



**TRANSFORMASI PADA TEBU PRODUK REKAYASA GENETIK  
EVENT 2 DAN 20 DENGAN GEN UNTUK SUCROSE  
PHOSPHATE SYNTASE**

**TESIS**

Oleh:  
**Mohamad Syaifudin Aswan**  
**121820401004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**TRANSFORMASI PADA TEBU PRODUK REKAYASA GENETIK  
EVENT 2 DAN 20 DENGAN GEN UNTUK SUCROSE  
PHOSPHATE SYNTASE**

**TESIS**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Magister Biologi (S2)  
dan mencapai gelar magister sains

Oleh:  
**Mohamad Syaifudin Aswan**  
**121820401004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT yang maha pengasih dan maha penyayang, kupersembahkan Tesis ini kepada:

1. Ayah dan Ibunda tercinta, yang telah memberikan kasih sayang, pengorbanan dan do'anya sehingga mampu menghantarkan putranya untuk menyelesaikan Studi;
2. Istri (Ike Rusdiana, S.Pd) dan anak-anakku (Michelia Nova Azarin Aswan dan Talita Mufida Azarin Aswan) yang selalu memberikan dorongan, bantuan, ketabahan dan semangat. Semoga keberhasilan ini menjadikan semangat untuk kalian semua;
3. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MAgr.Sc. dan Ibu Dr. Ir. Parawita Dewanti yang telah memberikan bimbingan, semangat dan pengorbanan sehingga penulis bisa menyelesaikan Tesis ini;
4. Seluruh Mahasiswa Universitas Jember terutama rekan-rekan seangkatan dan teman-teman *Sugar Group*;
5. Semua guru-guru yang telah mendidik dan memberikan ilmunya, terimakasih yang tak terhingga atas ilmu yang diberikan;
6. Almamater Universitas Jember.

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>RINGKASAN</b> .....	iii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	Iv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	v
<b>ABSTRAK</b>	
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan dan Manfaat</b> .....	3
1.3.1 Tujuan.....	3
1.3.2 Manfaat .....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Peranan <i>sucrose phosphate synthase</i> (SPS) dalam Biosintesis Sukrosa</b>	4
<b>2.2 Peran <i>Sucrose transporter</i> (SUT) dalam Akumulasi Sukrosa</b> .....	5
<b>2.3 Transformasi Genetik menggunakan <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b> .....	7
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b> .....	12

<b>2.1 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	12
<b>3.2 Bahan dan Alat</b> .....	12
<b>3.3 Prosedur Penelitian</b> .....	12
3.3.1 Persiapan Eksplan Tebu PRG event 2 dan 20.....	12
3.3.2 Efektifitas Kanamisin Sebagai Agen Seleksi.....	13
3.3.3 Kultur <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dan konfirmasi plasmid.....	13
3.3.4 Transformasi Gen SoSPS1 Pada eksplan Tebu PRG.....	14
3.3.5 Analisis PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....	16
3.3.6 Aklimatisasi Tebu Transforman.....	18
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	19
<b>4.1 Hasil Penelitian</b> .....	19
4.1.1 Media Induksi Tunas dan Persiapan Eksplan.....	19
4.1.2 Efektifitas kanamisin sebagai Agen Seleksi .....	20
4.1.3 Konfirmasi Keberadaan konstruk pKYS-SoSPS1.....	21
4.1.4 Transformasi Gen SoSPS1 Pada Eksplan Tebu.....	22
4.1.5 Analisis PCR Tebu Overekspresi gen SoSUT1 dan SoSPS1 .....	24
4.1.6 Hasil Aklimatisasi .....	26
<b>4.2 Pembahasan</b> .....	26
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	32
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	32
<b>5.2 Saran</b> .....	32
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	33

### Abstrak

Tebu produk rekayasa genetika event 2 dan 20 merupakan tebu overekspresi gen SoSUT1 yang diketahui mampu meningkatkan produksi *Sucrose transporter* (SUT). Gen SoSUT1 adalah gen pengkode protein *Sucrose transporter* (SUT). Protein SUT merupakan protein membrane yang berfungsi sebagai protein transporter sukrosa dari jaringan asimilasi ke jaringan penyimpanan. Untuk mendapatkan tebu dengan kandungan sukrosa tinggi, Peningkatan translokasi sukrosa harus di imbangi dengan peningkatan sintesis sukrosa di organ asimilasi. Gen SoSPS1 adalah gen pengkode *Sucrose phosphate synthase* yang merupakan enzim kunci dalam sintesis sukrosa di sitosol. Transformasi gen SoSPS1 menggunakan vector *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 pembawa pKYS-SoSPS1 pada tebu Produk rekayasa genetika event 2 dan 20 dipandang perlu untuk mendapatkan tebu dengan sintesis sukrosa tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu dengan *overekspresi* gen *SoSPS1* pada tebu PRG *SUT event 2* dan *20*. Parameter keberhasilan penelitian ini adalah terintegrasinya konstruk pKYS-SoSPS1 kedalam genom tanaman target dengan uji ketahanan terhadap media seleksi antibiotik dan analisis PCR. Penelitian ini berhasil mendapatkan 10 tebu transgenic SUT- SPS yang terdiri dari 3 tanaman berasal dari planlet tebu PRG event 20 dan 7 tanaman berasal dari planlet event 2.

**Kata Kunci:** Transformasi Genetik, Tebu Event 2 dan 20, *Sucrose phosphate Synthase*

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tumbuhan penghasil gula (Sukrosa). Akumulasi sukrosa pada tanaman sangat dipengaruhi oleh tingkat asimilasi karbon dan sintesanya (Chavez et al., 2000) serta dipengaruhi oleh laju transportasi sukrosa dari organ asimilasi (source) ke organ penyimpanan (sink) (Khun and Cristopher., 2010). Enzim yang berperan dalam sintesis sukrosa, diantaranya adalah *Sucrose phosphate synthase* (SPS) dan *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) (Chavez et al., 2000). Transportasi sukrosa dari organ asimilasi (source) ke organ penyimpanan (sink) difasilitasi oleh protein pentransport sukrosa yang disebut dengan Sucrose Transporters (SUT) (Khun and Cristopher., 2010).

*Sucrose Phosphate Synthase* berperan mengkatalisis *UDP-glucose* dan *Fructose-6-phosphat* menjadi *Sucrose-6-phosphate*. *Sucrose-6-phosphate* merupakan substrat bagi enzim *Sucrose phosphat phosphatase* (SPP) untuk membentuk sukrosa. Menurut Sugiarto. (1997) aktivitas enzim SPS berkorelasi nyata dengan pertumbuhan dan produksi gula. Menurut Huber dan Huber. (1996) aktivitas enzim SPS berperan penting dalam akumulasi sukrosa pada tanaman karena mempengaruhi laju sintesis sukrosa. Gen SPS secara alami telah dimiliki oleh beberapa tanaman, pada tebu disebut dengan gen *Saccharum officinarum Sucrose Phosphate Synthase* (SoSPS1) (Sugiharto et al., 1997)

Peningkatan produksi sukrosa pada tebu, selain ditentukan oleh tingkat sintesisnya juga dipengaruhi oleh proses transportasi sukrosa dari organ asimilasi (*source*) menuju organ penyimpanan (*sink*). *Sucrose Transporter* (SUT) merupakan protein spesifik yang berperan dalam proses transport Sukrosa dari organ asimilasi ke organ penyimpanan (Dewanti., 2011). Gen pengkode protein SUT secara alami telah

dimiliki oleh beberapa tanaman, pada tebu disebut dengan gen *Saccarum officinarum Sucrose Transporter* (SoSUT) (Sugiharto., 2008).

Tebu Produk rekayasa genetik (PRG) event 2 dan 20 merupakan tebu overekspresi gen SoSUT1 hasil transformasi gen SoSUT1 pada penelitian sebelumnya. Tebu PRG tersebut memiliki tingkat transport sukrosa yang tinggi. Peningkatan transport sukrosa perlu diimbangi dengan peningkatan sintesis sukrosa, Oleh karena itu, transformasi gen untuk *sucrose phosphate syntase* yaitu gen SoSPS1 menjadi alternatif untuk mendapatkan tebu dengan tingkat sintesis sukrosa tinggi.

Tehnik transformasi genetik dalam perkembangan bioteknologi dapat dilakukan dengan memanfaatkan peran bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Bakteri ini secara alami merupakan bakteri yang dapat menginfeksi dan menyebabkan penyakit tumor pada tanaman (*crown gall disease*). *Agrobacterium* ini memiliki kemampuan untuk mentransfer segmen DNA yang terdapat dalam Ti (*Tumor inducing*) plasmid kedalam inti sel tanaman (Gelvin., 2003).

*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 merupakan bakteri rekombinan yang akan digunakan dalam penelitian ini. *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 merupakan bakteri yang Ti plasmidnya telah direkayasa dengan cara membuang gen penyandi dalam pembentukan *crown gall* dan memasukkan gen penyandi protein SPS yang terkonstruksi dalam pKYS-SoSPS1, sehingga tidak menyebabkan terbentuknya tumor.

Tebu secara alami telah memiliki gen penyandi SPS (*SPS endogen*). Melalui transformasi gen *SoSPS1* diharapkan akan mendapatkan tanaman tebu dengan overekspresi gen *SoSPS1* pada tanaman tebu PRG event 2 dan 20, sehingga biosintesis dan translokasi sukrosa dapat meningkat. Peningkatan biosintesis dan traslokasi sukrosa diharapkan dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada batang tanaman tebu.



## 1.2 Rumusan Masalah

Tebu Produk Rekayasa Genetik (PRG) *event 2* dan *20* merupakan tebu overekspresi gen *SoSUT1*. Tebu PRG tersebut memiliki tingkat transport sukrosa yang tinggi dari organ asimilasi ke organ penyimpanan. Akan tetapi, pada tebu PRG tersebut belum terjadi peningkatan sintesis sukrosa atau sintesis sukrosanya sama dengan *wild tipe*. Oleh karena itu, transformasi gen untuk *sucrose phosphate syntase* yaitu gen *SoSPS1* menjadi alternatif untuk mendapatkan tebu dengan tingkat sintesis sukrosa tinggi.

## 1.3 Tujuan dan Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu Produk Rekayasa Genetik *SoSPS1* pada tebu Produk Rekayasa Genetik *event 2* dan *20*

### 1.3.1 Manfaat

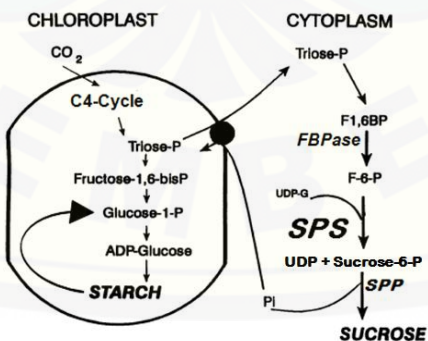
Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai model pengembangan untuk perakitan varietas tanaman tebu yang memiliki tingkat biosintesis dan translokasi sukrosa tinggi.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Peran SPS (*Sucrose Phosphat Synthase*) dalam Biosintesis Sukrosa

Sukrosa dalam tanaman mempunyai fungsi yang sangat penting, tidak hanya menyediakan energi tetapi juga merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Akumulasi sukrosa pada tanaman sangat dipengaruhi oleh tingkat asimilasi karbon dan sintesa sukrosa. Pada saat ini telah ditemukan enzim yang berperan dalam sintesis sukrosa, diantaranya adalah *Sucrose phosphate synthase* (SPS) dan *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) (Chavez *et al.*, 2000).

*Sucrose phosphate synthase* berperan mengkatalisis *UDP-glucose* dan *Fructose-6-phosphat* menjadi *Sucrose-6-phosphate* dan *phospat anorganik (Pi)*. *Sucrose-6-phosphate* merupakan substrat bagi enzim *Sucrose phosphat phosphatase (SPP)* untuk membentuk sukrosa. Peran SPS dapat dilihat seperti tampak pada Gambar 2.1. Pada tanaman aktivitas kedua enzim tersebut saling terkait, peningkatan aktivitas SPS akan meningkatkan ketersediaan substrat (*sucrose-6-phosphate*) bagi enzim SPP, sehingga aktivitasnya meningkat (Echeverria *et al.*, 1997)



Gambar 2.1. Jalur Biosintesa Sukrosa Pada Daun Tanaman (Cheikh and Brenner, 2008).

Menurut Huber dan Huber. 1996. “Tanaman yang telah ditransformasi dengan gen penyandi enzim SPS mempunyai laju fotosintesis yang lebih tinggi dibanding tanaman kontrol”. Tanaman tomat yang ditransformasi dengan gen penyandi enzim SPS jagung dengan promoter *CaMV* dapat meningkatkan aktivitas enzim SPS pada daun 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). Gen yang menyandi untuk protein SPS (*SoSPSI*) 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).

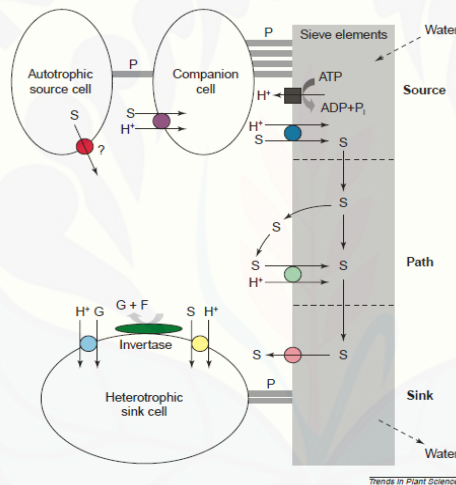
## 2.2 Peran SUT dalam Akumulasi Sukrosa

Akumulasi sukrosa pada organ penyimpanan salah satunya dipengaruhi oleh laju transportasi sukrosa dari organ asimilasi (*source*) ke organ penyimpanan (*sink*). Transport tersebut difasilitasi oleh protein pentransport sukrosa yang disebut dengan *Sucrose Transporters* (SUT). Protein SUT terletak di membran plastid, membran vacuola, dan membran plasma (Khun and Cristopher., 2010). Proses transport sukrosa yang melibatkan protein SUT disebut juga dengan *long distance transport*, dibagi menjadi dua tahap yaitu *phloem loading* (dari organ *source* menuju floem) dan *unloading* (dari floem menuju organ *sink*) (Ayre., 2011).

Transportasi sukrosa oleh protein SUT merupakan bentuk pengangkutan aktif (transport aktif) yang disebut sebagai sukrosa- $H^+$  symporter (*sucrose proton symport*) (Riesmeier *et al.*, 1993). Ion hidrogen ( $H^+$ ) bersama dengan sukrosa akan memasuki protein SUT, kemudian akan ditransport ke luar dari sitoplasma. Pengangkutan aktif merupakan pemindahan zat terlarut melawan gradien konsentrasi, melintasi membran plasma dari satu sisi yang konsentrasi zat terlarutnya rendah menuju ke sisi yang konsentrasinya tinggi dan membutuhkan energi (Campbell *et al.*, 2000).

Transportasi sukrosa dari *source* ke *sink* terjadi secara apoplasmik dan simplasmik (Lalonde *et al.*, 2003). Sukrosa yang disintesis di sitosol akan bergerak

secara apoplasmik melalui *sucrose transporter*. Apoplasmik merupakan translokasi sukrosa melewati ruang interseluler jaringan, proses ini terjadi dalam CC/SE (*companion cell/sieve element*), kemudian sukrosa akan memasuki sel pengiring (*companion cell*) melalui *sucrose transporter*. Transport simplasmik merupakan translokasi sukrosa dari sel ke sel melalui plasmodesmata, yang terjadi pada jaringan meristem dan organ tanaman yang masih muda. Secara simplas, sukrosa yang sudah berada di dalam sel pengiring (*companion cell*), akan memasuki *sieve element* floem melalui plasmodesmata. Sukrosa dari *sieve element* floem akan bergerak menuju jaringan penyimpanan (*sink*) melalui aliran massa, seperti terlihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 *Long distance transport* sukrosa dari *source* ke *sink*. Sukrosa ditransport oleh protein sucrose transporter secara simplas melalui plasmodesmata dan secara apoplas melalui ruang interseluler. S: sukrosa, P: plasmodesmata, G+F: glukosa dan fruktosa (Williams *et al.*, 2000).

Berdasarkan analisis filogenetik gen *SUT* terbagi dalam tiga famili, yaitu *SUT1*, *SUT2*, dan *SUT4*. Menurut Kuhn *et al.* (2003), klasifikasi *SUT* ke dalam tiga famili ini didasarkan pada homologi sekuensi, afinitas substrat, dan fungsi masing-masing *SUT*.

Protein *SUT1* memiliki afinitas yang tinggi terhadap substrat tetapi daya muat pengangkutannya rendah, sebaliknya *SUT2* memiliki afinitas yang rendah dengan

daya muat pengangkutan yang tinggi. SUT4 memiliki afinitas rendah dan daya muat pengangkutannya rendah pula (Shiratake, 2007). Berdasarkan karakteristik tersebut, protein SUT1 lebih baik diantara tiga subfamili protein SUT lainnya sehingga keberadaannya dalam tanaman penting dalam hal akumulasi sukrosa.

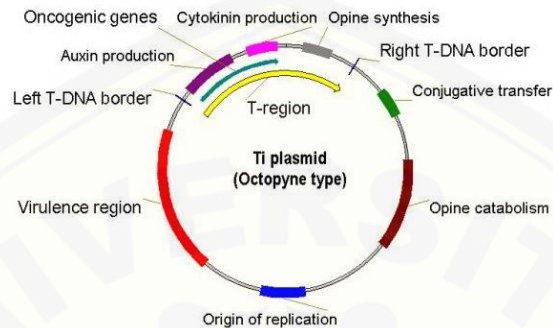
### **2.3 Transformasi Genetik menggunakan Bakteri *Agrobacterium tumefaciens***

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*). Transformasi gen secara langsung dilakukan dengan *Particle bombardment* dan *Electroporation*. Sedangkan, transformasi gen dengan 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).

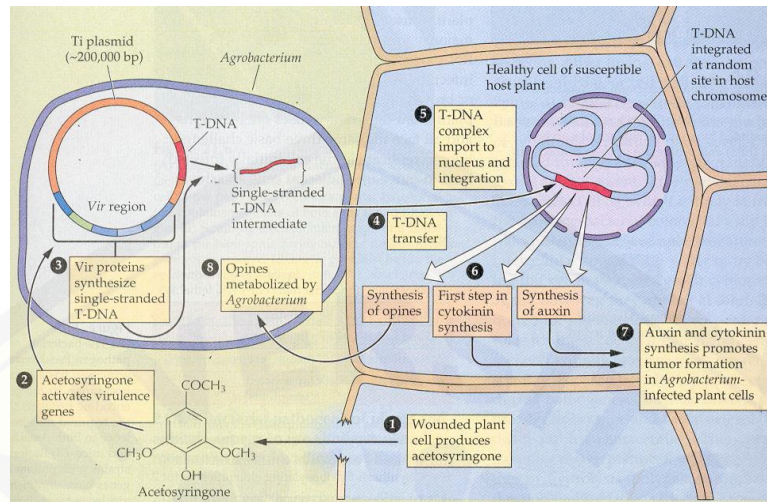
*A. tumefaciens* dalam proses pembentukan tumor akibat infeksi memiliki 3 komponen genetik penting yang terlibat (De la riva *et al.*, 1998). Pertama adalah gen virulen kromosom (*chromosomal virulence*) yang berfungsi dalam pelekatan bakteri dengan sel tanaman. Kedua, gen virulen yang terdapat dalam plasmid Ti (Gambar 2.3) 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. T-DNA mengandung gen yang berperan dalam sintesis dan sekresi *opine* untuk pertumbuhan *A. tumefaciens*.



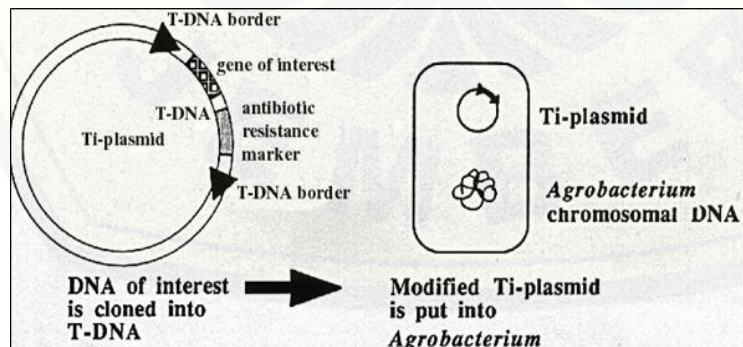
Gambar 2.3. *Tumor inducing* plasmid pada *A. tumefaciens* (Kakkar dan Verma,, 2011).

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 2.4.



Gambar 2.4 Mekanisme interaksi *A. tumefaciens* dengan sel tanaman (Kakkar dan Verma., 2011).

Untuk meningkatkan efektivitas transformasi, Ti plasmid bakteri terlebih dahulu direkayasa dengan cara membuang gen-gen yang bereperan dalam pembentukan *crown gall* dan memasukkan gen-gen penting yang dibutuhkan untuk proses transformasi (Gambar 2.5), sehingga tidak menyebabkan terbentuknya tumor dan dapat dihasilkan tanaman transgenik dengan ekspresi gen yang diharapkan (Zambryski *et al.*, 1983).



Gambar 2.5. Modifikasi Ti plasmid *Agrobacterium tumefaciens*.

*Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 *pKYS-SoSPSI* merupakan bakteri rekombinan yang Ti plasmidnya telah direkayasa dengan cara membuang gen Ti yang merupakan penyandi dalam pembentukan *crown gall* dan memasukkan gen penyandi protein SPS yang terkonstruksi dalam *pKYS-SoSPSI*, sehingga tidak menyebabkan terbentuknya tumor. Gen *SoSPSI* dalam konstruk plasmid ini dikendalikan oleh promoter *CaMV 35S* dan memiliki gen penyeleksi *nptII*.

Promoter merupakan DNA yang tidak mengandung informasi genetik. Promoter memainkan peranan penting dalam keberhasilan proses transformasi (Rachmawati., 2003). *CaMV 35S* merupakan Promoter konstitutif. Promoter konstitutif merupakan promoter yang sangat kuat dan dapat diekspresikan pada semua jenis jaringan.

Dalam konstruk plasmid yang berperan penting selain promoter dan gen target adalah gen penyeleksi. Gen penyeleksi sangat dibutuhkan sebagai indikator keberhasilan transformasi. Tanaman yang diduga transforman harus mampu hidup pada media seleksi. Gen penyeleksi dalam konstruk plasmid *pKYS-SoSPSI* ini adalah gen *nptII* (*neomycin phosphotransferaseII*).

*Neomycin phosphotransferaseII*) yang menyandi gen ketahanan terhadap golongan antibiotik aminoglikosida diantaranya adalah kanamisin. Mekanisme ketahanan tanaman transforman terhadap paparan antibiotik kanamisin dilakukan dengan mensintesa enzim *neomycin phosphotransferase II* untuk menginaktivasi antibiotik yang masuk ke dalam tanaman sehingga antibiotik kanamisin 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 kanamisin dapat membuat organ tanaman yang tidak transforman menjadi klorosis sehingga menyebabkan kematian pada tanaman (Duan *et al.*, 2009).

Klorosis disebabkan karena protein yang dibutuhkan untuk biogenesis kloroplas terganggu sintesanya (Miswar *et al.*, 2007). Antibiotik kanamisin memiliki kemampuan untuk menghambat sintesis protein dengan cara mengganggu proses translasi mRNA (Nap *et al.*, 1992 dan Vliagentarth, 1991).



Transformasi menggunakan *Agrobacterium* sebagai vektor telah berhasil dilakukan pada beberapa tanaman seperti tebu, tembakau (Miswar et al., 2005) dan tomat (Worrell et al., 1991). Efektivitas dan efisiensi transformasi gen menggunakan *Agrobacterium* dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu, selain vektor memiliki T-DNA yang mengandung *goi* juga harus memiliki promotor yang berperan dalam keberhasilan transformasi dan gen penyeleksi.

Transformasi genetik pada tanaman tebu dengan vektor *Agrobacterium* 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, meminimalisir tingkat variasi somaklonal dan memungkinkan melakukan infeksi secara intensif (Hazmi et al., 2009).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember divisi Biologi Molekul dan Bioteknologi, mulai bulan april 2014 sampai mei 2015

### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan standart untuk kultur jaringan, Transformasi gen, analisis biokimia dan molekuler. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: eksplan tebu PRG *event 2* dan *20*, *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 yang mengandung konstruk *pKYS-SoSPSI*, Bahan untuk media kultur jaringan, analisis Kimia dan molekuler.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pangkal planlet tebu PRG (Produk Rekayasa Genetik) *event 2* dan *20* dalam kondisi *invitro*. Tahap transformasi dalam penelitian ini, tiap event membutuhkan  $\pm 100$  eksplan. Perbanyak planlet merupakan hal pokok untuk memenuhi jumlah eksplan yang dibutuhkan. Untuk mengetahui media yang paling efektif dalam menginduksi tunas pada planlet tebu PRG *event 2* dan *20* dilakukan optimasi media.

Media induksi pertunasan yang di ujobakan dalam penelitian meliputi 4 macam media yaitu, media M1: (MS0), M2: (MS+100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> L-Glutamin), M3: (MS+ 2mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> 2,4D, 2mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> BAP), M4: (MS + 2mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> Glisin) dengan 5 ulangan pada masing masing perlakuan. Pengamatan dilakukan setiap kelipatan 7 hari setelah

tanam. Komposisi media yang paling efektif akan digunakan dalam perbanyakan planlet tebu PRG *event* 2 dan 20 dengan menambahkan Hygromycin 20 mgL<sup>-1</sup>. Penggunaan antibiotik Hygromisin dalam media perbanyakan planlet berfungsi sebagai *Screening* (penyeleksi) tebu PRG SUT. Planlet disubkultur setiap 3 minggu sekali sampai mendapatkan planlet *in-vitro* ± 100 pada masing-masing *event*.

### 3.3.2 Efektifitas Kanamisin Sebagai Agen Seleksi

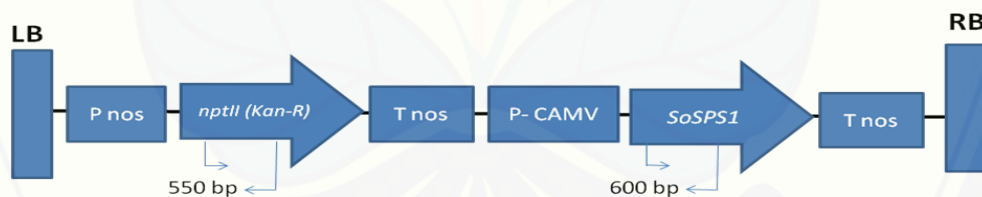
Percobaan ini dilakukan untuk mengetahui tingkat efektifitas kanamisin dalam menyeleksi tabu non transforman. Penelitian ini dilakukan secara invitro dengan lima macam konsentrasi kanamisin yaitu; media U1 (control negative): MS+ 0 mg<sup>-1</sup> kanamisin), U2: MS + kanamisin 25 mgL<sup>-1</sup>, U3: MS + kanamisin 50 mgL<sup>-1</sup>, U4: MS + kanamisin 75 mgL<sup>-1</sup>, U5: MS + kanamisin 100 mgL<sup>-1</sup> dengan 5 kali ulangan pada masing-masing perlakuan. Pengamatan dilakukan dengan interval 7 hari setelah tanam.

### 3.3.3 Kultur *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 dan Konfirmasi pKYS-SoSPS1

Transformasi genetik pada penelitian ini menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 dengan konstruk plasmid pKYS-SoSPS1. Kultur *Agrobacterium tumefaciens* dan konfirmasi keberadaan gen target merupakan hal pokok yang harus dilakukan sebelum melakukan tahapan transformasi. Kultur *Agrobacterium* dilakukan dengan mengambil 100 µl *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 pKYS-SoSPS1 dari gliserol stok dan ditumbuhkan pada 2 ml media YEP cair yang mengandung antibiotik rifampycin 50 mgL<sup>-1</sup>, kanamisin 50 mgL<sup>-1</sup>, dan Streptomycin 30 mgL<sup>-1</sup>, kemudian diinkubasi pada seker dengan suhu 28°C pada putaran 150 rpm selama 24 jam. Biakan yang telah tumbuh sebagian di tumbuhkan pada media YEP padat selektif dan sebagian digunakan untuk isolasi DNA plasmid. Isolasi DNA plasmid dilakukan dengan menggunakan metode Sambrook *et al.*, (1989).

DNA hasil isolasi digunakan sebagai cetakan DNA dalam analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Analisis PCR untuk konfirmasi keberadaan konstruk pKYS-SoSPS1 ini menggunakan 2 macam pasangan primer (*forward* dan *reverse*) yaitu primer SPS dan *nptII*. Primer SPS digunakan untuk konfirmasi gen SoSPS1 dan *nptII* untuk konfirmasi gen penyeleksi *nptII*, hal ini sesuai dengan konstruk pKYS-SoSPS1 (gambar 3.1) Primer SPS dengan sekuen primer F(5'-ATT CTG ATA CAG GTG GCCA-3') dan R (5'-TCCTGCCTTGTGCTCGTGAT-3') yang memiliki ukuran 600 bp, sedangkan primer *nptII* dengan sekuen primer *forward* (PF) (5'-TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG-3') dan *reverse* (PR) (5'-AGC CAA CGT ATG TCC TGAT-3') yang memiliki ukuran 550 bp.

Program yang digunakan meliputi beberapa segmen seperti *pre-denaturation* 95°C 4 menit, *denaturation* 95°C 30 detik, *annealing* 58°C 30 detik, *elongation* 72°C 2 menit, *final elongation* 72°C 7 menit, Selanjutnya hasil PCR di elektroforesis dengan menggunakan 1% gel agarose Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan dengan *Gel Imaging System* untuk dilihat keberadaan pita DNA target dan didokumentasikan.



Gambar 3.1. Bagian T-DNA dari konstruk pKYS-SoSPS1 yang mengandung gen *SoSPS1* dan gen ketahanan terhadap antibiotik kanamycin (*nptII*)

### 3.3.4 Transformasi Gen *SoSPS1* pada Eksplant Tebu

Proses tranformasi diawali dengan persiapan *A. tumefaciens* yang berperan sebagai vektor dalam transformasi ini. Prosedur persiapan *A. tumefaciens* adalah sebagai berikut; Kultur *A. tumefaciens* yang tumbuh pada media YEP cair 2 ml yang

mengandung antibiotik *rifampycin* 50 mgL<sup>-1</sup>, *kanamisin* 50 mgL<sup>-1</sup>, dan *Streptomycin* 30 mgL<sup>-1</sup> dipindah ke dalam media YEP cair 50 ml yang mengandung antibiotik yang sama dan diinkubasi dalam *shaker* 150 rpm pada suhu 28<sup>0</sup>C hingga kepadatan populasi pada ABS<sub>600</sub> = 0,7 OD.

Eksplan tebu yang digunakan adalah pangkal tebu dengan ± 0,5- 1 cm yang diukur dari pangkal akar ke batang. Selanjutnya, eksplan dilukai 3 tusukan pada bagian ventral menggunakan 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<sup>0</sup>C selama 15 menit. Kemudian, eksplan di kering anginkan diatas kertas saring steril dan ditanam pada media ko-kultivasi.

Ko-kultivasi dilakukan setelah proses infeksi dengan tujuan memberi kesempatan *A. tumefaciens* tumbuh bersama dengan eksplan, sehingga integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman diharapkan dapat berlangsung. Media ko-kultivasi yang digunakan yaitu (MS + 100 mgL<sup>-1</sup> *acetosyringone*). Pada tahapan ko-kultivasi ini, planlet diinkubasi dalam kondisi gelap selama 3 hari pada suhu 24<sup>0</sup>C, selanjutnya dilakukan tahapan eliminasi.

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 planlet menggunakan akuades steril. Eksplan dikering anginkan 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.

Tahapan seleksi planlet *putative* transforman dilakukan pada media seleksi sebanyak 5 kali dan masing-masing tahapan membutuhkan waktu inkubasi 21 hari. Media yang digunakan dalam tahapan seleksi yaitu media MS + cefotaxime 500 mg L<sup>-1</sup> + kanamisin 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> + hygromicyn 20 mgL<sup>-1</sup>. Planlet di inkubasi pada suhu 24<sup>0</sup>C dengan penyinaran cahaya lampu 1000-2000 lux.

Setiap akhir tahapan seleksi dilakukan pengamatan dan menghitung persentase planlet yang tahan terhadap media seleksi, dengan rumus sebagai berikut:

$$\frac{\text{Jumlah planlet tahan pada media seleksi}}{\text{Jumlah planlet awal sebelum transformasi}} \times 100\%$$

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

Untuk mengetahui keberadaan gen target *SoSPS1* dan gen *SoSUT1* dari genom tanaman *putative* transforman dilakukan analisis PCR. Analisis ini diawali dengan isolasi DNA genom dengan prosedur sebagai berikut; 0,2 gram daun tebu digerus dengan nitrogen cair. Serbuk dimasukkan ke dalam *Ependolf* (2ml) yang berisi 1 ml buffer ekstraksi DNA (100 mM Tris, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, dengan pH 8,0), 1,25 µl β-mercaptoethanol dan 50 µl SDS 20%. Campuran tersebut divortex dan diinkubasi pada suhu 65<sup>0</sup>C selama 10 menit. Kemudian ditambah 500 µl potasium asetat (5 M) dan diinkubasi dalam es selama 10 menit. Selanjutnya disentrifius 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Supernatan yang dihasilkan ditambah 625 µl isopropanol kemudian diinkubasi pada suhu -20<sup>0</sup>C selama 30 menit-1 jam. Selanjutnya disentrifius 12.000 rpm 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Pellet ditambah 500 µl buffer TE dan 15 µl RNA-se (*stock* 10 mg/ml) lalu diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 1 jam.

Setelah inkubasi selesai, ditambah PCI 500 µl dan divortex serta disentrifius 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Lapisan atas dipindah ke *Ependolf* baru dan ditambah *chloroform equal volume*. Campuran divortex dan disentrifius 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Lapisan atas dipindah ke *Ependolf* baru, ditambah 0,8 kali isopropanol dan 0,2 kali NaAc kemudian diinkubasi dalam -20<sup>0</sup>C selama 1 jam. Selanjutnya disentrifius 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>C. Pellet ditambah 1 ml ethanol 70% dan disentrifius 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4<sup>0</sup>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 UV spektrofotometer (*nano drop*) pada panjang gelombang 260 nm dan dilanjutkan dengan analisis PCR.

Analisis *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dilakukan untuk mengetahui keberadaan gen target *SoSPS1* dan *SoSUT1* dari genom tanaman *putative* transforman. Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer yang sesuai dengan konstruk *pKYS-SoSPS1* yaitu *nptII* yang memiliki sekuen primer *forward* (PF) (5'-TGA ATG AAC TGC AGG ACG AG-3') dan *reverse* (PR) (5'-AGC CAA CGT ATG TCC TGAT-3') yang dapat mengamplifikasi fragmen DNA dengan ukuran  $\pm$  550 bp.

Program yang digunakan dalam PCR meliputi pre-denaturasi dengan suhu 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 58°C selama 20 detik, *elongasi* 72°C selama 1 menit dan *final extention* 72°C selama 1 menit. DNA hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* sebanyak 3  $\mu$ l untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat di *Gel Imaging System* dan didokumentasikan.

Analisis PCR dilanjutkan dengan mendeteksi keberadaan gen *SoSUT1* pada tanaman transforman *SoSPS1*. Hal ini dilakukan untuk mengetahui tebu yang memiliki overekspresi ganda *SoSUT1* dan *SoSPS1*. Konfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* dilakukan dengan menggunakan pasangan primer yang sesuai dengan konstruk *pACT-SoSUT1* yaitu *hptII* dengan sekuen primer *forward* (5'- CCG CAA GGA ATC GGT CAA TA -3'), dan Primer *reverse* (PR) (5'- CCC AAG CTG CAT CAT CGA AA -3') dengan ukuran 470 bp. (gambar, 3.2)