



**POTENSI PERTUMBUHAN DAN AKUMULASI SUKROSA PADA  
TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L.) TRANSGENIK OVER  
EKSPRESI GEN *SoSUT1* GENERASI KEDUA**

**SKRIPSI**

Oleh:

**NURHALIMAH  
101510501028**

**JURUSAN AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan jenis tanaman dari famili Poaceae dan banyak tumbuh di daerah yang memiliki iklim tropis dan subtropis. Salah satunya di Indonesia yang memiliki iklim tropis, sangat cocok digunakan untuk usaha budidaya tanaman tebu. Produksi gula di Indonesia hampir seluruhnya berbahan dasar dari tanaman tebu, karena tanaman ini mampu memproduksi biomassa yang cukup besar dengan kandungan sukrosa yang besar pula. Batang tanaman tebu dapat mengakumulasi sukrosa 12-16% dari berat basah dan 50% dari berat kering batang tebu (Casu *et al.*, 2002).

Sukrosa merupakan hasil utama proses fotosintesis pada tanaman yang dihasilkan sebagai sumber energi bagi tanaman dan bahan yang disimpan pada jaringan penyimpanan. Sukrosa ditranslokasikan dari jaringan asal (*source*) melalui floem menuju jaringan penyimpanan (*sink*) untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Pada tanaman tebu, organ penyimpan sukrosa adalah pada batang tebu, dalam proses translokasi diperlukan suatu pentransport sukrosa dari daun menuju batang tanaman tebu. Protein transport merupakan protein yang memfasilitasi proses translokasi sukrosa pada tanaman dari *source* ke *sink* yang dikenal sebagai *sucrose transporter* (SUT) (Rae *et al.*, 2005).

*Sucrose transporter* (SUT) merupakan protein kunci dalam transport karbon dan memiliki posisi yang sangat strategis di dalam tanaman. Protein ini diketahui merupakan penentu besarnya sukrosa yang dapat diakumulasi pada tanaman (Kuhn *et al.*, 1999). Translokasi sukrosa oleh protein SUT merupakan bentuk pengangkutan aktif yaitu pemindahan zat terlarut melawan konsentrasi, melintasi plasma dari satu sisi yang konsentrasi zat terlarutnya rendah menuju ke sisi yang konsentrasi zat terlarutnya tinggi (Campbell *et al.*, 2000). Peran protein SUT sangat penting dalam proses akumulasi sukrosa karena kemampuan tanaman dalam mengakumulasi sukrosa tidak hanya ditentukan oleh tingkat sintesis dan degradasinya, namun juga translokasi dari *source* ke *sink* oleh SUT. Transformasi gen SUT telah berhasil meningkatkan translokasi sukrosa ke organ *sink* pada

tomat (Hackel *et al.*, 2006). Selain itu, Kuhn *et al.* (2003) melaporkan bahwa dengan melakukan penghambatan ekspresi gen SUT1 pada kentang dapat menurunkan produksi kentang, karena dapat menghentikan translokasi sukrosa. Protein SUT telah diteliti pada hampir semua tanaman yang memiliki manfaat penting seperti padi (Aoki *et al.*, 2003), kentang (Krugel *et al.*, 2008) dan tebu (Rae *et al.*, 2005). Oleh sebab itu, dengan adanya penambahan gen SUT dengan transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu (*overekspresi* gen *SoSUT1*) diharapkan mampu meningkatkan proses translokasi sukrosa pada tanaman tebu dan juga meningkatkan akumulasi sukrosa pada batang tanaman tebu.

Pada penelitian sebelumnya telah berhasil ditransformasikan gen *SoSUT1* (*Saccharum officinarum* *Sucrose Transporter1*) pada tanaman tebu var. Bulu Lawang menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 yang membawa konstruk plasmid *pAct-SoSUT1* oleh Dwinianti (2013) dan berhasil mendapatkan 13 tanaman tebu yang diduga transgenik *overekspresi* gen *SoSUT1* yakni T.1, T.2, T.3, T.4, T.5, T.6, T.7, T.8, T.9, T.10, T.11, T.12 dan T.13. Semua tanaman yang diperoleh merupakan tanaman tebu transgenik *overekspresi* gen *SoSUT1* generasi pertama dan belum diketahui potensi pertumbuhannya dan kemampuan akumulasi sukrosa. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi pertumbuhan dan kemampuan tanaman tebu transgenik dalam mengakumulasi sukrosa serta menguji kestabilan gen SUT pada tanaman tebu transgenik *overekspresi* gen *SoSUT1* di generasi kedua.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah transformasi gen *SoSUT1* dapat meningkatkan potensi pertumbuhan tanaman tebu transgenik pada generasi kedua ?
2. Apakah transformasi gen *SoSUT1* dapat meningkatkan kandungan sukrosa dan rendemen batang pada tanaman tebu transgenik pada generasi kedua?
3. Apakah gen *SoSUT1* yang ditransferkan masih terdapat pada tanaman tebu transgenik generasi kedua?

## **1.3 Tujuan dan Manfaat**

### **1.3.1 Tujuan**

1. Untuk mengetahui potensi pertumbuhan tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua.
2. Untuk mengetahui kandungan sukrosa dan rendemen batang pada tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua.
3. Untuk mengetahui keberadaan gen *SoSUT1* tanaman tebu transgenik generasi kedua.

### **1.3.2 Manfaat**

Bagi mahasiswa dengan penelitian ini diharapkan dapat memberikan tambahan pengetahuan, khususnya dibidang pertanian dan diharapkan dapat menjadi acuan serta tambahan literatur untuk penelitian selanjutnya yang berhubungan dengan topik dalam penelitian ini.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.)

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) adalah tanaman yang termasuk dalam suku (Gramineae atau Poaceae) yang merupakan jenis rumput-rumputan dan dapat tumbuh baik di daerah beriklim tropis seperti di Indonesia. Terdapat 5 spesies lain dari tebu yaitu *S. Officinarum* L, *S.sinense* Roxb., *S. Barberi* Jeswit., *S. Spontaneum* L. Dan *S. Robustum* Brandes & Jesw. Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan komoditas dan tanaman penting di dunia. Produksi gula Indonesia hampir seluruhnya berbahan dasar tebu dan lebih dari 60% gula dunia juga berbahan dasar tebu (Guimarces and Sobral,1998).

Secara morfologi tanaman tebu termasuk tanaman yang lengkap terdiri dari beberapa bagian, yaitu batang, daun, akar dan bunga. Dari setiap bagian ini dapat menjadi sasaran serangan hama tebu. Selain serangan hama, tanaman tebu juga terserang oleh beberapa penyakit berat yang berasal dari virus, bakteri dan jamur. Sugarcane Mozaic Virus (SCMV) atau penyakit mozaik merupakan penyakit yang paling dikenal dari virus yang terjadi didunia dimanapun tanaman tebu tumbuh. Penyakit ini pertama kali dilaporkan pada tahun 1892 dari jawa yang di anggap telah merusak di India (Sharma, 2004).

Tanaman tebu dapat tumbuh di daerah yang beriklim panas dan sedang dengan daerah penyebaran antara 35° LS dan 39° LU. Namun umumnya tanaman tebu tumbuh baik di daerah beriklim tropis. Tebu memerlukan suhu tertentu, yaitu 22 – 27° C dengan kelembaban nisbi 65 – 85% untuk menghasilkan sukrosa yang tinggi. Dalam pertumbuhannya tanaman tebu memerlukan banyak air, sedangkan pada saat menjelang tebu masak dan panen, tebu membutuhkan kondisi lingkungan kering dan tidak ada hujan. Tanaman tebu tumbuh baik pada lokasi yang mempunyai tekstur tanah lempung pada lapisan permukaan, drainase baik dan kemampuan menahan kapasitas air yang baik. Pada jenis tanah beras juga dapat ditanamai tanaman tebu, namun memerlukan pengolahan yang khusus (Sudiatso, 1982).

Tebu mempunyai empat fase pertumbuhan yaitu (Lukito, 2008) :

- (1) Fase perkecambahan (*germination phase*). Fase ini adalah dari saat tanam sampai terjadi perkecambahan tunas. Pada kondisi lapang, perkecambahan dimulai 7 – 10 hari setelah tanam (HST) dan biasanya berakhir pada 30 – 45 HST.
- (2) Fase pembentukan anakan (*tillering phase*). Pembentukan anakan dimulai dari sekitar 45 HST dan mungkin sampai 120 HST. Fase ini menghasilkan tanaman dengan jumlah batang tertentu untuk hasil yang baik.
- (3) Fase pertumbuhan utama (*grand growth phase*). Setelah pembentukan anakan berakhir, selanjutnya pada umur antara 120 –150 hari, terjadi pengurangan jumlah anakan dan hanya sekitar 40 – 50% yang akan bertahan hidup menjadi batang yang dapat dipanen dan digiling.
- (4) Fase pemasakan dan pematangan (*maturity and ripening phase*). Fase ini merupakan fase sintesis dan akumulasi sukrosa pada batang tebu, yang berlangsung selama lebih kurang 3 bulan dan umumnya terjadi pada periode umur antara 150 – 360 hari.

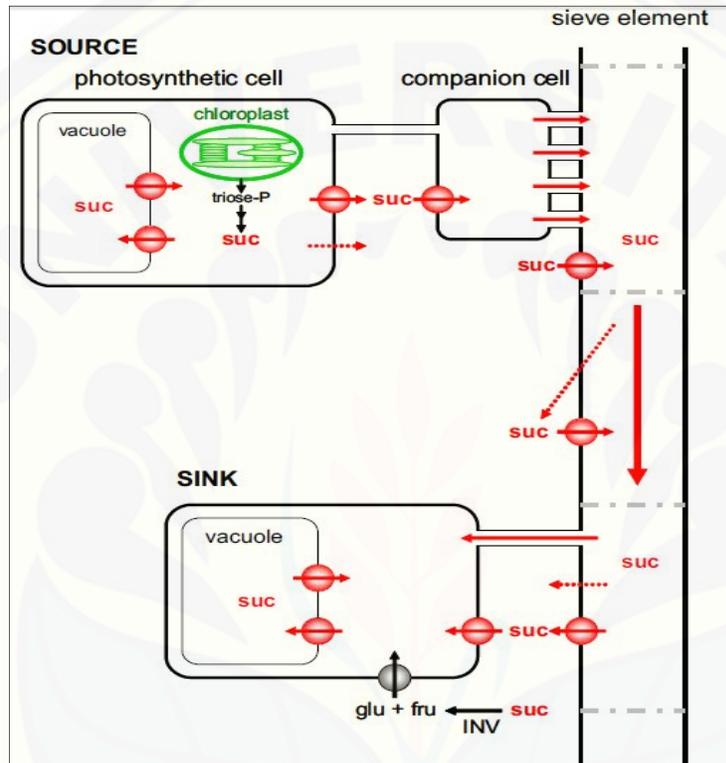
## **1.2 Akumulasi Sukrosa pada Tanaman Tebu dan SUT (*Sucrose Transporter*)**

Sukrosa merupakan hasil akhir dari proses fotosintesis yang terjadi di daun (Campbell *et al.*, 2000) dan bentuk karbohidrat yang mudah ditransportasikan ke jaringan simpan atau *sink tissues* (Cheng *et al.*, 1996). Sukrosa juga digunakan sebagai sumber kerangka karbon dan energi bagi organ tanaman seperti buah, batang, akar dan bunga (Lemoine, 2000).

Tanaman tebu mampu memproduksi biomassa dalam jumlah yang sangat besar dengan kandungan sukrosa yang cukup besar. Batang tanaman tebu dapat mengakumulasi sukrosa 12-16% dari berat basah dan 50% dari berat kering batang tebu (Casu *et al.*, 2002). Kemampuan tanaman tebu dalam mengakumulasi sukrosa ditentukan oleh selisih antara proses biosintesis dan degradasi sukrosa yang terjadi pada daun (Mao *et al.*, 2006).

Akumulasi sukrosa pada tanaman dipengaruhi oleh tingkat asimilasi karbon, sintesis dan degradasinya serta distribusi sukrosa. Tingkat sintesis dan degradasi

sukrosa melibatkan satu atau lebih aktivitas enzim. Biosintesis sukrosa ditentukan oleh aktivitas *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) (Huber and Huber, 1996). Distribusi sukrosa dalam tanaman diperankan oleh protein transporter sukrosa (SUT) (Rae *et al.*, 2005).



Gambar 2.1 Translokasi sukrosa dari daun (*source*) menuju jaringan penyimpan (*sink*) yang difasilitasi oleh protein *Sucrose transporter*. Keterangan: suc = sucrose, glu = glucose, fru = fructose, INV = Invertase.

Sukrosa yang dihasilkan pada proses fotosintesis akan ditranslokasikan dari jaringan asal (*source tissue*) melalui floem menuju berbagai macam jaringan penyimpan (*sink tissue*) untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman, terutama sebagai bahan yang ditimbun untuk cadangan makanan seperti buah pada tanaman buah. Dalam proses tersebut, didukung oleh protein pentransport (*sucrose transporter*) yang terletak di plasma dan disandikan oleh gen yang disebut sebagai gen SUT (Aoki *et al.*, 2003). Protein SUT terletak di membran plastid, membran vacuola, dan membran plasma (Khun and Cristopher,

2010). Berdasarkan analisis filogenetik gen *SUT* terbagi dalam tiga famili, yaitu *SUT1*, *SUT2*, dan *SUT4*. Menurut Kuhn *et al.* (2003), klasifikasi *SUT* ke dalam tiga famili ini didasarkan pada homologi sekuensi, afinitas substrat, dan fungsi masing-masing *SUT*. Protein *SUT1* memiliki afinitas yang tinggi terhadap substrat tetapi daya muat pengangkutannya rendah, sebaliknya *SUT2* memiliki afinitas yang rendah dengan daya muat pengangkutan yang tinggi. *SUT4* memiliki afinitas rendah dan daya muat pengangkutannya rendah pula (Shiratake, 2007). Berdasarkan karakteristik tersebut, protein *SUT1* lebih baik diantara tiga subfamili protein *SUT* lainnya sehingga keberadaannya dalam tanaman penting dalam hal akumulasi sukrosa.

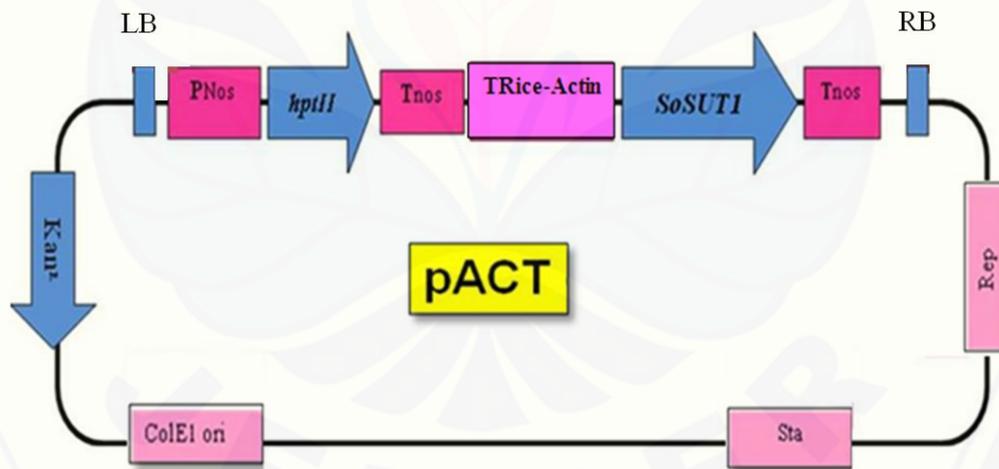
Translokasi sukrosa dari *source* ke *sink* (jaringan penyimpanan) disebut dengan long distance transport, secara umum digolongkan menjadi 2 tahapan yaitu *loading* dan *unloading* sukrosa menuju organ penyimpanan yang difasilitasi oleh protein transport yang dikenal dengan transporter sukrosa (*sucrose transporter*). Oleh karena itu *SUT* merupakan penentu besarnya sukrosa yang dapat diakumulasi pada bagian tanaman (Lemoine, 2000). Translokasi sukrosa pada sebagian besar tanaman terjadi secara *simplastik* dan *apoplastik*, tergantung pada tipe jaringan dan tahap perkembangan tanaman. Transport sukrosa secara *simplastik* yaitu transport sukrosa dari satu sel ke sel yang lain melalui plasmodesmata. Selain itu, sukrosa juga ditransport secara *apoplastik* yaitu transport sukrosa melalui dinding sel dan ruang interseluler pada jaringan, proses ini terjadi dalam *sieve element* (pembuluh tapis) / *companion cell* (sel pengiring) (Lalonde *et al.*, 2003).

Translokasi sukrosa oleh protein *SUT* merupakan bentuk pengangkutan aktif yaitu pemindahan zat terlarut melawan konsentrasi, melintasi plasma dari satu sisi yang konsentrasi zat terlarutnya rendah menuju ke sisi yang konsentrasi zat terlarutnya tinggi (Campbell *et al.*, 2000). Pengangkutan aktif (transport aktif) juga disebut sebagai sukrosa-H<sup>+</sup> symporter (sucrose proton symport) (Riesmeier *et al.*, 1993). Ion hidrogen (H<sup>+</sup>) bersama dengan sukrosa akan memasuki protein *SUT*, kemudian akan ditransport ke luar dari sitoplasma. Peran *sucrose transporter* yang lain seperti menentukan kematangan buah, berperan dalam

perkembangan bunga, berperan dalam penentuan musim atau waktu berbunga, saling mempengaruhi protein lain dalam proses dan berpengaruh terhadap organ tanaman (Chincinska *et al.*, 2008). Beberapa peneliti telah berhasil mengisolasi gen SUT dari tanaman tebu (Rae, *et al.*, 2005), padi (Aoki *et al.*, 2003), dan tomat (Weise *et al.*, 2000). Hackel *et al* (2006) melaporkan bahwa, over ekspresi gen SUT dari tomat telah berhasil untuk meningkatkan translokasi sukrosa ke organ *sink* pada tomat.

### 1.3 Tanaman Transgenik Overekspresi Gen *SoSUT1* Generasi Pertama

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) varietas Bulu Lawang digunakan sebagai bahan tanaman dalam proses transformasi gen *SoSUT1* oleh Dwinianti (2013). Penelitian tersebut melakukan transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 yang membawa konstruk plasmid *pAct-SoSUT1*. Eksplan yang digunakan untuk transformasi adalah bagian pangkal tunas tebu *in vitro*. Konstruk plasmid *pAct-SoSUT1* dapat dilihat pada gambar 2.2 dibawah ini:



Gambar 2.2 Konstruk *pACT* (plasmid Actin) yang telah disisipi gen penyandi enzim Sucrose Transporter (SUT) Keterangan: LB = *Left Border*, RB = *Right Border*, P<sub>Nos</sub> = Promotor Nophaline Synthase, T<sub>Nos</sub> = Terminator Nophaline Synthase, T<sub>Rice Actin</sub> = Terminator Rice Actin, Hpt II = Hygromycin phosphotransferase II, SoSUT1 = *Saccharum officinarum* Sucrose Transporter 1, Rep = *Replication*, Sta = *Stability*, ColE1 ori = ColE1 *origin of replication*. (Sumber: Sugiharto, 2010).

*A. tumefaciens* merupakan bakteri tanah yang memiliki karakter morfologi sel berbentuk batang, tidak berspora, bersifat Gram negatif, respirasi secara aerob, tumbuh pada kisaran suhu 18 – 28<sup>0</sup>C dan bersifat fitopatogen pada tanaman. Secara alami *A. tumefaciens* menyebabkan terbentuknya *crown gall* pada tanaman dikotil dan secara genetik dapat memindahkan (mentransfer) gen ke tanaman (Bins and Thomashow, 1988). Keberhasilan transformasi menggunakan vektor *A. Tumefaciens* pada awalnya hanya terbatas pada kelompok tanaman dikotil. Penelitian secara intensif telah membuahkan pemahaman mekanisme transfer gen *A. tumefaciens*. Sehingga ditemukan dari beberapa penelitian bahwa *A. tumefaciens* efisien untuk transformasi gen pada tanaman monokotil (Rahmawati, 2006).

Setelah proses transformasi dilakukan, kemudian eksplan hasil transformasi diseleksi dengan menumbuhkan eksplan pada media yang mengandung antibiotik *hygromicin* sebagai *selectable marker* untuk menyeleksi tanaman transforman dan non transforman. Eksplan yang telah terintegrasi gen *hpt II* yang merupakan gen ketahanan antibiotik *hygromicin* akan mampu bertahan pada media seleksi. Tanaman tebu putatif transforman *in vitro* kemudian di aklimatisasi di green house dan di analisis PCR dengan menggunakan pasangan primer 1F/1R *hpt II* dan didapatkan 15 tanaman tebu transforman yang positif mengandung mengandung gen *hptII*, sehingga dapat dikatakan juga mengandung gen target *SoSUT1* (Gambar 2.2). Hasil transformasi dari Dwinianti (2013) menunjukkan efektifitas rata-rata transformasi gen *SoSUT1* menggunakan eksplan pangkal tunas tebu *in vitro* adalah sebesar 6,8 persen.

## 2.5 Rendemen Tebu

Rendemen tebu adalah kadar total gula yang terkandung di dalam tebu. Berdasarkan definisi, rendemen adalah jumlah kilogram kristal gula yang terbentuk dari setiap 100 kg tebu yang giling. Misalnya, nilai rendemen 10% artinya dihasilkan 10 kg gula dari 100 kg tebu. Tinggi rendahnya kadar gula atau nilai rendemen tebu dipengaruhi oleh 3 faktor yaitu faktor budidaya (*on-farm*), faktor tebang angkut dan faktor pengolahan (*off-farm*). Faktor budidaya meliputi;

penyiapan lahan, penggunaan bibit, pemupukan, pemeliharaan dan pemanenan. Faktor tebang angkut meliputi manajemen tebang, pengangkutan dan waktu tunggu untuk menggiling. Faktor pengolahan meliputi peralatan analisa dan kesiapan mesin di pabrik gula yang juga didukung dengan manajemen dan kapabilitas SDM yang ada di bagian pabrikasi (Supriyadi, 1992).

Secara umum, mekanisme penentuan nilai rendemen tebu berlangsung dalam tiga titik. Pertama adalah pada bagian penimbangan tebu, kedua pada analisa sampel laboratorium dan ketiga pada penimbangan gula. Pada stasiun penimbangan tebu, yang perlu diperhatikan adalah kalibrasi alat timbangan, proses penimbangan apakah sesuai prosedur dan pencatatan hasil timbangan. Stasiun laboratorium, meliputi kalibrasi peralatan laboratorium, proses pengambilan sampel nira perahan pertama pada gilingan 1, analisa brix dengan refraktometer, hydrometer atau poknometer, analisa pol dengan polarimeter atau sakarimeter dan pencatatan hasil analisa. Hasil dari analisa sampel di laboratorium inilah yang disebut dengan rendemen sementara (RS) (Manalu, 2006).

Perhitungan nilai rendemen di laboratorium diperoleh dengan mengetahui nilai brix, pol, harkat kemurnian dan nilai nira. Brix adalah jumlah zat padat semu yang larut (dalam gram) setiap 100 glarutan atau dapat dikatakan bahwa brix menunjukkan kandungan padatan (gula dan bukan gula). Zat yang terlarut dalam nira seperti gula (Sukrosa, glukosa, fruktosa, dan lain-lain), atau garam-garam klorida atau sulfat dari kalium, natrium, kalsium, dan lain-lain. Satuan brix merupakan satuan yang digunakan untuk menunjukkan kadar gula yang terlarut dalam suatu larutan. Semakin tinggi derajat brixnya maka semakin manis larutan tersebut. Pol adalah jumlah gula (dalam gram) yang ada dalam setiap 100 gram larutan yang diperoleh dari pengukuran dengan menggunakan polarimeter secara langsung. HK (harkat kemurnian) merupakan ukuran dari kemurnian nira, semakin murni secara relatif semakin banyak mengandung gula (Manalu, 2006).

Nira adalah cairan yang keluar dari pohon/batang yang merupakan bahan baku pembuatan gula. Nira tebu merupakan cairan dari batang tanaman tebu. Menurut Yukamgo (2007), nira tebu merupakan bahan baku utama dalam produksi gula. Air gula pada batang tebu mencapai 20 % mulai dari pangkal

sampai ujungnya, dan kadar air gula di bagian pangkal lebih tinggi dari pada bagian ujung.

Fitri (2008) menyatakan bahwa nira yang berasal dari stasiun penggilingan disebut dengan nira mentah. Secara garis besar komponen nira mentah terdiri dari:

1. Air
2. Gula
3. Kotoran
  - a. Kotoran kasar terdiri dari tanah pasir, ampas halus, udara dan sebagainya
  - b. Kotoran melayang terdiri dari jenis-jenis kotoran yang tidak dapat mengendap (koloid)
  - c. Kotoran terlarut terdiri dari berbagai jenis bahan baik bahan organik maupun dari batang tebu, misalnya jenis-jenis bahan yang bersifat asam dan yang memberikan warna dan sebagainya.

Di dalam stasiun pemurnian, kotoran-kotoran tersebut akan dihilangkan meskipun dalam pelaksanaannya penghilangan kotoran belum dapat sempurna khususnya terhadap kotoran yang terlarut dan melayang baru dapat dihilangkan sekitar 10-25 persen dari jumlah kotoran yang ada.

Selain itu, nira mentah mengandung gula dan zat bukan gula dalam susunan rata-rata sebagai berikut:

Tabel 2.1 kandungan gula dan zat bukan gula dalam nira mentah

No.	Kandungan nira mentah	Kadar (%)
1	Gula-sukrosa	11-14
2	Gula mereduksi	0,5-2,0
3	Zat anorganik	0,5-2,5
4	Zat organik	0,15-0,20
5	Sabut	10-15
6	Zat warna	7,5-15
7	Air	60-80

Sumber : Moerdokusumo (1993)

## 2.4 Hipotesis

Berdasarkan hasil studi pustaka yang telah dilakukan maka dapat di ambil beberapa hipotesis untuk penelitian ini yaitu :

1. Transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman tebu transgenik pada generasi kedua.
2. Terjadi peningkatan kandungan sukrosa dan rendemen batang pada tanaman tebu transgenik *overekspresi* gen *SoSUT1* pada generasi kedua.
3. Terdapat gen *SoSUT1* pada tanaman tebu transgenik digenerasi kedua.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di lahan Agroteknopark dan di CDAST (*Center for Development Advanced Science and Technology*), Universitas Jember pada bulan Februari 2014 sampai Februari 2015.

### 3.2 Bahan dan Alat

#### 3.2.1 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam percobaan ini antara lain bibit tanaman tebu varietas BL (Bulu Lawang) transgenik *overekspresi SoSUT1* yang terdiri dari 13 tanaman transforman yang telah disisipi gen SUT melalui konstruk *plasmid Actin* (Gambar 2.2) menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* STRAIN GV 3101 oleh Dwinianti (2013), serta 1 tanaman tebu *wildtype* (wt) varietas BL sebagai kontrol, pupuk NPK, dan bahan lain yang digunakan untuk analisis PCR dan kandungan sukrosa di laboratorium.

#### 3.2.2 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam percobaan ini antara lain pot 60 x70 (cm), nanodrop, mesin PCR, spektrofotometer, polarimeter, brixmeter dan alat pendukung lainnya.

### 3.3 Rancangan percobaan

Metode yang digunakan dalam percobaan ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 1 faktor perlakuan yaitu tanaman tebu transgenik (varietas BL) generasi pertama yang terdiri 13 taraf dan 1 tanaman tebu varietas BL *wild type* dengan 3 ulangan. Berikut merupakan 13 tanaman tebu transforman dan kontrol (*wildtype*):

Wt = *wild type*

T.1 = Tebu transforman SUT ke-1 (T1.1)

T.2 = Tebu transforman SUT ke-2 (T1.4)

T.3 = Tebu transforman SUT ke-3 (T1.7)

- T.4 = Tebu transforman SUT ke-4 (T2.1)
- T.5 = Tebu transforman SUT ke-5 (T2.2)
- T.6 = Tebu transforman SUT ke-6 (T2.4)
- T.7 = Tebu transforman SUT ke-7 (T3.2)
- T.8 = Tebu transforman SUT ke-8 (T3.5)
- T.9 = Tebu transforman SUT ke-9 (T2)
- T.10 = Tebu transforman SUT ke-10 (T20)
- T.11 = Tebu transforman SUT ke-11 (TB16)
- T.12 = Tebu transforman SUT ke-12 (TB17)
- T.13 = Tebu transforman SUT ke-13(TB18)

Tanaman tebu transforman dan kontrol ditanam sesuai dengan denah percobaan yang disajikan pada tabel 3.1 berikut ini:

<b>UL 1</b>	<b>UL 2</b>	<b>UL 3</b>
T.6	T.12	T.11
T.7	T.8	T.6
T.11	T.13	T.2
T.9	T.6	T.12
Wt	T.11	T.4
T.8	T.7	T.5
T.3	T.3	T.13
T.5	T.2	T.3
T.1	Wt	T.7
T.4	T.5	T.1
T.12	T.9	T.10
T.13	T.1	T.8
T.2	T.10	Wt
T.10	T.4	T.9

Tabel 3.1 Denah Percobaan

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnet 5% untuk melihat perbedaan perlakuan dengan kontrol.

## **3.4 Pelaksanaan Percobaan**

### **3.4.1 Pembibitan**

Bibit tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* generasi pertama yang berumur 11 bulan ditanam stek batangnya pada bak pembibitan selama 3-4 minggu dengan media tanah, pasir dan kompos (1:1:1). Perawatan bibit dilakukan dengan menyiram air supaya kelembapan media terjaga.

### **3.4.2 Persiapan Media Tanam**

Media tanam yang digunakan adalah tanah yang diayak terlebih dahulu. Kemudian media dimasukkan ke dalam pot, kemudian pot yang berisi media tersebut ditimbang  $\pm 28$  kg. Pot yang sudah berisi media tanam diatur letaknya sesuai dengan denah percobaan dengan jarak antar polibag  $\pm 15$  cm sehingga jarak antar tanam dalam satu baris ulangan adalah  $\pm 50$  cm. Jarak antar baris ulangan  $\pm 1$  meter.

### **3.4.3 Penanaman dan Pemeliharaan**

Penanaman tanaman tebu transgenik dan kontrol dilakukan setelah bibit siap tanam (berumur 3-4 minggu). Dosis pemupukan yang digunakan yaitu sebanyak 30 g per tanaman (Purwanti, 2008). Pemupukan NPK sebagai pupuk dasar dilakukan 2 hari sebelum tanam dengan dosis sebanyak 1/3 dosis. Tanaman dipelihara dengan melakukan penyiraman 1 kali sehari serta dilakukan penyulaman pada 5-7 HST. Pemupukan lanjutan dilakukan dengan menggunakan pupuk NPK umur 1-1,5 bulan sebanyak 2/3 dari dosis yang diberikan. Melakukan penyiangan dan pengendalian jika terdapat serangan OPT.

### **3.4.4 Analisis Laboratorium**

#### **1. Isolasi DNA dan Analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Isolasi DNA dilakukan dengan menggerus 0,5 gram daun tebu dengan nitrogen cair sampai halus untuk mendapatkan serbuknya. Menambahkan 1 ml buffer ekstraksi, 50  $\mu$ L SDS 20%, 1,25  $\mu$ L  $\beta$ -mercaptoethanol ke dalam serbuk daun. Vortex larutan sampai homogen kemudian menginkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Menambahkan 500  $\mu$ L Potasium Acetat 5M dan mencampur dengan cara *swirling* (digoyang dengan tangan), menginkubasi di dalam es selama 10 menit, sentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm, 4°C, selama 10 menit.

Supernatan diambil dan ditambah 5 ml isopropanol, dibolak-balik perlahan. Jika DNA tampak melayang-layang, diambil, keringkan dan larutkan pada 500 µl buffer TE. Tetapi jika DNA tidak melayang, lakukan inkubasi terlebih dahulu pada suhu -20°C selama 30 menit, kemudian sentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm, 4°C, selama 10 menit untuk mengendapkan DNA.

Purifikasi DNA dilakukan dengan menambahkan 15 µl RNAase, kemudian menginkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Menambahkan 500 µl PCI kemudian divortex. Sentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm, 4°C selama 10 menit, ambil supernatan, tambahkan 0,8 volume isopropanol dan 0,2 volume sodium asetat 3M. Cuci pellet dengan 1ml ethanol 70%. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Mengeringkan pellet dengan *vacum dry* dan tambahkan 50 µL buffer TE (100 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA pH 8,0, 500 mM NaCl, pH 8,0). DNA yang diperoleh kemudian diukur dengan menggunakan *spektrofotometer* dan analisis elektroforesis gel *agarose*.

PCR dilakukan dengan menggunakan PCR Master Mix (KAPA), dengan komposisi yang terdiri dari PCR Reaction Buffer yaitu 100 mM tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl pH 8,3 ditambah dNTP, air steril, Taq DNA polimerase, Primer dan DNA template. Dalam satu kali reaksi memiliki total volume 20 µl dengan larutan yang terdiri dari PCR Master Mix (KAPA) 10 µl, masing-masing primer (forward dan reverse) 1 µl, template genom 1,25µl dan ddH<sub>2</sub>O 6,75µl. PCR dilakukan dengan program predenaturasi 95°C selama 3 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 58°C selama 20 detik, elongation 72°C selama 1 menit dan final elongation 72°C selama 5 menit dengan jumlah siklus sebanyak 40 siklus. Pelaksanaan PCR harus berdasarkan primer yang digunakan, untuk mengetahui keberadaan gen SoSUT1, digunakan primer (forward dan reverse) dari *hptII* (*hygromycin phosphotransferaseII*). Sekuen primer hpt-F (5'-CCGCAAGGAATCGGTCAATA-3) dan sekuen primer hpt-R (5'-CCCAAGCTGCATCATCGAAA-3) dengan ukuran 470 bp.

Hasil PCR kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose 1%, yang mengandung 3 µl ethidium bromide (Sigma) pada tegangan 100 Volt selama 25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb Ladder (intron biotechnology) sebanyak 4µl untuk melihat pita DNA yang telah teramplifikasi. Kemudian hasil elektroforesis dilihat di UV mini transiluminator dan didokumentasikan dengan kamera.

## **2. Ekstraksi dan Penentuan Kandungan Sukrosa Batang**

Ekstraksi nira batang dilakukan dengan menggerus batang tebu, ambil nira tebu dan masukkan kedalam *microtube*, sentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu 4°C setelah itu buang pellet (kotoran). Simpan supernatan (nira) kemudian untuk analisis kandungan sukrosa. Encerkan terlebih dahulu nira yang disimpan sebelum menganalisis kandungan sukrosa. Pengenceran nira dilakukan dengan menambahkan aquadest 790 µl dalam 10 µl nira murni hasil penggerusan untuk 80x pengenceran.

Analisis kandungan sukrosa dilakukan menggunakan metode Seliwanoff (1887) dengan menambahkan 35 µl NaOH 1 N pada 3µl sampel nira yang sudah diencerkan kemudian homogenkan menggunakan vortek. Inkubasi campuran dengan suhu 100°C selama 10 menit, setelah dingin reaksikan dengan 125 µl *resorcinol* 0,1 % (dalam *ethanol* 95%) dan 375 µl HCl 30% kemudian inkubasi dengan 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 dengan kandungan bahan aktif sukrosa 1µg; 4,5µg ; 6,5µg; 7µg dan 8µg kemudian buat rumus regresi linear. Nilai kandungan sukrosa diperoleh dengan mengkonversikan nilai absorbansi sampel kedalam rumus regresi linier dari standart sukrosa yang telah dibuat sebelumnya.

## 2. Rendemen Tebu

Pengukuran rendemen tebu dilakukan dengan beberapa tahapan yakni batang tebu ditimbang untuk mendapatkan beratnya, kemudian digiling untuk memperoleh nira. Nira yang diperoleh ditimbang dan diukur nilai brixnya dengan menggunakan Brixmeter, sedangkan nilai Pol diperoleh dari pengukuran nira dengan menggunakan polarimeter secara langsung. Nilai brix menunjukkan kandungan padatan (gula dan bukan gula), sedangkan pol adalah jumlah (gram) yang terlarut dalam 100 gram larutan gulanya. Setelah itu dapat diperoleh nilai Harkat kemurnian (HK). HK merupakan hasil bagi dari nilai pol dan brix dalam persen berdasarkan rumus dibawah ini:

$$HK = \frac{Pol}{Brix} \times 100\%$$

Nilai nira juga diperoleh berdasarkan nilai pol dan brix. Nilai nira dihitung dengan rumus:

$$Nira = pol - 0,4(brix - pol)$$

Rendemen adalah hasil kali dari nilai nira dengan faktor rendemen (FR), faktor rendemen merupakan nilai rasio antara berat nira yang dihasilkan dengan berat tebu yang digiling. Faktor rendemen dan nilai rendemen dihitung dengan rumus berikut:

$$FR = \text{berat nira} / \text{berat tebu}$$

$$\text{Rendemen} = Nira \times FR \text{ (persen)}$$

### 3.5 Parameter Pengamatan

1. Pengamatan pertumbuhan tanaman dilakukan untuk mengetahui perbandingan potensi pertumbuhan antara tanaman tebu transgenik *SoSUT1* dengan tanaman kontrol. Pengamatan potensi pertumbuhan pada tebu umur 9 bulan meliputi :
  - a. Tinggi tanaman
  - b. Jumlah daun
  - c. Jumlah ruas
  - d. Jumlah anakan

2. Analisis kandungan sukrosa batang, dilakukan untuk mengetahui perbandingan besarnya kandungan sukrosa batang antara tanaman transgenik gen *SoSUT1* dan tanaman kontrol pada umur 12 bulan.
3. Pengukuran nilai rendemen tebu, dilakukan untuk mengetahui perbandingan besarnya nilai rendemen batang antara tanaman transgenik gen *SoSUT1* dan tanaman kontrol pada umur 12 bulan.
4. Deteksi keberadaan gen SUT dengan menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) pada umur 6 bulan.

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Potensi Pertumbuhan Tanaman Tebu Transgenik Over Ekspresi Gen *SoSUT1*

Hasil analisis data pada penelitian Potensi Pertumbuhan dan Akumulasi Sukrosa pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Transgenik Over Ekspresi Gen *SoSUT1* Generasi Kedua pada seluruh variabel pengamatan potensi pertumbuhan disajikan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Rangkuman analisis ragam pada seluruh variabel pengamatan

Variabel	Kuadran Tengah		
	ulangan	perlakuan	eror
<b>Tinggi tanaman</b>	485,21 <sup>ns</sup>	431,01 <sup>ns</sup>	439,75
<b>Jumlah daun</b>	0,50 <sup>ns</sup>	2,69 <sup>ns</sup>	2,17
<b>Jumlah ruas</b>	1,17 <sup>ns</sup>	6,13 <sup>ns</sup>	4,47
<b>Jumlah anakan</b>	13,17 <sup>ns</sup>	9,42 <sup>ns</sup>	8,45
<b>Sukrosa Batang</b>	741,26 <sup>*</sup>	384,14 <sup>*</sup>	160,18

Keterangan : ns = berbeda tidak nyata

\* = berbeda nyata

Adanya overekspresi gen *SoSUT1* diharapkan akan terjadi peningkatan aktivitas SUT pada tanaman tebu yang dapat meningkatkan proses translokasi sukrosa serta pertumbuhan tanaman tebu transgenik, namun berdasarkan tabel 4.1 diatas, data yang dihasilkan menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh nyata dari tanaman tebu transgenik transgenik over ekspresi gen *SoSUT1* terhadap seluruh variabel pengamatan potensi pertumbuhan tanaman, baik dari tinggi tanaman, jumlah daun, jumlah ruas maupun jumlah anakan. Hal ini dapat diduga disebabkan oleh kesamaan jumlah sukrosa yang disintesis di dalam tanaman tebu, karena tidak ada overekspresi gen SPS pada tanaman tebu. Biosintesis sukrosa ditentukan oleh aktivitas *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) (Huber and Huber, 1996) sedangkan untuk distribusi sukrosa dalam tanaman diperankan oleh protein transporter sukrosa (SUT) (Rae *et al.*, 2005). Oleh sebab itu, yang terjadi dalam tanaman tebu transgenik *overekspresi* gen *SoSUT1* adalah adanya peningkatan

distribusi sukrosa, sedangkan biosintesis sukrosa di dalam tanaman tebu transgenik *over ekspresi* gen *SoSUT1* sama dengan tanaman tebu *wildtype* atau kontrol.

Disamping itu, meskipun tanaman transgenik *overekspresi* gen *SoSUT1* tidak memberikan pengaruh nyata terhadap pertumbuhan tanaman tebu, namun terjadi peningkatan pertumbuhan pada semua tebu transforman jika dibandingkan dengan tanaman tebu kontrol yang disajikan dalam tabel 4.2 berikut:

Tabel 4.2 Peningkatan pertumbuhan tebu transgenik *overekspresi* gen *SoSUT1* dibandingkan dengan kontrol.

Tanaman Tebu Transforman	Peningkatan (%)			
	Tinggi tanaman	Jumlah daun	Jumlah ruas	Jumlah anakan
T.1	5,42	30,38	12,25	45,57
T.2	11,45	30,38	22,47	59,21
T.3	12,31	8,6	20,45	45,57
T.4	2,59	39,11	22,47	72,85
T.5	15,15	17,34	8,21	50,07
T.6	7,63	34,68	12,25	36,43
T.7	3,57	8,6	18,37	86,49
T.8	3,57	30,38	6,12	22,78
T.9	1,97	26,08	2,08	63,71
T.10	5,05	30,38	4,1	18,28
T.11	1,35	34,68	12,25	59,21
T.12	5,17	39,11	20,45	13,64
T.13	5,17	17,34	28,6	36,43

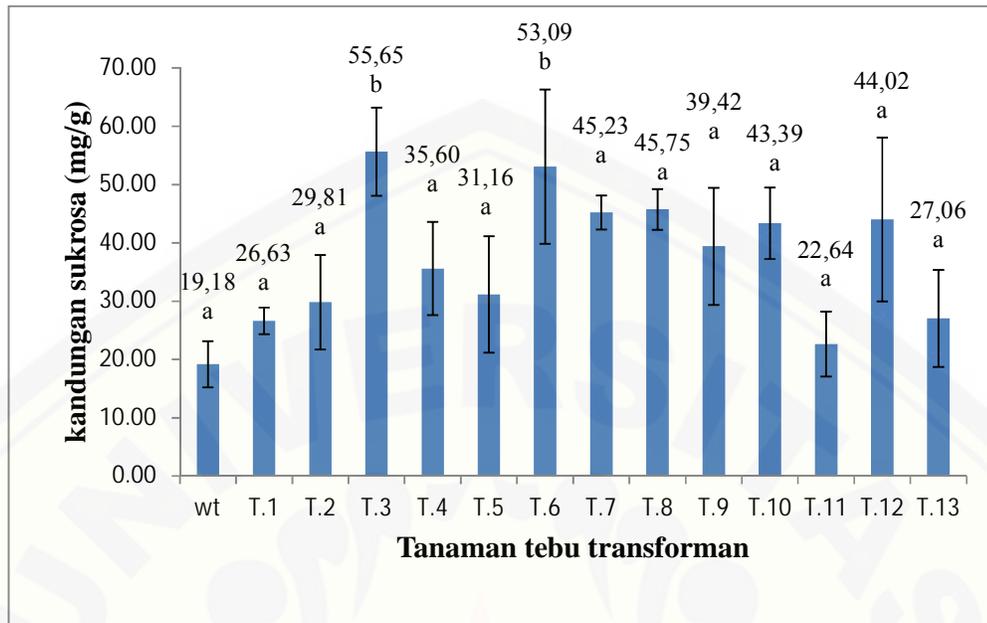
Berdasarkan tabel 4.2 diatas, dapat diketahui adanya peningkatan pertumbuhan pada tanaman tebu transforman jika dibandingkan dengan tanaman kontrol. Pada tinggi tanaman tebu transforman terjadi peningkatan mulai dari 1,35 persen (T.11) hingga 15,15 persen (T.5) dari tinggi tanaman tebu *wildtype* sedangkan pada jumlah daun, peningkatan jumlah daun tebu transforman yakni

sebesar 8,6 persen (T.7) sampai 39,11 persen (T.4 dan T.12) dari tebu kontrolnya. Jumlah ruas tanaman tebu transgenik over ekspresi gen *SoSUT1* meningkat hingga mencapai 22,47 persen pada T.2, sedangkan jumlah anakan meningkat mulai 13,64 persen pada T.12, bahkan pada T.7 terjadi peningkatan jumlah anakan sebanyak 86,49 persen.

#### **4.2 Kandungan Sukrosa dan Rendemen Batang Tanaman Tebu Transgenik *Overekspresi Gen SoSUT1***

Sukrosa yang dihasilkan tanaman pada proses fotosintesis digunakan untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman, salah satunya sebagai bahan yang ditimbun untuk cadangan makanan pada organ penyimpan cadangan makanan seperti pada batang tebu, dalam proses tersebut, didukung oleh *sucrose transporter* yang terletak di membran plasma dan disandikan oleh gen yang disebut sebagai gen *SUT* (Aoki *et al.* 2003). Adanya transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu diharapkan dapat meningkatkan aktivitas *SUT* untuk proses translokasi sukrosa dari jaringan asal menuju jaringan penyimpan sehingga mampu meningkatkan akumulasi sukrosa pada batang tanaman tebu.

Meskipun potensi pertumbuhan pada tanaman tebu transgenik *overekspresi* gen *SoSUT1* menunjukkan hasil berbeda tidak nyata, namun hasil analisis kandungan sukrosa batang menunjukkan berbeda nyata pada tebu transforman T.3 dan T.6 (Gbr.4.1). Tanaman tebu transgenik yang memiliki rata-rata kandungan sukrosa paling tinggi yaitu T.6 sebanyak 53,09 mg/g dan yang paling tinggi adalah T.3 dengan rata-rata kandungan sukrosa 55,65 mg/g, sedangkan pada tanaman tebu kontrol atau *wildtype* hanya sebanyak 19,18 mg/g.



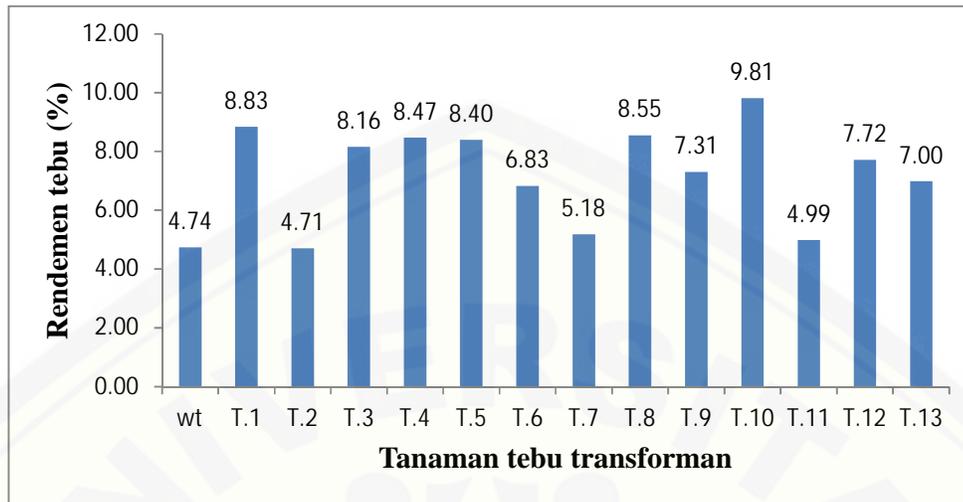
Gambar 4.1 Hasil analisis rata-rata kandungan sukrosa batang umur 12 bulan pada tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* dan tanaman kontrol.

Selain itu terlihat bahwa hasil rata-rata kandungan sukrosa antar tebu transforman berbeda tidak nyata (a) dari pada tanaman kontrol, seperti pada T.11 dan T.1 hanya sebesar 22,64 mg/g dan 26,63 mg/g. Hal ini dapat diduga bahwa sebagian sukrosa telah terdegradasi menjadi glukosa dan fruktosa oleh adanya enzim pendegradasi sukrosa seperti *Invertase* dan *Sucrose Synthase* (SS). Michaud (1995) menyatakan bahwa sukrosa yang disintesis di daun belum tentu diakumulasi atau ditransport ke buah (tempat cadangan makanan), tetapi setelah sukrosa disintesis dapat dipecahkan menjadi senyawa yang lebih sederhana untuk pertumbuhan tanaman.

Meskipun hasil uji lanjut Dunnet 5% menghasilkan bahwa hanya T.3 dan T.6 saja yang berbeda nyata, namun semua tanaman tebu transgenik *overekspresi* gen *SoSUT1* memiliki nilai yang lebih tinggi dari pada tanaman tebu kontrol. Hal ini dapat dipengaruhi oleh peran dari SUT, dimana translokasi sukrosa oleh protein SUT merupakan bentuk pengangkutan aktif yaitu pemindahan zat terlarut melawan konsentrasi, melintasi plasma dari satu sisi yang konsentrasi zat terlarutnya rendah menuju ke sisi yang konsentrasi zat terlarutnya tinggi (Campbell *et al.*, 2000), sehingga dengan adanya *overekspresi* gen *SoSUT1* lebih

meningkatkan proses translokasinya dari pada tanaman tebu kontrol karena di dalam tanaman tebu sudah mengandung protein SUT endogen, dengan penambahan gen SUT melalui Transformasi gen SoSUT1 maka akan terjadi penambahan SUT eksogen pada tanaman tebu transforman dan proses transport sukrosa akan semakin cepat dan jumlah sukrosa yang disimpan juga akan lebih tinggi dari pada tanaman tebu yang hanya menggunakan SUT endogen dalam transportasi sukrosa dari *source* ke *sink*. Selain itu protein SUT1 dianggap sebagai protein transporter yang lebih baik diantara sub famili protein SUT lainnya (SUT2 dan SUT4). Meskipun daya muat pengangkutannya rendah, SUT1 memiliki afinitas yang tinggi terhadap substrat, sehingga keberadaannya dalam tanaman penting dalam hal akumulasi sukrosa (Shiratake, 2007).

Pengukuran kandungan sukrosa di laboratorium bertujuan untuk mengetahui tingkat akumulasi sukrosa murni pada tanaman tebu. Berbeda dengan sukrosa, rendemen tebu yang diukur di pabrik gula mendeskripsikan banyaknya gula-gula (sukrosa, glukosa, fruktosa, dsb) yang dihasilkan dari tebu yang digiling yang dinyatakan dalam persen sehingga tingkat nilai kandungan sukrosa pada masing-masing tebu transforman belum tentu sama dengan hasil dari rendemen tebu karena selain komponennya yang berbeda, pengukuran nilai rendemen tebu dipengaruhi oleh banyak faktor. Untuk dapat memperoleh hasil yang optimal, perhitungan nilai rendemen tebu perlu memperhatikan 3 faktor utama yaitu faktor budidaya (*on-farm*), faktor tebang angkut dan faktor pengolahan (*off-farm*). Nilai rendemen tanaman tebu transgenik *over ekspresi* gen *SoSUT1* generasi kedua dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 4.2. Hasil analisis rendemen umur 12 bulan pada tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* dan tanaman kontrol (*wildtype*).

Secara umum hasil perhitungan nilai rendemen tanaman tebu transgenik lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman kontrol. Berdasarkan gambar diatas rendemen paling tinggi yaitu T.10 9,81 persen, T.1 8,83 persen dan T.8 yaitu 8,55 persen. Namun, ada tebu transforman yang memiliki nilai rendemen dibawah tanaman tebu kontrol, yaitu pada T.2 hanya 4,71 persen.

Rendahnya nilai rendemen pada T.2 dapat disebabkan oleh banyak faktor, salah satunya diduga disebabkan oleh aktivitas enzim pendegradasi sukrosa seperti *Invertase* dan *Sucrose Synthase* (SS), sukrosa yang sudah disintesis dapat dipecah menjadi glukosa dan fruktosa untuk digunakan dalam pembentukan sel-sel baru (pertumbuhan) oleh enzim pendegradasi sukrosa. Pada T.2 diduga memiliki aktivitas enzim *Invertase* dan *Sucrose Synthase* yang lebih tinggi untuk meningkatkan jumlah sel dalam proses pertumbuhannya, sehingga kandungan sukrosa maupun gula invert (glukosa dan fruktosa hasil hidrolisis sukrosa) pada T.2 menurun dan menyebabkan rendemen tebu sedikit lebih rendah dari tanaman kontrol. Oleh sebab itu, perlu dilakukan analisis aktivitas enzim *Invertase* dan *Sucrose Synthase* untuk mengetahui pengaruh aktivitas enzim pendegradasi sukrosa terhadap kandungan gula pada batang tanaman tebu.

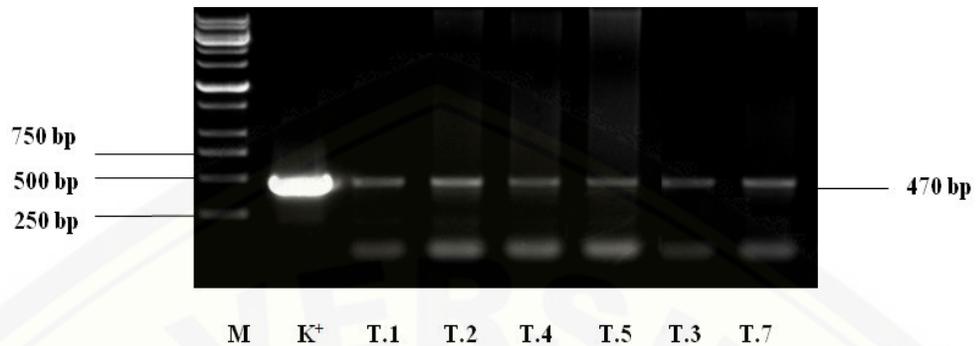
Selain itu, jika dibandingkan antara hasil pengukuran kandungan sukrosa dan nilai rendemen tebu maka hasil yang diperoleh tidak sama, misalnya pada T.1 yang memiliki kandungan sukrosa rendah yakni 26,63 mg/g (terendah kedua), namun rendemennya sebesar 8,8 persen (tertinggi kedua), hal ini dapat disebabkan karena pada pengukuran rendemen ini merupakan pengukuran rendemen di pabrik yang merupakan persentase dari kandungan gula-gula (sukrosa, fruktosa, glukosa, dll), namun pada kandungan sukrosa merupakan hasil pengukuran gula sukrosa saja. Oleh sebab itu, pada T.1 ini memiliki kandungan sukrosa yang rendah namun kandungan gula lain non-sukrosa cukup tinggi.

Menurut Fitri (2008) faktor lain yang dapat mempengaruhi nilai rendemen adalah kondisi asam pada nira hasil perahan dalam pabrik, dimana gula yang terkandung dalam nira tidak kuat terhadap kondisi lingkungan asam, artinya bila di dalam larutan terdapat bahan yang bersifat asam maka gula-gula dapat berpotensi untuk rusak karena salah satu komponen nira adalah bahan yang bersifat asam (jenis kotoran yang terlarut dalam nira) sehingga sifat asam dari nira harus segera dihilangkan menjadi netral untuk menjaga kandungan gula dalam nira tidak rusak.

#### **4.3 Hasil PCR Tanaman Tebu Transgenik *Overekspresi Gen SoSUT1***

Pada penelitian sebelumnya telah berhasil dilakukan transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu varietas BL menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Untuk mengetahui keberadaan gen *SoSUT1* dilakukan analisis *PCR* dengan menggunakan primer *hpt II-F/R* yang menghasilkan pita DNA *hpt* dengan ukuran 470 bp yang menunjukkan bahwa terdapat pita dengan ukuran tersebut pada plasmid pAct dan *sample* tanaman transforman, sedangkan tanaman kontrol (*non transgenic*) tidak ada. Hasil analisis *PCR* disajikan dalam Gambar berikut:

(a)



(b) T.8 T.6 T.10 M K<sup>+</sup> wt T.9 T.11 T.12 T.13

Gambar 4.3. (a) dan (b). Elektroforesis hasil PCR konfirmasi gen *SoSUT1* dengan pasangan primer *hpt-F/R*. Keterangan: M=Marker DNA, K<sup>+</sup>= plasmid pAct, Wt = tanaman kontrol dan T.1, T.2, T.3, T.4, T.5, T.6, T.7, T.8, T.9, T.10, T.11, T.12, T.13 adalah sampel DNA genom daun tebu transgenik.

Pada Gambar 4.3 diatas, terlihat adanya pita DNA pada K<sup>+</sup> (plasmid pActin) dengan panjang 470 bp. Pita DNA dengan ukuran yang sama juga terlihat pada semua sampel DNA genom yaitu T.1, T.2, T.3, T.4, T.5, T.6, T.7, T.8, T.9, T.10, T.11, T.12 dan T.13 yang menandakan bahwa semua tebu transforman positif mengandung gen *SoSUT1* pada generasi kedua. Sedangkan pada tanaman tebu kontrol (Wt) tidak menunjukkan adanya pita DNA pada analisis PCR tersebut, hal ini menunjukkan bahwa tanaman kontrol tidak terinsersi gen *SoSUT* dan tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* stabil di generasi kedua. Namun selain pita DNA pada ukuran 470 bp, terdapat pita DNA lain yang teramplifikasi pada ukuran  $\pm$  100 bp, hal ini dapat terjadi karena adanya desain primer yang belum spesifik, sehingga menyebabkan adanya kecocokan antara primer dengan sekuen DNA yang lain.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat ditarik beberapa kesimpulan bahwa :

1. Tidak terjadi peningkatan pertumbuhan yang berbeda nyata pada tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* pada generasi kedua.
2. Terjadi peningkatan kandungan sukrosa batang pada semua tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* pada generasi kedua, tanaman transforman yang memiliki kandungan sukrosa tertinggi adalah T.3 dan T.6. Nilai rendemen pada semua tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* meningkat pada generasi kedua, kecuali pada T.2.
3. Semua tanaman tebu transgenik terdeteksi gen *SoSUT1* pada generasi kedua.

### 5.2 Saran

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman tebu transgenik *overekspresi* gen *SoSUT1* generasi kedua memiliki kestabilan gen yang baik dan mengalami peningkatan pertumbuhan, kandungan sukrosa dan rendemen tebu. Namun, masih perlu diperhatikan beberapa faktor pada proses budidaya (*on-farm*), faktor tebang angkut dan pengolahan (*off-farm*) agar mampu menghasilkan tanaman tebu yang sehat dan hasil produksi yang maksimal. Selain itu, desain primer untuk *hpt II* perlu diperbaiki lagi agar lebih spesifik pada sekuen DNA yang ditargetkan saja.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Aoki, N., Hirose, T., Scofield, G.N., Whitfield, P.R. and Furbank, R.T. 2003. The Sucrose transporter Gene Family in Rice. *Plant Cell Physiol.* 44: 223-232.
- Binns, A.N. and Thomashow, M.F. 1988. Cell Biology of Agrobacterium Infection and Transformation of Plants. *Annual Review of Microbiology.* Vol. 42: 575- 606.
- Campbell, N. A., J. B. Reece dan L. G. Mitchell. 2000. *Biologi.* Jakarta: Erlangga.
- Casu, R.E., C.P.L. Grof, A.L. Rae, C.L. McIntyre, C.M. Dimmock, and J.M. Manners. 2003. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of Sugarcane by expressed sequence tag and micro array analysis. *Palant Mol. Biol.* 10:1-16.
- Cheng, W.H., K. H. Im, and P. S. Chourey. 1996. Sucrose Phosphate Synthase Expression at The Cell and Tissue Level is Coordinated With Sucrose Sink to Source Transitions in Maize Leaf. *Plant Physiol.* Vol. 111 : 1021-1029.
- Chincinska IA., Liesche J., Krugel U., Michalska J., Geigenberger P., Grimm B., Kuhn C. 2008. Sucrose transporter StSUT4 from potato affects flowering, tuberization, and shade avoidance response. *Plant Physiol,* 146: 515-528.
- Dwinianti, E.F. 2013. Transformasi Gen SoSUT1 pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L var. BL) Menggunakan Agrobacterium tumefaciens STRAIN GV 3101. *Skripsi.* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Jember.
- Fitri, Y. F. 2008. Pengaruh Penambahan Susu Kapur (CaOH)<sub>2</sub> dan gas SO<sub>2</sub> terhadap pH Nira Mentah dalam Pemurnian Nira di Pabrik Gula Kwala Madu PTPN II Langkat. *Karya Ilmiah.* Universitas Sumatera Utara.
- Guimaraes, C.T and W.S. Sobral (1998). The *Saccharum* Complex: Relation to Other Pndropogoneae. *Plant Breeding Review* 16: 269–288.
- 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.*45 :180–192.

- Huber, S.C. And J.L. Huber. 1996. Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plant. *Annu. Rev.Plant Mol. Biol*, 47: 431 – 444.
- Krugel, Veenhoff, Langbein, Wiederhold, Liesche, Friedich, Grimm, Martioia, Poolman, and Kuhn. 2008. Transport and Sorting of Solanum tuberosum Sucrose Transporter SUT1 is Affected by Posttranslational Modification. *Plant Cell*. Vol. 20: 1-17.
- Kuhn, C., Barker, L., and Frommer, W.B. 1999. Update on Sucrose Transport in Higher Plants. *Journal of Experimental Botany*, Vol.50: 935-953.
- Kuhn, C., and Christopher. 2010. Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 13:1–11.
- 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 Physiology and Development. *Plant Physiology*.Vol. 131: 102–113.
- Lalonde, S., Tegeder, M., Throne-Holst M., Frommer, W.B., Patrick, J.W. 2003. Phloem Loading and Unloading of Sugars And Amino Acids. *Plant Cell Environ* 26: 37-56.
- Lemoine, R. 2000. Sucrose Transporter in Plants: Update on Function and Structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 246-262.
- Lukito, Aris. 2008. *Tebu – Sugarcane*. Yogyakarta: Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.
- Manalu, L.P. 2006. Studi Kasus Penentuan Rendemen Tebu di Pabrik Gula BUMN. *Jurnal Keteknikaan Pertanian*. Vol 20 (1).
- Mao, L., F. Que, and G. Wang. 2006. Sugar Metabolism and involvement of enzymes in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) stems during storage. *Food Chem*. 98:338-342.
- Michaud, D. 1995. Evidence for the involvement of sucrose phosphate synthase in the pathway of sucrose accumulation in sucrose accumulating tomato fruits. *Plant Physiology* 99,434–438.
- Moerdokusumo. 1993. *Pengawasan Kualitas dan Teknologi Pembuatan Gula di Indonesia*. Bandung : ITB.
- Purwanti, E. 2008. Pengaruh Dosis Pupuk Majemuk Dan Konsentrasi Em-4 Terhadap Pertumbuhan Bibit Stek Tebu (*Saccharum Officinarum* L.). *Skripsi*. Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta.

- Rae, A.L., Perroux, J.M., Grof, C.P.L. 2005. Sucrose partitioning vascular bundles and storage parenchyma in sugarcane stem: a potential role for ShSUT1 sucrose transporter. *Planta* 220: 817-825.
- Rahmawati, S. 2006. Status Perkembangan Perbaikan Sifat Genetik Padi Menggunakan Transformasi Agrobacterium. *Jurnal AgroBiogen*. Vol. 2 (1): 36-44.
- Reismeier, J. W., Hirner, B., Frommer, W. B. 1993. Potato sucrose transporter expression in minor veins indicates a role in phloem loading. *Plant Cell*. Vol. 5: 1591-1598.
- Seliwanoff . 1887. "Notiz über eine Fruchtzuckerreaction".*Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*20: 181
- Sharma, P.D. 2004. *Plant Pathology*. Rakesh Kumar Rastogi. India. Hlm 426-427.
- Shiratake, K. 2007. Genetics Of Sucrose Transporter in Plants. *Genes genomes and Genomics Global Science Books*. Vol. 1(1): 73-80.
- Sudiatso, S. 1982. *Bertanam Tebu*. Departemen Agronomi. Fakultas Pertanian. Institut Pertanian Bogor.
- Sugiharto, B. 2010. *Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspressi Gen untuk Sucrose Phosphate Synthase dan Sucrose Transporter Protein ppada Tanaman Tebu*. Tidak Dipublikasikan. Laporan Akhir Hibah Kompetensi Tahun 2010.
- Supriyadi, Ahmad. 1992. *Rendemen Tebu Liku-liku Permasalahannya*. Kanisius. Yogyakarta.
- Weise, A., L. Barker, C. Kuhn, S. Lalonde, H. Buschmann, W. B. Frommer dan J. M. Ward. 2000. A New Subfamily of Sucrose Transporters, SUT4, with Low Affinity/High Capacity Localized in Eucleate Sieve Elements of Plants. *Plant Cell*. Vol. 12: 1345 – 1355.
- Yukamgo, E. dan Nasih. 2007. Peran Silikon sebagai unsur bermanfaat pada tanaman Tebu. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan*. 7 (2): 103-116.

LAMPIRAN

1. Analisis sidik ragam data tinggi tanaman

No.urut	Tebu	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Total	Rata-rata
1	wt	277	293	242	812	271
2	T.7	228	323	290	841	280
3	T.11	244	295	284	823	274
4	T.2	308	305	292	905	302
5	T.6	275	291	308	874	291
6	T.8	293	267	281	841	280
7	T.3	281	312	319	912	304
8	T.5	288	332	315	935	312
9	T.1	284	279	293	856	285
10	T.4	285	273	275	833	278
11	T.12	291	268	295	854	285
12	T.13	296	260	298	854	285
13	T.9	285	263	280	828	276
14	T.10	279	275	299	853	284
	<b>Total</b>	3914	4036	4071	12021	4007

$$FK = 3440581,929$$

SK	db	JK	KT	Fhit	5%	1%
ulangan	2	970,43	485,21	1,10 <sup>ns</sup>	3,34	5,45
perlakuan	13	5603,07	431,01	0,98 <sup>ns</sup>	2,06	2,79
<b>Error</b>	26	11433,57	439,75			
<b>total</b>	41	18007,07				

$$CV = 0,523341$$

2. Analisis sidik ragam data jumlah daun tanaman

No.urut	Tebu	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Total	Rata-rata
1	wt	6	9	8	23	7,7
2	T.7	8	9	8	25	8,3
3	T.11	9	14	8	31	10,3
4	T.2	10	9	11	30	10,0
5	T.6	10	10	11	31	10,3
6	T.8	13	8	9	30	10,0
7	T.3	8	9	8	25	8,3
8	T.5	9	8	10	27	9,0
9	T.1	11	10	9	30	10,0
10	T.4	10	11	11	32	10,7
11	T.12	11	11	10	32	10,7
12	T.13	11	8	8	27	9,0
13	T.9	10	9	10	29	9,7
14	T.10	9	11	10	30	10,0
	<b>Total</b>	135	136	131	402	134,00

FK =3847,714

SK	db	JK	KT	Fhit	5%	1%
Ulangan	2	1,00	0,50	0,23 <sup>ns</sup>	3,34	5,45
perlakuan	13	34,95	2,69	1,24 <sup>ns</sup>	2,06	2,79
Error	26	56,33	2,17			
Total	41	92,29				

CV =1,098478

3. Analisis sidik ragam data jumlah ruas tanaman

No.urut	Tebu	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Total	Rata-rata
1	wt	15	19	15	49	16,3
2	T.7	17	20	21	58	19,3
3	T.11	16	19	20	55	18,3
4	T.2	21	19	20	60	20,0
5	T.6	20	17	18	55	18,3
6	T.8	19	13	20	52	17,3
7	T.3	19	20	20	59	19,7
8	T.5	20	16	17	53	17,7
9	T.1	19	17	19	55	18,3
10	T.4	20	20	20	60	20,0
11	T.12	20	19	20	59	19,7
12	T.13	22	20	21	63	21,0
13	T.9	13	21	16	50	16,7
14	T.10	15	19	17	51	17,0
	<b>Total</b>	256	259	264	779	259,66

FK =14448,6

SK	db	JK	KT	Fhit	5%	1%
ulangan	2	2,33	1,17	0,26 <sup>ns</sup>	3,34	5,45
perlakuan	13	79,74	6,13	1,37 <sup>ns</sup>	2,06	2,79
Error	26	116,33	4,47			
Total	41	198,40				

CV =0,81463

4. Analisis sidik ragam data jumlah anakan tanaman

No.urut	Tebu	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Total	Rata-rata
1	wt	7	7	8	22	7,3
2	T.7	8	15	18	41	13,7
3	T.11	7	14	14	35	11,7
4	T.2	16	9	10	35	11,7
5	T.6	10	9	11	30	10,0
6	T.8	10	8	9	27	9,0
7	T.3	9	12	11	32	10,7
8	T.5	8	12	13	33	11,0
9	T.1	12	6	14	32	10,7
10	T.4	10	18	10	38	12,7
11	T.12	7	9	9	25	8,3
12	T.13	11	10	9	30	10,0
13	T.9	9	11	16	36	12,0
14	T.10	9	9	8	26	8,7
	<b>Total</b>	133	149	160	442	147,33

FK =4651,524

SK	db	JK	KT	Fhit	5%	1%
ulangan	2	26,33	13,17	1,56 <sup>ns</sup>	3,34	5,45
perlakuan	13	122,48	9,42	1,12 <sup>ns</sup>	2,06	2,79
Eror	26	219,67	8,45			
<b>Total</b>	41	368,48				

CV =1,972851

5. Lampiran analisis kandungan sukrosa batang tebu

No.	Tebu	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Total	Rata-rata	St-eror
1.	wt	26,27	18,77	12,51	57,6	19,18	3,97
2.	T.1	22,88	26,24	30,78	79,9	26,63	2,27
3.	T.2	46,04	21,5	21,9	89,4	29,81	8,11
4.	T.3	40,88	60,05	66,02	167,0	55,65	7,58
5.	T.4	28,11	27,1	51,6	106,8	35,60	8,00
6.	T.5	21,57	20,77	51,13	93,5	31,16	9,99
7.	T.6	42,94	37,02	79,32	159,3	53,09	13,23
8.	T.7	41,94	42,7	51,05	135,7	45,23	2,90
9.	T.8	48,17	38,8	50,27	137,2	45,75	3,51
10.	T.9	28,98	29,76	59,52	118,3	39,42	10,05
11.	T.10	47,25	31,36	51,55	130,2	43,39	6,13
12.	T.11	12,3	31,44	24,19	67,9	22,64	5,57
13.	T.12	18,98	45,44	67,65	132,1	44,02	14,08
14.	T.13	19,88	43,66	17,63	81,2	27,06	8,32
	Total	446,2	474,6	635,1	1555,9	518,6	

FK 57640,17

SK	db	JK	KT	Fhit	5%	1%
ulangan	2	1482,52	741,26	4,63*	3,34	5,45
perlakuan	13	4993,88	384,14	2,40*	2,06	2,79
eror	26	4164,69	160,18			
total	41	10641,08				

CV 2,51696

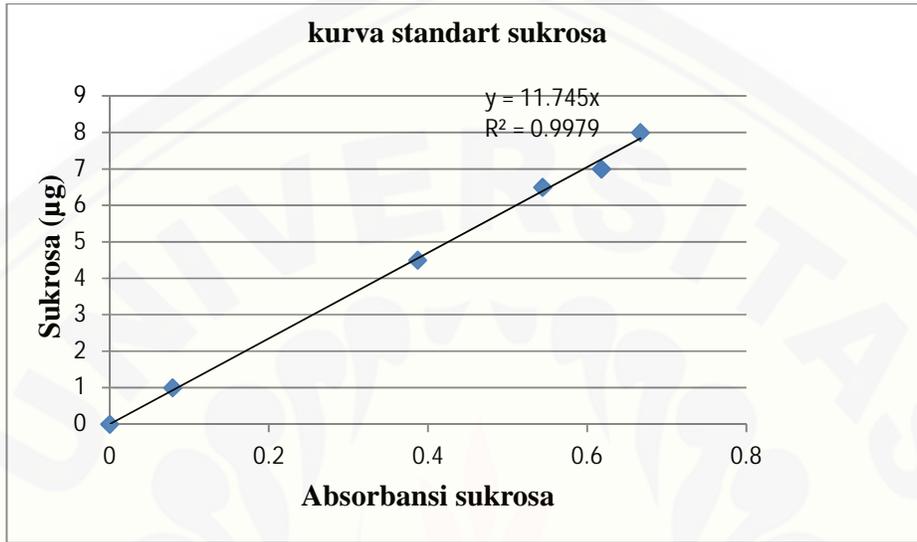
**6. Hasil uji Dunnet 5% kandungan sukrosa batang tebu**

No.	Tebu	Sukrosa batang (mg/g)	Sukrosa batang – kontrol (wt) (mg/g)	DLSD	Notasi
1	wt	19,18	0 <sup>ns</sup>	29,76	a
2	T.11	22,64	3,46 <sup>ns</sup>	29,76	a
3	T.1	26,63	7,45 <sup>ns</sup>	29,76	a
4	T.13	27,06	7,88 <sup>ns</sup>	29,76	a
5	T.2	29,81	10,63 <sup>ns</sup>	29,76	a
6	T.5	31,16	11,98 <sup>ns</sup>	29,76	a
7	T.4	35,60	16,42 <sup>ns</sup>	29,76	a
8	T.9	39,42	20,24 <sup>ns</sup>	29,76	a
9	T.10	43,39	24,21 <sup>ns</sup>	29,76	a
10	T.12	44,02	24,84 <sup>ns</sup>	29,76	a
11	T.7	45,23	26,05 <sup>ns</sup>	29,76	a
12	T.8	45,75	26,57 <sup>ns</sup>	29,76	a
13	T.6	53,09	33,91 <sup>*</sup>	29,76	b
14	T.3	55,65	36,47 <sup>*</sup>	29,76	b

Keterangan :

DLSD : *Dunnet Least Significant Difference*

7. Kurva standart yang digunakan untuk perhitungan sukrosa



8. Lampiran analisis rendemen tebu

No	Tebu	Berat/ pot	Berat	Berat nira	Presing (FR)	Brix	Suhu	Pol	Brix terkoreksi	%pol	HK	Nila nira	Rende men
1	wt	5,5	12100	7300	0,6	16,5	29	38,6	16,59	10,38	62,57	7,90	4,74
2	T.1	5,67	10700	6400	0,6	15,5	29,5	55,6	15,63	14,98	95,84	14,72	8,83
3	T.2	9,5	16100	9900	0,61	16,05	29	37,6	16,14	10,13	62,76	7,73	4,71
4	T.3	6,5	12400	6800	0,55	16,25	29	56,7	16,34	15,26	93,39	14,83	8,16
5	T.4	6	11500	7000	0,61	16,3	29,5	54,3	16,43	14,61	88,92	13,88	8,47
6	T.5	6,33	10900	6600	0,61	17,1	29	55	17,19	14,75	85,81	13,77	8,40
7	T.6	5,33	9200	5900	0,64	16,6	29	46,1	16,69	12,39	74,24	10,67	6,83
8	T.7	6,5	10950	6300	0,58	17,2	29	42,2	17,29	11,32	65,47	8,93	5,18
9	T.8	4,83	8800	5100	0,58	17,5	28	58,1	17,59	15,56	88,46	14,75	8,55
10	T.9	4,5	7800	4600	0,59	16	29,5	50	16,13	13,46	83,45	12,39	7,31
11	T.10	5,17	8600	5600	0,65	16,8	29,5	58,2	16,93	15,62	92,26	15,10	9,81
12	T.11	3,83	5400	3300	0,61	16,05	29	38,8	16,14	10,45	64,75	8,17	4,99
13	T.12	5,67	9800	6000	0,61	16,15	29,5	50,9	16,28	13,69	84,09	12,65	7,72
14	T.13	8	14000	8700	0,62	14,85	29,5	45,8	14,98	12,34	82,38	11,28	7,00