tebu pada Media Seleksi dan Media MS0.....	18
Gambar 4.4 Kontaminasi Jamur pada Eksplan Tanaman Tebu yang Ditanam pada Media Seleksi ke-5 pada Transformasi 1.....	20
Gambar 4.5 Tanaman Tebu yang Berhasil di Aklimatisasi Umur 1 Bulan.....	21
Gambar 4.6 Hasil Elektroforesis Gel Agarose 1% DNA Hasil PCR dengan Menggunakan Pasangan Primer <i>hptII</i> F/R dan <i>Template</i> DNA Genom Tebu.....	22
Gambar 4.7 Hasil Elektroforesis Gel Agarose 1% DNA Hasil PCR dengan Menggunakan Pasangan Primer <i>nptII</i> F/R dan <i>Template</i> DNA Genom Tebu.....	23

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Larutan Hoagland .....	29
B. Komposisi Media <i>Murashige and Skoog</i> (MS).....	30
C. Komposisi Media <i>Yeast Extract Pepton</i> (YEP) .....	31

## DAFTAR SINGKATAN

ABS	: Absorbansi
bp	: <i>basepair</i>
BL	: Bulu lawang
<i>CaMV</i>	: <i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	: <i>Complementary deoxyribose nucleic acid</i>
<i>cyt-FBPase</i>	: <i>Cytosol- fructose-1,6-biphosphatase</i>
DNA	: <i>Deoxyribose nucleic acid</i>
EDTA	: <i>Ethylene diamine tetra acetic acid</i>
F	: <i>Forward</i>
F-6-P	: <i>Fructose-6-phosphate</i>
G-6-P	: <i>Glucose-6-Phosphate</i>
GUS	: - Glucoronidase
<i>hptII</i>	: <i>Higromycin phosphotransferaseII</i>
kb	: kilo <i>basepair</i>
LB	: <i>Left border</i>
mRNA	: <i>Messenger ribose nucleic acid</i>
MS	: <i>Murashige and Skoog</i>
NaCl	: <i>Natrium Chlorida</i>
nm	: nano meter
<i>nos</i>	: <i>Nopaline synthase</i>
<i>nptII</i>	: <i>Neomycin phosphotransferaseII</i>
OD	: <i>Optical density</i>
PCI	: <i>Phenol chloroform isoamylalcohol</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>



Pi	: <i>Phosphate anorganik</i>
R	: <i>Reverse</i>
RB	: <i>Right border</i>
<i>RUBQ2</i>	: <i>Rice ubiquitin 2</i>
S-6-P	: <i>Sucrose-6-phosphate</i>
SDS	: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SE/CC	: <i>Sieve element/companion cell</i>
<i>SoSPS1</i>	: <i>Saccharum officinarum Sucrose phosphate synthase 1</i>
<i>SoSUT1</i>	: <i>Saccharum officinarum Sucrose transporter 1</i>
SPP	: <i>Sucrose phosphate phosphatase</i>
SPS	: <i>Sucrose phosphate synthase</i>
SUT	: <i>Sucrose transporter</i>
T-DNA	: <i>Transfer DNA</i>
TE	: <i>Tris-EDTA</i>
Ti-plasmid	: <i>Tumor inducing plasmid</i>
<i>Ubi-1</i>	: <i>Maize ubiquitin 1</i>
UDPG	: <i>Uridine-5- diphospho glucose</i>
UV	: <i>Ultra violet</i>
<i>Vir</i>	: <i>Virulence</i>
YEP	: <i>Yeast extract pepton</i>

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Transformasi genetik pada tanaman adalah suatu upaya memasukkan gen target yang diisolasi dari suatu organisme ke dalam sel tanaman. Proses transformasi genetik pada tanaman dapat dilakukan menggunakan metode secara langsung misalnya penembakan DNA menggunakan partikel *bombardment*, mikroinjeksi, dan elektroporasi, maupun metode secara tidak langsung dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Penerapan proses transformasi genetik secara langsung, memiliki beberapa kelemahan yaitu biaya yang tinggi karena memerlukan perlengkapan khusus dan gen yang tersisip cenderung dalam jumlah salinan yang banyak. Berdasarkan kendala tersebut, metode transformasi secara tidak langsung menggunakan *A. tumefaciens* lebih sering digunakan ( Mohammed dan Abalaka, 2011).

Secara alami *A. tumefaciens* merupakan bakteri tanah yang bersifat patogen pada tanaman. Namun, bakteri *A. tumefaciens* tersebut bermanfaat dalam rekayasa genetik tanaman karena dapat digunakan sebagai vektor untuk transfer gen pada tanaman. Keuntungan penggunaan *A. tumefaciens* dalam proses transformasi genetik pada tanaman adalah dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium yang sederhana serta jumlah *copy* gen yang diintegrasikan ke genomik tanaman berjumlah sedikit (Le *et al.*, 2001). Transformasi menggunakan *A. tumefaciens* pada tanaman tebu telah dilakukan oleh Arencibia *et al.*, (1998) dan berhasil mengekspresikan gen GUS pada kalus tebu. Manickavasagam *et al.*, (2004) berhasil melakukan transformasi gen GUS menggunakan *A. tumefaciens* pada tunas lateral tebu. Hal yang sama telah dilaporkan oleh Miswar *et al.*, (2007) yang berhasil melakukan transformasi gen *SoSPSI* ke dalam genom tanaman tebu menggunakan *A. tumefaciens*.

*SoSPS1* adalah cDNA/gen yang menyandikan protein SPS (*Sucrose phosphate synthase*), yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman (Huber dan Huber, 1996). Enzim SPS mengkatalisis reaksi pembentukan *sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG). *Sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) menghasilkan sukrosa. Sukrosa disintesis pada jaringan daun selama proses fotosintesis dan kemudian ditranslokasikan ke jaringan penyimpanan oleh protein SUT (*Sucrose transporter*) (Barker *et al.*, 2000). Protein SUT adalah protein yang berfungsi sebagai translokator sukrosa dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpanan.

Pada penelitian sebelumnya, telah diperoleh tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) overekspresi gen *SoSUT1* (Sugiharto dan Safitri, 2011). Selanjutnya Oktaria (2012) melaporkan bahwa berdasarkan analisis *western blot* tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* yang mengalami peningkatan kandungan protein SUT1 terdapat pada tanaman transgenik *event 2*. Melalui transformasi gen *SoSPS1* menggunakan *A. tumefaciens* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1 event 2* diharapkan dapat meningkatkan biosintesis sukrosa dan translokasi sukrosa sehingga dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada batang tanaman tebu.

## 1.2 Rumusan Masalah

Tebu overekspresi gen *SoSUT1* dapat meningkatkan translokasi sukrosa pada tanaman tebu. Namun demikian, pada tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* tersebut tidak terjadi peningkatan biosintesis sukrosa. Oleh karena itu diperlukan overekspresi gen *SoSPS1* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* agar terjadi peningkatan baik biosintesis maupun translokasi sukrosa sehingga dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada batang tanaman tebu.

## **1.3 Tujuan dan Manfaat**

### **1.3.1 Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu overekspresi ganda yaitu gen *SoSPSI* dan gen *SoSUTI* melalui transformasi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUTI* menggunakan *A. tumefaciens*.

### **1.3.2 Manfaat**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai model pengembangan untuk perakitan varietas tanaman tebu baru dengan overekspresi ganda gen *SoSPSI* dan gen *SoSUTI* sehingga dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada batang tanaman tebu.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

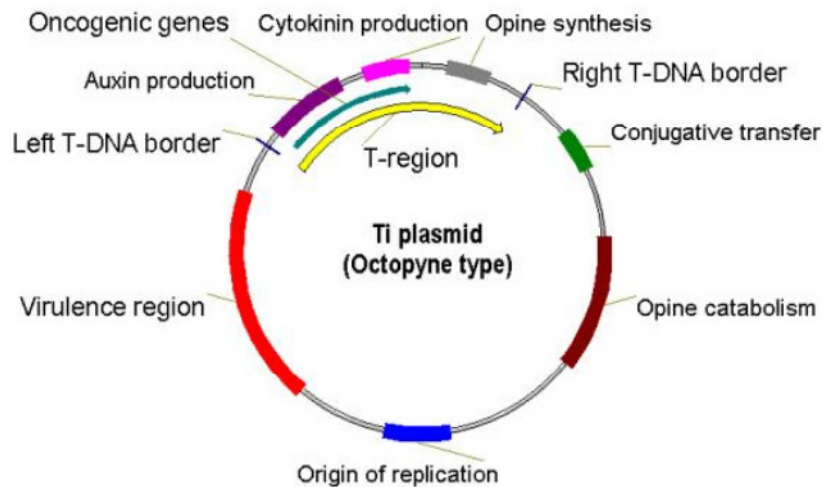
### 2.1 Transformasi Gen Melalui *A. tumefaciens*

Transformasi genetik pada tanaman saat ini telah menjadi suatu metode yang banyak digunakan untuk mendapatkan tanaman komersial dengan karakter yang lebih baik. Proses transfer gen pada tanaman dapat dilakukan dengan metode langsung (*direct method*) dan metode tidak langsung (*indirect method*). Metode langsung misalnya dengan *Particle bombardment* dan *Electroporation*. Sedangkan metode tidak langsung melalui *A. tumefaciens* (Koichi *et al.*, 2002).

*Agrobacterium tumefaciens* merupakan bakteri tanah Gram negatif berbentuk batang. Bakteri ini dapat menyebabkan penyakit tumor pada tanaman, tetapi bermanfaat dalam rekayasa genetik tanaman karena dapat digunakan sebagai vektor untuk transfer gen ke dalam sel tanaman. Secara alami, *A. tumefaciens* mempunyai kemampuan untuk mentransfer potongan DNA-nya yang kemudian dikenal dengan T-DNA (*transfer DNA*) ke dalam genom tanaman dan menyebabkan terbentuknya tumor (*crown gall*) (De la riva *et al.*, 1998). Kemampuan *A. tumefaciens* tersebut kemudian dimanfaatkan untuk menyisipkan gen bermanfaat ke dalam tanaman. Gen-gen yang berperan dalam sintesis hormon dan opine dihilangkan dan diganti dengan gen bermanfaat untuk perbaikan sifat tanaman.

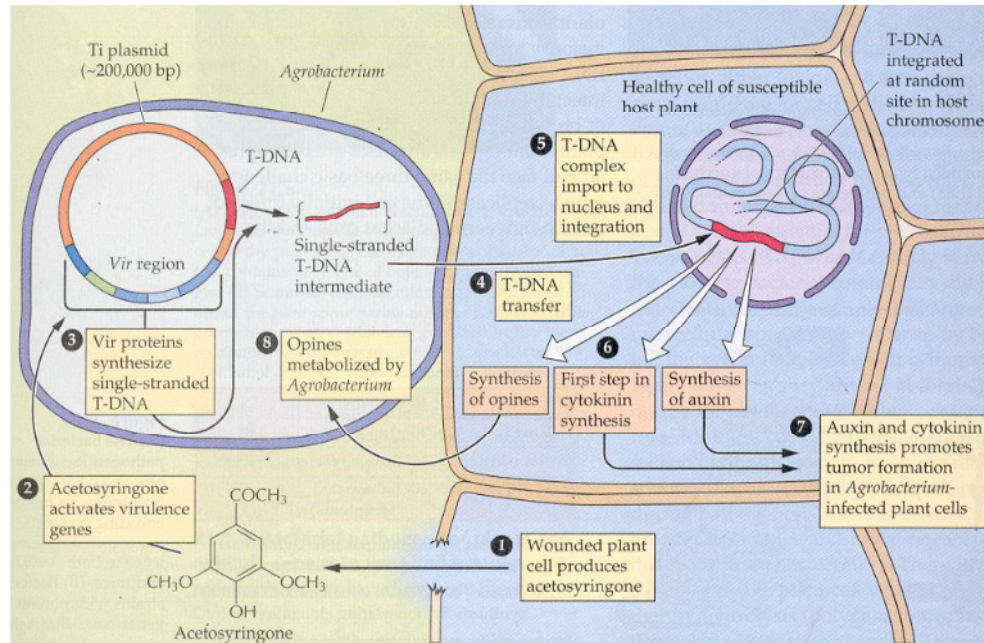
Pada proses pembentukan tumor akibat infeksi *A. tumefaciens* terdapat 3 komponen genetik penting yang terlibat (De la riva *et al.*, 1998). Pertama adalah gen virulen kromosom (*chromosomal virulence*) yang terdapat pada kromosom *A. tumefaciens* dan berfungsi dalam pelekatan bakteri dengan sel tanaman. Kedua, gen virulen yang terdapat dalam plasmid Ti (Gambar 2.1) yang berukuran besar ( 200 kb) yang berperan dalam menginduksi transfer dan integrasi T-DNA. Komponen ketiga adalah daerah T-DNA yang juga terletak pada plasmid Ti. Daerah T-DNA

dibatasi oleh LB (*left border*) dan RB (*right border*), mengandung gen penting bagi *A. tumefaciens*. Di dalam T-DNA terdapat gen yang menyandikan enzim untuk biosintesis auksin dan sitokinin untuk pembelahan sel sehingga terjadi pembelahan sel yang tidak terkontrol dan menyebabkan terbentuknya tumor. Di samping itu, T-DNA juga mengandung gen yang berperan dalam sintesis dan sekresi opine untuk pertumbuhan *A. tumefaciens*.



Gambar 2.1. *Tumor inducing* plasmid pada *A. tumefaciens* (Kakkar dan Verma, 2011).

Proses interaksi *A. tumefaciens* pada sel tanaman meliputi beberapa tahapan. Pertama, sel tanaman yang terluka akan memproduksi senyawa acetosyringone. Acetosyringone akan mengaktifkan gen-gen virulensi pada *A. tumefaciens*. Gen-gen virulen mensintesis *single stranded* T-DNA dan terjadi transfer T-DNA. Kompleks T-DNA masuk kedalam nukleus dan berintegrasi sehingga terjadi sintesis sitokinin, auksin serta opine. Sintesis auksin dan sitokinin memacu pembentukan tumor pada sel tanaman yang terinfeksi *A. tumefaciens*. Senyawa opine yang terbentuk digunakan oleh *A. tumefaciens* untuk pertumbuhannya. Secara singkat mekanisme interaksi *A. tumefaciens* dengan sel tanaman dan proses transformasi genetik oleh *A. tumefaciens* dapat dilihat pada Gambar 2.2.



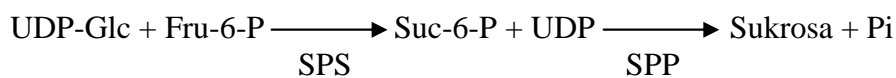
Gambar 2.2. Mekanisme interaksi *A. tumefaciens* dengan sel tanaman (Kakkar dan Verma, 2011).

Pada tanaman tebu, transformasi genetik pada tanaman dapat menggunakan beberapa macam eksplan seperti kalus, kultur sel, maupun tunas *in-vitro*. Penggunaan pangkal tunas tebu *in-vitro* sebagai eksplan untuk transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* memiliki beberapa keuntungan misalnya sumber eksplan selalu tersedia dalam jumlah banyak, meminimumkan tingkat variasi somaklonal dan memungkinkan melakukan infeksi secara intensif (Hazmi *et al.*, 2009). Transformasi gen GUS pada pangkal tunas tebu *in-vitro* menggunakan *A. tumefaciens* strain LBA4404 dapat menghindari terjadinya variasi somaklonal serta tunas tebu *in-vitro* tumbuh dengan cepat, sehingga sangat potensial digunakan sebagai eksplan transformasi pada tanaman tebu (Setyati *et al.*, 2007).

## 2.2 Biosintesis Sukrosa dan *Sucrose Phosphat Synthase* (SPS)

Sukrosa merupakan salah satu hasil akhir dari proses fotosintesis (Campbell *et al.*, 2000). Peran sukrosa sangat penting bagi tanaman yaitu sebagai sumber karbon dan sumber energi untuk pertumbuhan (Laporte *et al.*, 1997). Untuk membentuk satu

molekul sukrosa diperlukan 4 molekul triosa-P hasil asimilasi karbon pada proses fotosintesis. Empat triosa-P dikonversikan menjadi 2 molekul *fructose,1-6 bisphosphate* yang dikatalisis oleh aldolase. Dua molekul *fructose,1-6 bisphosphate* selanjutnya dikonversikan menjadi 2 molekul *fructose-6-phosphate* (F6P) yang dikatalisis oleh *cyt-FBPase*. F6P yang terbentuk sebagian dikonversikan menjadi UDP-*glucose* yang merupakan substrat untuk sintesis sukrosa (Buchanan *et al.*, 2000). Selanjutnya SPS mengkatalisis pembentukan *sucrose-6-phosphate* (suc6P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG). Enzim *sucrose-phosphate phosphatase* (SPP) akan melakukan pemutusan ikatan *phosphate* dari *sucrose-6-phosphate* sehingga menghasilkan sukrosa dan *phosphate anorganik* (Pi). Dengan demikian, SPS merupakan enzim kunci dalam pembentukan sukrosa (Huber dan Huber, 1996). Reaksi sintesis sukrosa yang dikatalisis oleh enzim SPS adalah sebagai berikut:



Aktivitas enzim SPS mempunyai peran yang sangat penting dalam akumulasi sukrosa pada tanaman karena mempengaruhi laju sintesis sukrosa (Huber dan Huber, 1996). Pada beberapa varietas tebu yang diuji menunjukkan bahwa aktivitas enzim SPS berkorelasi nyata dengan pertumbuhan tanaman tebu dan produksi gula (Sugiharto *et al.*, 1997). Tanaman yang telah ditransformasi dengan gen penyandi enzim SPS mempunyai laju fotosintesis yang lebih tinggi dibanding tanaman kontrol (Huber dan Huber, 1996). Tanaman tomat yang ditransformasi dengan gen penyandi enzim SPS jagung di bawah kontrol promotor *CaMV*, aktivitas enzim SPS pada daun meningkat sebesar 2–3 kali (Laporte *et al.*, 1997). Pada *Arabidopsis thaliana* yang mengandung gen penyandi enzim SPS jagung dapat meningkatkan aktivitas enzim SPS daun sampai tiga kali (Signora *et al.*, 1998). Worrel *et al.*, (1991) melaporkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim SPS dan akumulasi sukrosa pada daun tomat transgenik yang mengandung gen penyandi enzim SPS jagung. Gen yang menyandi untuk protein SPS (*SoSPS1*) telah di kloning dari tanaman tebu (Sugiharto



*et al.*, 1997) dan overekspresi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu dapat meningkatkan kandungan sukrosa (Miswar *et al.*, 2007).

### **2.3 Sucrose Transporter (SUT) pada Tanaman**

Sukrosa merupakan salah satu bagian terbesar dari produk akhir fotosintesis (Barker *et al.*, 2000). Sukrosa di dalam tanaman ditranslokasikan dari daun (*source*) ke organ penyimpanan (*sink*) (Campbell *et al.*, 2000). Proses transportasi sukrosa dari *source* ke *sink* difasilitasi oleh protein transport yang dikenal dengan *Sucrose transporter* (Barker *et al.*, 2000). *Sucrose transporter* (SUT) adalah protein yang berfungsi sebagai translokator sukrosa dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpan.

Berdasarkan analisis filogenetik, *sucrose transporter* terbagi dalam 3 famili yaitu SUT1, SUT2, dan SUT4 (Barker *et al.*, 2000). Selanjutnya menurut Kuhn (2003), klasifikasi SUT kedalam 3 famili ini berdasarkan homologi sekuensi dan afinitas substrat. Famili SUT1 mempunyai afinitas yang tinggi tetapi daya muat pengangkutannya rendah, sebaliknya SUT2 mempunyai afinitas yang rendah dengan daya muat pengangkutan yang tinggi. SUT4 mempunyai afinitas rendah dan daya muat pengangkutan yang rendah, bahkan hampir tidak terdeteksi adanya aktivitas pengangkutan.

Pada sebagian besar tanaman, translokasi hasil fotosintesis dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpan terjadi secara simplas dan apoplas. Secara simplas yaitu translokasi sukrosa terjadi dari sel melalui plasmodesmata yang terdapat pada jaringan meristem. Sedangkan secara apoplas sukrosa ditranslokasikan melewati ruang interseluler. Proses ini terjadi dalam SE/CC (*sieve element/companion cell*).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 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 dalam kultur jaringan sesuai yang disebutkan dalam metode penelitian.

Bahan yang digunakan yaitu tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) *in-vitro* varietas Bulu Lawang (BL) overekspresi gen *SoSUT1 event 2* dan biakan bakteri *A. tumefaciens* strain GV 3101 yang mengandung gen *Sucrose Phosphate Synthase (SoSPSI)* yang dikonstruksi dalam plasmid pCL4.

### 3.3 Prosedur Penelitian

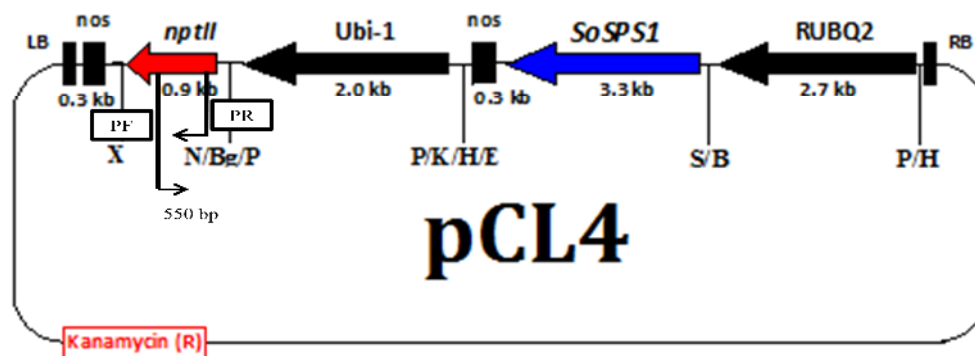
#### 3.3.1 Persiapan Eksplan

Planlet tebu (*Saccharum officinarum* L.) var. Bulu Lawang (BL) overekspresi gen *SoSUT1 event 2* yang ditumbuhkan pada media seleksi (MS + Hygromycin 20 mgL<sup>-1</sup>) disubkultur setiap 3 minggu sekali. Subkultur dilakukan sampai planlet *in-vitro* berjumlah ± 100 planlet.

#### 3.3.2 Kultur *A. tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 yang mengandung gen *SoSPSI* dalam konstruk plasmid pCL4 diperoleh dari *gliserol stock* yang kemudian diambil 50 µl untuk diinokulasi ke dalam media YEP cair 2 ml yang mengandung antibiotik

rifampicin  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , kanamycin  $50 \text{ mgL}^{-1}$ , dan gentamycin  $12,5 \text{ mgL}^{-1}$ . Biakan bakteri tersebut diinkubasi dalam *shaker* 150 rpm pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Selanjutnya biakan diinokulasi pada media YEP padat yang mengandung antibiotik yang sama dan diinkubasi pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Koloni tunggal yang diperoleh sesudah dikonfirmasi keberadaan konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* selanjutnya digunakan untuk transformasi. Peta konstruk plasmid pCL4 dijelaskan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Peta konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* yang tersusun oleh bagian T-DNA. LB: left border, RB: right border, nos: nopaline synthetase gene, nptII: neomycin phosphotransferase gene, Ubi-1: maize ubiquitin promoter, *SoSPS1*: *Saccharum officinarum* sucrose phosphate synthase gene, RUBQ2: rice ubiquitin promoter.

### 3.3.3 Isolasi DNA Plasmid dan PCR

Isolasi DNA plasmid ditujukan untuk melakukan konfirmasi keberadaan konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* yang diinsersikan pada *A. tumefaciens*. Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan menggunakan metode Sambrook *et al.*, (1989). *A. tumefaciens* strain GV 3101 yang membawa gen *SoSPS1* dalam konstruk plasmid pCL4 dikulturkan terlebih dahulu pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Pellet DNA yang diperoleh selanjutnya dikeringkan dengan *vacum dry*  $\pm 10-15$  menit, kemudian dilarutkan dalam  $20 \mu\text{l}$  *buffer* TE dan diukur konsentrasinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan dianalisis PCR menggunakan primer *nptII* F/R dengan sekuen sebagai berikut: primer *nptII* (the neomycin

*phosphotransferaseII gene*)-F (5'-GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGCC-3'), primer *nptII-R* (5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCG-3') dengan ukuran 550 bp. Tahapan pre-denaturasi, denaturasi, *annealing*, elongasi dan *final extention* berturut-turut pada suhu 94°C selama 2 menit, 94°C selama 20 detik, 59°C selama 10 detik, 72°C selama 50 detik dan 72°C selama 5 menit. DNA hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada 1% gel agarosa yang mengandung 3 µl ethidium bromida. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* sebanyak 4 µl untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat di UV iluminator dan didokumentasikan.

### 3.3.4 Infeksi *A. tumefaciens* pada Eksplan

Kultur *A. tumefaciens* yang tumbuh pada media YEP cair 2 ml yang mengandung antibiotik rifampycin 100 mgL<sup>-1</sup>, kanamycin 50 mgL<sup>-1</sup>, dan gentamicyn 12,5 mgL<sup>-1</sup> diperoleh dari inokulan koloni tunggal *A. tumefaciens*. Kultur *A. tumefaciens* kemudian dipindah ke dalam media YEP cair 50 ml yang berisi antibiotik yang sama dan diinkubasi dalam *shaker* 150 rpm pada suhu 28°C hingga kepadatan populasi pada ABS<sub>600</sub> = 0,5 - 1,0 OD.

Eksplan yang digunakan yaitu bagian pangkal planlet yang dipotong ± 5 mm dan ditusuk-tusuk dengan jarum steril. Eksplan direndam dalam 50 ml media YEP cair yang berisi kultur *A. tumefaciens* dengan penambahan 100 mgL<sup>-1</sup> acetosyringone, lalu diinkubasi dalam *shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C selama 15 menit dengan tujuan menginfeksi eksplan dengan *A. tumefaciens*. Kemudian eksplan ditiriskan diatas kertas saring steril dan ditanam pada media ko-kultivasi.

### 3.3.5 Ko-kultivasi

Ko-kultivasi dilakukan setelah proses infeksi yang bertujuan untuk memberi kesempatan *A. tumefaciens* tumbuh bersama dengan eksplan. Selama tahapan ko-kultivasi, integrasi plasmid ke dalam genom tanaman dapat berlangsung. Media ko-

kultivasi yang digunakan yaitu (MS + 100 mgL<sup>-1</sup> acetosyringone). Pada tahapan ko-kultivasi ini, eksplan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 3 hari pada suhu 24°C.

### 3.3.6 Eliminasi *A. tumefaciens*

Eliminasi dilakukan dengan tujuan menghilangkan bakteri *A. tumefaciens* pada eksplan sesudah ko-kultivasi. Eksplan dari media ko-kultivasi dicuci dengan larutan cefotaxime 500 mg L<sup>-1</sup> sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan membilas eksplan menggunakan akuades steril setiap pencucian eksplan. Eksplan kemudian ditiriskan di kertas saring steril dan ditanam pada media eliminasi (MS + cefotaxime 500 mg L<sup>-1</sup>). Pada tahap ini, eksplan diinkubasi selama 7 hari dalam kondisi terang.

### 3.3.7 Seleksi Eksplan *Putative* Transforman

Tahapan seleksi eksplan *putative* transforman dilakukan sebanyak 5 kali dan masing-masing tahapan seleksi membutuhkan waktu inkubasi selama 21 hari. Seleksi dilakukan dengan subkultur eksplan tebu sesudah eliminasi pada media seleksi dan di inkubasi pada suhu 24°C dengan penyinaran cahaya lampu 1000-2000 lux. Media yang digunakan dalam tahapan seleksi yaitu media MS + cefotaxime 500 mg L<sup>-1</sup> + kanamycin 50 mgL<sup>-1</sup> + hygromycin 10 mgL<sup>-1</sup> untuk seleksi ke-1 dan ke-2. Sedangkan untuk seleksi ke-3, ke-4 dan ke-5 media yang digunakan yaitu media MS + cefotaxime 500 mg L<sup>-1</sup> + kanamicyn 50 mgL<sup>-1</sup> + hygromycin 20 mgL<sup>-1</sup>.

### 3.3.8. Aklimatisasi Tanaman *Putative* Transforman

Tahap aklimatisasi bertujuan untuk mengadaptasikan tanaman dari kondisi *in-vitro* ke kondisi *in-vivo*. Aklimatisasi dilakukan pada planlet tebu dengan kondisi perakaran yang banyak. Planlet dibersihkan dari sisa media dengan air mengalir dan direndam dalam larutan fungisida (Dithane 0,1%) ± 30 detik. Selanjutnya planlet ditanam pada media aklimatisasi yaitu tanah yang dimasukkan dalam *polybag*. Aklimatisasi dilakukan bertahap dengan meletakkan tanaman dalam naungan ± 3-4

hari kemudian tanaman diletakkan di *green house*. Pemeliharaan tanaman selama aklimatisasi dilakukan dengan pemberian larutan nutrisi Hoagland (pH 6,5). Tanaman tebu *putative* transforman yang telah berumur  $\pm$  1 bulan selanjutnya diambil daunnya untuk isolasi DNA genom.

### 3.3.9 Isolasi DNA Genom Tanaman *Putative* Transforman

Sebanyak 0,5 gram daun tebu digerus dengan nitrogen cair. Serbuk dimasukkan ke dalam *micro tube sentrifuge* (2ml) yang berisi 1 ml buffer ekstraksi DNA (100 mM Tris, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, dengan pH 8,0), 1,25  $\mu$ l -mercaptoethanol dan 50  $\mu$ l SDS 20%. Campuran tersebut divortex dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Kemudian ditambah 500  $\mu$ l potasium asetat (5 M) dan *diswirling* serta diinkubasi dalam es selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan ditambah 625  $\mu$ l isopropanol kemudian *diswirling* dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 30 menit-1 jam. Selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm 10 menit pada suhu 4°C. Pellet ditambah 500  $\mu$ l buffer TE dan 15  $\mu$ l RNA-se (*stock* 10 mg/ml) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

Setelah inkubasi selesai, ditambah PCI 500  $\mu$ l dan divortex serta disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Lapisan atas dipindah ke *micro tube sentrifuge* baru dan ditambah *chloroform equal volume*. Campuran divortex dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Lapisan atas dipindah ke *micro tube sentrifuge* baru, ditambah 0,8 kali isopropanol dan 0,2 kali NaAc kemudian *diswirling* dan diinkubasi dalam -20°C selama 1 jam. Selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet ditambah 1 ml ethanol 70% dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet yang dihasilkan dikeringkan dengan *vacum dry* selama 5 menit dan ditambah 35  $\mu$ l buffer TE. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan dianalisis menggunakan PCR.

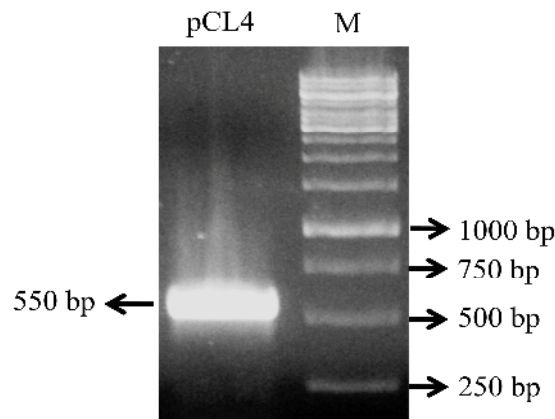
### 3.3.10 Analisis *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Untuk mengetahui keberadaan gen target *SoSPS1* dan gen *SoSUT1* dari genom tanaman *putative* transforman dilakukan analisis PCR menggunakan primer *nptII* F/R dengan sekuen sebagai berikut: primer *nptII* (*the neomycin phosphotransferaseII gene*)-F (5'-GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGCC-3'), primer *nptII*-R (5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCG-3') dengan ukuran 550 bp dan primer *hptII* (*the higromycin phosphotransferaseII gene*)-F (5'- CCG CAA GGA ATC GGT CAA TA -3'), primer *hptII*-R (5'- CCC AAG CTG CAT CAT CGA AA -3') dengan ukuran 470 bp. Tahapan yang dilakukan meliputi pre-denaturasi, denaturasi, *annealing*, elongasi dan *final extention* berturut-turut adalah pada suhu 94°C selama 2 menit, 94°C selama 20 detik, 59°C selama 10 detik, 72°C selama 50 detik dan 72°C selama 5 menit untuk primer *nptII* dan *hptII*. DNA hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada 1% gel agarosa. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* sebanyak 4 µl untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat di UV iluminator dan didokumentasikan.

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Konfirmasi Gen Target Pada *A. tumefaciens*

Konfirmasi keberadaan plasmid pCL4 yang membawa gen *SoSPSI* dan gen *nptII* dalam bakteri *A. tumefaciens* diperlukan untuk melihat apakah bakteri *A. tumefaciens* yang dijadikan sebagai vektor dalam transformasi telah membawa konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI*. Berdasarkan hasil analisis PCR diperoleh pita DNA dengan panjang 550 bp (Gambar 4.1). Pita DNA yang diperoleh dari amplifikasi PCR sesuai dengan panjang DNA *nptII* yang teramplifikasi dengan primer *nptII* yang digunakan yaitu 550 bp seperti pada konstruk peta T-DNA (Gambar 3.1). Berdasarkan hasil ini maka *A. tumefaciens* strain GV 3101 dapat digunakan sebagai vektor transformasi karena terbukti telah mengandung konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* sebagai gen target untuk transformasi pada tanaman tebu.



Gambar 4.1. Hasil elektroforesis gel agarose 1% DNA hasil PCR dengan pasangan primer F/R *nptII* dan *template* DNA plasmid yang diisolasi dari bakteri *A. tumefaciens* strain GV 3101; (M) DNA marker (1 Kb *Ladder*).

### 4.2. Transformasi Gen *SoSPSI* Pada Tanaman Tebu

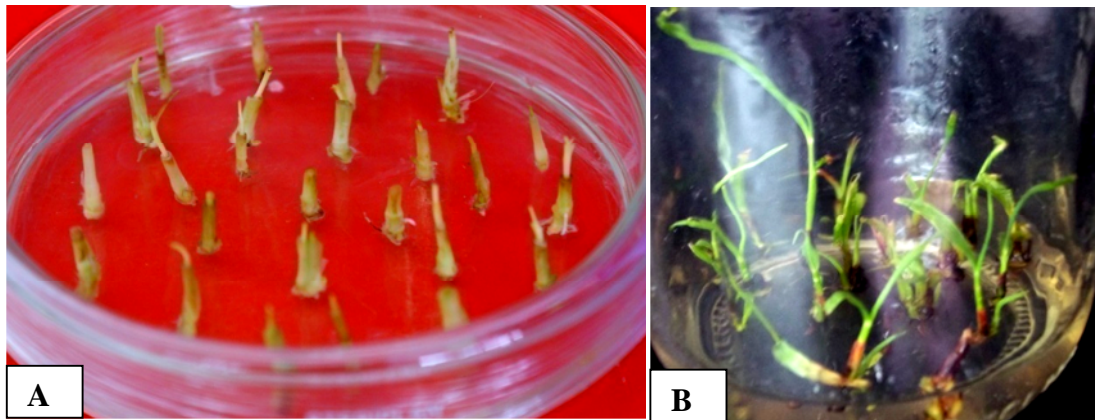
Pada tahap transformasi, bakteri *A. tumefaciens* yang digunakan terlebih dahulu di ukur kepadatan populasinya melalui pembacaan OD (*Optical Density*) pada



panjang gelombang 600 nm. Kepadatan populasi bakteri merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi efisiensi transformasi, karena kepadatan populasi bakteri yang terlalu tinggi dapat mengganggu proses regenerasi tanaman. Sedangkan kepadatan populasi bakteri yang terlalu rendah dapat mengurangi frekuensi insersi T-DNA (Mannan *et al.*, 2009). Pada proses transformasi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu, *optical density* bakteri *A. tumefaciens* yang digunakan yaitu 0,53. Setyati (2005) melaporkan bahwa pada transformasi tanaman tebu, *optical density* *A. tumefaciens* yang optimal untuk digunakan pada  $ABS_{600}$  berkisar antara 0,5-1,0 karena pada kisaran tersebut bakteri berada pada fase logaritmik sehingga dapat meningkatkan kemampuan bakteri untuk menginfeksi genom tanaman.

Pada tahapan ko-kultivasi penambahan senyawa acetosyringone dilaporkan dapat meningkatkan frekuensi transformasi oleh *A. tumefaciens* (Schafer *et al.*, 1987). Dalam proses transfer gen, senyawa acetosyringone tersebut berfungsi untuk menginduksi *vir* G. Eksplan yang ditanam pada media ko-kultivasi mulai menunjukkan adanya pertumbuhan tunas (Gambar 4.2).

Setelah keluar dari tahapan ko-kultivasi, eksplan ditanam pada media eliminasi yang mengandung antibiotik cefotaxime  $500 \text{ mgL}^{-1}$ . Cefotaxime merupakan antibiotik yang umum digunakan untuk mengeliminasi bakteri *A. tumefaciens*. Mekanisme kerja antibiotik ini dengan cara menghambat biosintesis dinding sel bakteri dalam pembentukan peptidoglikan melalui penonaktifan enzim transpeptidase (Silva dan Fukai, 2001). Pada tahapan eliminasi, planlet tebu yang ditumbuhkan pada media yang mengandung antibiotik cefotaxime  $500 \text{ mgL}^{-1}$  tidak mengalami *over growth* dan planlet tebu dapat tumbuh dengan baik (Gambar 4.2). Hal ini sesuai dengan Manickavasagam *et al.*, (2004) yang melaporkan bahwa konsentrasi optimal cefotaxime yang dapat mengeliminasi bakteri *A. tumefaciens* tetapi tidak toksik untuk eksplan tanaman tebu adalah  $500 \text{ mgL}^{-1}$ .

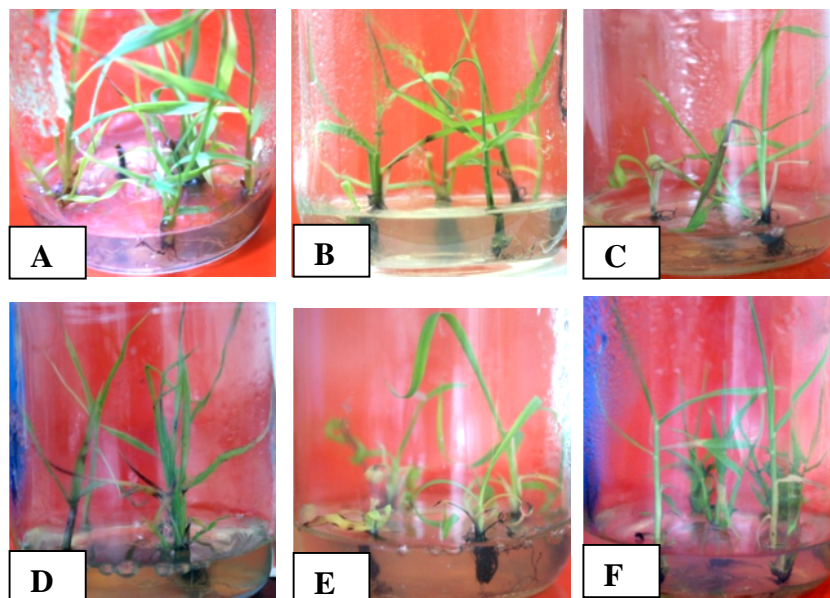


Gambar 4.2. Eksplan tanaman tebu pada media ko-kultivasi (A), Eksplan tanaman tebu pada media eliminasi (B).

Eksplan kemudian ditumbuhkan pada media seleksi yang mengandung antibiotik hygromycin dan kanamycin sebagai *selectable marker* seperti pada konstruk plasmid yang digunakan (Gambar 3.1). Konsentrasi kanamycin pada level  $50 \text{ mgL}^{-1}$  telah dapat digunakan untuk menyeleksi tanaman transgenik (Carrer *et al.*, 1993) karena mampu menghambat pertumbuhan tanaman yang bukan transforman (Yelli, 2009), sehingga tanaman yang mampu lolos dari media seleksi dapat dijadikan sebagai indikator tanaman *putative* transforman (Carrer *et al.*, 1993).

Tanaman tebu *putative* transforman akan mampu beregenerasi pada media seleksi dan tidak terganggu proses metabolismenya. Hal ini karena konstruk plasmid pCL4 yang mengandung gen *nptII* sebagai *selectable marker* telah terinsersi ke dalam genom tanaman sehingga tanaman *putative* transforman memiliki mekanisme ketahanan terhadap antibiotik kanamycin. Mekanisme ketahanan tanaman transforman terhadap paparan antibiotik kanamycin dilakukan dengan mensintesa enzim neomycin phosphotransferase II untuk menginaktivasi antibiotik kanamycin yang masuk ke dalam tanaman sehingga antibiotik kanamycin tidak dapat mengganggu sintesis protein tanaman (Matthews *et al.*, 1995). Sedangkan tanaman yang tidak transforman pada akhirnya akan mati ketika berada pada media seleksi. Antibiotik kanamycin dapat membuat organ tanaman yang tidak transforman menjadi

etiolasi dan klorosis sehingga menyebabkan kematian pada tanaman (Duan *et al.*, 2009). Etiolasi dan klorosis tersebut disebabkan protein yang dibutuhkan untuk biogenesis kloroplas terganggu sintesanya (Miswar *et al.*, 2007) karena antibiotik kanamycin memiliki kemampuan untuk menghambat sintesis protein dengan cara mengganggu proses translasi mRNA (Nap *et al.*, 1992 dan Vliegenterth, 1991). Setelah keluar dari tahap seleksi, tanaman tebu *putative* transforman kemudian ditumbuhkan pada media MS0 untuk pengakaran dan selanjutnya tanaman tebu di aklimatisasi. Kondisi pertumbuhan tanaman tebu selama berada pada media seleksi dan MS0 dapat dilihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3. Planlet tebu pada media seleksi 1 (A), Seleksi 2 (B), Seleksi 3 (C), Seleksi 4 (D), Seleksi 5 (E) dan Media MS0 (F). Pada tahap siklus seleksi planlet tebu diinkubasi pada suhu 24<sup>0</sup>C dibawah penyinaran cahaya lampu 1000-2000 lux.

Pada penelitian ini, transformasi dilakukan sebanyak 3 kali yang masing-masing merupakan penelitian terpisah (*independen experimen*). Hasil transformasi hingga tahapan seleksi ke-5 masing-masing dapat dilihat pada tabel 4.1.

Tabel 4.1. Efektivitas transformasi menggunakan eksplan tunas tebu *in-vitro* dan vektor *A. tumefaciens* yang mengandung konstruk plasmid pCLA-SoSPSI selama 5 periode siklus seleksi.

Transformasi	Persentase jumlah planlet tiap tahapan (%)						
	K	E	S1	S2	S3	S4	S5
1	100	100	20	10,90	10,90	10,90	1,81
2	100	100	62,90	62,90	62,90	59,67	41,93
3	100	100	89,28	19,64	19,64	17,85	8,92

**Keterangan:**

**K:** Ko-kultivasi, **E:** Eliminasi, dan **S:** Seleksi.

Jumlah eksplan awal (K) pada transformasi 1, 2, dan 3 berturut-turut 55, 62, dan 56.

Berdasarkan tabel diatas, persentase planlet *putative* transforman yang mampu tumbuh hingga pada media seleksi ke-5 yaitu 1,81% (1 planlet) pada transformasi ke-1, 41,93% (26 planlet) pada transformasi ke-2, dan 8,92% (5 planlet) pada transformasi ke-3. Pada transformasi ke-1 jumlah planlet yang dihasilkan hingga seleksi ke-5 lebih sedikit dibandingkan pada transformasi ke-2 dan transformasi ke-3. Hal ini disebabkan pada transformasi pertama terdapat beberapa planlet yang mengalami kontaminasi jamur pada saat dalam media seleksi ke-5 (Gambar 4.4). Kontaminasi ini disebabkan karena kondisi yang kurang steril pada saat pemindahan planlet ke dalam media seleksi 5. Pada transformasi ke-2 dan transformasi k-3, kematian planlet pada media seleksi diduga karena gen target tidak terinsersi ke dalam genom tanaman sehingga eksplan tidak tahan terhadap antibiotik yang terkandung dalam media seleksi.



Gambar 4.4. Kontaminasi jamur pada eksplan tanaman tebu yang ditanam pada media seleksi ke-5 pada transformasi 1. Warna putih disekitar planlet menunjukkan pertumbuhan jamur.

### 4.3. Aklimatisasi Tanaman Tebu *In-vitro*

Aklimatisasi bertujuan agar tanaman *in-vitro* dapat beradaptasi dengan kondisi lingkungan luar. Hasil aklimatisasi menunjukkan bahwa pada proses transformasi ke-1 planlet berhasil diaklimatisasi seluruhnya yaitu berjumlah 6 tanaman yang berasal dari 1 tanaman, begitu pula pada transformasi ke-3 yang berjumlah 5 tanaman. Pada transformasi ke-2, dari 26 tanaman *putative* transforman overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1* yang didapatkan, planlet yang berhasil diaklimatisasi yaitu 22 tanaman. Kematian planlet yang dihasilkan pada transformasi ke-2 pada saat tahapan aklimatisasi karena planlet tidak dapat beradaptasi dengan lingkungan. Kondisi tanaman tebu yang telah berhasil di aklimatisasi dapat dilihat pada gambar 4.5.

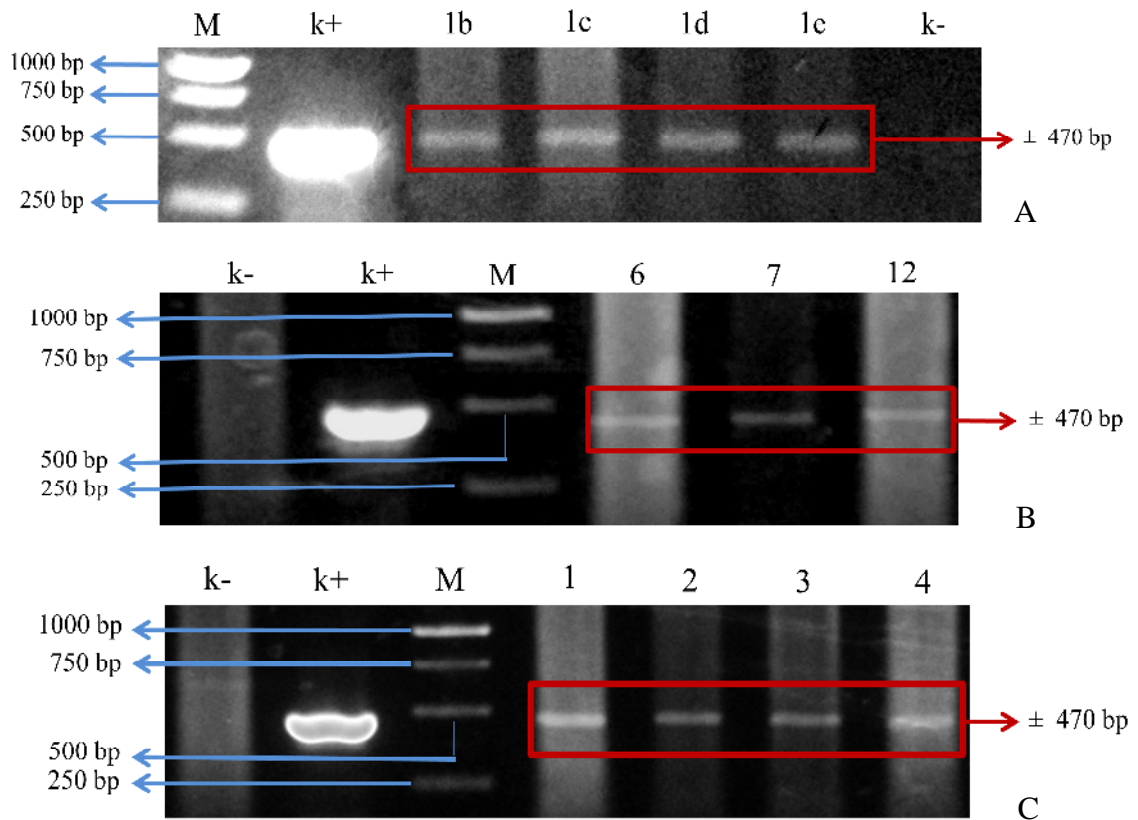


Gambar 4.5. Tanaman tebu yang berhasil di aklimatisasi umur 1 bulan. Planlet tebu dari kondisi *in-vitro* sesudah dibersihkan dari sisa media agar dan diperlakukan dengan fungisida (Dithane 0,1%), kemudian ditanam dalam *polybag* berisi pasir steril.

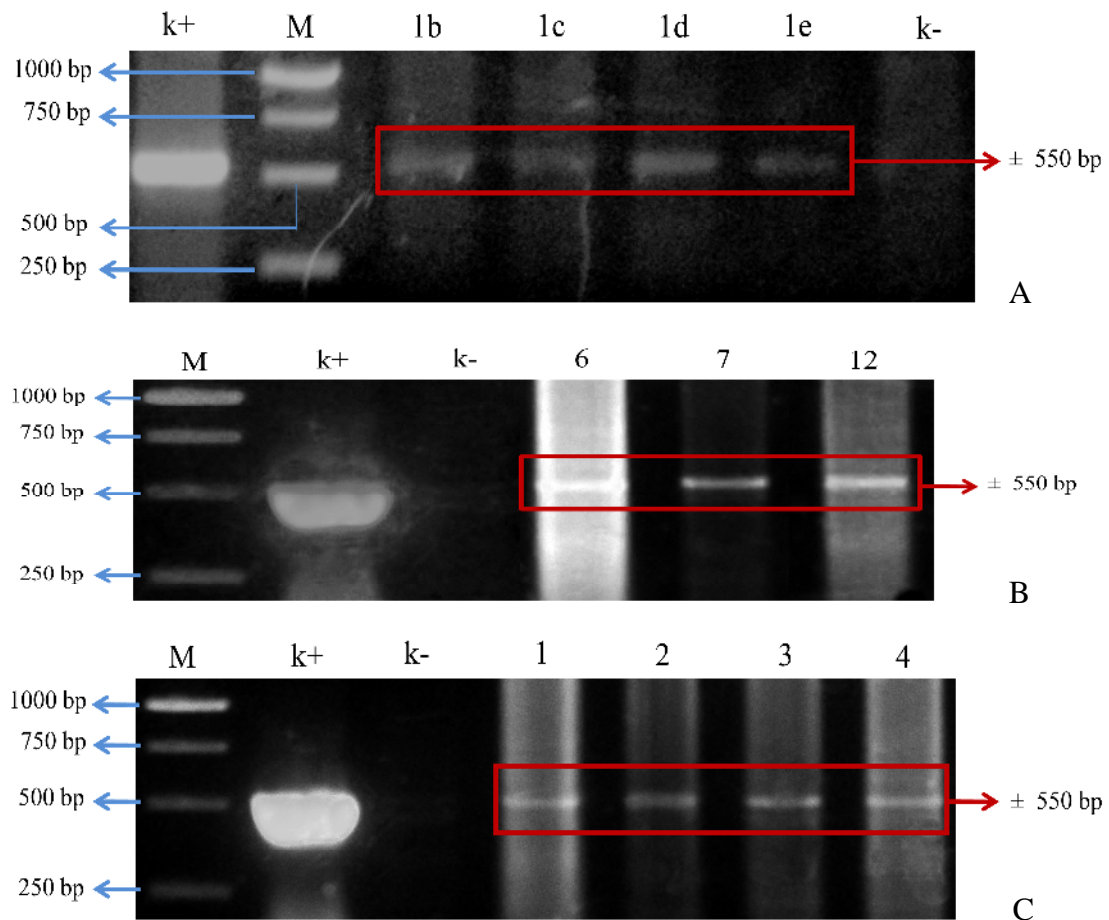
#### 4.4. Hasil Analisis PCR Tanaman Tebu *Putative* Transforman Gen *SoSPS1* dan Gen *SoSUT1*

Keberhasilan transformasi genetik ditentukan oleh terintegrasinya gen target ke dalam genom tanaman. Terintegrasinya gen target kedalam genom tanaman dapat dilakukan dengan analisis PCR menggunakan DNA genom sebagai *template*. Berdasarkan hasil analisis PCR menggunakan primer *hptII* dan *nptII*, persentase tanaman tebu *putative* transforman yang positif mengandung gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1* sebesar 1,81% (4 tanaman yang berasal dari 1 tanaman) pada transformasi ke-1, 4,84% (3 tanaman) pada transformasi ke-2 dan 7,14% (4 tanaman) pada transformasi ke-3 sehingga efektivitas rata-rata transformasi gen *SoSPS1* menggunakan konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* yang dikendalikan oleh promotor *RUBQ2* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* sebesar 4,59%. Hasil analisis PCR dari DNA genom sampel nomer 1b, 1c, 1d, dan 1e pada transformasi ke-1 (berasal dari 1 tanaman), sampel nomer 6, 7, dan 12 pada transformasi ke-2 dan sampel nomer 1, 2, 3, dan 4 pada transformasi ke-3 berhasil mengamplifikasi fragmen DNA dengan panjang 470 bp yang sesuai dengan panjang primer *hptII* dan

fragmen DNA dengan panjang 550 bp yang sesuai dengan panjang primer *nptII* yang digunakan seperti pada Gambar 4.6 dan Gambar 4.7.



Gambar 4.6. Hasil elektroforesis gel agarose 1% DNA hasil PCR dengan menggunakan pasangan primer *hptII* F/R dan *template* DNA genom tebu, M: Marker DNA 1 Kb *Ladder*; K+: Plasmid pAct-*SoSUTI*; K-: Tanaman kontrol non transforman; A: Transformasi ke-1; B: Transformasi ke-2; C: Transformasi ke-3.



Gambar 4.7. Hasil elektroforesis gel agarose 1% DNA hasil PCR dengan menggunakan pasangan primer *nptII* F/R dan *template* DNA genom tebu, M: Marker DNA 1 Kb *Ladder*; K+: Plasmid pCL4-*SoSPS1*; K-: Tanaman transforman gen *SoSUT1*; A: Transformasi ke-1; B: Transformasi ke-2; C: Transformasi ke-3.

Keberadaan fragment DNA *hptII* sebesar 470 bp dan DNA *nptII* sebesar 550 bp hasil PCR menunjukkan integrasi konstruk pCL4-*SoSPS1* pada genom tebu transforman sehingga dapat dikatakan sebagai tanaman tebu transgenik overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1*.



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil analisis PCR, diperoleh tanaman tebu yang positif overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1* sebanyak 4 tanaman pada transformasi ke-1, 3 tanaman pada transformasi ke-2 dan 4 tanaman pada transformasi ke-3. Efektivitas rata-rata transformasi gen *SoSPS1* menggunakan *A. tumefaciens* yang mengandung konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* dan dikendalikan oleh promoter *RUBQ2* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* sebesar 4,59%.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan analisis fisiologis dari seluruh tanaman tebu transforman yang telah didapatkan untuk mengetahui peningkatan sintesis dan translokasi sukrosa serta akumulasinya pada batang tebu transgenik sehingga dapat diketahui pengaruh overekspresi ganda gen *SoSPS1* dan gen *SoSUT1* pada tanaman tebu.

## DAFTAR PUSTAKA

### Buku

- Buchanan, B. B., W. Gruissem, dan 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. Mitchell. 2000. *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch dan T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

### Tidak diterbitkan

- Oktaria, N. 2012. Metabolisme Sukrosa Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Transgenic Overekspresi Gen *SoSUT1*. Tidak dipublikasikan. *Skripsi*. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Setyati, S. 2005. Optimasi Transformasi Gen *Sucrose Phosphate Synthase* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Dengan Bantuan *Agrobacterium tumefaciens*. Tidak dipublikasikan. *Tesis*. Jember: Universitas Jember.

### Terbitan berkala

- Arencibia, A. D., E. R. Carmona, P. Tellez, M. T. Chan, S. M. Yu, L. E. Trujilo, dan P. Oramas. 1998. An Efficient Protocol for Sugarcane (*Saccharum* spp. L.) Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research*. Vol. 7: 213 - 222.
- Barker, L., C. Kuhn, A. Weise, A. Schulz, C. Gebhardt, B. Himer, H. Hellmann, W. Schulze, J. M. Ward dan W. B. Frommer. 2000. SUT2, a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *Plant Cell*. Vol. 12: 1153 - 1164.

- Carrer, H., T. N. Hoeckenberry, Z. Svab dan P. Maliga. 1993. Kanamycin Resistance as a Selectable Marker for Plastid Transformation in Tobacco. *Mol Gen Genet.* Vol. 241: 49 - 56.
- De la Riva, G. A., J. Gonzalez-Cabrera, R. Vazquez-Padron dan C. Ayra-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A Natural Tool for Plant Transformation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology.* Vol. 1 (3): 118 - 133.
- Duan, H., X. Ding, J. Song, Z. Duan, Y. Zhou dan C. Zhou. 2009. Effects of Kanamycin on Growth and Development of *Arabidopsis thaliana* Seedling, Cotyledon and Leaf. *Pakistan Journal. Bot.* Vol. 41(4): 1611 - 1618.
- Hazmi, M., Iskandar, S. B. Sumitro dan B. Sugiharto. 2009. Studi Penggunaan Pangkal Tunas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Sebagai Eksplan Transformasi DNA dengan Faktor *Agrobacterium tumefaciens*. *Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus.* Vol. 3: 81–85.
- Huber, S. C dan J. L. Huber. 1996. Role and Regulation of Sucrose Phosphate Synthase In Higher Plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol. 47: 431 - 444.
- Kakkar, A dan V. K. Verma. 2011. *Agrobacterium* Mediated Biotransformation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* Vol. 1 (7): 29-35.
- Koichi, T., C. H. Bag, M. S. Seo, I. J. Song, T. P. Lim, P. S. Song dan H. Y. Lee. 2002. Overcoming of Barriers to Transformation in Monocot Plants. *J. Plant Boitechnology.* Vol. 4: 135 - 141.
- Kuhn, C. 2003. A Comparison of the Sucrose Transporter Systems of Different Plant Species. *Plant Biology.* Vol. 5: 215 – 232.
- Laporte, M. M., J. A. Galagan, J. A. Shapiro, M. R. Boersig, C. K. Shewmarker dan T. D. Sharkey. 1997. Sucrose Phosphate Syntase Activity and Yield Analysis of Tomato Plants Transformed with Maize Sucrose Phosphate Synthase. *Planta.* Vol. 203: 253 - 259.
- Le, B. Isles, Dusabenyagasani dan Tremblay. 2001. An Improved Procedure for Production of White Spruce (*Picea glauca*) Transgenic Plants Using *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Exp. Bot.* Vol. 52: 2089–2095.
- Manickavasagam, M., A. Ganapathi, V. R. Anbazhagan, B. Sudhakar, N. Selvaraj, A. Vasudevan, dan S. Kasthurirengan. 2004. *Agrobacterium*-Mediated Genetic

- Transformation and Development of Herbicide-Resistant Sugarcane (*Saccharum* species hybrids) Using Axillary Buds. *Plant Cell Rep.* Vol. 23: 134 - 143.
- Mannan, A., T. Noor Syed, dan B. Mirza. 2009. Factors Affecting *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation of *Artemisia absinthium* L. *Pakistan Journal Bot.* Vol. 41 (6): 3239 - 3246.
- Matthews, B. F., J.A. Saunders, J.S. Gebhardt, J. J. Lin dan S.M. Koehler. 1995. Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols: Reporter Genes and Transient Assays for Plants. *Plant Sciences.* Vol. 55: 147 - 162.
- Miswar, B. Sugiharto, J. Soedarsono dan S. Moeljapawiro. 2007. Transformasi Gen Sucrose Phosphate Synthase (*SoSPS1*) Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* untuk Meningkatkan Sintesis Sukrosa pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Berk. Penel. Hayati.* Vol. 12: 137 - 143.
- Mohammed dan Abalaka. 2011. *Agrobacterium* Transformation: A Boost to Agricultural Biotechnology. *Journal of Medical Genetics and Genomics.* Vol. 3 (8): 126 – 130.
- Nap, P. J., J. Bijvoet dan W. J. Stiekema. 1992. Biosafety of Kanamycin-Resistant Transgenic Plants. *Transgenic Research.* Vol. 1: 239 - 249.
- Schafer, W., Gorz dan G. Kahl. 1987. T-DNA Integration and Expression in a Monocot Crop Plant After Introduction of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature.* Vol. 327: 529 - 531.
- Setyati, S., P. Oktaviandari, M. Hazmi dan B. Sugiharto. 2007. Studi Perbandingan Metode Transformasi DNA Menggunakan Vector *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Tebu (*Saccharum* hybrid). *Berk. Penel. Hayati.* Vol. 13: 39 - 44.
- Signora, L., N. Galtier, L. Skot, H. Lucas dan C. H. Foyer. 1998. Overexpression of Sucrose Phosphate Synthase in *Arabidopsis thaliana* Results in Increased Foliar Sucrose/Starch Ratios and Favours Decreased Foliar Carbohydrate Accumulation in Plants After Prolonged Growth with CO<sub>2</sub> Enrichment. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 321 (49): 669 - 680.
- Sugiharto, B dan H. Safitri. 2011. A Comparison Study for *Agrobacterium*-Mediated Transformation Method in Sugarcane (*Saccharum* spp L.). *Jurnal Ilmu Dasar.* Vol. 12 (2): 140 – 147.

- Sugiharto, B., H. Sakakibara, Sumadi, dan T. Sugiyama. 1997. Differential Expression of Two Genes for Sucrose Phosphate Synthase in Sugar Cane: Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. *Plant Cell Physiol.* Vol. 38: 961 – 965.
- Texeira da Silva dan Fukai. 2001. The Impact of Carbenicillin, Cefotaxime and Vancomycin on Chrysanthemum and Tobacco TCL Morphogenesis and *Agrobacterium* Growth. *J.Appl.Hort.* Vol. 3 (1): 3 - 12.
- Toki, Hara, Ono, Onodera, Tagiri, Oka dan Tanaka. 2006. Early Infection of Scutellum Tissues with *Agrobacterium* Allows High-Speed Transformation of Rice. *The Plant Jurnal.* Vol. 47: 969 - 976.
- Vliegenterth, J. S. 1991. Aminoglycoside Resistance, Structure, Occurrence, and Identification of Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes. *Thesis.* RU Leiden.
- Worrell, A. C., J. M. Bruneau, K. Summerfelt, M. Boersig dan T. Voelker. 1991. Expression of Maize Sucrose Phosphate Synthase in Tomato Alter Leaf Carbohydrate Partitioning. *Plant Cell.* Vol. 3: 112 – 130.
- Yelli, F. 2009. Transformasi dan Regenerasi Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculantum* Mill.) dengan Gen Partenokarpi Melalui Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Seminar Hasil Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. UNILA.

### LAMPIRAN A. Komposisi Larutan Hoagland

Larutan Stok	Bahan	Jumlah (g/ml)	Pengambilan (ml/L)
1	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	
2	2,5 M KCl	18,65	1
3	150 mM CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	22,1	0,5
4	1 M MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	24,7	2
5	1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	15,6	2
	0,3 mM EDTA. Fe Sodium	0,012	
	0,27 mM MnSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,007	
	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	0,01	

**LAMPIRAN B. Komposisi Media *Murashige and Skoog* (MS)**

Larutan Stok	Bahan	Jumlah (g/L)	Pengambilan (ml/L)
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
	H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>	1,24	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34	
D	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0052	5
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05	
	KI	0,166	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	74	
E	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,72	5
	CuSO <sub>4</sub> .5H <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>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	5.56	
	Myo-inositol	0,001	
Vitamin	Pyridoxin	0,004	5
	Tyamin HCl	0,0004	
	Sukrosa	30	
	Phytigel	2,5	

**LAMPIRAN C. Komposisi Media *Yeast Extract Peptone* (YEP)**

Bahan	Jumlah (g/L)
<i>Yeast Extract</i>	10
Pepton	10
Sodium Chloride (NaCl)	5
Agar Bakteriologi	14