



**KARAKTERISASI TANAMAN TEBU PRODUK REKAYASA GENETIKA
OVEREKSPRESI GEN *SoSUTI* GENERASI KEDUA**

SKRIPSI

Oleh

Nurul Mufitdhah

NIM 101810401018

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2015



**KARAKTERISASI TANAMAN TEBU PRODUK REKAYASA GENETIKA
OVEREKSPRESI GEN *SoSUT1* GENERASI KEDUA**

SKRIPSI

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

Oleh

Nurul Mufitdhah
NIM 101810401018

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015

PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan syukur alhamdulillah, saya persembahkan skripsi ini kepada:

1. Ibunda Siti Khotijah dan Ayahanda Daeroni, saya ucapkan terimakasih yang tak terhingga atas segala pengorbanan, jerih payah, kasih sayang, dan do'a yang tak pernah putus;
2. Adinda Yaumil Qoriah dan N. M. Nashiral Magribi atas semangat yang telah diberikan;
3. seluruh keluarga besar yang telah banyak memberikan dukungan dalam setiap usahaku;
4. semua guru-guru yang telah memberikan ilmu dan mendidik, terimakasih yang tak terhingga atas ilmu yang diberikan;
5. Almamater Universitas Jember.

MOTO

“Sesungguhnya bersama kesulitan pasti ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai dari suatu urusan, tetaplah bekerja keras untuk urusan yang lain”

(Asy-Syarah: 6-7)*)

*Departemen Agama Republik Indonesia. 2008. Al-Qur'an dan Terjemahan. Jakarta: CV. Pustaka Al-Kautsar.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nurul Mufitdhah

NIM : 101810401018

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Karakterisasi Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSUT1* Generasi Kedua” 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 oleh PT. Perkebunan Nusantara XI dan Masterplan Percepatan dan Perkembangan Pembangunan Ekonomi Indonesia (MP3EI) tahun 2014 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 di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Mei 2015

Yang Menyatakan,

Nurul Mufitdhah

NIM 101810401018

SKRIPSI

**KARAKTERISASI TANAMAN TEBU PRODUK REKAYASA GENETIKA
OVEREKSPRESI GEN *SoSUT1* GENERASI KEDUA**

Oleh

**Nurul Mufitdhah
NIM 101810401018**

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Karakterisasi Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSUT1* Generasi Kedua” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Jember pada:

Hari, tanggal :

Tempat : Fakultas MIPA Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

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

Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS.
NIP. 19650426 199403 1 001

Anggota

Penguji I,

Penguji II,

Kahar Muzakhar, S.Si, Ph.D.
NIP 196805031994011001

Dra. Dwi Setyati, M.Si.
NIP 196404171991032001

Mengesahkan
Dekan,

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

RINGKASAN

Karakterisasi Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSUT1* Generasi Kedua; Nurul Mufitdhah; 181810401018; 2015; 32 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tebu produk rekayasa genetika (PRG) overekspresi gen *SoSUT1* merupakan tanaman tebu hasil transformasi gen *SoSUT1* pada penelitian sebelumnya. Gen *SoSUT1* merupakan gen penyandi protein SUT (*Sucrose Transporter*) pada tanaman tebu, sebagai protein translokator sukrosa dari organ fotosintat menuju organ penyimpanan. Overekspresi gen *SoSUT1* diharapkan dapat meningkatkan kandungan protein SUT1 sehingga akumulasi sukrosa pada organ batang juga dapat mengalami peningkatan. Penelitian ini ditujukan untuk karakterisasi pertumbuhan, ekspresi gen SUT1, serta kandungan sukrosa pada tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua yang ditumbuhkan dalam pot percobaan.

Karakterisasi tebu PRG diawali dengan konfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* dengan analisis PCR menggunakan pasangan primer *F/R HptII*. Hasil konfirmasi gen *SoSUT1* pada 42 tanaman PRG generasi kedua yang berasal dari 13 event dengan analisis PCR menunjukkan 39 tanaman positif mengandung gen *SoSUT1* yang telah ditransformasikan ke dalam genom tanaman. Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua memiliki kestabilan genetik sebesar 92,8%. Analisis western blot dengan menggunakan antibody SUT1 menunjukkan bahwa tanaman tebu PRG memiliki pita protein SUT1 lebih tebal dibandingkan dengan *wildtype*. Analisis kandungan sukrosa daun menunjukkan bahwa secara umum kandungan sukrosa daun pada tanaman tebu PRG lebih rendah daripada tanaman kontrol. Hasil analisis sukrosa batang pada 14 event tanaman tebu PRG

umur 9 bulan menunjukkan bahwa secara umum kandungan sukrosa batang tanaman PRG lebih tinggi dariada kontrol. Analisis pertumbuhan berupa rata-rata jumlah anakan menunjukkan tebu PRG secara umum memiliki jumlah anakan lebih sedikit daripada tebu non-PRG (kontrol).



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, hidayah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Karakterisasi Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSUTI* Generasi Kedua”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

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

1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc selaku dosen pembimbing utama dan Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS. selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, saran, maupun bimbingan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini;
2. Kahar Muzakhar, S.Si, Ph.D selaku dosen penguji I dan Dra. Dwi Setyati, M.Si selaku dosen penguji II yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Dra. Mahriani, M. Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing dan memberikan nasehat selama penulis menjadi mahasiswa;
4. seluruh keluarga besarku yang telah begitu banyak memberikan dorongan dan dukungan dalam setiap jalanku;
5. Purnama Okviandari, S.P, M.P. teman-teman seperjuanganku: Fika, Narita, S. Si., Nana, Aping, Aal, S. P., Derta, Ahmil, S. Si., Warda, S. Si., Icha, Halimah, Loly, Putri, Qoyim, beserta para seniorku Frenki S. P., Wimbuh S. Si., Novita S. Si., Dina S. Si., Ani S.Si., Ana S. P., Ifan S. P., Ryski S. P, Fadrian S. P., adik- adik (Ryan, Wulan, Retna, Retno, Iffah)

serta seluruh keluarga besar CDAST yang telah memberikan masukan dan semangat selama menjalankan tugas akhir;

6. teman-teman yang banyak memberi motivasi penulis; Yura Bagus, Ari Kristiana, Enis Anike, Lusi Dwi dan semua teman-teman BOLU (biologi 2010) yang telah memberi banyak semangat dan motivasi selama ini, serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

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

Jember, Mei 2015

Penulis

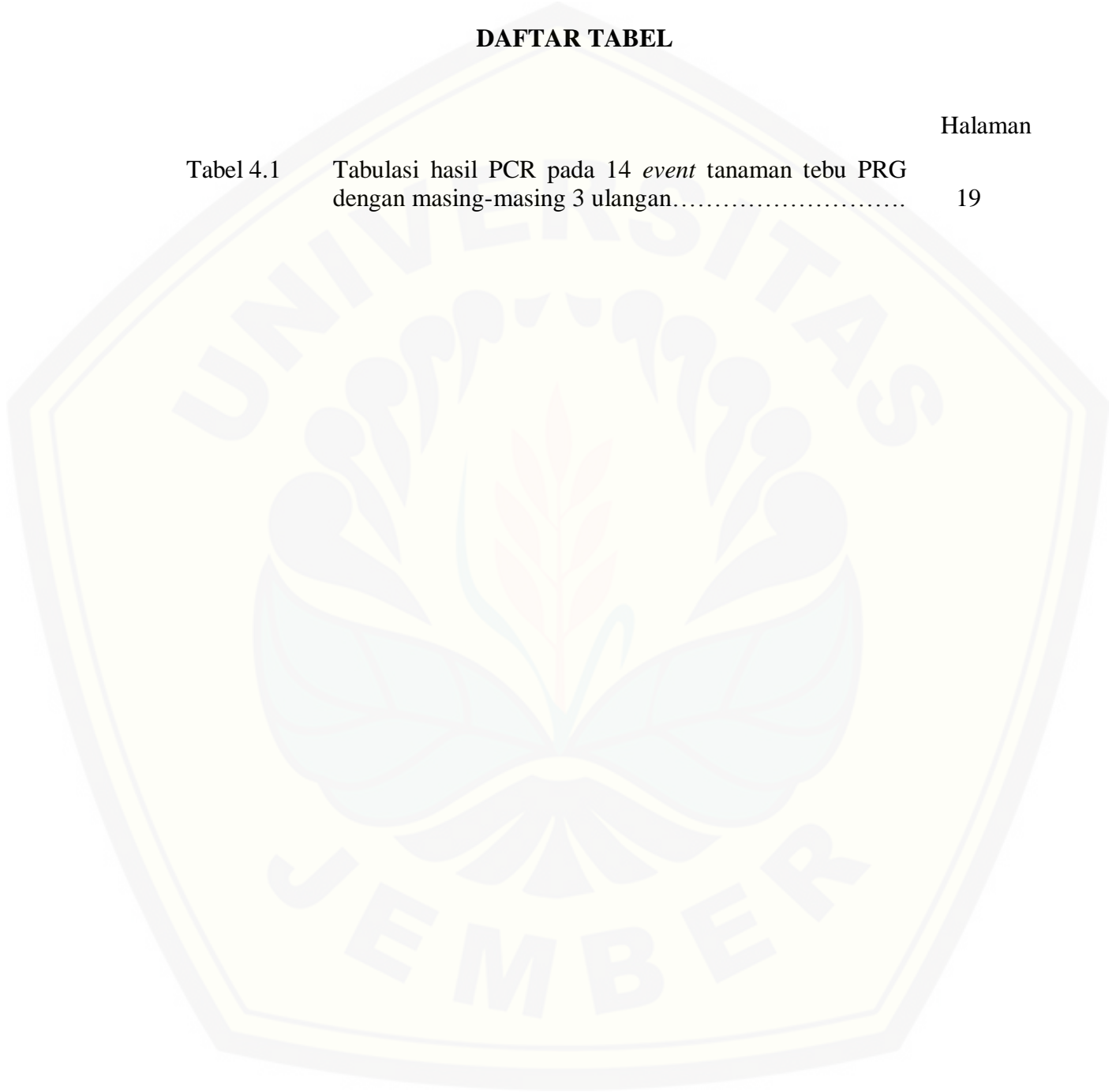
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan	3
1.5 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Sintesis dan Translokasi Sukrosa pada Tanaman Tebu	4
2.2 Akumulasi Sukrosa pada Organ Penyimpanan (<i>sink</i>)	7
2.3 Tanaman PRG Overekspresi Gen <i>SoSUT1</i> generasi Kedua	8

BAB 3. METODE PENELITIAN.....	10
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	10
3.2 Alat dan Bahan	10
3.3 Alur Penelitian.....	11
3.4 Prosedur Penelitian.....	12
3.4.1 Pengambilan sampel.....	12
3.4.2. Isolasi DNA Genom.....	12
3.4.3 Analisis PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	13
3.4.4 Elektroforesis Gel Agarose.....	13
3.3.5 Ekstraksi Protein SUT1.....	14
3.4.6 Analisis SDS-PAGE dan <i>Western Blot</i>	15
3.4.7 Ekstraksi dan Analisis Kandungan Sukrosa Daun dan Batang...	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	18
4.1 PCR Tanaman Tebu PRG Overekspresi Gen <i>SoSUT1</i>	
generasi Kedua.....	18
4.2 Western Blot Protein SUT1.....	21
4.3 Kandungan Sukrosa Daun dan Batang.....	23
4.3.1 Kandungan Sukrosa Daun.....	23
4.3.2 Kandungan sukrosa batang.....	25
4.4 Rata-rata Jumlah Anakan pada saat Tebu Umur	
Bulan.....	26
BAB 5. PENUTUP.....	28
5.1 Kesimpulan.....	28
5.2 Saran.....	28
DAFTAR PUSTAKA.....	29
LAMPIRAN.....	33

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Tabulasi hasil PCR pada 14 <i>event</i> tanaman tebu PRG dengan masing-masing 3 ulangan.....	19



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Mekanisme asimilasi karbon pada tanaman C4 yang terjadi pada dua sel yaitu mesofil sebagai photosynthetic carbon assimilation (PCA) tissue dan <i>bundle sheath cell</i> sebagai photosynthetic carbon reduction (PCR) tissue.....	5
Gambar 2.2 Sukrosa ditransport oleh protein sucrose transporter secara simplas melalui plasmodesmata dan secara apoplas melalui ruang interseluler. SE.....	6
Gambar 4.1 Elektroforesis 1% gel agarose DNA hasil PCR dengan pasangan primer <i>hptII-1F/1R</i> dan <i>template</i> sampel DNA genom tanaman tebu PRG overekspresi gen <i>SoSUT1</i> dan kontrol.....	20
Gambar 4.2 Hasil analisis <i>western blot</i> protein SUT1 pada tanaman tebu PRG overekspresi gen <i>SoSUT1</i> dan kontrol dengan konsentrasi 30 µg, menggunakan antibodi poliklonal spesifik SUT1 dan antibodi 2 <i>Goat Anti-Rabbit Igg Phosphatase Conjugate</i>	22
Gambar 4.3 Hasil analisis rata-rata kandungan sukrosa daun umur 9 bulan pada tanaman PRG overekspresi gen <i>SoSUT1</i> dan tanaman kontrol (<i>wildtype</i>).....	24
Gambar 4.4 Hasil analisis rata-rata kandungan sukrosa batang umur 9 bulan pada tanaman PRG overekspresi gen <i>SoSUT1</i> dan tanaman kontrol (<i>wildtype</i>) ruas ke enam.....	25
Gambar 4.5 Hasil perhitungan rata-rata jumlah anakan tanaman PRG overekspresi gen <i>SoSUT1</i> dan tanaman kontrol (<i>wildtype</i>) umur 6 bulan.....	26

DAFTAR SINGKATAN

APS	= <i>ammonium persulfate</i>
BCIP	= <i>bromo chloro indolyl phosphate disodium salt</i>
BSA	= <i>Bovine Serume Albumin</i>
DDT	= <i>dithiotreitol</i>
EDTA	= <i>ethylenediaminetetraacetic acid,</i>
HCl	= <i>Hydrochloric acid</i>
LGB	= <i>lower gell buffer</i>
MCW	= <i>Metanol : Chloroform : Water</i>
NaCl	= <i>Sodium chloride</i>
NaCl	= <i>Sodium hydroxide</i>
NBT	= <i>nitro blue tetrazolium chloride</i>
PSMF	= <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PVP	= <i>polyvinyl pyrrolidone</i>
SDS	= <i>sodium dodecyl sulphate</i>
TBS	= <i>tris-buffered saline</i>
TCA	= <i>trichroriacetic acid</i>
UGB	= <i>upper gell buffer</i>

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A1. Kurva Standart BSA Menggunakan metode Lowry	33
A2. Kurva Standart sukrosa.....	33
B. Daftar Nama Event Tanaman Tebu PRG Overekspresi Gen <i>SoSUT1</i> Generasi Kedua serta Penempatannya di Agrotechnopark.....	34
C. Konfirmasi PCR menggunakan pasangan primer <i>hptII</i> pada tanaman tebu hasil transformasi gen <i>SoSUT1</i>	35
D1. Kandungan Sukrosa Daun Tanaman Tebu Hasil Transformasi <i>Single Gen SoSUT1</i> Event A-D.....	36
D2. Kandungan Sukrosa Batang Tanaman Tebu Hasil Transformasi <i>Single Gen SoSUT1</i> Event A-D.....	36

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tebu merupakan tanaman utama penghasil gula sukrosa dan sukrosa merupakan produk utama fotosintesis tanaman yang dihasilkan melalui proses asimilasi karbon (Campbell *et al.*, 2000). Sintesis sukrosa terjadi di jaringan sitosol (*source tissue*) yang dikatalisis oleh enzim *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) (Huber and Huber, 1996). Pada tanaman, enzim SPS merupakan enzim kunci yang menentukan biosintesis sukrosa dalam jaringan mesofil daun. Selanjutnya sukrosa yang dihasilkan digunakan sebagai sumber karbon dan sumber energi, serta ditranslokasi ke organ penyimpanan (*sink tissue*) (Lakitan, 2010), oleh *Sucrose Transporter* (SUT). SUT merupakan protein yang berfungsi sebagai translokator sukrosa dari *source tissue* ke *sink tissue* dan disandikan oleh gen *SoSUT1* (Riesmeier *et al.*, 1992).

Total produksi tebu ditentukan oleh rendemen tebu, semakin tinggi rendemen maka produksi akan meningkat (Marliani, 2011). Lamhot (2003) menyatakan bahwa rendemen gula tebu merupakan kadar gula yang terkandung di dalam tebu dan didefinisikan sebagai jumlah kilogram kristal gula yang terbentuk dari setiap kuintal tebu yang digiling. Upaya peningkatan rendemen tebu yang saat ini banyak dilakukan adalah dengan melakukan transformasi genetik, yaitu memasukkan gen target yang telah diisolasi dari suatu organisme ke dalam sel tanaman. Salah satunya adalah dengan melakukan transformasi gen *SoSUT1* yang diharapkan dapat memperbaiki atau meningkatkan translokasi sukrosa ke batang tebu.

Tebu produk rekayasa genetika (PRG) overekspresi gen *SoSUT1* merupakan tanaman tebu yang telah mengalami proses transformasi gen *SoSUT1*. Pada dasarnya, di dalam tanaman tebu telah terdapat gen *SUT1*, tetapi dengan adanya

transformasi gen *SoSUT1* diharapkan tanaman tebu mengalami overekspresi atau peningkatan ekspresi gen *SUT*. Hackel *et al.*, (2006) menyatakan bahwa *overekspresi* gen *SUT* dapat meningkatkan translokasi sukrosa ke organ *sink*. Adanya overekspresi diharapkan dapat menghasilkan tanaman tebu yang memiliki nilai rendemen tinggi.

Pada penelitian yang dilakukan Dwinianti (2013), telah diperoleh tanaman tebu PRG varietas BL overekspresi gen *SoSUT1* event T 1.1, T 1.4, T 1.7, T 2.1, T 2.2, T 2.4, T 3.2, T 3.5, hasil transformasi Sugiharto dan Safitri (2011) T 2, 1 event hasil transformasi Wiyono (2012) yaitu T 20, dan 4 *event* hasil transformasi dari Hardjo (2014) yaitu TB 16, TB 17, TB 18, dan TB 20. Tanaman tebu tersebut sebelumnya telah dikonfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* dengan analisis PCR. Selanjutnya tanaman yang telah ada tersebut ditanam kembali menggunakan stek batang/bagal tebu, dan untuk mengetahui stabilitas genetik tanaman tebu PRG perlu dilakukan karakterisasi pada generasi kedua. Dong & Huguen (1993) menyatakan bahwa penyebaran/insersi gen target tidak merata pada jaringan tanaman transgenik diakibatkan adanya *chimera*. *Chimera* dapat menyebabkan gen tidak terekspresi dan tidak dapat diturunkan pada generasi selanjutnya. Belum stabilnya gen pada tanaman hasil transformasi menjadi alasan perlunya dilakukan penelitian tentang karakterisasi tanaman PRG generasi kedua untuk mengetahui stabilitas ekspresi gen *SoSUT1* yang terinsersi ke dalam genom tanaman, serta hubungannya dengan akumulasi sukrosa pada tanaman tebu.

1.2 Perumusan Masalah

Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi pertama telah dikonfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* melalui analisis PCR dan positif mengandung gen *hptII*, sehingga dapat dikatakan juga mengandung gen target *SoSUT1*. Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua belum dikarakterisasi dan masih memerlukan beberapa pengujian untuk mengetahui

ekspresi gen *SoSUT1* yang telah diinsersikan. Pada penelitian ini dilakukan uji ekspresi gen pada tingkat translasi, serta uji kandungan sukrosa daun dan batang.

1.3 Batasan Masalah

Karakterisasi yang dilakukan meliputi uji keberadaan overekspresi gen *SoSUT1* dengan analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*), penentuan kandungan protein SUT1 dengan *western blot* dan analisis kandungan sukrosa untuk mengetahui kandungan sukrosa daun dan batang dengan uji *Seliwanoff* (1887 dalam Widodo 2014).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakter tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua, terutama pada ekspresi protein SUT1, serta keberadaan gen *SoSUT1* untuk mengetahui stabilitas genetiknya.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan mampu memberikan gambaran tentang stabilitas genetik tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* dalam hubungannya dengan ekspresi gen *SoSUT1* pada tebu. Serta dapat memberi informasi tentang karakter tanaman tebu PRG generasi kedua.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

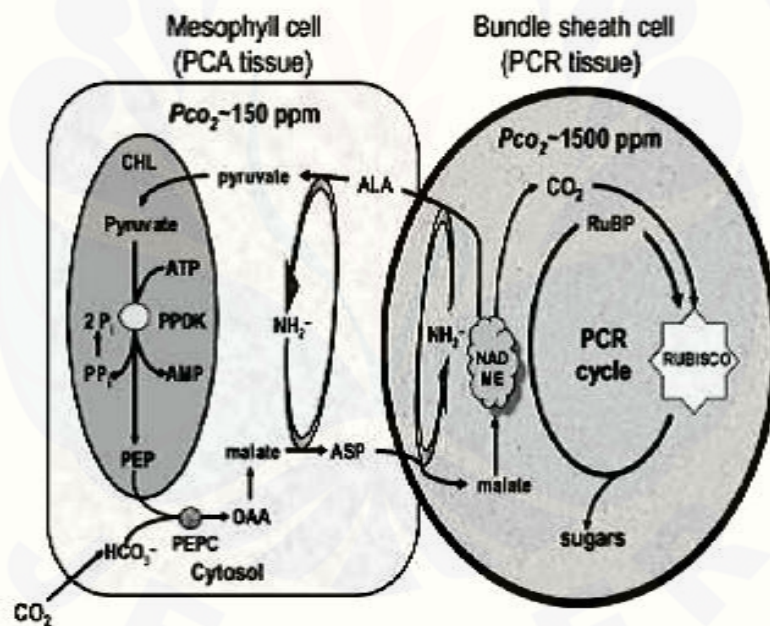
2.1 Sintesis dan Translokasi Sukrosa pada Tanaman Tebu

Sukrosa merupakan produk akhir dari proses asimilasi karbon (C) pada fotosintesis yang terjadi di daun. Berdasarkan tipe fotosintesisnya tebu termasuk dalam tumbuhan C4. Jalur asimilasi karbon tanaman C4 melibatkan sel mesofil dan *bundle sheath cell*. Secara singkat, proses asimilasi karbon terjadi di dalam sel mesofil yang diawali dengan masuknya CO₂ ke dalam sel kemudian menjadi HCO₃⁻. HCO₃⁻ akan bereaksi dengan *Phosphoenol Pyruvate* (PEP-3C) membentuk asam oksaloasetat (4C). Oksaloasetat dengan bantuan NADP *malate dehidrogenase* menghasilkan asam malat yang kemudian ditransfer ke dalam *bundle sheath cell* (Buchanan *et al*, 2000).

Di dalam *bundle sheath cell*, malat akan mengalami dekarboksilasi untuk menghasilkan CO₂. Pada siklus calvin, CO₂ akan segera difiksasi oleh rubisco untuk membentuk senyawa 3-PGA. Senyawa 3-PGA lalu dikonversikan menjadi triosa phosphate (triosa-P) yang menjadi titik persimpangan penggunaan senyawa fotosintat untuk sintesis sukrosa atau pati. Sebagian triosa phosphate digunakan untuk membentuk pati di kloroplas dan ada yang dikeluarkan dari kloroplas untuk membentuk sukrosa di dalam sitosol yang difasilitasi oleh protein *triose phosphate translocator* (TPT) (Buchanan *et al*, 2000).

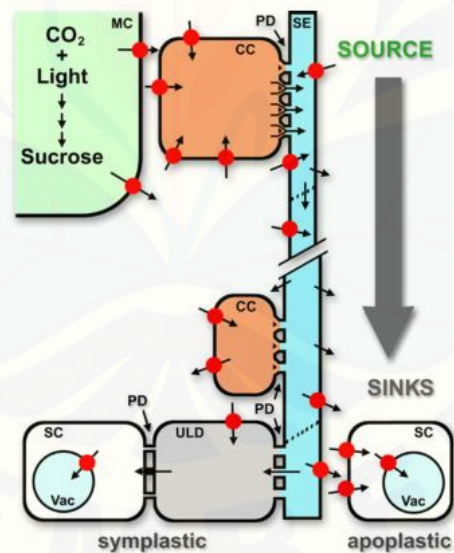
Empat triosa phosphate dalam sitosol dikonversi menjadi 2 molekul *glyceraldehyde 3-phosphate* dan 2 molekul *dihydroxyacetone-phosphate* yang dikatalisis oleh enzim *triosephosphate isomerase*. Kemudian dari molekul tersebut akan dibentuk *fructose 1,6-bisphosphate* yang dikatalisis oleh *aldolase*. Selanjutnya terjadi pelepasan *phosphate* sehingga membentuk dua molekul *fructose-6-phosphate* yang dikatalisis oleh *fructose-1,6-bisphosphatase*. *Fructose-6-phosphate* yang terbentuk sebagian dikonversikan menjadi *glucose-1-phosphate*

yang dikatalisis oleh *hexose phosphate isomerase* dan *glucose phosphate mutase*. Kemudian *glucose-1-phosphate* akan bereaksi dengan *Uridin triphosphate* untuk membentuk *uridine diphosphate glucose* (Anderson dan Beardall, 1991). *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) adalah enzim yang berperan dalam mengkatalisis pembentukan *sucrose-6-phosphate* (suc6P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG), sehingga menjadi enzim kunci dalam biosintesis sukrosa di mesofil daun. Gugus *phosphate* pada suc6P akan diputus oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) sehingga dihasilkan sukrosa dan *phosphate anorganic* (Pi) (Anderson dan Beardall, 1991).



Gambar 2.1. Mekanisme asimilasi karbon pada tanaman C4 yang terjadi pada dua sel yaitu mesofil sebagai photosynthetic carbon assimilation (PCA) tissue dan *bundle sheath cell* sebagai photosynthetic carbon reduction (PCR) tissue (Sage, 2003).

Sukrosa merupakan senyawa yang sangat dibutuhkan oleh setiap jaringan tanaman sebagai sumber energi dan disimpan sebagai cadangan makanan. Sukrosa yang telah disintesis di daun kemudian akan diangkut menuju jaringan penyimpanan. Pengangkutan sukrosa berawal dari sintesis sukrosa di dalam sitosol pada sel fotosintetik dan akan berpindah secara simplast dengan difusi sederhana maupun apoplast dengan perantara *sucrose transporter* (SUT) (Ningsih, 2003). Lalonde *et al.*, (2003) menyatakan bahwa secara symplast, sukrosa yang telah berada di dalam *companion cell*, akan memasuki *sieve element* floem melalui plasmodesmata dan akan bergerak menuju jaringan penyimpan (*sink*) melalui aliran massa. Sukrosa secara apoplast dimuat ke dalam *companion cell* (CC) dan *sieve elements* (SE) oleh protein SUT menuju organ batang (*sink*), seperti terlihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Sukrosa ditransport secara simplast melalui plasmodesmata dan secara apoplas melalui ruang interseluler oleh protein sucrose transporter . SE: sieve element; CC: companion cell; MC: mesophyll cell; PD: plasmodesmata; ULD: unloading domain; SC: sink cell; Vac: vakuola (Sauer, 2007).

Sucrose Transporter terletak pada membran plastid, membran *vacuola*, dan membran plasma. Translokasi sukrosa oleh protein SUT menggunakan mekanisme sukrosa -H⁺ simporter (*sucrose proton symport*), serta merupakan bentuk pengangkutan aktif yaitu pemindahan zat terlarut melawan gradien konsentrasi, melintasi membran plasma dari satu sisi yang konsentrasi zat terlarutnya rendah menuju ke sisi yang konsentrasi zat terlarutnya tinggi (Champbell *et al.*, 2000).

2.2 Akumulasi Sukrosa pada Organ Penyimpanan (*sink*)

Akumulasi sukrosa pada batang tebu dimulai pada internodus yang sedang mengalami proses pemanjangan (*elongation*) sampai pada internodus yang proses pemanjangannya berhenti (Lingle, 1997). Di batang sukrosa akan mengalami proses metabolisme lebih lanjut meliputi proses hidrolisis dan resintesis. Miswar *et al.*, (2007), menyebutkan bahwa pada internodus batang yang masih muda kandungan sukrosanya relatif kecil karena jumlah energi dan kerangka karbon diperlukan dalam jumlah besar, sehingga jumlah sukrosa yang dihidrolisis juga lebih besar. Besarnya jumlah sukrosa yang dapat diakumulasi pada batang ditentukan oleh selisih antara proses sintesis dan degradasi sukrosa menjadi fruktosa serta glukosa yang akan digunakan untuk pertumbuhan.

Kandungan sukrosa pada batang tebu sangat terkait dengan besarnya perbedaan antara aktivitas SPS dan *acid invertase* (Zhu *et al.*, 1997). Pada internodus batang tebu yang baru memulai proses pemanjangan mempunyai kandungan sukrosa yang rendah dan aktivitas *invertase* sangat tinggi. Seiring dengan semakin dewasanya internodus, kandungan sukrosa semakin meningkat dan aktivitas *invertase* semakin menurun. Banyak penelitian yang melaporkan tentang pengaruh SPS dan *invertase* terhadap kandungan sukrosa buah, antara lain Dali *et al.* (1992) yang menduga bahwa sukrosa yang dibentuk pada daun tomat

akan dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh *invertase* setelah sampai di buah. Sukrosa kemudian dibentuk kembali (resintesis) dari glukosa dan fruktosa yang dikatalisis oleh SPS buah.

Akumulasi sukrosa di jaringan penyimpanan juga sangat dipengaruhi oleh translokasi sukrosa oleh *sucrose transporter* (SUT). Berdasarkan analisis filogenetik pada homologi sekuensi, afinitas substrat, dan fungsi masing-masing SUT, gen *SUT* terbagi dalam tiga famili, yaitu *SUT1*, *SUT2*, dan *SUT4* (Kuhn, 2003). 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 famili protein SUT lainnya sehingga keberadaannya dalam tanaman penting dalam hal akumulasi sukrosa pada organ penyimpanan (*storage tissue*).

2.3 Tanaman PRG Overekspresi Gen *SoSUT1* generasi Kedua

Tanaman PRG merupakan produk yang dirakit struktur genetiknya dengan memasukkan gen tertentu sehingga menghasilkan tanaman yang memiliki produksi lebih tinggi (Mulyadi, 2011). Gen *SoSUT1* merupakan gen penyandi protein *sucrose transporter1* (SUT1) pada tanaman tebu yang memiliki peran penting terhadap transportasi sukrosa dari organ fotosintesis ke organ nonfotosintesis. Penelitian pertama mengenai *sucrose transporter* dilakukan oleh Riesmeier *et al.* (1992) dengan mengisolasi cDNA *SUT* dari bayam. Isolasi cDNA *SoSUT1* dari tanaman tebu juga telah dilakukan (Sugiharto, 2010) kemudian ditransformasikan ke dalam sel tanaman tebu menggunakan plasmid *pAct-SoSUT1* oleh Dwinianti (2013), Sugiharto dan Safitri (2011), Wiyono (2012), dan Hardjo (2014). Transformasi tersebut bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu transforman melalui transformasi genetik menggunakan vektor *A. tumefaciens* yang membawa gen *SoSUT1*.

Pada tanaman tebu sudah terdapat gen *SUT1* endogen, tetapi dengan dilakukannya transformasi gen *SoSUT1* diharapkan tanaman tebu akan mengalami overekspresi (ekspresi berlebih). Riesmeier *et al.* (1994) melaporkan bahwa dengan melakukan overekspresi gen pengkode *sucrose transporter* (gen *SUT1* pada tanaman kentang) dapat meningkatkan laju transportasi sukrosa, sehingga meningkatkan kemampuannya untuk mengakumulasikan sukrosa di organ penyimpanan (*sink*). Hackel *et al.*, (2006) juga melaporkan bahwa overekspresi gen *SUT* pada tanaman tomat telah berhasil dilakukan dan dapat meningkatkan translokasi sukrosa.

Christou *et al.* (1991) menyatakan bahwa tanaman dikatakan stabil apabila gen target telah terinsersi ke dalam genom tanaman dan dapat diwariskan ke generasi berikutnya. Menurut Oard *et al.*, (1996), pada tanaman yang dapat melakukan penyerbukan sendiri, umumnya memiliki gen yang stabil pada generasi T4 dan pada tanaman yang penyerbukannya membutuhkan perantara (*cross pollination*) gen akan stabil pada generasi T8. Uji stabilitas genetik pada tanaman PRG perlu dilakukan untuk mengetahui kestabilan insersi gen pada turunannya. Uji stabilitas gen tersebut dapat dilakukan dengan analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan cara amplifikasi fragmen gen target menggunakan primer spesifik sehingga tanaman yang telah terinsersi dapat terdeteksi. Analisis lebih lanjut seperti *Western blot* juga perlu dilakukan untuk melihat keberadaan gen target yang telah terinsersi dapat terekspresikan. Serta untuk melihat adanya overekspresi gen *SoSUT1* dapat meningkatkan translokasi sukrosa, maka juga perlu dilakukan analisis kandungan sukrosa daun dan batang.

BAB 3. METODE PENELITIAN

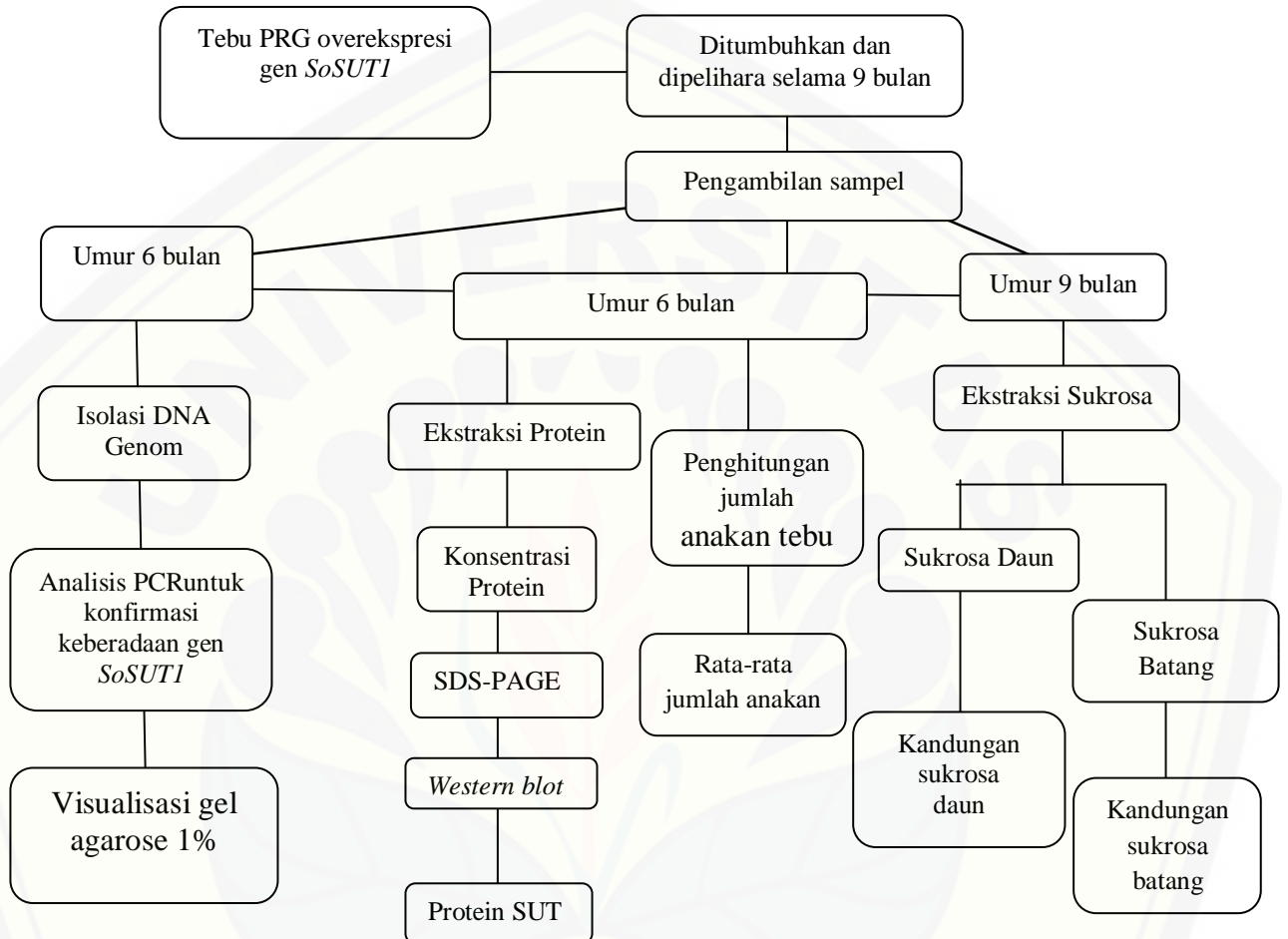
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Divisi Biomolekuler dan Bioteknologi, Laboratorium Center for Development Advance Science and Technology (CDAST), Universitas Jember pada Bulan Juli 2014 sampai Desember 2014.

3.2 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L. varietas Bulu Lawang) PRG overekspresi gen *SoSUT1* sebanyak 14 *event* dan 1 tanaman tebu kontrol non PRG varietas BL dengan masing-masing 3 ulangan. Alat dan bahan kimia yang digunakan antara lain bahan standar untuk isolasi DNA genom, analisis PCR, ekstraksi protein dan ekstraksi sukrosa, SDS-PAGE, serta *western blot*.

3.3 Alur Penelitian



3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun dan batang dilakukan pada 14 *event* tanaman PRG yang ditumbuhkan pada pot percobaan dengan masing-masing 3 ulangan. Pengambilan sampel daun untuk analisis DNA genom, protein, serta sukrosa dilakukan pada daun pertama yang membuka sempurna (dihitung dari pucuk). Pengambilan sampel nira tebu untuk analisis sukrosa dilakukan pada batang tebu ruas ke 6 yang dihitung dari ruas bawah (di atas permukaan tanah).

3.4.2 Isolasi DNA Genom Tanaman

Isolasi DNA genom tanaman dilakukan dengan cara menggerus 0,3 gram daun tebu sampai halus menggunakan mortar-stamper dengan menambahkan N₂ cair (Zheng *et al.*, 1995). Serbuk yang didapatkan dipindahkan ke tabung mikrosentrifuge dan ditambahkan 600 µl buffer ekstraksi (100 mM Tris, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, dengan pH keseluruhan 8,0), 50 µl SDS 20% dan 1,25 µl β-Mercaptoethanol. Campuran dihomogenkan menggunakan vorteks dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 10 menit. Campuran ditambahkan dengan 300 µl *Potassium acetat* 5M dan dihomogenkan dengan teknik *swirling* (membolak balik tabung mikrosentrifuge). Campuran diinkubasi dalam es selama 10 menit dan disentrifugasi 12.000 rpm pada suhu 4 °C, selama 10 menit. Supernatan dipindah ke tabung mikrosentrifuge dan ditambahkan 375 µl isopropanol, dihomogenkan dengan teknik *swirling* dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 1 jam. Selanjutnya disentrifugasi ulang, supernatan dibuang dan pada pellet yang dihasilkan, ditambah dengan 300 µl buffer TE dan 10 µl RNA-se. Campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam.

Campuran ditambah dengan 300 µl Phenol Chloroform Isoamil Alchohol kemudian divorteks dan disentrifugasi 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan (lapisan paling atas) yang dihasilkan dipindah ke tabung mikrosentrifuge dan ditambahkan chloroform (*equal volume*), divorteks lalu

disentrifuge kembali. Supernatan dipindah ke eppendorf baru, ditambahkan isopropanol sebanyak 0.8 kali supernatant dan NaAc 3 M sebanyak 0.2 kali supernatant. Diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam, disentrifuge 12.000 rpm, 4°C , selama 10 menit. Pellet dicuci dengan ethanol 70 % 600 μl dan disentrifuge 12.000 rpm, 4°C , selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet dikeringkan dengan *vacum dry* selama 10 menit, kemudian dilarutkan dengan 20 μl buffer Tris EDTA. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya dengan nanodrop dari *Nanovue* pada panjang gelombang 260 nm dan digunakan untuk analisis PCR.

3.4.3 Analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan PCR Kit dari *KAPABIOSYSTEMS* yang komposisinya terdiri dari *KAPA Taq Extra HotStart DNA Polymerase*, *KAPA Taq Extra Buffer*, dNTPs, MgCl_2 , *two inert tracking dyes*. Dalam satu kali reaksi memiliki total volume 20 μl dengan larutan yang terdiri dari 2X PCR *Master Mix* 10 μl , masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) 10 pmol sebanyak 1 μl , template DNA genom 1,25 μl (konsentrasi 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dan ddH₂O 6,75 μl . PCR dilakukan menggunakan primer forward primer hpt-F (5' CCGCAAGGAATCGGTCAATA-3) dan reverse primer hpt-R (5'CCCAAGCTGCATCATGGAAA-3) dari *hptII* (*hygromycin phosphotransferase*). PCR dilakukan sebanyak 40 siklus meliputi tahapan predenaturasi 94°C selama 3 menit, denaturasi 94°C selama 30 detik, *annealing* 58°C selama 20 detik, *elongation* 72°C selama 1 menit dan *final elongation* 72°C selama 5 menit.

3.4.4 Elektroforesis Gel Agarose

DNA yang telah teramplifikasi oleh PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Elektroforesis gel agarose memiliki prinsip pemisahan senyawa berdasarkan berat molekulnya dibawah medan listrik. Pembuatan gel agarose dilakukan dengan cara mencampurkan sebanyak 50 ml TBE ditambah 0,5 gram agarose dan 3 μl *ethidium bromide*, kemudian dipanaskan dan dituang dalam

cetakan hingga menjadi gel. Sampel DNA sebanyak 10 µl dimasukkan pada sumuran gel lalu dialiri arus listrik dengan tegangan 100 Volt selama 20-25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb Ladder (*intron biotechnology*) sebanyak 3 µl untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat dengan alat *gel imagine system* dari *Major Sciences*.

3.4.5 Ekstraksi Protein SUT1

Ekstraksi dilakukan dengan menggerus 1 gram daun tebu sampai halus kemudian ditambahkan buffer ekstraksi SUT1 (250 mM Tris-HCl, 25mM EDTA, 30% sukrosa, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, dan 5 %, *polyvinyl pyrrolidone* (PVP)) dengan perbandingan 1:3 dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Pellet dicuci dengan buffer ekuilibrasi (50 mM Tris-HCl, 25 mM, 10 % MgCl) kemudian divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit.

Pellet yang didapatkan ditambah dengan 150 µl buffer solubilisasi (50 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, 2% SDS, dan 5 mM DTT) dan divortex. Campuran diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang sudah diperoleh ditampung dalam *microtube* untuk dilakukan analisis SDS-PAGE dan *western blot* protein SUT1. Namun sebelum dilakukan analisis lebih lanjut dilakukan perhitungan total protein terlarut dengan Lowry (1951).

Total protein terlarut ditentukan dengan metode Lowry (1951) dengan mengambil crude protein 50 µl ditambah H₂O hingga volume 500 µl, kemudian ditambah dengan 500 µl TCA 20 % dan diinkubasi selama satu malam. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Pelet dicuci dengan 500 µl *acetone* dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit sebanyak 2 kali. Pelet ditambah dengan 0,25 µl NaOH 0,25N kemudian direaksikan dengan 500 µl reagen Lowry (2% Na₂CO₃, 0.5% CuSO₄.H₂O, 1% Sodium Tetrata) dan diinkubasi selama 10 menit. Campuran direaksikan dengan

500 µl Follin 1 N serta dihomogenkan menggunakan *vortex*. Campuran diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang kemudian diukur absorbansinya pada 660 nm. Nilai absorbansi yang didapat kemudian dihitung dengan rumus yang terdapat pada kurva standart BSA.

3.4.6 Analisis SDS-PAGE dan *Western Blot*

Sampel yang didapatkan dari ekstraksi protein SUT1 dengan konsentrasi protein 30 µg ditambah *buffer loading* (Tris-Cl 0,5 M pH 6,8; SDS 10 %; *glycerol* 10 %; *bromophenol blue*). Perbandingan volume antara sampel dan buffer adalah 1 : 1, setelah itu didenaturasi pada suhu 100°C selama 3 menit. Sampel yang telah dicampur buffer loading kemudian dielektroforesis menggunakan SDS-PAGE dengan konsentrasi *akrilamide* 12,5 %.

Terdapat dua gel pada SDS-PAGE, yaitu *separating* dan *stacking*. Pembuatan gel dilakukan dengan cara mencampurkan 4,15 ml *acrilamide* 30 %, 2,5 ml 4x *lower gell buffer* (LGB), 5 µl *temed*, 50 µl APS dan 3,3 ml H₂O. Sedangkan pada gel *stacking*, mencampurkan 0,45 ml *acrilamide* 30 %, 0,75 ml 4x *upper gell buffer* (UGB), 4,5 µl *temed*, 10-20 µl APS, 1,8 ml H₂O. Sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel lalu dipisahkan menggunakan arus listrik 40-70 Volt selama 3 jam melalui buffer elektroda (Sambrook *et al.*, 2001).

Analisis *western blot* dilakukan setelah protein SUT1 dipisahkan dengan SDS-PAGE. Gel hasil SDS-PAGE ditransfer ke membran nitroselulosa menggunakan aliran listrik sebesar 250 mA, suhu 4°C selama 1 jam dalam buffer transfer. Membran kemudian dicuci dengan (TBS) sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit, lalu direndam dalam TBS yang mengandung *skimmilk* 4% selama 30 menit. Setelah itu, ditambahkan 20 µl antibodi I (antibodi poliklonal spesifik SUT1) yang telah mengandung NaN₃ 0,02 % dalam 40 ml TBS + *skimmilk* 0,5 % dan diinkubasi pada *shaker* selama 24 jam. Membran dicuci dengan TBS sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit, lalu ditambah antibody II (*Goat Anti-Rabbit IgG Phosphatase Conjugated*) dalam TBS + *skim milk* dan diinkubasi

selama 1 jam. Sebelum pewarnaan, membran dicuci lagi dengan TBS dan buffer alkalin fosfat pH 9,5 (100 mM *tris-base*, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). Pewarnaan dilakukan dengan pemberian 100 µl BCIP dan 50 µl NBT yang dilarutkan dalam 10 ml bufer alkalin fosfat (Sambrook *et al.*, 2001).

3.4.7 Ekstraksi dan Analisis Kandungan Sukrosa Daun dan Batang

Ekstraksi sukrosa daun dilakukan dengan cara menggerus 2 gram sampel daun menggunakan N₂ cair kemudian ditambahkan 5 ml buffer MCW. Campuran diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Campuran dihomogenkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan bahan yang terlarut dan tidak terlarut. Supernatan yang diperoleh ditampung dalam botol *falcon*. Perlakuan ini diulang 5 kali sampai pellet yang tersisa berwarna putih. Supernatan yang diperoleh dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* sampai methanol kloroform menguap sehingga yang tersisa hanya larutan berpelarut air. Cairan hasil evaporasi digunakan untuk uji kandungan sukrosa.

Ekstraksi sukrosa batang dilakukan dengan cara mengambil nira dari ruas ke-6 batang tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* dan tanaman kontrol dengan alat penusuk. Nira yang diperoleh ditampung dalam tabung mikrosentrifus dan disimpan pada -20°C sebelum digunakan untuk analisis sukrosa batang.

Analisis kandungan sukrosa dilakukan menggunakan metode *Seliwanoff* (1887 dalam Widodo 2014) dengan menambahkan 70 µl NaOH 1 N pada 10 µl sampel kemudian divortek agar homogen. Campuran dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit, setelah dingin direaksikan dengan 250 µl *resorcinol* 0,1 % (dalam *ethanol* 95%) dan 750 µl HCl 30%. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 80°C selama 8 menit. Setelah dingin, warna yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm.

Pembuatan standart dilakukan dengan mengukur absorbansi sukrosa yang telah diperlakukan seperti sampel pada konsentrasi 10 µg/µl, 25 µg/µl, 45 µg/µl,

65 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan 90 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ kemudian dibuat rumus regresi linear. Nilai kandungan sukrosa diperoleh dengan mengkonversikan nilai absorbansi sampel kedalam rumus regresi linier dari standart sukrosa yang telah dibuat sebelumnya.



BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman tebu produk rekayasa genetika (PRG) overekspresi gen *SoSUT1* merupakan tanaman tebu yang dirakit dengan transformasi gen *SoSUT1* dari tanaman tebu sehingga terjadi peningkatan kandungan dan aktivitas protein SUT1. *Sucrose transporter (SUT)* adalah protein yang berperan dalam translokasi sukrosa dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpanan. Diinsersinya gen *SoSUT1* pada tanaman tebu bertujuan untuk meningkatkan akumulasi sukrosa pada organ batang. Penelitian dilakukan untuk mengetahui karakter tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua, terutama pada ekspresi protein SUT1, serta keberadaan gen *SoSUT1* untuk mengetahui stabilitas genetiknya

Tanaman PRG overekspresi gen *SoSUT1* diperoleh dari hasil transformasi Dwinianti (2013) yang terdiri dari 8 *event*, 1 *event* hasil transformasi Sugiharto dan Safitri (2011), 1 *event* hasil transformasi Wiyono (2012), dan 4 *event* hasil transformasi dari Hardjo (2014). Tanaman tebu PRG hasil transformasi yang telah dewasa kemudian dipanen dan ditumbuhkan kembali secara vegetatif untuk diregenerasikan. Tanaman yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai bahan penelitian dengan 3 ulangan ditambah dengan tanaman *wild type* (kontrol) sebagai pembanding. Tanaman tebu yang telah berumur 6 bulan kemudian dilakukan analisis PCR untuk mendeteksi keberadaan gen target. Tanaman tebu yang telah dianalisis PCR kemudian dilakukan analisis lanjutan untuk mengetahui ekspresi pada tingkat translasi (protein), serta dilakukan uji kandungan sukrosa daun dan batang

4.1 Hasil PCR tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua

Analisis *PCR* pada tanaman PRG generasi kedua bertujuan untuk mengetahui apakah gen *SoSUT1* yang telah diinsersikan pada penelitian

sebelumnya masih terdapat pada genom tanaman tebu yang diuji. Salah satu kendala dalam perakitan tanaman transgenik adalah tidak terintegrasinya gen target dengan stabil di dalam kromosom tanaman inang, sehingga menyebabkan gen tersebut tidak diwariskan ke tanaman generasi berikutnya (Christou *et al.* 1992). Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer *hpt-F/R* pada 14 *event* tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua dengan masing-masing 3 ulangan.

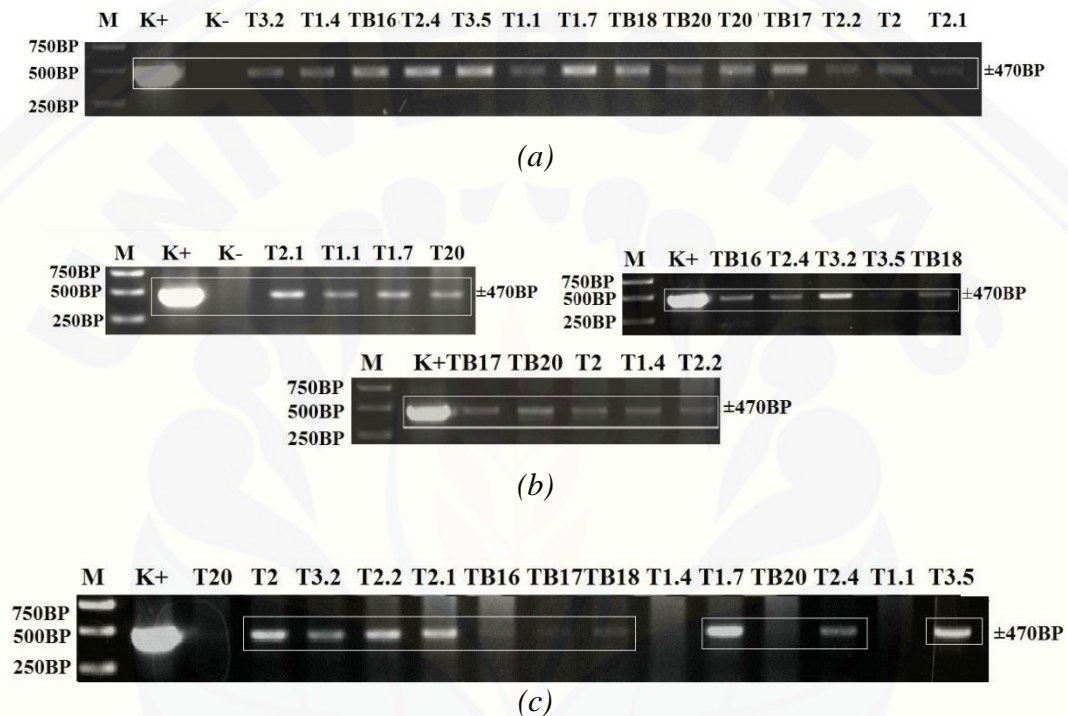
Tabel 4.1 Tabulasi hasil analisa PCR pada 14 *event* tanaman tebu PRG dengan masing-masing 3 ulangan

Event tebu PRG	Ulangan		
	1	2	3
T2.4	+	+	+
T3.2	+	+	+
TB16	+	+	+
T1.4	+	+	-
T3.5	+	+	+
T1.7	+	+	+
T2.2	+	+	+
T1.1	+	+	-
T.2.1	+	+	+
TB20	+	+	+
TB17	+	+	+
TB18	+	+	+
T2	+	+	+
T20	+	+	-

Keterangan: Tanda (+) menandakan bahwa *event* tanaman PRG yang diuji positif mengandung gen *hptII*, sedangkan tanda (-) untuk tanaman PRG yang tidak mengandung gen *hptII*

Hasil analisis PCR (Tabel 4.1) pada semua sampel genom tanaman ulangan 1 dan 2 menunjukkan positif transgenik *SoSUT1*, sedangkan pada ulangan 3 terdapat 11 tanaman positif transgenik *SoSUT1* dan 3 tanaman negatif yaitu event T20, T1.4, dan T1.1. Berdasarkan data analisa PCR tersebut, tanaman

tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua memiliki kestabilan genetik lebih dari 92,8%. Tanaman tebu positif transgenik *SoSUT1* ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA dengan ukuran ± 470 bp sesuai dengan ukuran DNA yang teramplifikasi dengan cetakan plasmid *pAct-SoSUT1* sebagai kontrol positif.



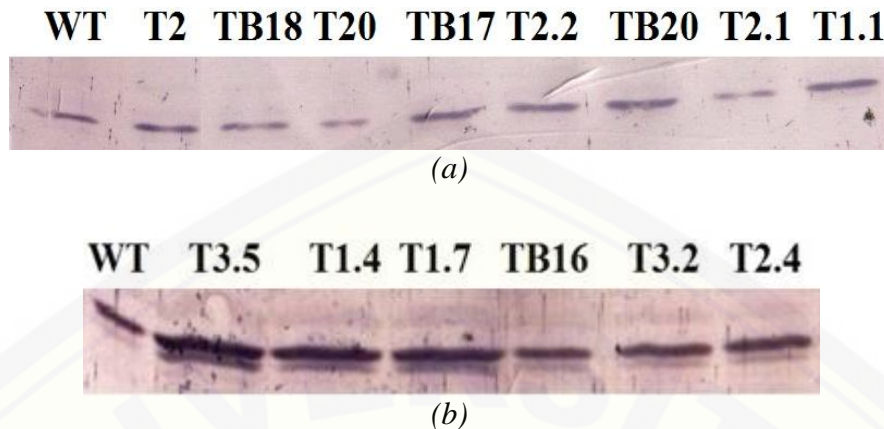
Gambar 4.1 Elektroforesis gel agarose 1% hasil PCR dengan pasangan primer *hptI-F/R* dan template DNA genom dari tanaman (a) Ulangan 1; (b) Ulangan 2; (c) Ulangan 3. M: Marker; K+: kontrol positif (Plasmid *pAct-SoSUT1*); K-: kontrol negatif (*wildtype*); dan 14 tanaman PRG overekspresi gen *SoSUT1*.

Terbentuknya pita DNA *hptII* dengan ukuran ± 470 bp pada Gambar 4.1 menunjukkan bahwa gen target *SoSUT1* yang berada dalam satu kaset T-DNA bersama gen *hptII* sebagai *selectable marker* telah terinsersi ke dalam genom tanaman. Sedangkan pada tanaman yang negatif tidak terbentuk pita DNA pada ukuran 470 bp dikarenakan tidak terintegrasinya gen *SoSUT1* ke dalam genom

tanaman. Kejadian tersebut diduga karena tanaman uji mengalami *chimera*, yaitu penyebaran gen target yang ditransformasikan tidak merata pada seluruh jaringan (Yasmeen *et al*, 2009). *Chimera* menyebabkan gen target tidak diwariskan pada generasi berikutnya, sehingga pada tebu PRG generasi kedua ini masih terdapat tanaman yang tidak mengandung gen yang ditransformasikan. Dari Gambar 4.1 (a), (b), dan (c) juga menunjukkan bahwa tanaman tebu kontrol (*wild type*) menunjukkan hasil negatif, hal tersebut dikarenakan pada tanaman kontrol tidak dilakukan transformasi, sehingga tidak memiliki gen *hptII*.

4.2 Hasil Analisis Western Blot Protein SUT1

Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* yang terdiri dari 14 event dan 3 ulangan selanjutnya dilakukan analisis Western Blot untuk mendeteksi protein SUT dengan menggunakan antibodi spesifik. Ekstraksi protein SUT1 dilakukan dengan mengambil sampel daun secara komposit (menggabungkan sampel dari 3 ulangan) dari ke-14 *event* tanaman tebu PRG dengan 3 ulangan. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan buffer ekstraksi SUT dan buffer solubelisasi yang mengandung SDS. Analisis *western blot* protein SUT1 dilakukan menggunakan antibodi poliklonal spesifik untuk protein SUT1. Hasil analisis *western blot* dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil analisis *western blot* protein SUT1 pada tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* (a), (b) dan kontrol dengan konsentrasi protein 30 μg , menggunakan antibodi poliklonal spesifik SUT1 dan antibodi 2 *Goat Anti-Rabbit Igg Phosphatase Conjugate*

Pada Gambar 4.2 terlihat adanya pita protein pada semua sampel yang menunjukkan bahwa protein SUT1 terdeteksi pada tanaman tebu transgenik maupun tebu kontrol. 14 sampel tanaman tebu PRG yang diuji, beberapa *event* tanaman tebu menghasilkan pita protein SUT1 lebih tebal dibandingkan tanaman tebu kontrol. Secara kualitatif, *event* tanaman tebu PRG yang menunjukkan pita protein lebih tebal dari *wildtype* Gambar 4.2 (a) yaitu pada TB17, T2.2, TB20, T1.1, sedangkan pada Gambar 4.2 (b) yaitu T3.5, T1.4, T1.7, T3.2, dan T2.4. Tebalnya pita protein pada beberapa *event* tebu tersebut menunjukkan adanya overekspresi dari gen *SoSUT1* yang ditransformasikan pada tanaman tebu dapat diekspresikan pada tingkat translasi membentuk protein, sehingga terjadi peningkatan kandungan protein SUT1. Namun pada event T20 dan T2.1 terlihat bahwa pita protein lebih tipis daripada tanaman kontrol. Hal ini kemungkinan karena terjadi *gen silencing* yang mengakibatkan terhalangnya proses translasi sehingga sintesis protein (ekspresi gen) terganggu. Menurut Malik (2005) proses penghambatan ekspresi gen dapat terjadi pada beberapa tahap diantaranya pada tahap translasi yaitu dengan mengganggu proses translasi pada molekul mRNA.

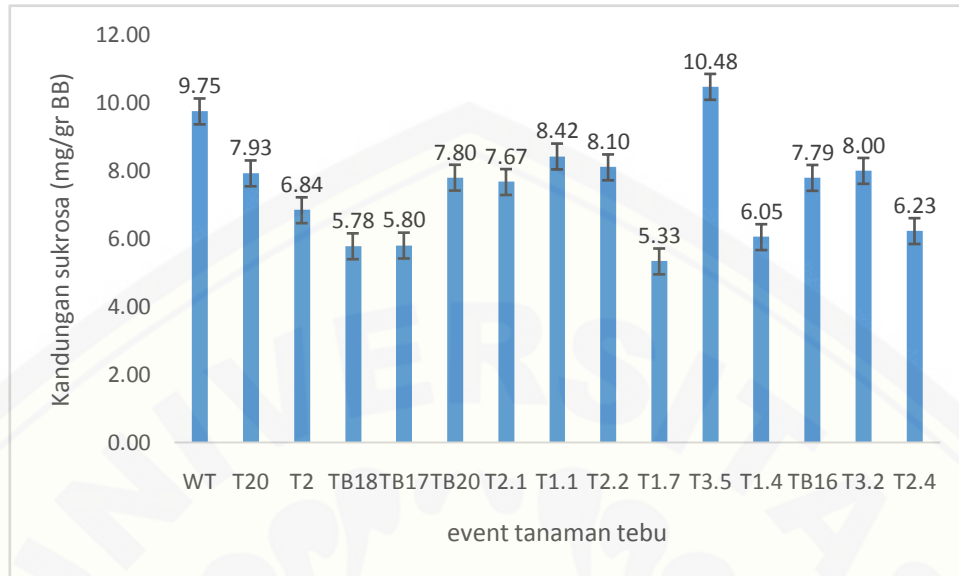
Peningkatan protein SUT1 pada tanaman PRG merupakan hasil akumulasi ekspresi gen penyandi SUT1 endogen dan SUT1 eksogen. Banyaknya protein yang disintesis disebabkan oleh bertambahnya jumlah copi gen penyandi SUT1 yang menyebabkan terjadinya peningkatan laju transkripsi (Sugiharto, 2003). Peningkatan kandungan protein SUT1 pada tanaman tebu PRG diharapkan dapat meningkatkan translokasi dan akumulasi sukrosa pada organ penyimpanan.

4.3 Kandungan Sukrosa Daun dan Batang

Sukrosa merupakan produk akhir dari proses asimilasi karbon yang dapat ditransport dari organ fotosintesis menuju organ penyimpanan (batang). Analisis kandungan sukrosa daun ditujukan untuk mengetahui jumlah sukrosa yang disintesis, dan analisis kandungan sukrosa batang untuk mengetahui akumulasi sukrosa pada organ penyimpanan.

4.3.1 Kandungan Sukrosa Daun

Analisis kandungan sukrosa daun dilakukan pada semua tanaman PRG dan tanaman kontrol. Tinggi rendahnya kandungan sukrosa pada daun dipengaruhi oleh enzim SPS, invertase dan Sucrose transporter. Enzim SPS adalah enzim kunci dalam biosintesis sukrosa yang mengkatalisis reaksi penggabungan antara uridine diphosphate glucose (UDPG) dan fructose-6-phosphate (F6P) sehingga membentuk sukrosa-6-phosphate. Sukrosa yang dihasilkan sebagian dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan perkembangan oleh enzim *invertase* (Jin *et al.*, 2009). Sebagian besar sukrosa yang ada di daun juga ditransportasikan ke organ penyimpanan oleh protein translokator *Sucrose transporter*.

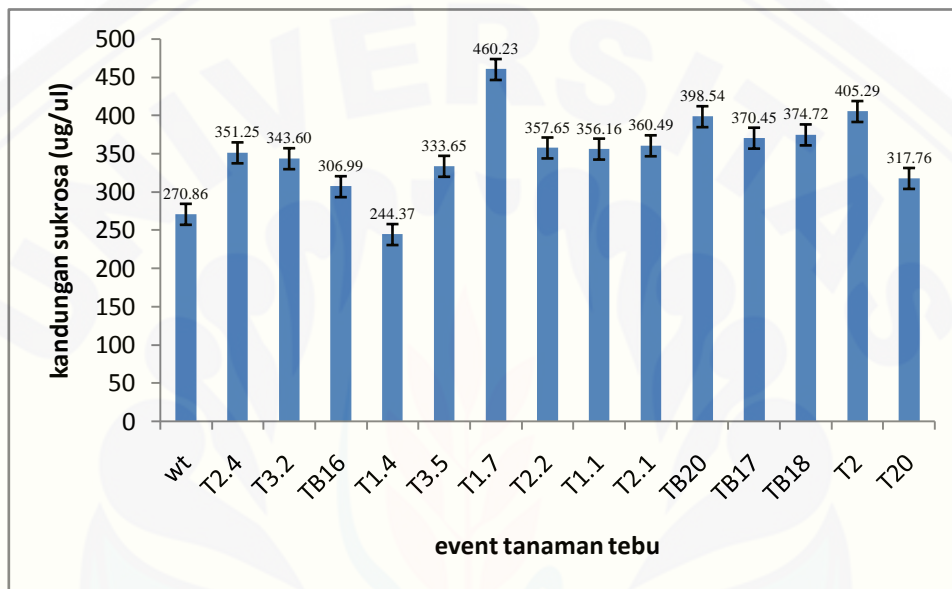


Gambar 4.3 Hasil analisis rata-rata kandungan sukrosa daun umur 9 bulan pada tanaman PRG overekspresi gen *SoSUT1* dan tanaman kontrol (*wildtype*).

Hasil uji kandungan sukrosa menunjukkan sebagian besar kandungan sukrosa daun pada tanaman tebu PRG lebih rendah dari pada tanaman kontrol. Menurut penelitian Murtyaningsih (2013), kandungan sukrosa daun pada tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* event A-D lebih rendah dibandingkan tanaman kontrol. Rendahnya sukrosa pada organ daun tanaman PRG overekspresi gen *SoSUT1* diduga diakibatkan oleh lebih banyaknya protein translokator sukrosa yang mentransport sukrosa dari daun ke organ batang. Hal tersebut didukung oleh data hasil analisis western blot protein SUT1, bahwa kandungan protein pada tanaman PRG lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Overekspresi protein SUT1 pada tanaman tebu PRG tersebut diduga menyebabkan sukrosa pada daun menurun, karena sebagian telah tertransport ke organ penyimpanan. Selain itu rendahnya kandungan sukrosa daun kemungkinan juga diakibatkan adanya hidrolisis sukrosa oleh invertase.

4.3.2 Kandungan Sukrosa Batang

Analisis kandungan sukrosa batang dilakukan dengan mengambil nira pada batang tanaman tebu PRG dan kontrol ruas ke-6 dihitung dari ruas paling bawah dengan perkiraan bahwa ruas ke enam dapat mewakili semua ruas yang ada. Hasil analisis kandungan sukrosa batang ditunjukkan pada Gambar 4.4.



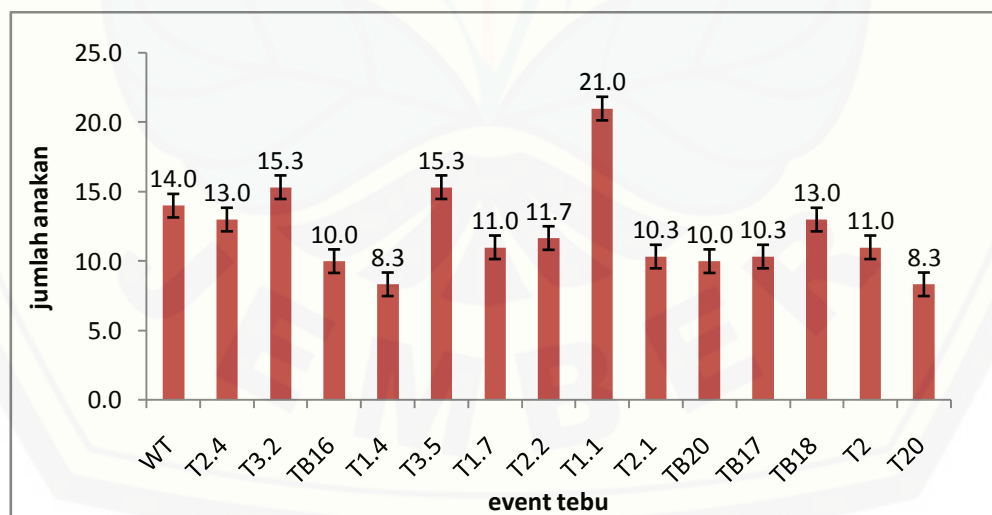
Gambar 4.4 Hasil analisis rata-rata kandungan sukrosa batang umur 9 bulan pada tanaman PRG overekspresi gen *SoSUT1* dan tanaman kontrol (*wildtype*) ruas ke enam.

Berdasarkan Gambar 4.4 terlihat bahwa secara umum kandungan sukrosa batang tanaman tebu PRG lebih tinggi dari kontrol (*wildtype*). Akumulasi sukrosa tanaman tebu PRG yang lebih tinggi tersebut karena adanya peningkatan jumlah protein SUT1 yang berperan dalam proses translokasi sukrosa dari daun ke batang. Secara kualitatif rata-rata kandungan sukrosa batang ini bersifat variatif. Kejadian ini terjadi karena tanaman tersebut merupakan tanaman hasil transformasi menggunakan *Agrobacterium*. Gen target yang insersikan bersifat random/acak pada lokus genom tanaman sehingga karakteristik tiap-tiap tanaman yang

dihasilkan juga berbeda salah satunya dalam hal kandungan sukrosa batang. Rata-rata kandungan sukrosa yang rendah pada tanaman kontrol terjadi karena pada tanaman tersebut hanya terdapat protein SUT1 endogen sehingga jumlah sukrosa yang dapat diakumulasi pada batang hanya sedikit jika dibandingkan dengan tebu PRG.

4.4 Rata-rata Jumlah Anakan pada saat Tebu Umur 6 Bulan

Sukrosa hasil fotosintesis tidak semua diakumulasi pada organ penyimpanan, beberapa dari sukrosa tersebut di digunakan sebagai energi untuk pertumbuhan dan perkembangan. Dali *et al.*, (1992) menyatakan bahwa sukrosa yang disintesis di daun belum tentu diakumulasi atau ditransport ke buah, tetapi setelah sukrosa disintesis dapat dipecahkan menjadi senyawa yang lebih sederhana untuk pertumbuhan tanaman. Overekspresi gen *SoSUT1* diduga juga berpengaruh pada pertumbuhan tanaman tebu, sehingga dilakukan analisis pertumbuhan dengan hasil perhitungan jumlah anakan tanaman tebu PRG (Gambar 4.5).



Gambar 4.5 Hasil perhitungan rata-rata jumlah anakan tanaman PRG overekspresi gen *SoSUT1* dan tanaman kontrol (*wildtype*) umur 6 bulan.

Pada Gambar 4.5, rata-rata jumlah anakan tanaman tebu PRG lebih sedikit jika dibandingkan dengan tanaman kontrol. Tetapi juga terdapat 3 event tanaman PRG yang lebih tinggi daripada kontrol, yaitu event T1.1, T3.2, dan T3.5. Banyaknya jumlah anakan juga tidak terlepas dari jumlah sukrosa yang tersedia. Semakin banyak jumlah sukrosa yang disintesis kemungkinan akan memperbaiki pertumbuhan maupun pertumbuhan tanaman. Sukrosa digunakan oleh tanaman sebagai sumber karbon untuk proses metabolisme. Overekspresi gen *SoSUT1* yang dilakukan mampu meningkatkan translokasi sukrosa hasil fotosintesis, sehingga semakin sedikit sukrosa yang dapat didegradasi oleh *invertase*. Semakin sedikit sukrosa yang terdegradasi oleh *invertase* maka semakin sedikit jumlah anakan yang dihasilkan pada tiap tanaman tebu PRG. Pada kejadian yang lain, kemungkinan biosintesis sukrosa tinggi sehingga jumlah sukrosa yang diakumulasi pada organ batang lebih tinggi serta jumlah sukrosa yang didegradasi untuk pertumbuhan juga lebih banyak. Pengamatan jumlah anakan dilakukan pada umur 6 bulan dikarenakan pada umur tersebut pertunasan tanaman tebu telah terhenti dan diteruskan pada fase pemanjangan batang. Menurut Wahyudi (2014), pada usia 1-3 bulan tanaman tebu mengalami fase pertunasan dan pertumbuhan, kemudian mengalami pemanjangan batang pada usia 3-9 bulan.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa hampir semua tanaman tebu PRG (lebih dari 92.8%) stabil terinsersi gen target SoSUT1. Overekspresi gen SoSUT1 juga menghasilkan protein SUT1 dan aktif secara fungsional sehingga secara umum kandungan sukrosa batang lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol (*wildtype*). Akan tetapi kandungan sukrosa daun pada tanaman tebu PRG overekspresi gen SoSUT1 lebih rendah dibandingkan tanaman tebu kontrol (*wildtype*). Tanaman tebu PRG overekspresi gen SoSUT1 secara umum menghasilkan jumlah anakan lebih sedikit dibandingkan tanaman tebu kontrol.

5.2 Saran

Perlu adanya karakterisasi pada generasi berikutnya untuk menghasilkan tanaman PRG overekspresi gen SoSUT1 yang stabil, serta perlu dilakukan uji ekspresi gen pada tingkat transkripsi dan uji aktivitas enzim invertase yang mempunyai fungsi dalam pendegradasi sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa.

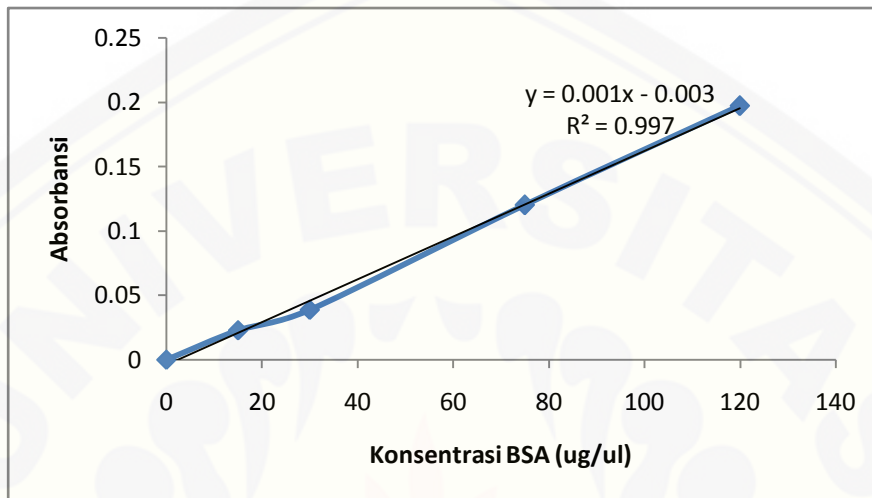
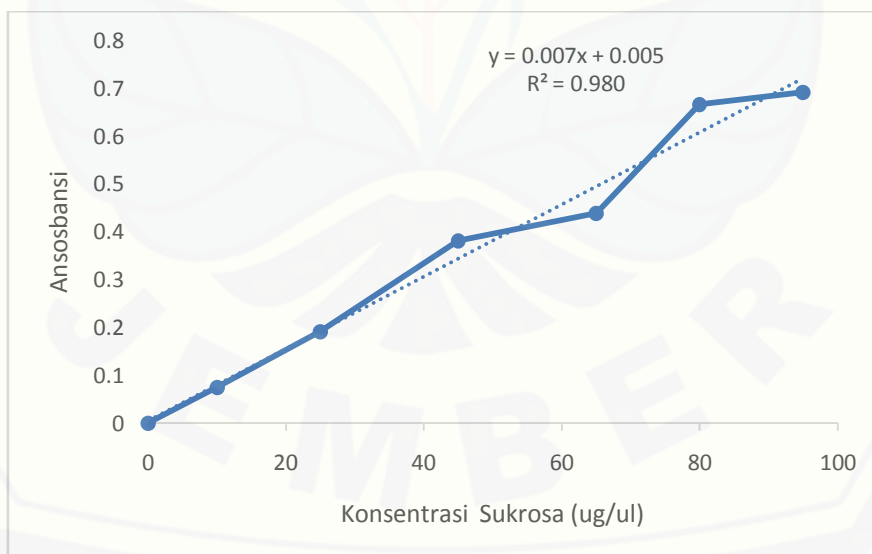
DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J. W. and Beardall, J. 1991. *Molecular Activities of Plant Cells. An Introduction to Plant Biochemistry*. Australia: Blackwell Scientific publications.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem and R. L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of plant physiologist.
- Campbell, N. A., J. B. Reece dan L. G. Mitchell. 2000. *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- Christou, P., Ford, and Kofron. 1991. Production of Transgenic Rice (*Oryza sativa* L.) Plants from Agronomically Important Indica and Japonica Varieties via Electric Discharge Particle Acceleration of Exogenous DNA into Immature Zygotic Embryos. *Bio/Technology* 9: 957-962.
- Dali, N., D. Michaud, & S. Yelle (1992) Evidence for the involvement of sucrose phosphate synthase in the pathway of sugar accumulation in sucrose accumulating tomato fruits. *Plant Physiol.* 99: 434-438
- Dong, Jin-Zuo and A. McHughen. 1993. Transgenic Flaxplants From Agrobacterium Mediated Transformation: Incidence of Chimeric Regenerants and Inheritance of Transgenic Plants. *Plant Science*. Vol. 91 (2): 139-148
- Dwinianti, Edia Fitri. 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 : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Hackel, A., N. Schauer, F. Carrari, A. R. Fernie, B. Grimm and C. Kuhn. 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant Journal*. Vol. 45: 180-192.
- Hardjo, Popy Hartatie, 2014. Overekspresi Gen *SoSUT1* untuk Meningkatkan Translokasi Sukrosa Pada Tanaman Tebu (*Saccharum* spp. hybrids). Undergraduate Airlangga University. <http://adln.lib.unair.ac.id/> (diakses 8 Januari 2015)

- Huber, S. C., dan Huber. 1996. Role And Regulation Of Sucrose-Phosphate Synthase In Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol, Biol.* Vol. 47:431–444.
- Jin, Y., An Ni, D., and Ruan, Y. L. 2009. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *The Plant Cell.* Vol. 21: 2072-2089.
- Kuhn, C., Hajirezaei M., Fernie A. R., Tunali U. R., Czechowski T., Hirner B., Frommer W. B. 2003. The Sucrose Transporter *StSUT1* Localizes to Sieve Elements in Potato Tuber Phloem and Influences Tuber Pysiology and Development. *Plant Physiology.* Vol. 131: 102–113.
- Lakitan, B. 2010. *Dasar-dasar Fisiologi Tumbuhan.* Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Lalonde, M., M. Tegeder, W. Throne-holst, B. Frommer, J. W. Patrick.. 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell and Environment.* Vol. 26:37–56.
- Lingle, S.E. 1997. Seasonal internoda development and sugar metabolism in sugarcane. *Crop Sci.* 37 : 1222-1227
- Lowry, Rosebrough, Farr, Randall. 1951. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. *J.Biol.Chem.* 75 : 265-276.
- Malik, Amarlia. 2005. RNA Therapeutic, Pendekatan Baru dalam Terapi Gen. *Majalah Ilmu Kefarmasian.* Vol. II (2): 51-61
- Manalu, Lamhot P. 2006. A Case Study of Sugar Rendemen Determination in State Owned Sugar Mill. *Jurnal Keteknikan Pertanian.* Vol 20 (1)
- Marliani, V. P. 2011. Analisis Kandungan Hara N dan P serta Klorofil Tebu Transgenik IPB I yang Ditanam di Kebun Percobaan PG Djatiroto, Jawa Timur. *Skripsi.* Bogor: Program Studi Sumber Daya Lahan Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.
- Miswar, B. Sugiharto, T. Handoyo, dan S. A. Made. 2007. Peranan Sucrose Phosphate Synthase (SPS) dan Acid Invertase (AI) Internoda Tebu (*Saccharum officinarum* L.) dalam Akumulasi Sukrosa. *Agritrop.* Vol. 26 (4): 187 -193

- Mulyadi, Agus. 2011. Tebu Transgenik Direkomendasikan Menteri LH. *Tekno.kompas.com*. [17 Februari 2014]
- Murtiyaningsih, H. 2013. “Karakterisasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. Var. BL) Transgenik overekspresi gen *SoSUT1 Event A-D*. *Skripsi*. Jember : Universitas Jember.
- Ningsih, Devita Areifvia. 2003. Perakitan Klon Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Rendemen Tinggi dengan Menurunkan Aktivitas Enzim Invertase. *Makalah Seminar Umum*. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta
- Oard, J.H., Linscombe, S.D., Braverman, M.P., Jodari, F., Blouin, D., C. Leech, M., Kohli, A., Vain, P., Cooley, J.C., and Cristou, P. 1996. Development, Field Evaluation, and Agronomic Performance, of Transgenic Herbicide Resistant Rice. *Molecular Breeding* 2: 359-368.
- Reismeier, J. W., Willmitzer, L., Frommer, W. B. 1992. Isolation and Characterization of A Sucrose Carrier cDNA from Spinach by Functional Expression in Yeast. *The EMBO Journal*. Vol. 11: 4705-4713.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., dan Frommer. W. B. 1994. Evidence for An Essential Role of The Sucrose Transporter in Phloem Loading and Assimilate Partitioning. *The EMBO Journal*. Vol. 13: 1-7.
- Sage, Rowan F. 2003. the Evolution of C4 Photosynthesis. *New Phytologist* (2004) 161: 341-370.
- Sambrook *et al.*, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sauer, Norbert. 2007. Molecular Physiology of Higher Plant Sucrose Transporters. *FEBS Letters*. 581: 2309–2317.
- Shiratake, K. 2007. Genetics Of Sucrose Transporter in Plants. *Genes genomes and Genomics Global Science Books*. Vol. 1(1): 73-80.
- 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.

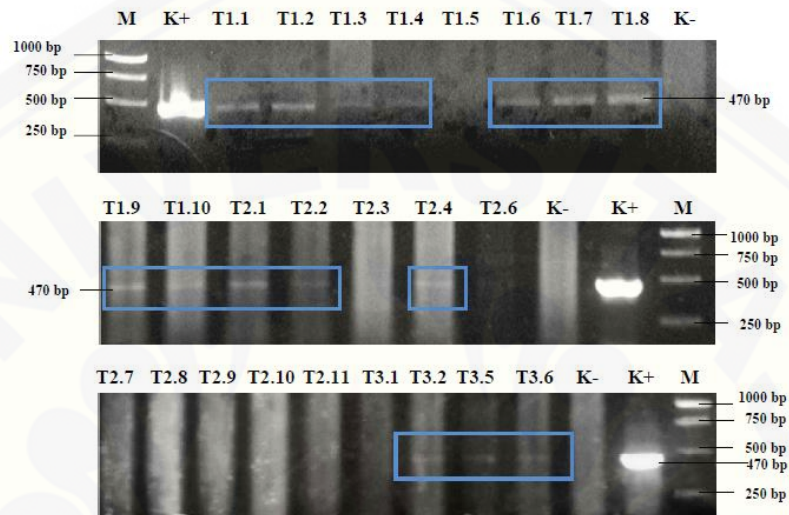
- Sugiharto, B. 2003. Overekspresi Gen Sucrose Phosphate Synthase untuk Peningkatan Biosintesis Sukrosa pada Tanaman Tebu. *Laporan Riset Biologi Unggulan Terpadu VII Bidang Bioteknologi*. LIPI, Jakarta.
- Sugiharto, B., 2010. Overekspresi Gen Sucrose Phosphate Synthase, Konstruksi Double Ekspresi Gen SPS-SUT: Laporan Akhir Kerjasama Riset Bioteknologi Tebu Rendemen Tinggi. Jember: Pusat Penelitian Biologi Molekul UNEJ.
- Wahyudi, Yudi. 2014. Optimalisasi Teknik Budidaya pada Fase Perkecambahan dan Pertunasan Tanaman Tebu. <http://ditjenbun.pertanian.go.id> (diakses 14 Januari 2015 pukul 19.16 WIB)
- Widodo, W. T., 2014. Aktivitas *Sucrose Phosphate Synthase* dan Kandungan Protein *Sucrose Transporter* serta Akumulasi Sukrosa pada Tanaman Tebu Hasil Transformasi Ganda Gen *SoSPS1-SoSUTI*. *Skripsi*. Jember : Universitas Jember
- Wiyono, A. G. 2012. Transformasi Gen *SoSUTI* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Lateral pada Tanaman Tebu (*Saccharum* spp. Hybrid). *Skripsi*. FAPERTA Universitas Jember. Jember.
- Yasmeen, A., B. Mirza, S. Inayatullah, N. Safdar, M. Jamil, S Ali and M. F. Choudhry. 2009. In Planta Transformation of Tomato. *Plant Mol Biol Rep* 27: 20-28.
- Zheng, K., Huang, N., Bennet P., and Khush G. S. 1995. PCR Based Marker Assisted Selection in Rice Breeding. *IRRI news lett* 2.
- Zhu, Y.J., E. Komor, and P.H. Moore .1997. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiol.* 115 : 609-616

Lampiran A. Kurva Standart**A.1 Kurva Standart BSA Menggunakan metode Lowry****A.2 Kurva Standart sukrosa**

Lampiran B. Daftar Nama Event Tanaman Tebu PRG Overekspresi Gen *SoSUT1* Generasi Kedua serta Penempatannya di green house

Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
T 2.4	TB 17	TB 16
T 3.2	T 3.5	T 2.4
TB 16	TB 18	T 1.4
T 1.4	T 2.4	TB 17
WT	TB 20	T 2.1
T 3.5	TB 16	T 2.2
T 1.7	T 3.2	TB 20
T 2.2	T 1.7	TB 18
T 1.1	T 1.4	T 1.7
T 2.1	WT	T 3.2
TB 20	T 2.2	T 1.1
TB 17	T 2	T 20
TB 18	T 1.1	T 3.5
T 2	T 20	WT
T 20	T 2.1	T 2

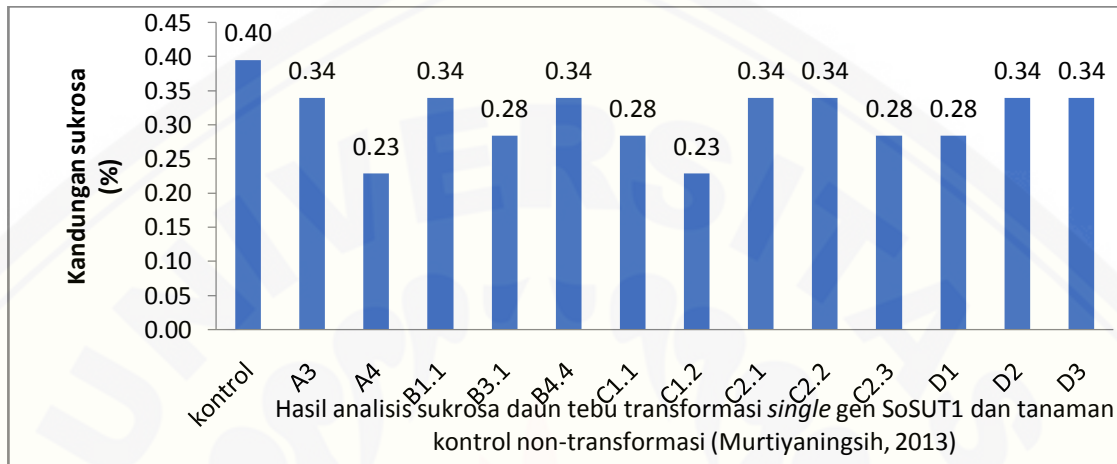
Lampiran C. Konfirmasi PCR menggunakan pasangan primer *hptII* pada tanaman tebu hasil transformasi gen *SoSUT1*



Gambar 4.6 Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer 1F/1R *hpt II*. M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid *pAct-SoSUT1* (kontrol positif); K-: tanaman tebu *wildtype*; T1.1 – T3.6: sampel DNA tanaman tebu yang telah ditransformasi (Dwinianti, 2013)

Lampiran D. Kandungan Sukrosa

D.1 Kandungan Sukrosa Daun Tanaman Tebu Hasil Transformasi *Single Gen SoSUT1* Event A-D



D.2 Kandungan Sukrosa Batang Tanaman Tebu Hasil Transformasi *Single Gen SoSUT1* Event A-D

