



**UJI STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU PRODUK REKAYASA  
GENETIK (PRG) OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1* DAN *SoSUT1*  
SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

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

Oleh  
Fragaria Vesca Paradisa  
NIM 101810401043

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## **PERSEMBAHAN**

Dengan mengucapkan syukur alhamdulillah, saya persembahkan skripsi ini kepada:

1. Ibunda Lilik Sekarsih dan Ayahanda Sudarsono, saya ucapkan terima kasih yang tak terhingga atas segala pengorbanan, nasehat, kasih sayang, dan do'a yang selalu dipanjatkan;
2. Kakak tercinta Ricky Dharma, Nuning Dwi Fandiya dan adik tersayang Roffi Athur atas semangat yang telah diberikan;
3. Seluruh keluarga besar yang telah banyak memberikan dukungan dalam setiap langkahku;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

## MOTO

“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)\*

Pada dasarnya, kekuatan yang anda miliki di dalam diri anda lebih besar dibanding hambatan yang sedang anda hadapi  
(Greg Philips)\*\*

---

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

\*\*\*) Firdauz, F. 2010. *Golden Words*. Yogyakarta : Pustaka Larasati

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fragaria Vesca Paradisa

NIM : 101810401043

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Ganda Gen *SoSPS1* Dan *SoSUT1* Secara *In Vitro*”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai dari dana penelitian MP3EI tahun 2014 dengan peneliti utama Prof. Dr. Bambang Sugiharto. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, Juni 2015

Yang Menyatakan,

Fragaria Vesca Paradisa

NIM 101810401043

**SKRIPSI**

**UJI STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU PRODUK REKAYASA  
GENETIK (PRG) OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1* DAN *SoSUT1*  
SECARA *IN VITRO***

**Oleh**  
**Fragaria Vesca Paradisa**  
**NIM 101810401043**

**Pembimbing:**

**Dosen Pembimbing Utama : Dra. Dwi Setyati, M.Si**

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

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen *SoSPSI* Dan *SoSUTI* Secara *In Vitro*” telah diuji dan disahkan pada :

Hari, Tanggal :

Tempat : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Tim Penguji :

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Dra. Dwi Setyati M.Si  
NIP 196404171991032001

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

Penguji I,

Penguji II,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini  
NIP 19750913200002001

Sri Mumpuni W.W, S.Pd, M.Si  
NIP 197105101999032001

Mengesahkan  
Dekan,

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

## RINGKASAN

**Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen *SoSPSI* Dan *SoSUTI* Secara *In Vitro*; *Fragaria Vesca* Paradisa ; 101810401043 ; 2015 ; 30 halaman ; Jurusan Biologi Universitas Jember.**

Seiring dengan kemajuan bioteknologi, saat ini telah didapatkan tanaman tebu produk rekayasa genetik (PRG) yaitu tanaman tebu overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI*. Tanaman tersebut merupakan hasil dari proses transformasi dengan menyisipkan gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* pada tanaman tebu. Proses transformasi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* bertujuan untuk meningkatkan biosintesis dan translokasi sukrosa dari *source* ke *sink*. Suatu tanaman transgenik dapat dikatakan stabil jika gen yang diinsersikan pada tanaman induk dapat ditemukan kembali pada tanaman generasi selanjutnya. Pada tanaman transgenik yang mampu melakukan persilangan sendiri dapat mencapai kestabilan hingga turunan ke-4, sedangkan tanaman transgenik yang membutuhkan perantara dalam melakukan penyerbukan akan mencapai kestabilan hingga ke-8. Tanaman tebu termasuk dalam tanaman yang memiliki proses pembungaan yang lama, untuk menghasilkan bunga memerlukan waktu  $\pm 1$  tahun selain itu, *pollen* tebu hanya mampu bertahan beberapa menit sehingga peluang terjadinya penyerbukan sangat kecil. Tujuan dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui efisiensi penggunaan eksplan tunas apikal dan tunas lateral untuk perbanyak tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* secara *in vitro* serta mendapatkan tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua yang mampu bertahan pada media seleksi dan sudah stabil secara genetik setelah dikonfirmasi keberadaan gen target menggunakan PCR.

Penelitian ini dilakukan di dLaboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi *Centre for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember pada bulan Juli 2014 sampai Mei 2015. Dalam penelitian ini dilakukan beberapa tahapan yakni tahapan perbanyak, seleksi dan verifikasi PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Tanaman tebu PRG

overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua dari 5 *event* yang telah lolos seleksi antibiotik kanamisisn dan higromisin 50 *plantlet* (100%) pada seleksi 1, 23,7 *plantlet* (47,3%) pada seleksi 2 dan 6,3 *plantlet* (29,2%) pada seleksi 3.

Selain itu Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua yang telah stabil sebanyak 5 *plantlet* yakni *event* 3.2B (B1 dan B2), *event* 2.6B (C1 dan C4) dan *event* 2.12B (E4) yang dibuktikan dengan keberadaan pita / band *hptII* ukuran 470 bp dan *nptII* dengan ukuran 550 bp melalui analisis PCR.



## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, hidayah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen *SoSPSI* Dan *SoSUTI* Secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

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

1. Dra. Dwi Setyati. M.Si selaku dosen pembimbing utama, Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, saran, maupun bimbingan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini dan Sri Mumpuni W.W, S.Pd, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Kahar Muzakhar, S.Si, Ph.D selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing dan memberikan nasehat selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Seluruh keluarga besarku yang telah banyak memberikan motivasi dan dukungan;
5. Bapak Sugeng Riyanto dan ibu Wigiarti sekeluarga yang banyak memberikan jasa dan dukungan selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Purnama Okviandari, SP, M.P. dan rekan-rekan kerja; Mufitdhah, S.Si., Nana, S.Si., Warda, S.Si., Narita, S.Si., Ahmil, S.Si., Derta, Qoyim, Putri, Icha, Firdha, S.P., Almansyah, S.P., Halimah, S.P., Laily, S.P., para seniorku Novita Berliana, S.Si., Wimbuh, S.Si., para juniorku di CDAST (Ryan, Retna, Wulan, Retno, Iffah) beserta seluruh keluarga besar CDAST

yang telah memberikan masukan dan semangat selama menjalankan tugas akhir;

7. Teman-teman BOLU (Biologi 2010) yang telah memberikan kesan, motivasi dan semangat selama kuliah;
8. Seluruh pihak terkait yang tidak bisa 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, Juni 2015

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
PRAKATA.....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Tujuan .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Manfaat .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 <i>Sucrose Phosphat Synthase (SPS) dan Sucrose Transporter</i></b> <b>(SUT) pada Tanaman.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 Tanaman Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi</b> <b>gen <i>SoSUT 1</i> dan <i>SoSPS 1</i>.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Kultur Jaringan dan Stabilitas Genetik Pada Tanaman.....</b>	<b>6</b>
2.3.1 Kultur Jaringan Tanaman .....	6

2.3.2 Stabilitas Genetik pada tanaman.....	8
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>10</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>10</b>
<b>3.2 Alat dan Bahan.....</b>	<b>10</b>
<b>3.3 Prosedur Penelitian.....</b>	<b>10</b>
3.3.1 Pengambilan Eksplan .....	10
3.3.2 Penanaman dan Perbanyakkan Eksplan .....	11
3.3.3 Seleksi dan Regenerasi Eksplan .....	12
3.3.4 Isolasi Genom.....	12
3.3.5 Analisis <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR).....	13
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1 Perbanyakkan Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika     (PRG) Overekspresi Ganda Gen <i>SoSPS1</i> Dan <i>SoSUT1</i>     Secara <i>In Vitro</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2 Seleksi <i>Plantlet</i> Tebu Tanaman Tebu Produk Rekayasa     Genetika (PRG) Overekspresi Ganda Gen <i>SoSPS1</i> Dan     <i>SoSUT1</i> pada media yang mengandung antibiotik.....</b>	<b>17</b>
<b>4.3 Konfirmasi Keberadaan Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> pada <i>Plantlet</i>     Tebu PRG Overekspresi Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> melalui     Analisis PCR Setelah Lolos Seleksi Secara <i>In Vitro</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>26</b>
<b>5.2 Saran.....</b>	<b>26</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>27</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>31</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Komposisi Media Pertumbuhan Tunas Apikal dan Tunas Lateral..... ..	23
4.1 Jumlah <i>plantlet</i> tebu PRG overekspresi gen <i>SoSUT1</i> dan <i>SoSPS1</i> yang telah diperbanyak pada media MS + Glutamin 100 ppm..... ..	17
4.2 Jumlah dan persentase <i>plantlet</i> tebu PRG overekspresi gen <i>SoSUT1</i> dan <i>SoSPS1</i> yang lolos seleksi..... ..	21

## DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 4.1	Eksplan tebu <i>in vitro</i> tunas apikal (A), tunas lateral (B).....	14
Gambar 4.2	Pertumbuhan <i>plantlet</i> dari eksplan tunas apikal.....	15
Gambar 4.3	Pertumbuhan <i>plantlet</i> dari eksplan tunas Lateral.....	16
Gambar 4.4	<i>Plantlet</i> yang siap untuk diseleksi pada media antibiotik.....	18
Gambar 4.5	Respon <i>Plantlet</i> WT yang terdapat pada media seleksi.....	19
Gambar 4.6	Respon <i>Plantlet</i> PRG yang terdapat pada media seleksi.....	20
Gambar 4.7	Hasil elektroforesis 1% gel agarose DNA 5 <i>event</i> Tebu PRG Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> dengan pasangan primer <i>hptII-1F/1R</i> dan <i>template</i> sampel DNA genom <i>plantlet</i> tebu.....	22
Gambar 4.8	Hasil elektroforesis 1% gel agarose DNA Tebu PRG Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> dengan pasangan primer <i>nptII-1F/1R</i> dan <i>template</i> sampel DNA genom <i>plantlet</i> tebu. M: Marker, K <sup>-</sup> : <i>plantlet</i> kontrol ( <i>wildtype</i> ). <i>Event</i> 3.2A (A); 3.2B (B) dan 3.4 (D).....	23
Gambar 4.9	Hasil elektroforesis 1% gel agarose DNA Tebu PRG Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> dengan pasangan primer <i>nptII-1F/1R</i> dan <i>template</i> sampel DNA genom <i>plantlet</i> tebu. M: Marker, K <sup>-</sup> : <i>plantlet</i> kontrol ( <i>wildtype</i> ). <i>Event</i> 2.6B (C) dan 2.12B (E).....	23
Gambar 4.10	Hasil elektroforesis 1% gel agarose DNA 5 <i>event</i> Tebu PRG Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> dengan pasangan primer <i>nptII-1F/1R</i> dan <i>template</i> sampel DNA genom <i>plantlet</i> tebu. M: Marker, K <sup>-</sup> : <i>plantlet</i> kontrol ( <i>wildtype</i> ). B : <i>event</i> 3.2B, C : <i>event</i> 2.6B, D : <i>event</i> 3.4, E : <i>event</i> 2.12B.....	23
Gambar 4.11	Hasil elektroforesis 1% gel agarose DNA Tebu PRG Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> dengan pasangan primer <i>nptII-1F/1R</i> dan <i>template</i> sampel DNA genom <i>plantlet</i> tebu. M: Marker, K <sup>+</sup> : DNA plasmid <i>pCl4</i> . A : <i>event</i> 3.2A, B : <i>event</i> 3.2B, D : 3.4.....	24
Gambar 4.12	Hasil elektroforesis 1% gel agarose DNA Tebu PRG Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> dengan pasangan primer <i>nptII-1F/1R</i> dan <i>template</i> sampel DNA genom <i>plantlet</i> tebu. M: Marker. C : <i>event</i> 2.6B, E : <i>event</i> 2.12B.....	24

## DAFTAR LAMPIRAN

A.	Komposisi Media <i>Murashige and Skoog</i> (MS)	31
----	---	----

## BAB I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Permasalahan industri gula nasional saat ini berkisar pada kesenjangan antara produktivitas yang rendah, inefisiensi pabrik gula, dan berkurangnya luas lahan perkebunan tebu sedangkan permintaan gula oleh masyarakat semakin meningkat guna memenuhi kebutuhan pokok sehari-hari (Syafa'at, 2005). Adapun upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produksi gula yakni dengan cara meningkatkan rendemen gula pada tanaman tebu. Salah satu cara yang dapat dilakukan melalui teknik rekayasa genetik pada tanaman tebu.

Seiring dengan kemajuan bioteknologi, saat ini telah didapatkan tanaman tebu produk rekayasa genetik (PRG), salah satunya adalah tanaman tebu overekspresi ganda (*stacked gen*) gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*. Tanaman tersebut merupakan hasil transformasi dengan menyisipkan gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* pada tanaman tebu. Pada dasarnya, tanaman tebu sudah memiliki gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* endogen, dengan adanya proses transformasi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* diharapkan terjadi peningkatan aktivitas enzim *Sucrose phosphate syntase* (SPS1) dan *Sucrose transporter* (SUT) sehingga dapat meningkatkan biosintesis dan translokasi sukrosa dari *source* ke *sink* dan diperoleh tanaman tebu yang memiliki rendemen gula yang tinggi (Sugiharto *et al.*, 2008).

*Sucrose phosphate syntase* (SPS) merupakan enzim yang menentukan sintesis sukrosa. Enzim SPS mengkatalisis reaksi penggabungan antara *uridine diphosphate glucose* (UDPG) dan *fructose-6-phosphate* (F6P) yang menghasilkan *sucrose-6-phosphate* (S6P), selanjutnya S6P dihidrolisis oleh SPP (*Sucrose Phosphate Phosphatase*) membentuk sukrosa bebas dan phosphate anorganik (Pi) pada akhir reaksi. *Sucrose transporter* (SUT) merupakan protein yang berfungsi sebagai translokator sukrosa dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpanan (Huber and Huber, 1996).

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa tanaman tebu hasil transformasi masih bersifat heterogen, gen yang diinsersikan masih belum tentu dapat ditemukan pada semua sel tanaman. Suatu tanaman transgenik dapat dikatakan



stabil jika gen yang diinsersikan pada tanaman induk juga dapat ditemukan kembali pada tanaman generasi selanjutnya (Dewi, 2001).

Bagi tanaman transgenik yang mampu melakukan persilangan sendiri dapat mencapai kestabilan genetik hingga turunan ke-4 sedangkan tanaman transgenik yang membutuhkan perantara dalam penyerbukan akan mencapai kestabilan hingga turunan ke-8 (Sutini, 2008). Tanaman tebu termasuk dalam tanaman yang memiliki proses pembungaan yang lama, untuk menghasilkan bunga memerlukan waktu  $\pm 1$  tahun selain itu, *pollen* tebu hanya mampu bertahan beberapa menit sehingga peluang terjadinya penyerbukan sangat kecil (Lahay, 2009). Tarique *et al.*, (2010) menyatakan bahwa untuk melakukan seleksi dengan metode konvensional biasanya membutuhkan 10-15 tahun dalam melengkapi seleksi. Oleh karena itu dalam penelitian ini dilakukan kultur *in vitro* melalui kultur jaringan pada tanaman tebu untuk mendapatkan tanaman stabil yang seragam dalam jumlah banyak dengan waktu singkat selain itu, perbanyakkan tebu yang dilakukan secara vegetatif dapat menghasilkan tanaman baru yang memiliki sifat seperti tanaman induk.

Menurut Ningtyas (2013) Tanaman tebu PRG telah positif terinsersi oleh gen *SoSPSI* dan *SoSUTI*. Hal ini dibuktikan dengan konfirmasi keberadaan gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* melalui analisis PCR, akan tetapi tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua belum dikonfirmasi stabilitas genetiknya. Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian mengenai uji stabilitas genetik pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua secara *in vitro* melalui kultur jaringan menggunakan analisis PCR.

## 1.2 Perumusan Masalah

Transformasi genetik merupakan salah satu upaya yang dapat dilakukan dalam proses perbaikan sifat pada tanaman. Saat ini telah diperoleh tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* yang memiliki biosintesa dan translokasi sukrosa yang tinggi pada tanaman tebu, akan tetapi generasi kedua dari

tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* masih belum dikaji stabilitas genetiknya. Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini yakni :

1. Bagaimana efisiensi penggunaan eksplan tunas apikal dan tunas lateral untuk perbanyakkan tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* secara *in vitro*?
2. Apakah tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* mampu bertahan pada media seleksi?
3. Apakah tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* telah memiliki gen yang stabil secara genetik?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efisiensi penggunaan eksplan tunas apikal dan tunas lateral untuk perbanyakkan tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* secara *in vitro* serta mendapatkan tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua yang mampu bertahan pada media seleksi dan sudah stabil secara genetik setelah dikonfirmasi keberadaan gen target menggunakan PCR.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi genetik dari tanaman tebu produk rekayasa genetika overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* yang sudah stabil secara genetik pada generasi selanjutnya.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Sucrose Phosphat Synthase (SPS)* dan *Sucrose Transporter (SUT)* pada Tanaman

Sukrosa merupakan hasil akhir dari proses fotosintesis yang ditranslokasi dari daun (*source*) ke organ yang membutuhkan (*sink*) seperti batang, buah, akar, bunga dan jaringan meristem (Ward, 2000). Sukrosa memiliki fungsi sebagai penyediaan energi dan kerangka karbon, selain itu sukrosa juga berperan dalam pengaturan ekspresi gen lainnya, partisi karbon asimilat serta pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Koch, 1996).

Pada tanaman tebu terdapat *Sucrose Phosphat Synthase (SPS)* dan *Sucrose Transporter (SUT)* yang berperan langsung terhadap proses sintesis dan translokasi sukrosa. SPS merupakan enzim utama yang menentukan biosintesis sukrosa yang berlangsung di mesofil daun. Pada beberapa varietas tebu yang diuji menunjukkan bahwa aktivitas enzim SPS berkorelasi nyata dengan pertumbuhan tanaman tebu dan produksi gula. Tanaman yang telah ditransformasi dengan gen penyandi enzim SPS mempunyai laju fotosintesis yang lebih tinggi dibanding tanaman kontrol (Huber dan Huber, 1996).

Proses translokasi sukrosa berasal dari *source* ke *sink* atau yang disebut dengan *long distance transport* secara umum digolongkan menjadi dua tahapan yaitu *loading* dan *unloading* sukrosa. Proses *loading* dan *unloading* sukrosa menuju batang difasilitasi oleh protein SUT (Truernit, 2001). Translokasi sukrosa oleh protein SUT merupakan bentuk pengangkutan aktif yang disebut sebagai sukrosa H<sup>+</sup> *symporter (sucrose proton symport)* (Reismier *et al.*, 1993).

Pada sebagian besar tanaman, translokasi hasil fotosintesis dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpanan terjadi secara simplas dan apoplas. Secara simplas yaitu translokasi sukrosa terjadi dari sel melalui plasmodesmata yang terdapat pada jaringan meristem. Translokasi sukrosa secara apoplas melewati ruang interseluler, proses ini terjadi dalam SE/CC (*sieve element/companion cell*) (Lalonde *et al.*, 2003).

Pada tanaman terdapat lebih dari satu gen yang mengkode SUT. Berdasarkan homologi sekuensi dan afinitas substrat, protein SUT dibedakan menjadi 3 famili. SUT1 mempunyai afinitas yang tinggi, tetapi daya muat pengangkutannya rendah. SUT2 mempunyai afinitas yang rendah, tetapi daya muat pengangkutannya tinggi. SUT4 mempunyai afinitas yang rendah dan daya pengangkutannya sangat rendah bahkan hampir tidak terdeteksi aktivitas pengangkutannya. Sementara SUT3 hanya terdapat pada tanaman tembakau dan menurut sekuensi homologinya termasuk dalam famili SUT1 (Kuhn, 2003).

## **2.2 Tanaman Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen *SoSUT 1* dan *SoSPS 1***

Tanaman tebu PRG overekspresi ganda gen *SoSUT 1* dan *SoSPS 1* merupakan hasil dari penyisipan gen *SoSUT 1* dan *SoSPS 1* pada tanaman tebu dengan tujuan agar proses biosintesis dan translokasi sukrosa meningkat pada tanaman (Sugiharto dan Safitri 2011). Pada awalnya tanaman tebu tersebut ditransformasi dengan gen *SoSUT1* menggunakan plasmid pActin-*SoSUT* dengan penanda gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin (Sugiharto, 2010).

Tanaman tebu hasil tranformasi gen *SoSUT1* kemudian ditransformasi dengan gen *SoSPS1* menggunakan plasmid pCL4 dengan gen penanda ketahanan terhadap antibiotik kanamisin. Proses transformasi tersebut menghasilkan 5 event tanaman yang memiliki overekspresi gen *SoSUT 1* dan *SoSPS 1* berdasarkan hasil konfirmasi PCR mengenai keberadaan gen yang telah diinsersikan (Ningtyas, 2013).

Transformasi genetik tanaman merupakan metode alternatif untuk menghasilkan tanaman pangan hasil rekayasa genetik yang memiliki sifat-sifat unggul, diantaranya ketahanan terhadap hama dan penyakit, ketahanan terhadap herbisida, perubahan kandungan nutrisi dan peningkatan daya simpan. Transformasi genetik adalah suatu perpindahan gen asing yang diisolasi dari tanaman, virus, bakteri atau hewan ke dalam suatu genom baru (Oktaria, 2012).

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*. Pada penelitian sebelumnya hasil transformasi menunjukkan keberadaan fragment DNA *hptII* sebesar 470 bp dan DNA *nptII* sebesar 550 bp. Hasil analisis PCR menunjukkan terintegrasinya konstruk pCL4-*SoSPSI* pada genom tebu transforman sehingga dapat dikatakan sebagai tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* dan gen *SoSPSI*. Berdasarkan hal tersebut maka telah didapatkan 5 *event* tanaman tebu PRG yang telah diuji keberhasilan insersi gen targetnya sebagai berikut 3.1; 3.2A; 3.2B; 3.4; 2.12B ; 2.6B (Ningtyas, 2013).

## **2.3 Kultur Jaringan dan Stabilitas Genetik Pada Tanaman**

### **2.3.1 Kultur Jaringan Tanaman**

Kultur jaringan merupakan suatu teknik untuk mengisolasi, sel, protoplasma, jaringan, dan organ kemudian menumbuhkan bagian tersebut pada nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh tanaman pada kondisi yang aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman sempurna (Makziah, 2011). Dasar teori teknik kultur jaringan adalah teori Totipotensi Sel yang dikemukakan oleh Schwann dan Schleiden (1838) bahwa setiap sel memiliki kemampuan untuk tumbuh menjadi individu yang sempurna apabila diletakkan pada lingkungan yang sesuai. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah perbanyak tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril (Lahay, 2009).

Kultur jaringan akan lebih besar persentasenya jika menggunakan jaringan meristem. Jaringan meristem adalah jaringan muda, yaitu jaringan yang terdiri dari sel-sel yang selalu membelah, dindingnya tipis, belum mempunyai penebalan dari zat pektin, plasmanya penuh dan vakuolanya kecil-kecil. Kebanyakan orang menggunakan jaringan ini untuk *tissue culture*, sebab jaringan meristem keadaannya selalu membelah, sehingga diperkirakan mempunyai zat yang mengatur pembelahan. Keberhasilan dari kultur jaringan juga dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu pemilihan eksplan sebagai bahan dasar untuk pembentukan kalus, penggunaan medium yang cocok, kondisi yang aseptik dan pengaturan udara yang baik terutama untuk kultur cair. Pada

prinsipnya semua jenis sel dapat ditumbuhkan, tetapi sebaiknya dipilih bagian tanaman yang masih muda dan mudah tumbuh yaitu bagian meristem, misalnya: daun muda, ujung akar, ujung batang, keping biji dan sebagainya (Makziah, 2011).

Eksplan merupakan bagian dari tanaman yang digunakan dalam mikropropagasi atau kultur jaringan tanaman. Seluruh bagian tanaman (daun, batang, dan akar) dapat dipergunakan sebagai eksplan, namun yang biasanya dipergunakan adalah meristem (jaringan muda), mata tunas dan tunas pucuk (*shoot tip*). Eksplan dapat juga berupa embrio (kelapa), benih (anggrek), biji (sengon), umbi (wortel), keping biji (kotiledon), benang sari dan putik. Menurut Manickavasagam *et al.* (2004) pemilihan sumber eksplan yang tepat memiliki peranan penting dalam menentukan keberhasilan perbanyakan *in vitro*. Tiga aspek yang harus dipenuhi dalam pemilihan sumber eksplan (tanaman induk), yaitu karakter genetik sumber eksplan, kontrol patogen, dan kondisi fisik dari tanaman yang memiliki kemampuan optimum dalam inisiasi kultur.

Eksplan yang banyak digunakan adalah tunas apikal dan tunas lateral. Kedua eksplan ini merupakan titik tumbuh pada tebu. Namun, kelemahan eksplan dari tunas lateral adalah peka terhadap kontaminasi, teknik sterilisasinya sulit dan pertunasannya lambat, sehingga untuk mendapatkan eksplan yang sehat relatif terbatas. Sedangkan eksplan dari tunas apikal kurang efisien untuk dijadikan eksplan karena jumlahnya terbatas. Setiap batang tebu hanya ada satu tunas apikal, sehingga dibutuhkan banyak tanaman tebu sebagai sumber eksplan. Kelemahan tersebut diatasi dengan melakukan induksi dan multiplikasi tunas secara *in vitro* (Sofyana, 2014).

Terdapat 4 tahap perkembangan dalam kultur *in vitro*, yaitu (1) tahap inisiasi kultur, (2) tahap multiplikasi atau perbanyakan, (3) tahap pengakaran atau inisiasi akar, dan (4) tahap aklimatisasi. Satu tahap lagi bisa ditambahkan yaitu tahap nol (0), berupa tahap pemilihan dan penyiapan tanaman induk sumber eksplan (Manickavasagam *et al.*, 2004).

Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan kultur. Komponen utama pada media kultur umumnya berupa garam mineral, gula

sebagai sumber karbon, dan air. Komponen lainnya pada media kultur adalah nutrisi organik, zat pengatur tumbuh, dan agar sebagai pematat. Media dasar tersebut dapat dimodifikasi sesuai dengan kebutuhan, dengan menambahkan vitamin dan zat pengatur tumbuh (hormon). Zat pengatur tumbuh diperlukan untuk mengatur diferensiasi tanaman (Makziah, 2011).

### 2.3.2 Stabilitas Genetik Pada Tanaman

Uji stabilitas tanaman transgenik dapat dilakukan dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer yang didesain dari sekuen gen yang ditransformasikan atau dari sekuen gen antibiotik yang diintegrasikan bersama-sama dengan gen interes tersebut (Amirhusin 2004). PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA *template* (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA (Dong, and McHughen, 1993).

Pada penelitian Sofyana (2014) menyatakan bahwa *plantlet* tebu PRG *SoSUT1* hasil dari seleksi *in vitro* yang terdiri dari *event* B1.1 ; B3.1 ; C1.1 ; C1.2 ; C2.1 dan C2.3 menunjukkan bahwa *plantlet* tersebut positif PRG dengan terdeteksinya pita DNA dengan ukuran 470 bp pada gel agarose yang merupakan gen *hptII* setelah dianalisis dengan PCR. Selain itu, Kusri (2014) juga melaporkan bahwa berdasarkan hasil PCR menunjukkan 20 dari 23 *plantlet* yang lolos media seleksi secara *in vitro* terdapat pita / band pada ukuran panjang  $\pm 550$  bp sesuai dengan pita / band DNA plasmid pCLA-*SoSPS1*, sehingga dapat dikatakan *plantlet* tebu PRG tersebut telah stabil secara genetik. Hasil tersebut menunjukkan bahwa uji stabilitas genetik tebu PRG secara *in vitro* memiliki keberhasilan 80%.

Stabilitas genetik pada tanaman transforman merupakan salah satu faktor penting dalam perakitan tanaman PRG. Pada umumnya gen yang ditransformasikan dapat diwariskan pada generasi berikutnya. Namun terdapat

beberapa kasus yang menyebutkan bahwa gen yang telah diinsersikan tidak dapat diwariskan pada generasi selanjutnya. Berdasarkan hasil tersebut diduga bahwa gen target tidak terintegrasi dalam kromosom inti sehingga gen yang diinsersikan tidak dapat diwariskan (Rahmawati dan Slametloedin, 2006).

Pada awalnya sebelum melakukan proses PCR tanaman tebu transgenik diseleksi terlebih dahulu menggunakan antibiotik. Seleksi tanaman transgenik dilakukan dengan menumbuhkan sel, jaringan atau organ, seperti biji, pada media yang mengandung antibiotik. Sel, jaringan atau organ yang hidup atau lolos dari seleksi akan merupakan tanaman yang berpotensi membawa gen yang ditransformasikan. Selain dengan cara seleksi antibiotik, efektivitas penggunaan antibiotik sebagai agen seleksi bergantung pada jenis dan konsentrasi antibiotik serta tingkat ketahanan tanaman yang diseleksi. Penggunaan antibiotik didasarkan pada gen ketahanan pada plasmid yang berfungsi sebagai *selectable marker*. Jenis antibiotik yang sering digunakan dalam media seleksi adalah kanamisin dan higromisin (Nap *et al.*, 1992).



## **BAB 3. METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi *Centre for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember pada bulan Juli 2014 sampai Mei 2015.

### **3.2 Alat dan Bahan**

Alat yang digunakan adalah alat- alat standar yang digunakan dalam kultur jaringan seperti halnya botol jam, petridish, pinset, skalpel, gunting, pH meter, stirer, mikropipet, *beaker glass*, gelas ukur, autoklaf dan *Laminar Air Flow* (LAF), mesin PCR alat elektroforesis, *dry block*, *geldoc*, dan sebagainya.

Bahan yang digunakan adalah tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* event 3.1 ; 3.2A ; 3.2B ; 3.4 ; 2.12B ; 2.6B. Bahan yang digunakan dalam pembuatan media MS adalah stok A-F, vitamin (myoinositol, tyamin, pyridoxin), agar kuljar, sukrosa (lampiran A). Media Pertumbuhan (MS+Glutamin+Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) berupa BA, Kinetin, dan GA). Media seleksi (MS+higromisin 20 mg/L+kanamisin 50 mg/L), nitrogen cair, aquadest steril, natrium hipoklorit, bahan PCR ( *KAPA* master mix, primer *hptII* dan *nptII*), ddH<sub>2</sub>O dan bahan yang disebutkan pada metode kerja.

### **3.3 Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1 Pengambilan Eksplan**

Eksplan yang digunakan adalah tunas apikal dan tunas lateral yang diperoleh dari tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) overekspresi gen *SoSUTI* dan *SoSPSI* hasil peneliti sebelumnya (Ningtyas, 2013). Pucukan tebu PRG yang berumur ±10 bulan diambil dari lapang kemudian dipotong-potong. Pucukan dipotong ±30 cm terhitung dari ruas munculnya daun hingga ruas pada tebu yang masih tertutup oleh pelepah daun. Tunas apikal yang sudah dipotong selanjutnya dibersihkan terlebih dahulu kemudian disterilkan dengan alkohol 70% dan dilewatkan api bunsen. Tunas apikal kemudian dibuka pelepah daun satu per

satu hingga didapatkan tunas bagian dalam yang berwarna putih bersih dan dipotong  $\pm 10$  mm. Tunas apikal siap ditanam pada media pertumbuhan.

Eksplan tunas lateral diperoleh dari bagian antar ruas pada tanaman. Tunas lateral kemudian dipotong dengan ukuran 1,5 cm x 2 cm, setelah itu dibersihkan menggunakan alkohol 70% dan diletakkan pada petridish steril. Potongan ruas tersebut dicelupkan pada alkohol 96% kemudian dilewatkan pada api bunsen hingga bagian luarnya terbakar selanjutnya dibersihkan menggunakan skalpel hingga didapatkan mata tunas. Mata tunas kemudian disterilisasi menggunakan larutan klorok dengan perbandingan 1 : 3 (klorok : aquadest steril) selama 5 menit. Mata tunas dibilas menggunakan aquadest steril sebanyak 2 kali dan ditiriskan pada petridish yang telah dilapisi dengan kertas saring steril sampai sisa aquadest yang menempel hilang.

### 3.3.2 Penanaman dan Perbanyakan Eksplan

Eksplan tunas apikal dan tunas lateral kemudian ditanam pada media pertumbuhan yang berada didalam botol kultur. Komposisi Media pertumbuhan tunas apikal dan tunas lateral dapat dilihat pada tabel 3.1

Tabel 3.1 Komposisi Media Pertumbuhan Tunas Apikal dan Tunas Lateral

<b>Eksplan</b>	<b>Komposisi Media Pertumbuhan</b>
<b>Tunas Apikal</b>	MS + 2 ml BA 2 ppm + 2,5 ml Glutamin 100 ppm + 25 $\mu$ l Kinetin 0,5 ppm
<b>Tunas Lateral</b>	MS + 1,5 ml BA 1,5 ppm + 2,5 ml Glutamin 100 ppm+ 500 $\mu$ l GA 0,1 ppm

Dalam setiap botol kultur ditanami sebanyak 2 eksplan, selanjutnya botol-botol kultur tersebut diinkubasi di ruang gelap selama 1 minggu kemudian dipindahkan ke ruang terang. Selama proses inkubasi di ruang terang dilakukan subkultur pada eksplan menggunakan media yang sama. Subkultur dilakukan

selama 3 minggu sekali hingga diperoleh *plantlet* dengan perakaran yang kuat, batang yang besar, dan daun yang berwarna hijau segar sehingga siap untuk dilakukan tahapan seleksi.

### 3.3.3 Seleksi dan Regenerasi Eksplan

Eksplan yang telah beregenerasi menjadi *plantlet* selanjutnya ditanam pada media seleksi. Seleksi dilakukan pada media MS padat yang telah ditambah antibiotik kanamisin  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  pada seleksi 1 dan kanamisin  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  + higromisin  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  pada seleksi 2 dan 3. Masing-masing seleksi membutuhkan waktu 3 minggu inkubasi.

Seleksi dilakukan pada *plantlet* yang telah mempunyai anakan dengan tinggi  $\pm 5-7$  cm dan memiliki perakaran yang kuat. *Plantlet* yang lolos dari media seleksi selanjutnya ditumbuhkan pada media regenerasi yaitu media MS untuk dilakukan perbanyakan. Perhitungan jumlah dan persentase *plantlet* yang lolos media seleksi dapat menggunakan rumus perhitungan persentase yang didasarkan pada data tahap seleksi sebelumnya yaitu hasil persentase seleksi 1 diperoleh dari  $\Sigma \text{ plantlet}$  yang hidup pada seleksi 1 dibagi  $\Sigma \text{ plantlet}$  awal dikalikan 100% selanjutnya hasil persentase seleksi 2 diperoleh dari  $\Sigma \text{ plantlet}$  yang hidup pada seleksi 2 dibagi  $\Sigma \text{ plantlet}$  yang masih hidup pada seleksi 1 dikalikan 100% kemudian hasil persentase seleksi 3 diperoleh dari  $\Sigma \text{ plantlet}$  yang hidup pada seleksi 3 dibagi  $\Sigma \text{ plantlet}$  yang masih hidup pada seleksi 2 dikalikan 100%

### 3.3.4 Isolasi Genom

Sampel daun tebu PRG yang digunakan untuk isolasi genom tanaman tebu sebanyak 0,1 gram dihaluskan dengan menambahkan  $\text{N}_2$  cair. Serbuk yang didapatkan dipindah ke *microtube* (1,5 ml) dan ditambahkan 600  $\mu\text{l}$  *Nucle lysis*, kemudian divortex dan diinkubasi pada suhu  $65^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan 3  $\mu\text{l}$  *RNAse Solution*, dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan *microtube* (*swirling*) 2-5 kali. Setelah homogen, diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit, didinginkan pada suhu ruang selama 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan 200  $\mu\text{l}$  *Protein Precipitation Solution*, divortex, kemudian

disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit. Supernatan yang telah didapat dipindah pada *microtube* 1,5 ml dan ditambahkan 600 µl isopropanol, kemudian di *swirling* dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Pellet yang didapatkan ditambah 600 µl ethanol 70%, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit. Pellet yang dihasilkan diambil dan dikeringkan selama 3 menit, pada pellet tersebut ditambahkan 100 µl DNA *Rehydration Solution* dan diinkubasi pada suhu 65<sup>0</sup>C selama 1 jam. DNA selanjutnya disimpan pada suhu 20<sup>0</sup>C.

### 3.3.5 Analisis *Polymerase chain reaction* (PCR)

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan *KAPA Master Mix* yang komposisinya terdiri dari *Taq DNA Polimerase*, Magnesium chloride, 2 kali konsentrasi reaksi buffer dan nukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP masing-masing 0,4 mM). Dalam satu kali reaksi memiliki total volume 25 µl dengan larutan yang terdiri dari *KAPA Master Mix* 10 µl, masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) 1 µl, template genom 2 µl dan ddH<sub>2</sub>O 6 µl. Untuk mengetahui keberadaan gen target *SoSPS1* dan gen *SoSUT1* dari genom tanaman PRG maka 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. DNA hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada 1% gel agarose. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* sebanyak 3 µl untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat dan didokumentasikan menggunakan *geldoc*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Sucrose Phosphat Synthase (SPS)* dan *Sucrose Transporter (SUT)* pada Tanaman

Sukrosa merupakan hasil akhir dari proses fotosintesis yang ditranslokasi dari daun (*source*) ke organ yang membutuhkan (*sink*) seperti batang, buah, akar, bunga dan jaringan meristem (Ward, 2000). Sukrosa memiliki fungsi sebagai penyediaan energi dan kerangka karbon, Selain itu sukrosa juga berperan dalam pengaturan ekspresi gen lainnya, partisi karbon asimilat serta pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Koch, 1996).

Pada tanaman tebu terdapat *Phosphat Synthase (SPS)* dan *Sucrose Transporter (SUT)* yang berperan langsung terhadap proses sintesis dan translokasi sukrosa. SPS merupakan enzim utama yang menentukan biosintesis sukrosa yang berlangsung di mesofil daun. Pada beberapa varietas tebu yang diuji menunjukkan bahwa aktivitas enzim SPS berkorelasi nyata dengan pertumbuhan tanaman tebu dan produksi gula. Tanaman yang telah ditransformasi dengan gen penyandi enzim SPS mempunyai laju fotosintesis yang lebih tinggi dibanding tanaman kontrol (Huber dan Huber, 1996).

Proses translokasi sukrosa berasal dari *source* ke *sink* atau yang disebut dengan *long distance transport* secara umum digolongkan menjadi dua tahapan yaitu *loading* dan *unloading* sukrosa. Proses *loading* dan *unloading* sukrosa menuju batang difasilitasi oleh protein SUT (Truernit, 2001). Translokasi sukrosa oleh protein SUT merupakan bentuk pengangkutan aktif yang disebut sebagai sukrosa H<sup>+</sup> *symporter (sucrose proton symport)* (Reismier *et al.*, 1993).

Pada sebagian besar tanaman, translokasi hasil fotosintesis dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpanan 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*) (Lalonde *et al.*, 2003).

Pada tanaman terdapat lebih dari satu gen yang mengkode SUT. Berdasarkan homologi sekuensi dan afinitas substrat, protein SUT dibedakan menjadi 3 famili. SUT1 mempunyai afinitas yang tinggi, tetapi daya muat pengangkutannya rendah. SUT2 mempunyai afinitas yang rendah, tetapi daya muat pengangkutannya tinggi. SUT4 mempunyai afinitas yang rendah dan daya pengangkutannya sangat rendah bahkan hampir tidak terdeteksi aktivitas pengangkutannya. Sementara SUT3 hanya terdapat pada tanaman tembakau dan menurut sekuensi homologinya termasuk dalam famili SUT1 (Kuhn, 2003).

## **2.2 Tanaman Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen *SoSUT 1* dan *SoSPS 1***

Tanaman tebu PRG overekspresi ganda gen *SoSUT 1* dan *SoSPS 1* merupakan hasil dari penyisipan gen *SoSUT 1* dan *SoSPS 1* pada tanaman tebu dengan tujuan agar proses biosintesis dan translokasi sukrosa meningkat pada tanaman (Sugiharto dan Safitri 2011). Pada awalnya tanaman tebu tersebut ditransformasi dengan gen *SoSUT1* menggunakan plasmid pActin-*SoSUT* dengan penanda gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin (Sugiharto, 2010).

Tanaman tebu hasil tranformasi gen *SoSUT1* kemudian ditransformasi dengan gen *SoSPS1* menggunakan plasmid pCL4 dengan gen penanda ketahanan terhadap antibiotik kanamisin. Proses transformasi tersebut menghasilkan 5 event tanaman yang memiliki overekspresi gen *SoSUT 1* dan *SoSPS 1* berdasarkan hasil konfirmasi PCR mengenai keberadaan gen yang telah diinsersikan (Ningtyas, 2013).

Transformasi genetik tanaman merupakan metode alternatif untuk menghasilkan tanaman pangan hasil rekayasa genetik yang memiliki sifat-sifat unggul, diantaranya ketahanan terhadap hama dan penyakit, ketahanan terhadap herbisida, perubahan kandungan nutrisi dan peningkatan daya simpan. Transformasi genetik adalah suatu perpindahan gen asing yang diisolasi dari tanaman, virus, bakteri atau hewan ke dalam suatu genom baru (Oktaria, 2012).

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*. Pada penelitian sebelumnya hasil transformasi menunjukkan keberadaan fragment DNA *hptII* sebesar 470 bp dan DNA *nptII* sebesar 550 bp. Hasil PCR menunjukkan terintegrasinya konstruk pCL4-*SoSPSI* pada genom tebu transforman sehingga dapat dikatakan sebagai tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* dan gen *SoSPSI*. Berdasarkan hal tersebut maka telah didapatkan 5 *event* tanaman tebu PRG yang telah diuji keberhasilan insersi gen targetnya sebagai berikut 3.1; 3.2A; 3.2B; 3.4; 2.12B ; 2.6B (Ningtyas, 2013).

## **2.3 Kultur Jaringan dan Stabilitas Genetik Pada Tanaman**

### **2.3.1 Kultur Jaringan Tanaman**

Kultur jaringan merupakan suatu teknik untuk mengisolasi, sel, protoplasma, jaringan, dan organ kemudian menumbuhkan bagian tersebut pada nutrisi yang mengandung zat pengatur tumbuh tanaman pada kondisi yang aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman sempurna (Makziah, 2011). Dasar teori teknik kultur jaringan adalah teori Totipotensi Sel yang dikemukakan oleh Schwann dan Schleiden (1838) bahwa setiap sel memiliki kemampuan untuk tumbuh menjadi individu yang sempurna apabila diletakkan pada lingkungan yang sesuai. Prinsip utama dari teknik kultur jaringan adalah perbanyak tanaman dengan menggunakan bagian vegetatif tanaman menggunakan media buatan yang dilakukan di tempat steril (Lahay,2009).

Kultur jaringan akan lebih besar persentase keberhasilannya bila menggunakan jaringan meristem. Jaringan meristem adalah jaringan muda, yaitu jaringan yang terdiri dari sel-sel yang selalu membelah, dindingnya tipis, belum mempunyai penebalan dari zat pektin, plasmanya penuh dan vakuolanya kecil-kecil. Kebanyakan orang menggunakan jaringan ini untuk *tissue culture*, sebab jaringan meristem keadaanya selalu membelah, sehingga diperkirakan mempunyai zat yang mengatur pembelahan. Keberhasilan dari kultur jaringan juga dipengaruhi oleh beberapa faktor yakni pemilihan eksplan sebagai bahan dasar untuk pembentukan kalus, penggunaan medium yang cocok, kondisi yang aseptik dan pengaturan udara yang baik terutama untuk kultur cair. Pada prinsipnya

semua jenis sel dapat di tumbuhkan, tetapi sebaiknya dipilih bagian tanaman yang masih muda dan mudah tumbuh yaitu bagian meristem, misalnya: daun muda, ujung akar, ujung batang, keping biji dan sebagainya (Makziah, 2011).

Eksplan merupakan bagian dari tanaman yang digunakan dalam mikropropagasi atau kultur jaringan tanaman. Seluruh bagian tanaman (daun, batang, dan akar) dapat dipergunakan sebagai eksplan, namun yang biasanya dipergunakan adalah meristem (jaringan muda), mata tunas dan tunas pucuk (*shoot tip*). Eksplan dapat juga berupa embrio (kelapa), benih (anggrek), biji (sengon), umbi (wortel), keping biji (kotiledon), benang sari dan putik. Menurut Manickavasagam *et al.* (2004) pemilihan sumber eksplan yang tepat memiliki peranan penting dalam menentukan keberhasilan perbanyakan *in vitro*. Tiga aspek yang harus dipenuhi dalam pemilihan sumber eksplan (tanaman induk), yaitu karakter genetik sumber eksplan, kontrol patogen, dan kondisi fisik dari tanaman yang memiliki kemampuan optimum dalam inisiasi kultur.

Eksplan yang banyak digunakan yakni tunas apikal dan tunas lateral. Kedua eksplan ini merupakan titik tumbuh pada ujung batang atau di dalam pangkal pucuk. Namun, kelemahan eksplan dari tunas lateral adalah peka terhadap kontaminasi, teknik sterilisasinya sulit dan pertunasannya lambat, sehingga untuk mendapatkan eksplan yang sehat relatif terbatas. Sedangkan eksplan dari tunas apikal kurang efisien untuk dijadikan eksplan karena jumlahnya terbatas. Setiap batang tebu hanya ada satu tunas apikal, sehingga dibutuhkan banyak tanaman tebu sebagai sumber eksplan. Kelemahan tersebut diatasi dengan melakukan induksi dan multiplikasi tunas secara *in vitro* (Sofyana, 2014).

Terdapat 4 tahap perkembangan dalam kultur *in vitro*, yaitu (1) tahap inisiasi kultur, (2) tahap multiplikasi atau perbanyakan, (3) tahap pengakaran atau inisiasi akar, dan (4) tahap aklimatisasi. Satu tahap lagi bisa ditambahkan yaitu tahap nol (0), berupa tahap pemilihan dan penyiapan tanaman induk sumber eksplan (Manickavasagam *et.al.*, 2004).

Media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan kultur. Komponen utama pada media kultur umumnya berupa garam mineral, gula sebagai sumber karbon, dan air. Komponen lainnya pada media kultur adalah



suplemen organik, zat pengatur tumbuh, dan *gel* sebagai pematat. Media dasar tersebut dapat dimodifikasi sesuai dengan kebutuhan, dengan menambahkan vitamin dan zat pengatur tumbuh (hormon). Zat pengatur tumbuh diperlukan untuk mengatur diferensiasi tanaman (Makziah, 2011).

### 2.3.2 Stabilitas Genetik Pada Tanaman

Uji stabilitas tanaman transgenik dapat dilakukan dengan menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer yang didesain dari sekuen gen yang ditransformasikan atau dari sekuen gen antibiotik yang diintegrasikan bersama-sama dengan gen interes tersebut (Amirhusin 2004). PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA (Dong, and McHughen, 1993).

Pada penelitian Sofyana (2014) menyatakan bahwa planlet tebu PRG *SoSUT1* hasil dari seleksi *in vitro* yang terdiri dari *event* B1.1 ; B3.1 ; C1.1 ; C1.2 ; C2.1 dan C2.3 menunjukkan bahwa planlet tersebut positif PRG dengan terdeteksinya pita DNA dengan ukuran 470 bp pada gel agarose yang merupakan gen *hptIII* setelah dianalisis dengan PCR. Selain itu, Kusrini (2014) juga melaporkan bahwa berdasarkan hasil PCR menunjukkan 20 dari 23 *plantlet* yang lolos media seleksi secara *in vitro* terdapat pita / band pada ukuran panjang  $\pm 550$  bp sesuai dengan pita / band DNA plasmid *pCL4-SoSPSI*. Sehingga dapat dikatakan *plantlet* tebu PRG tersebut telah stabil secara genetik. Hasil tersebut menunjukkan bahwa uji stabilitas genetik tebu PRG secara *in vitro* memiliki keberhasilan 80%.

Stabilitas genetik pada tanaman tranforman merupakan salah satu faktor terpenting dalam perakitan tanaman PRG. Pada umumnya gen yang ditransformasikan dapat diwariskan pada generasi berikutnya. Namun terdapat beberapa kasus yang menyebutkan bahwa gen yang telah diinsersikan tidak dapat

diwariskan pada generasi selanjutnya. Berdasarkan hasil tersebut diduga bahwa gen target tidak terintegrasi dalam kromosom inti sehingga gen yang diinsersikan tidak dapat diwariskan (Rahmawati dan Slametloedin, 2006).

Pada awalnya sebelum melakukan proses PCR tanaman tebu transgenik diseleksi terlebih dahulu menggunakan antibiotik. Seleksi tanaman transgenik dilakukan dengan menumbuhkan sel, jaringan atau organ, seperti biji, pada media yang mengandung antibiotik. Sel, jaringan atau organ yang hidup atau lolos dari seleksi akan merupakan tanaman yang berpotensi membawa gen yang ditransformasikan. Selain dengan cara seleksi antibiotik, efektivitas penggunaan antibiotik sebagai agen seleksi bergantung pada jenis dan konsentrasi antibiotik serta tingkat ketahanan tanaman yang diseleksi. Penggunaan antibiotik didasarkan pada gen ketahanan pada plasmid yang berfungsi sebagai *selectable marker*. Jenis antibiotik yang sering digunakan dalam media seleksi adalah kanamisin dan higromisin.

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil penelitian yang diperoleh maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Tunas apikal lebih cepat untuk ditumbuhkan secara *in vitro*, namu lebih rentan jika dibandingkan dengan tunas lateral.
2. Tanaman tebu PRG overekpresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua dari 5 *event* yang telah lolos seleksi antibiotik kanamisin dan higromisin pada seleksi 1 sebanyak 50 *plantlet* (100%), pada seleksi 2 sebanyak 23,7 *plantlet* (47,3%) dan pada seleksi 3 sebanyak 6,3 *plantlet* (29,2%).
3. Tanaman tebu PRG overekpresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua yang telah stabil sebanyak 5 *plantlet* yakni *event* 3.2B (B1 dan B2), *event* 2.6B (C1 dan C4) dan *event* 2.12B (E4), hal ini dibuktikan dengan keberadaan pita / band *hptII* ukuran 470 bp dan *nptII* dengan ukuran 550 bp melalui analisis PCR.

### 5.2 Saran

Dalam perbanyakan menggunakan eksplan tunas apikal dan lateral harus diperhatikan proses sterilisasinya untuk mengurangi kontaminasi, selain itu juga perlu dilakukan analisis lebih lanjut kandungan sukrosa, protein, stabilitas lanjutan pada *plantlet* tebu PRG overekpresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* yang telah stabil secara genetik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Amirhusin B. 2004. Perakitan Tanaman Transgenik Tahan Hama. *J Lit Per* 23:1-7
- 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.
- Cheema, and M. Hussain. 2004. Micropropagation of sugarcane through apical bud and axillary bud. *International Journal of Agriculture & Biology*. Agriculture Biotechnology Research Institute: Faisalabad-Pakistan.
- Dewi, I. 2001. *Evaluasi Tanaman Padi Transgenik Balitbio terhadap Hama Penggerek Batang*. Jakarta: Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
- Dong, J. And McHughen, A. 1993. Transgenic Flax Plants from *Agrobacterium* mediated Transformation" Incidence of Chimeric Regenerants and Inheritance of Transgenic Plants. *Plant Science*. Vol. 91: 139-148.
- 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.
- Dwinianti, Edia. F. 2013. *Transformasi Gen SoSUT1 Pada Tanaman Tebu (Saccharum Officinarum L Var. Bl) Menggunakan Agrobacterium Tumefaciens Strain Gv 3101 Dan Eksplan Pangkal Tunas Tebu In Vitro*. Skripsi. Jember : Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Gritz,L. and Davies J. 1983. Plasmid-encoded Hygromycin B Resistance: The Sequence of Hygromycin B Phosphotransferase Gene and Its Expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. Vol. 25 (2-3): 179-188.
- Huber, S. C., and Huber. 1996. Role And Regulation Of Sucrose-Phosphate Synthase In Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol, Biol*. Vol. 47:431–444.

- Koch, K. E. 1996. Carbohydrate Modulated Gene Expression in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. Vol. 47: 509-540.
- 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 Biotechnology*. Vol. 4: 135 - 141.
- Kuhn, C. 2003. A Comparison of the Sucrose Transporter System of Different Plant Species. *Plant Biol*. Vol. 5: 215-232.
- Kusrini, Eni. 2014. Seleksi Dan Uji Stabilitas Genetic Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetik (PRG) *Pcl4-SoSPS1* Secara *In Vitro*. Jember: Universitas Jember.
- Lahay, R.R. 2009. *Pemuliaan Tanaman Tebu*. Karya Tulis Studi Literatur. Medan : Universitas Sumatera Utara.
- Lalonde, Tegeder, Frommer and Patrick. 2003. Phloem Loading and Unloading of Sugar and Amino Acids. *Plant Cell Environ*. Vol. 5: 37-53.
- Makziah, P.N. 2011. Regenerasi Eksplan Melalui Organogenesis Dan Embriogenesis Somatik. *Skripsi*. Surabaya: UPN "Veteran".
- Manickavasagam, M., A. Ganapathi, V. R. Anbazhagan, B. Sudhakar, N. Selvaraj, A. dan S. Kasthuriengan. 2004. Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation and Development of Herbicide-Resistant Sugarcane (*Saccharum species hybrids*) Using Axillary Buds. *Plant Cell Rep*. Vol. 23: 134 - 143.
- Nap, P. J., J. Bijvoet dan W. J. Stiekema. 1992. Biosafety of Kanamycin-Resistant Transgenic Plants. *Transgenic Research*. Vol. 1: 239 - 249.
- Ningtyas, Rinda M. 2013. Transformasi Gen *Sosps1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. Var. Bl) Overekspresi Gen *Sosut1 Event 2* Menggunakan *Agrobacterium Tumefaciens*. *Skripsi* (tidak dipublikasikan). Jember: Universitas Jember.
- Oktaria, N. 2012. Metabolisme Sukrosa Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Transgenik Overekspresi Gen *SoSUT1*. *Skripsi* (tidak dipublikasikan). Jember: Universitas Jember.

- Rahmawati,S. dan Slametloedin,I.H. 2006. Introduksi Gen *CryIB- cryIAa* dalam Genom Padi (*Oryza sativa*) cv. Rojolele Menggunakan Transformasi *Agrobacterium*. *Hayati* 13: 19-25
- Rashid, H., S. Yokoi, K. Toriyama, and K. Hinata. 1996. Transgenic Plant Production Mediated By *Agrobacterium* in Indica Rice. *Plant Cell Re.* 15 : 727-730.
- Reismeir, B. Hirner and W.B. Formmer. 1993. Potato Sucrose Transporter Expression in Minor Veins Indicated a Role in Phloem Loading. *The Plant Cell*. Vol. 5: 1591-1598.
- Sofyana, A. 2014. *Skrining dan Uji Stabilitas Genetik Tebu Produk Rekayasa Genetik (PRG) SoSUT1 Berdasarkan Penanda Gen hptII*. Jember: Universitas Jember.
- Sutini. 2008. *Analisis Stabilitas Inseri dan Ekspresi Fenotipik Gen Partenokarpi DefH9-iaaM pada T3 Tanaman Tomat (Lycopersicon esculentum Mill.) Transgenik Asal Varietas Opal*. FMIPA UI
- Sugiharto, B., Slameto dan Dewanti, P. 2008. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen SPS dan SUT Pada Tanaman Tebu. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi. *Unpublish*.
- Sugiharto, B. 2010. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen *Sucrose Phosphat Synthase* dan *Sucrose Transporter Protein* Pada Tanaman Tebu. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi. *Unpublish*.
- 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.
- Syafa'at, D. 2005. Laporan Akhir Pengembangan Model Permintaan dan Penawaran Komoditas Pertanian Utama. Jakarta: Pusat Penelitian dan Pengembangan Sosial Ekonomi Pertanian Balitbang Departemen Pertanian.
- Tarique,H.M., Mannan, A., Bhuiyan, S.R dan Rahman, M . 2010. Micropopagation of sugarcane through leaf sheath culture. *Int. J. Sustain. Crop Prod.* 5 (2) : 13-15.

- Truernit, E. 2001. Plant Physiology: The Importance of Sucrose transporters. *Current Biology*. Vol. 11: 169-171.
- Vliegenterh, J. S. 1991. Aminoglycoside Resistance, Structure, Occurrence, and Identification of Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes. *Thesis*. RU Leiden.
- Ward J. M. 2000. *The Role of Sucrose Transporter in Assimilate partitioning and Phloem Function*. *Plant Physiology*, Center for Plant Molecular Biology, University of Tuebingen, Auf der Morgentelle 1, 72076 Tuebingen, Germany
- Winarto, B dan Rachmawati, F .2004. Teknik kultur anther pada pemuliaan Anthurium. *J.Hort.*, vol. 17, no. 2, hlm. 127-37.

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

<b>Larutan Stok</b>	<b>Bahan</b>	<b>Jumlah (g/L)</b>	<b>Pengambilan (ml/L)</b>
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,50	20
B	KNO <sub>3</sub>	95,00	20
C	CaCl <sub>2</sub>	22,00	5
	H <sub>3</sub> Bo <sub>3</sub>	0,31	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,50	
D	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0013	5
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0125	
	KI	0,0415	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18,5	
E	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,43	5
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0013	
	MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7525	
F	Na <sub>2</sub> EDTA	1,86	5
	FeSO <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,39	
Vitamin	Myo-inositol	0,001	
	Pyridoxin	0,008	5
	Tyamin HCl	0,08	
	Sukrosa	30	
	Phytigel	2,5	