



**UJI STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU PRODUK REKAYASA  
GENETIKA OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1* dan *SoSUT1***

**TESIS**

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

**Oleh**

**Qusnul Khotimah**

**NIM 141820401003**

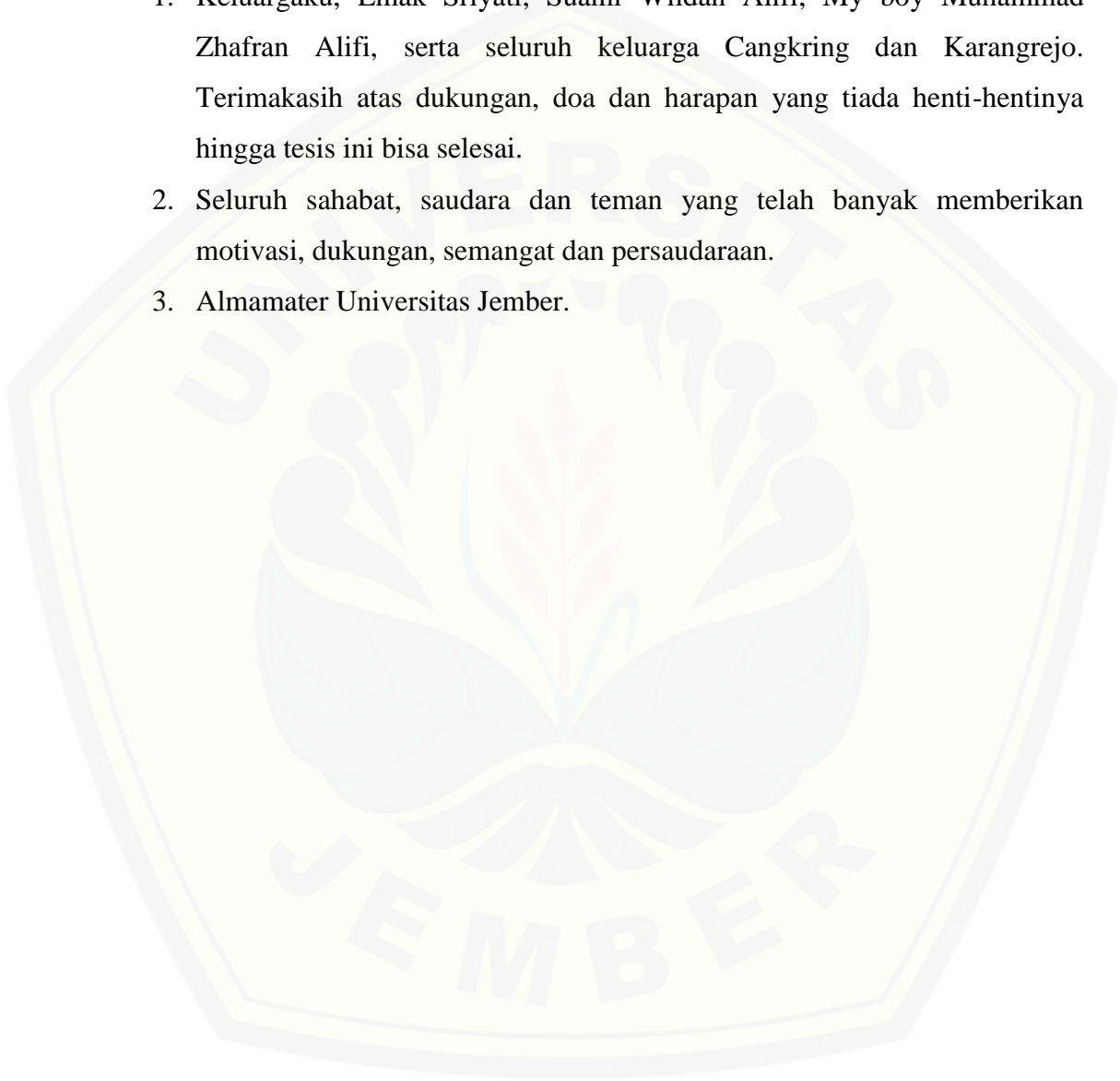
**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2017**

## PERSEMBAHAN

Dengan menyebut Nama Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, kupersembahkan Tesis ini kepada:

1. Keluargaku, Emak Sriyati, Suami Wildan Alifi, My boy Muhammad Zhafran Alifi, serta seluruh keluarga Cangkring dan Karangrejo. Terimakasih atas dukungan, doa dan harapan yang tiada henti-hentinya hingga tesis ini bisa selesai.
2. Seluruh sahabat, saudara dan teman yang telah banyak memberikan motivasi, dukungan, semangat dan persaudaraan.
3. Almamater Universitas Jember.



**MOTO**

“Merantaulah maka kau akan dapatkan pengganti dari kerabat dan kawan.  
Berlelah  
lelahlah, manisnya hidup terasa setelah lelah berjuang.”  
(Imam Syafi’i)<sup>\*)</sup>

“Sesungguhnya bersama kesulitan pasti ada kemudahan. Maka apabila engkau  
telah selesai dari suatu urusan, tetaplah bekerja keras untuk urusan yang lain”  
(Asy-Syarh: 6-7)<sup>\*\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup>Ulama Besar pengarang buku Diwan asy-Syafi’i

<sup>\*\*)</sup>Departemen Agama Republik Indonesia. 2008. Al-Qur’an dan Terjemahan.  
Jakarta: CV. Pustaka Al-Kautsar.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Qusnul Khotimah

NIM : 141820401003

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “**Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1***” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini didanai oleh Masterplan Percepatan dan Perkembangan Pembangunan Ekonomi Indonesia (MP3EI) dan PT. Perkebunan Nusantara XI 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, 16 Juni 2017

Yang menyatakan,

Qusnul Khotimah

NIM. 141820401003

**TESIS**

**UJI STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU PRODUK REKAYASA  
GENETIKA OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1* DAN *SoSUT1***

Oleh

**Qusnul Khotimah**  
NIM. 141820401003

**Pembimbing:**

Pembimbing Utama : Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr. Sc  
NIP. 19551022 198212 1 001  
Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP  
NIP. 19650425 199002 2 002

Karya ilmiah Tesis berjudul “**Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1***” telah diuji dan disahkan pada:

Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**Tim Penguji,**

Ketua,

Sekretaris,

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

Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP  
NIP. 19650425 199002 2 002

Anggota

Penguji I,

Penguji II,

Dr.Dra. Rike Oktarianti, M.Si  
NIP. 196310261990022001

Dr. A.A. Istri Ratnadewi, M.Si  
NIP. 197012251997022001

Mengesahkan  
Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D

NIP. 19610204198711101

## RINGKASAN

**Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPS1* Dan *SoSUT1***; Qusnul Khotimah, 141820401003; 2017: 32 halaman; Jurusan Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Sukrosa dan pati merupakan produk akhir asimilasi karbon pada proses fotosintesis yang terjadi di daun. Metabolisme sukrosa pada daun dipengaruhi oleh beberapa enzim, seperti *Sucrose phosphate synthase* (SPS), yaitu enzim kunci yang memiliki peran penting dalam biosintesis sukrosa dalam tanaman tebu (*Saccharum officinarum*). Sukrosa hasil biosintesis selanjutnya ditranslokasikan dari jaringan asal ke jaringan penyimpanan oleh protein *Sucrose transporter* (SUT). Saat ini tanaman tebu transgenik overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* telah tersedia. Namun tanaman tersebut masih memerlukan beberapa pengujian yang lebih lanjut untuk mengetahui kestabilan ekspresi gen yang telah diinsersikan pada tanaman tebu. Tujuan pada penelitian ini adalah untuk mengetahui kestabilan gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* tanaman tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* pada generasi ketiga.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biomolekuler dan Bioteknologi CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) dan Agroteknopark Jubung, Universitas Jember pada bulan Oktober 2015 sampai selesai. Bahan yang digunakan adalah tanaman tebu transgenik overekspresi *single* gen *SoSUT1* (14 tanaman yaitu *event* SU1, SU2, SU3, SU4, SU5, SU6, SU7, SU8, SU9, SU10, SU11, SU12, SU13, SU14 (Mufitdhah, 2015) dan 1 tanaman *event* SU15 (Rafikasari, 2015)), overekspresi *single* gen *SoSPS1* (4 tanaman yaitu *event* SP1, SP2, SP3, dan SP4 (Baskoro, 2012)), overekspresi *double* gen *SoSPS1-SoSUT1* (12 tanaman yaitu *event* D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11 dan D12 (Rafikasari, 2015)), dan tanaman tebu non-transformasi varietas BL sebagai kontrol, N<sub>2</sub> liquid,  $\beta$ -mercapto etanol, *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride* (PMSF), MgCl<sub>2</sub>, NaAc, NaOH, HCL, *Ethylenediaminetetra acetic* (EDTA), *Dithiothreitol* (DTT), *Polyvinyl poly*

*pyrrolidone* (PVP), Resorsinol, Tris-HCL, SDS, H<sub>2</sub>O, Potasium acetat, Isopropanol, Etanol, Chloroform, Buffer TE (Tris-EDTA), *Phenol Chloroform Isoamylalcohol* (PCI), dan bahan lain yang digunakan untuk analisis molekular. Pengamatan meliputi; analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*), analisis aktivitas enzim SPS, analisis kandungan sukrosa untuk mengetahui kandungan sukrosa batang dengan uji *Seliwanoff*.

Uji stabilitas tanaman tebu diawali dengan konfirmasi keberadaan gen *SoSPSI* dan gen *SoSUTI* dengan analisis PCR menggunakan pasangan primer F/R *nptII* dan primer F/R *nptII*. Hasil analisis PCR pada tanaman tebu transgenik overekspresi *single* gen *SoSPSI* generasi ketiga memiliki prosentase kestabilan genetik 100%, tebu transgenik overekspresi *single* gen *SoSUTI* memiliki prosentase kestabilan genetik 73,3% dan pada tanaman tebu transgenik overekspresi *double* gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* memiliki prosentase kestabilan genetik 50%. Analisis aktivitas enzim semua tanaman tebu transgenik overekspresi *single* gen *SoSPSI* dan overekspresi *double* gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* mengalami peningkatan aktivitas SPS dibandingkan tanaman kontrol, sehingga rata-rata kandungan sukrosa batang lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol (*wildtype*). Tanaman tebu transgenik menghasilkan jumlah anakan lebih sedikit atau sama dibandingkan tanaman tebu kontrol.



## PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini yang berjudul “Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekspresi gen SoSPS1 dan SoSUT1”. Penyusunan tesis ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

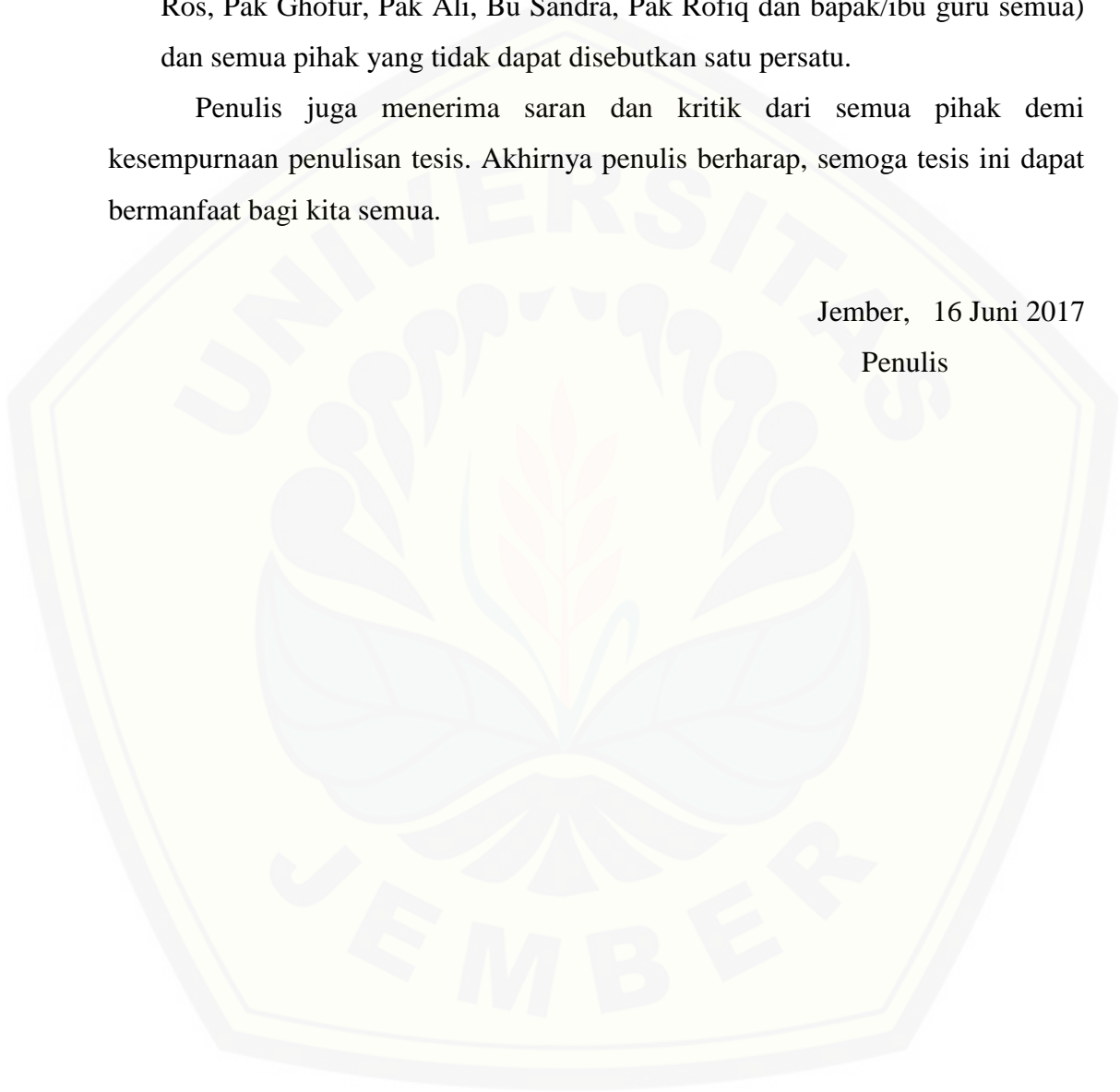
1. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP selaku Dosen Pembimbing Anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, saran dalam penulisan tesis ini;
2. Dr. Dra. Rike Oktarianti, M.Si dan Anak Agung Istri Ratnadewi, M.Si selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan tesis ini;
3. Prof. Sudarmaji selaku Dosen pembimbing akademik yang memberikan bimbingan keakademikan;
4. Keluargaku, Emak Sriyati dan Suamiku Wildan Alifi yang telah memberikan begitu banyak doa dan dorongan dalam penyelesaian tesis ini, juga kepada anakku tercinta Muhammad Zhafran Alifi dan seluruh keluarga besar Cangkring dan Karangrejo, juga nenek saya (Mbok Dut) yang memberiku kasih sayang tak terbatas;
5. Seluruh anggota Cdast yang memberi motivasi, saran dan masukan serta bantuan yang tak ternilai harganya dalam penelitian dan penyelesaian tesis ini;
6. Semua anggota Lantai 2 Cdast 2015 (Evi, Bu In, Intan, Embun, Pika, Aping, Obama, Nyol, Nok, Retna, dan adik-adikku semua), Mbak Mel, Mbak Arin, Mas Aryo yang memberiku motivasi, arahan, masukan, dan panutan dalam hidup, serta banyak memberikan pengetahuan baru yang tak ternilai;
7. Saudara dan sahabatku Program Magister Biologi (Mahbubatur, Bu Inyana, Jhoni, Shela, Esti, Warda, Nana) yang memberikan dorongan, canda dan mewarnai hariku;

8. Saudara dan sahabatku genk geje SMK Kesehatan TPA Jember (Bu Mei, Bu Eka, Bu Jeni, Pak Leksi, Pak Anam dan Pak Imam) yang telah menambah warna hidup selama ini;
9. Guru dan Karyawan SMK Kesehatan TPA Jember (Pak Dandik, Bu Yusi, Bu Ros, Pak Ghofur, Pak Ali, Bu Sandra, Pak Rofiq dan bapak/ibu guru semua) dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima saran dan kritik dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan tesis. Akhirnya penulis berharap, semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Jember, 16 Juni 2017

Penulis



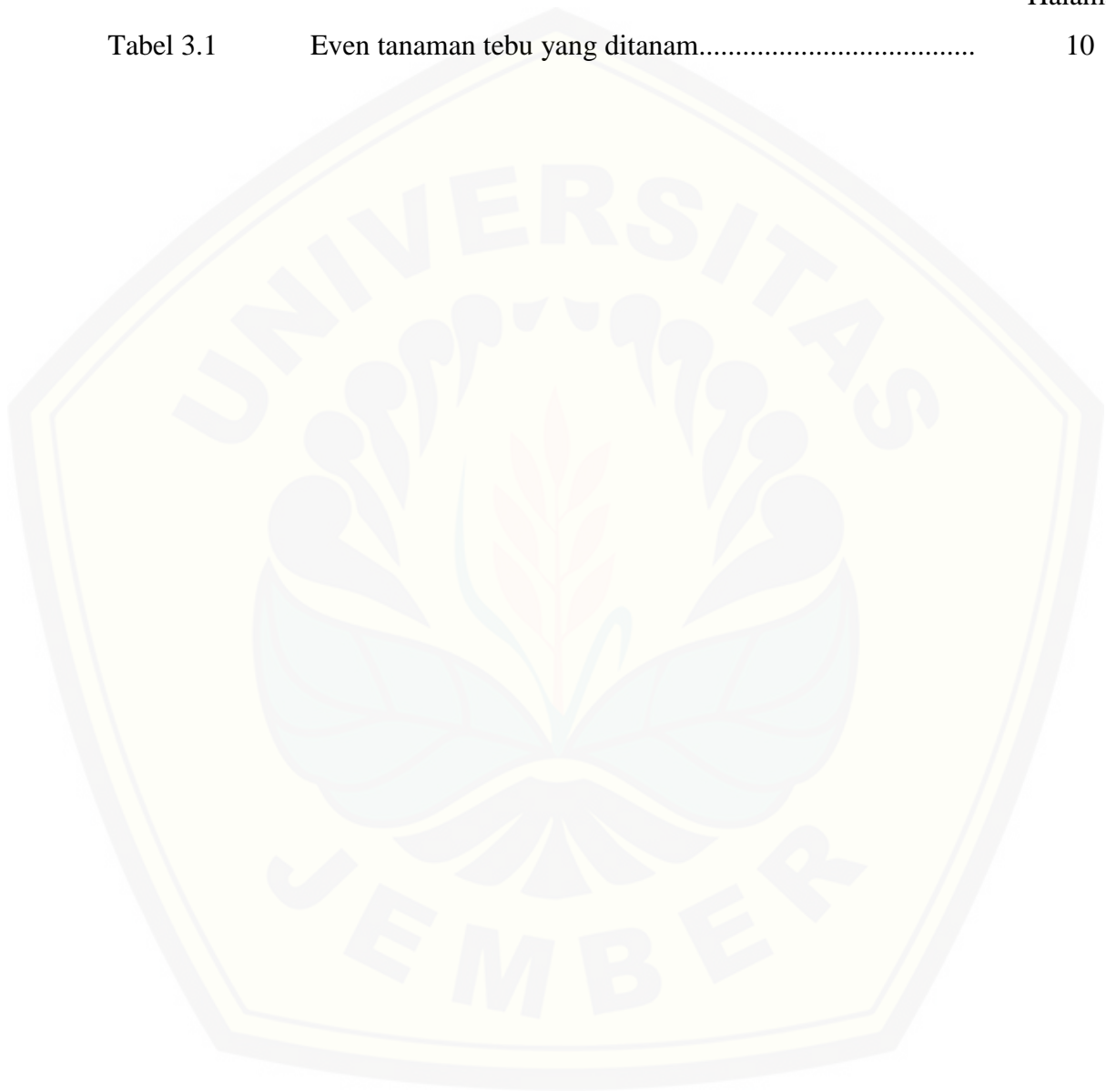
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTTO.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING.....	v
HAMALAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN.....	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1 Peranan Sucrose Phosphate Synthase (SPS) dalam Biosintesis Sukrosa.....	4
2.2 Translokasi Sukrosa dan Sucrose Transporter (SUT).....	5
2.3 Stabilitas Genetik Tanaman Produk Rekayasa Genetika (PRG).....	6
2.4 Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekspresi Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> .....	8
2.5 Polimerase Chain Reaction (PCR).....	8
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>10</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	10

3.2 Alat dan Bahan.....	10
3.3 Prosedur Kerja.....	10
3.3.1 Pelaksanaan.....	11
3.3.1.1 Perkecambahan.....	11
3.3.1.2 Pembibitan .....	12
3.3.1.3 Penanaman.....	12
3.3.1.4 Pemeliharaan.....	12
3.3.2 Analisis Molekuler.....	13
3.3.2.1 Konfirmasi Keberadaan Gen <i>SoSPSI</i> dan Gen <i>SoSUTI</i> pada Tanaman Tebu Transgenik.....	13
3.3.2.1.1 Preparasi/Pengambilan Sampel.....	13
3.3.2.1.2 Isolasi DNA Genom.....	13
3.3.2.1.3 Analisis PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	14
3.3.2.2 Uji Aktivitas Enzim SPS ( <i>Sucrose Phosphate Synthase</i> ).....	14
3.3.2.3 Analisis Kandungan Sukrosa Batang Tanaman Tebu Transgenik .....	15
3.3.2.3.1 Ekstraksi Sukrosa Batang.....	15
3.3.2.3.2 Pengukuran Kandungan Sukrosa.....	15
3.3.3 Jumlah Anakan Tebu Transgenik.....	16
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>17</b>
4.1 Konfirmasi Keberadaan Gen <i>SoSPSI</i> dan Gen <i>SoSUTI</i> ...	17
4.1.1 Konfirmasi Gen Target <i>SoSPSI</i> .....	17
4.1.2 Konfirmasi Gen Target <i>SoSUTI</i> .....	19
4.1.3 Konfirmasi Gen Target Double Gen <i>SoSPSI</i> dan <i>SoSUTI</i> .....	20
4.2 Kandungan Enzim SPS.....	22
4.3 Analisis Kandungan Sukrosa Batang.....	23
4.4 Jumlah Anakan.....	26
<b>BAB 5. PENUTUP.....</b>	<b>28</b>
5.1 Kesimpulan.....	28
5.2 Saran.....	28
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>29</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>33</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 3.1      Even tanaman tebu yang ditanam.....	10



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 4.1 Hasil elektroforesis pada tanaman taransgenik <i>SoSPS1</i> (single gen <i>SoSPS1</i> ) m: Marker; wt: tanaman control non-tranformasi ( <i>wild type</i> ).....	17
Gambar 4.2 Hasil Elektroforesis pada tanaman transgenik <i>SoSUT1</i> (single gen <i>SoSUT1</i> ) m: marker; wt: tanaman kontrol non-tranformasi ( <i>wild type</i> ).....	18
Gambar 4.3 Hasil elektroforesis pada tanaman taransgenik <i>SoSPS1</i> (double gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> ); m: marker; wt : tanaman kontrol non-tranformasi ( <i>wild type</i> ).....	19
Gambar 4.4 Hasil elektroforesis pada tanaman taransgenik <i>SoSUT1</i> (double gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> ); m : marker ; wt : tanaman kontrol non-tranformasi ( <i>wild type</i> ).....	20
Gambar 4.5 Aktivitas enzim SPS pada tanaman tebu transgenik overekspresi single gen <i>SoSPS1</i> , overekspresi double gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> , dan tanaman kontrol non-tranformasi ( <i>wild type</i> ).....	21
Gambar 4.6 Kandungan sukrosa batang tanaman tebu transgenik single dan double overekspresi gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> dan tanaman kontrol non-tranformasi ( <i>wild type</i> ).....	23
Gambar 4.7 Kandungan sukrosa batang tebu transgenik overekspresi single dan double gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> dan tanaman kontrol non-tranformasi ( <i>wild type</i> ).....	23
Gambar 4.8 Jumlah Anakan Tebu Transgenik overekspresi single dan double gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> dan tanaman kontrol non-tranformasi ( <i>wild type</i> ) usia 6 bulan sejak tanam.....	26

**DAFTAR SINGKATAN**

bp	: Basepair
DDT	: <i>Dithiothreitol</i>
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Fructose-6-P	: fructose-6-phosphate
G-6-P	: Glucose-6-Phosphate
H <sub>2</sub> O	: Air
Keprasan	: Cara menebang tebu dengan masih menyisakan tonggak tebu untuk bibit tanaman tebu selanjutnya
N <sub>2</sub> liquid	: Nitrogen Cair
<i>nptII</i>	: <i>neomycin phosphotransferaseII</i>
MOPS	: 3 (N-Morpolino) Propanol
PCI	: <i>Phenol Chloroform Isoamylalcohol</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Pi	: <i>Phosphate Inorganic</i>
PMSF	: <i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
PRG	: Produk Rekayasa Genetika
PVP	: <i>Polyvinyl poly pyrrolidone</i>
SE/CC	: <i>Sieve element/companion cell</i>
Sistem Reynoso	: Nama suatu sistem pembukaan tanah untuk tanaman tebu, sistem ini mulai diterapkan di pulau Jawa sejak tahun 1863 dan sistem ini ditemukan oleh Ronaldo Reynoso dari Kuba.
Suc-6-P	: <i>Sucrose-6-phosphate</i>
SPP	: <i>Sucrose phosphate phosphatase</i>
SPS	: <i>Sucrose phosphate synthase</i>
<i>SoSPS1</i>	: <i>Saccharum officinarum Sucrose phosphate synthase 1</i>
SUT	: <i>Sucrose Transport</i>

<i>SoSUT1</i>	: <i>Saccharum officinarum Sucrose Transport</i>
TE	: <i>tris-EDTA</i>
triosa-P	: Triosa phosphate
Tris	: (hydroxymethyl) aminomethane
UDP-Glucose	: <i>uridine diphosphate glucose</i>





DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Kurva Standart Sukrosa .....	33
B1. Konfirmasi PCR menggunakan pasangan priner <i>hptII</i> pada tanaman tebu hasil transformasi gen <i>SoSUT1</i> .....	33
B2. Konfirmasi PCR menggunakanpasangan primer <i>nptII</i> pada tanaman tebu transgenik <i>double overekspresi SoSPS1-SoSUT1</i> Generasi Kedua.....	34
B3. Konfirmasi PCR menggunakan pasangan priner <i>nptII</i> pada tanaman tebu hasil transformasi gen <i>SoSPS1</i> .....	35
C.1 Kandungan Sukrosa Batang Tanaman Tebu Transgenik <i>Single</i> gen <i>SoSUT1</i> .....	36
C.2 Kandungan Sukrosa Batang Tanaman Tebu Transgenik <i>double</i> gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> .....	36

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tanaman tebu tergolong tanaman perdu dengan nama latin *Saccharum officinarum*. Di daerah Jawa Barat disebut Tiwu, di daerah Jawa Tengah dan Jawa Timur disebut Tebu atau Rosan (Indrawanto, 2010). Tebu merupakan salah satu tanaman C4 yang dapat mengakumulasi sukrosa pada batangnya. Batang tanaman tebu dapat mengakumulasikan sukrosa 12-16% dari berat basah dan 50% dari berat kering merupakan sukrosa (Casu *et al* dalam Rafikasari., 2015).

Sukrosa dan pati merupakan produk akhir asimilasi karbon pada proses fotosintesis yang terjadi di daun. Metabolisme sukrosa pada daun dipengaruhi oleh beberapa enzim, seperti *sucrose phosphate synthase* (SPS), yaitu enzim kunci yang memiliki peran penting dalam biosintesis sukrosa dalam tanaman tebu (Huber dan Huber, 1996). Enzim SPS mengkatalisis reaksi pada pembentukan *sucrose-6-phosphate* dari *uridine diphosphate glucose* dan *fructose-6-phosphate* menjadi sukrosa (Anderson *et al.*, 1991). Selain enzim SPS, akumulasi sukrosa pada tanaman hasil biosintesis tersebut selanjutnya ditranslokasikan dari jaringan asal (*source tissue*) ke jaringan penyimpanan (*sink tissue*) oleh protein *Sucrose transporter* (SUT). Aktivitas transport sukrosa merupakan hal penting untuk memindahkan sukrosa dari organ fotosintesis (*source*) ke organ non fotosintesis (*sink*) (Campbell *et al.*, 2000).

Saat ini tanaman tebu transgenik overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* telah tersedia. Gen *SoSUT1* merupakan gen penyandi protein SUT1 yang berfungsi sebagai protein translokator sukrosa dari jaringan asal (*source*) menuju jaringan penyimpanan (*sink*) (Aoki *et al.*, 2003). Overekspresi gen *SoSUT1* tebu bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu yang memiliki daya transport sukrosa tinggi sehingga akumulasi sukrosa di batang meningkat. Gen *SoSPS1* pada tanaman tebu juga telah berhasil diisolasi (Sugiharto *et al*, 1997) dan overekspresi gen ini dapat meningkatkan aktivitas SPS dan kandungan sukrosa pada daun tanaman transgenik tembakau dan tebu

(Sugiharto *et al.*, 2003; Miswar *et al.*, 2005). Secara umum overekspresi gen *SoSPS1* mampu meningkatkan biosintesis sukrosa dan rasio antara kandungan pati daun.

Tanaman tebu transgenik overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*. Pada saat ini telah dilakukan beberapa pengujian namun masih perlu dilakukan beberapa pengujian lebih lanjut untuk mengetahui kesetabilan ekspresi gen yang telah diinsersikan pada tanaman tebu. Salah satu kendala dalam perakitan tanaman PRG adalah gen target tidak terintegrasi dengan stabil ke dalam kromosom tanaman inang sehingga gen tersebut tidak diwariskan ke generasi berikutnya (Christou *et al.*, 1992).

## 1.2 Rumusan Masalah

Penelitian sebelumnya telah didapatkan tanaman tebu PRG generasi kedua overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* yang telah dikonfirmasi keberadaan gen *SoSPS1-SoSUT1* melalui analisis PCR. Namun tanaman hasil transformasi tersebut seringkali tidak stabil (diwariskan) pada generasi ketiga. Oleh karena itu perlu dilakukan karakterisasi tanaman tebu overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi ketiga untuk mengetahui stabilitas genetiknya.

## 1.3 Batasan Masalah

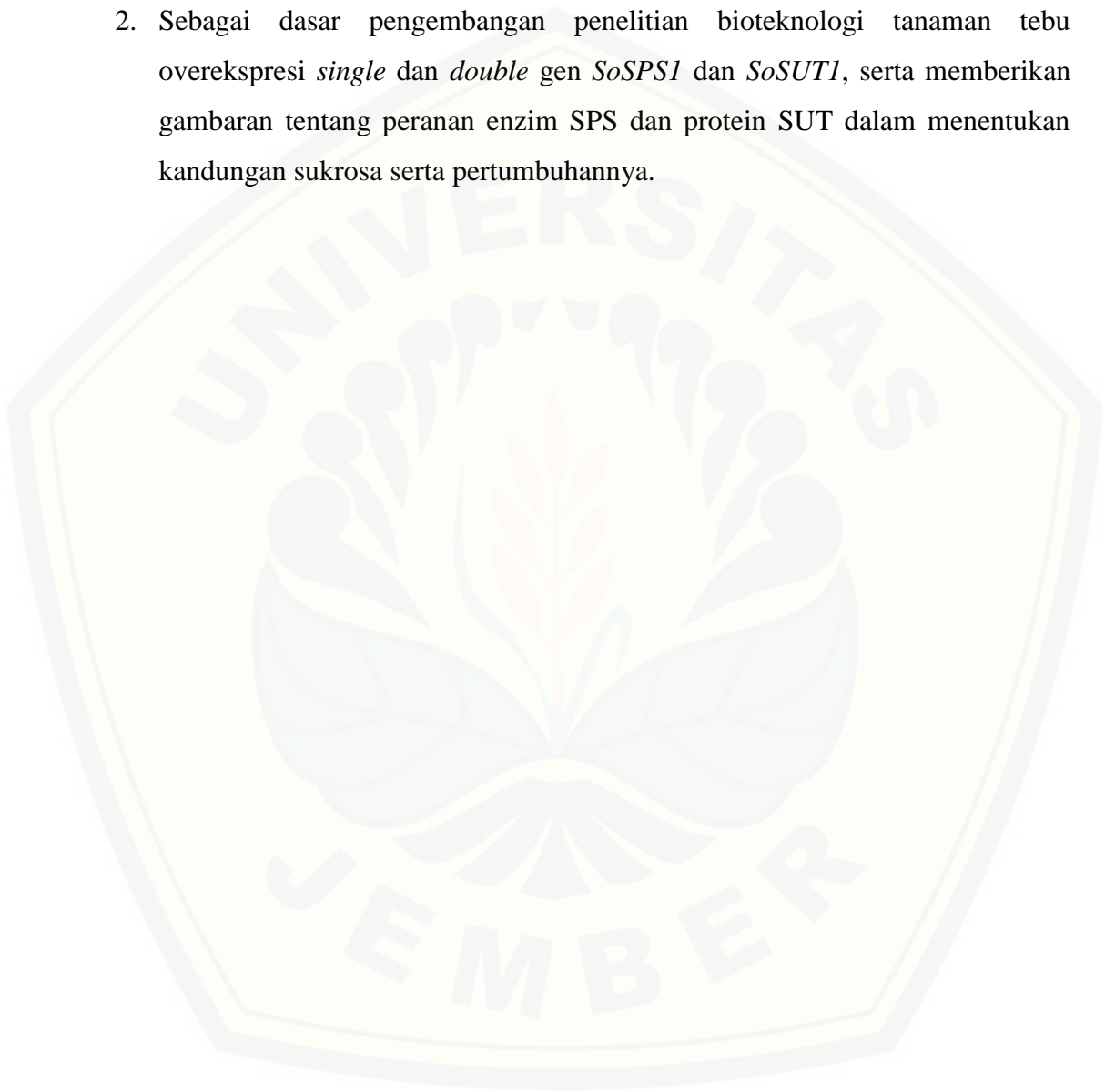
Uji stabilitas genetik tanaman yang dilakukan meliputi uji keberadaan overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* dengan analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*), analisis aktivitas enzim SPS, analisis kandungan sukrosa untuk mengetahui kandungan sukrosa batang dengan uji *Seliwanoff*.

## 1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kestabilan genetik gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* tanaman tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* pada generasi ketiga.

### 1.5 Manfaat Penelitian

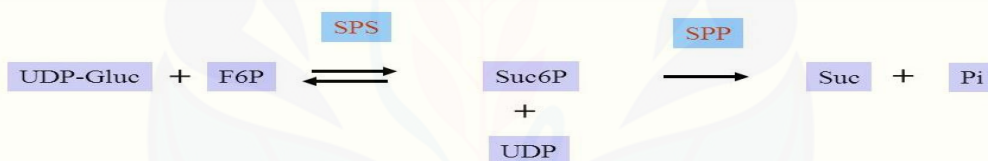
1. Memberikan informasi tentang stabilitas genetik tanaman tebu overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi ketiga tentang keberadaan gen, kandungan sukrosa, serta potensi pertumbuhan.
2. Sebagai dasar pengembangan penelitian bioteknologi tanaman tebu overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*, serta memberikan gambaran tentang peranan enzim SPS dan protein SUT dalam menentukan kandungan sukrosa serta pertumbuhannya.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Peranan Sucrose Phosphate Synthase (SPS) dalam Biosintesis Sukrosa

*Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) merupakan enzim yang mempunyai peranan penting dan enzim kunci dalam proses biosintesis sukrosa pada tanaman (Huber and Huber, 1996). Enzim SPS mengkatalisis reaksi antara *uridine diphosphate glucose* (UDP-glucose) dan *fructose-6-phosphate* (fructose-6-p) yang menghasilkan *sucrose-6-phosphate* (sucrose-6-p). Selanjutnya *phosphate* pada *sucrose-6-phosphate* dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) sehingga dihasilkan sukrosa dan *phosphate anorganik* (Pi). Phosphate anorganik yang dilepaskan kemudian digunakan untuk proses pertukaran dengan triosa-phosphate (triosa-P) (Anderson *et al.*, 1991). Reaksi sistesis sukrosa yang dikatalisis oleh enzim SPS adalah sebagai berikut:



Gambar 2.1 Jalur biosintesis sukrosa tanaman yang dikatalisis oleh enzim SPS (Anderson *et al.*, 1991)

Sebagian besar tanaman mempunyai lebih dari satu gen yang mengkode SPS, seperti pada tanaman tebu terdapat 2 gen yang mengkode SPS yaitu *SoSPS1* dan *SoSPS2* (Sugiharto *et al.*, 1997). Berdasarkan analisis *northern blot*, gen *SoSPS1* lebih dominan diekspresikan pada jaringan fotosintetik (daun) sedangkan *SoSPS2* diekspresikan di akar. Pada tingkatan transkripsi, ekspresi gen *SoSPS1* dipengaruhi oleh cahaya dan mencapai maksimum setelah pemberian cahaya selama 24 jam. Hal tersebut berlawanan dengan gen *SoSPS2* yang ekspresinya pada tingkat transkripsi tidak dipengaruhi oleh cahaya (Sugiharto *et al.*, 1997).

Enzim SPS merupakan enzim yang berperan penting dalam biosintesis sukrosa dan sudah berhasil diinsersikan pada tanaman PRG dengan tujuan meningkatkan aktifitas SPS dan kandungan sukrosanya. Sukrosa berperan penting bagi tanaman yaitu sebagai sumber karbon dan sumber energi untuk pertumbuhan

(Laporte *et al.*, 1997). SPS telah terbukti menjadi enzim utama yang menentukan keberlangsungan proses biosintesa sukrosa pada berbagai jenis tanaman juga termasuk tanaman tebu (Sugiharto *et al.*, 1997; Grof *et al.*, 2007).

## 2.2 Translokasi Sukrosa dan Sucrose Transporter (SUT)

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 dalam Mufidhah, 2014). Sukrosa merupakan bagian terbesar dari produk akhir fotosintesis (Barker *et al.*, 2000). Sukrosa didalam tanaman ditranslokasikan dari daun (*source*) ke organ penyimpanan (*sink*) (Campbell *et al.*, 2000). Proses transportasi sukrosa dari *source* ke *sink* difasilitasi oleh protein transport yang dikenal dengan *Sucrose transporter* (Barker *et al.*, 2000). *Sucrose transporter* (SUT) adalah protein yang berfungsi sebagai translokator sukrosa dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpan. Protein SUT sebagai perantara dalam transportasi sukrosa, keberadaannya diregulasi oleh gen *SoSUT1*. Pada tanaman tebu, sukrosa disimpan/diakumulasikan pada batang (Lingle, 1997).

Sebagian besar tanaman, translokasi hasil fotosintesis dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpan terjadi secara simplas dan apoplas. Secara simplas yaitu translokasi sukrosa terjadi dari sel melalui plasmodesmata yang terdapat pada jaringan meristem dan organ tanaman yang masih muda. Sedangkan secara apoplas sukrosa ditranslokasikan melewati ruang interseluler. Proses ini terjadi dalam SE/CC (*sieve element/companion cell*). Translokasi sukrosa oleh protein SUT merupakan bentuk pengangkutan aktif, yang merupakan pengangkutan zat melawan gradien konsentrasi (Campbell *et al.*, 2000) serta menggunakan mekanisme sukrosa-H<sup>+</sup> simporter (*sucrose proton symport*).

*Sucrose transporter* (SUT) terletak pada membran plastida, membran vacuola, dan membran plasma. Protein SUT berperan penting dalam translokasi

sukrosa secara aktif pada sel tanaman. Sukrosa akan memasuki sel pengiring (*companion cell*) dan *sieve elemen* melalui *sucrose transporter*. Sukrosa yang berada di dalam jaringan *source* dan sel pengiring (*companion cell*), akan memasuki *sieve element* floem melalui plasmodesmata yang akan bergerak menuju jaringan penyimpan (*sink*) melalui aliran massa (Khun dan Cristopher, 2010).

### 2.3 Stabilitas Genetik Tanaman Produk Rekayasa Genetika (PRG)

Stabilitas genetik tanaman PRG dapat dikatakan stabil jika gen yang diinsersikan pada tanaman transgen juga ditemukan kembali pada tanaman generasi berikutnya. Tanaman transgenik yang mampu melakukan persilangan sendiri dapat mencapai kestabilan genetik hingga turunan ke-4 sedangkan tanaman transgenik yang membutuhkan peranan dalam penyerbukan akan mencapai kestabilan hingga ke-8 (Sutini dalam Fragaria, 2015). Tanaman tebu termasuk dalam tanaman yang memiliki proses pembungaan yang lama, untuk menghasilkan bunga memerlukan waktu  $\pm 1$  tahun selain itu, *pollen* tebu hanya mampu bertahan beberapa menit sehingga peluang terjadinya penyerbukan sangat kecil (Lahay dalam Fragaria, 2015). Oleh karena itu perbanyakkan tebu yang dilakukan secara vegetatif dapat menghasilkan tanaman baru yang memiliki sifat seperti tanaman induk.

Kestabilan insersi transgen dalam tanaman PRG dapat diketahui dengan melakukan uji stabilitas gen (Christou *et al.*, 2012). Sehingga karakterisasi tanaman overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* dalam hal ini uji stabilitas gen dengan analisa PCR, untuk memastikan tanaman tersebut merupakan tanaman PRG yang membawa gen yang diinginkan. Teknik PCR dilakukan agar dapat mengamplifikasi fragmen transgen menggunakan primer spesifik sehingga tanaman yang memiliki insersi transgen dapat terdeteksi.

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

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

Penelitian Baskoro (2012) menyatakan hasil PCR tanaman tebu overekspresi single gen *SoSPS1* menunjukkan bahwa 6 tanaman putatif transforman yaitu K1.1, K1.2, K2 dan K3, K6.1, K6.2 (Lampiran B3) dikatakan sebagai tanaman tebu transforman gen *SoSPS1*, terdeteksinya pita DNA dengan ukuran  $\pm 550$  bp pada gel agarose yang merupakan gen *nptII*. Mufitdhah (2015) menyatakan bahwa tebu overekspresi single gen *SoSUT1* menunjukkan bahwa hampir semua tanaman tebu PRG (lebih dari 92%) stabil terinsersi gen target *SoSUT1* dengan ukuran pita DNA  $\pm 490$  bp pada gel agarose yang merupakan gen *hptII* setelah dianalisis dengan PCR.

Rafikasari (2015) juga melaporkan bahwa berdasarkan hasil analisis PCR tanaman tebu overekspresi double gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* dengan jumlah sampel yang diamati 2 ulangan (27 sampel dengan 24 sampel tanaman *double overekspresi SoSPS1- SoSUT1*, 2 tanaman single *SoSUT1*, dan 1 tanaman *wildtype*), menunjukkan hasil analisis PCR menggunakan primer *nptII-F/R* pada tanaman tebu transgenik tersebut terdapat 23 dari 24 tanaman positif transgenik *SoSPS1* ditunjukkan dengan terbentuknya pita fragmen DNA dengan ukuran  $\pm 550$  bp. Hasil konfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* dengan analisis PCR menggunakan primer *hptII-F/R* pada 26 sampel genom tanaman menunjukkan bahwa semua sampel genom tanaman dan kontrol positif menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran  $\pm 490$  bp.

## **2.4 Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1***

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



Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* merupakan hasil dari penyisipan gen *SoSUT1* dan *SoSPS1* pada tanaman tebu dengan tujuan agar proses biosintesis dan translokasi sukrosa meningkat pada tanaman (Sugiharto dan Safitri, 2011). Keberhasilan transformasi genetik ditentukan oleh terintegrasinya gen target ke dalam genom tanaman. Terintegrasinya gen target ke dalam genom tanaman dapat dilakukan dengan analisis PCR menggunakan DNA genom sebagai *template*. Pada penelitian sebelumnya hasil transformasi menunjukkan keberadaan fragmen DNA *hptII* sebesar 490bp pada tanaman yang mengandung gen overekspresi gen *SoSPS1* dan fragmen DNA *nptII* sebesar 550bp overekspresi gen *SoSUT1*.

Hasil analisis PCR menunjukkan terintegrasinya gen target ke dalam genom tebu transforman sehingga dapat dikatakan sebagai tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* dan *SoSPS1*. Berdasarkan hal tersebut maka telah didapatkan *event* tanaman tebu PRG yang telah diuji keberhasilan insersi gen targetnya sebagai berikut yaitu overekspresi *single* gen *SoSUT1 event* SUT2; 2.4; 3.2; TB16; 1.4; 3.5, 1.7; 2.2; 1.1; 2.1; TB17; TB8; T2; T.20 (Mufitdhah, 2015), *event* TB20 (Rafikasari, 2015), overekspresi *single* gen *SoSPS1 event* SPS1; SPS2; SPS3; SPS4 (Baskoro, 2012), serta overekspresi *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1 event* 212bc; 33ab; 31a; 31c; 3.4; 212ba; 32b; 32a, 212bd, 26bc; 31b; 32c (Rafikasari, 2015).

## 2.5 Polimerase Chain Reaction (PCR)

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah suatu teknik sintesis enzimatik dan amplifikasi DNA secara *in vitro*. Teknik PCR dapat meningkatkan jumlah urutan DNA sebanyak ribuan bahkan jutaan kali jumlah semula hanya dalam beberapa jam. Komponen-komponen yang diperlukan pada proses PCR adalah templat DNA; sepasang primer, yaitu suatu oligonukleotida pendek yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat; dNTPs (Deoxynucleotide triphosphates); buffer PCR; magnesium klorida (MgCl<sub>2</sub>) dan enzim polimerase DNA.

Proses PCR merupakan proses siklus yang berulang melibatkan beberapa tahap yaitu: pra-denaturasi DNA templat; denaturasi DNA templat; penempelan

primer pada templat (*annealing*); pemanjangan primer (*extension*) dan pemantapan (*postextension*).

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (*unamplified DNA*) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (*extend primers*) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 –40 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier. (Handoyo dan Rudiretna, 2000)

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biomolekuler dan Bioteknologi CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) dan Agroteknopark Jubung, Universitas Jember pada bulan Oktober 2015 sampai April 2017.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Alat yang digunakan adalah alat standart untuk elektroforesis, analisis PCR, aktivitas enzim dan kandungan sukrosa batang.

#### 3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah tanaman tebu transgenik overekspresi *single* gen *SoSUT1* (14 tanaman yaitu *event* SU1, SU2, SU3, SU4, SU5, SU6, SU7, SU8, SU9, SU10, SU11, SU12, SU13, SU14 (Mufitdhah, 2015) dan 1 tanaman *event* SU15 (Rafikasari, 2015)), overekspresi *single* gen *SoSPS1* (4 tanaman yaitu *event* SP1, SP2, SP3, dan SP4 (Baskoro, 2012)), overekspresi *double* gen *SoSPS1-SoSUT1* (12 tanaman yaitu *event* D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9, D10, D11 dan D12 (Rafikasari, 2015)), dan tanaman tebu non-transformasi varietas BL sebagai kontrol, N<sub>2</sub> liquid, *β-mercapto etanol*, *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride* (PMSF), MgCl<sub>2</sub>, NaAc, NaOH, HCL, *Ethylenediaminetetra acetic* (EDTA), *Dithiothreitol* (DTT), *Polyvinyl poly pyrrolidone* (PVP), Resorsinol, Tris-HCL, SDS, H<sub>2</sub>O, Potasium acetat, Isopropanol, Etanol, Chloroform, Buffer TE (Tris-EDTA), *Phenol Chloroform Isoamylalcohol* (PCI), dan bahan lain yang digunakan untuk analisis molekular.

### 3.3 Prosedur Kerja

Tanaman tebu yang digunakan adalah tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* (15 event), overekspresi gen *SoSPS1* (4 event),

overekspresi gen *SoSPS1-SoSUT1* (12 event), dan tanaman tebu non-transformasi varietas BL sebagai kontrol. Secara rinci dapat dilihat pada tabel 3.1, masing-masing even ditanam sebanyak 18 tanaman dan diulang 2 kali.

Tabel 3.1 Event tanaman tebu yang ditanam

No	Even	Notasi	Notasi baru
1	Double Over Ekspresi gen <i>SoSPS1-SoSUT1</i>	212bc	D 1
2		33ab	D 2
3		31a	D 3
4		31c	D 4
5		34	D 5
6		212ba	D 6
7		32b	D 7
8		32a	D 8
9		212bd	D 9
10		26bc	D 10
11		31b	D 11
12		32c	D 12
13	Over Ekspresi gen <i>SoSUT1</i>	Sut2	SU 1
14		2.4	SU 2
15		3.2	SU 3
16		TB 16	SU 4
17		1.4	SU 5
18		3.5	SU 6
19		1.7	SU 7
20		2.2	SU 8
21		1.1	SU 9
22		2.1	SU 10
23		TB 17	SU 11
24		TB 8	SU 12
25		T2	SU 13
26		T.20	SU 14
27		TB 20	SU 15
28	Over Ekspresi gen <i>SoSPS1</i>	SPS I	SP 1
29		SPS II	SP 2
30		SPS III	SP 3
31		SPS IV	SP 4
32	Tebu non-transformasi	Wild tipe	WT

### 3.3.1 Pelaksanaan

#### 3.3.1.1 Perkecambahan

Perkecambahan bibit tanaman tebu transgenik overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1-SoSUT1* dikecambahkan di Agroteknopark Jubung,

Universitas Jember. Tanaman tebu dikecambahkan dengan memotong ruas batang kemudian direndam dengan air hangat dan atonik dengan konsentrasi 1ml/ 20L selama 24 jam. Ruas tebu kemudian ditanam dalam tanah dengan tunas menghadap keatas.

### 3.3.1.2 Pembibitan

Bibit tanaman tebu transgenik overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1-SoSUT1* yang digunakan adalah bibit tebu yang sudah berusia 1 bulan dari perkecambahan yang telah dilakukan. Ruas batang yang digunakan sebagai bibit diambil dari tebu yang berumur 12 bulan dengan mengambil 2 sampai 3 tunas muda dengan panjang 20 cm.

### 3.3.1.3 Penanaman

Pertama-tama diratakan lahan dan digemburkan dengan bajak, kemudian tanah dibuat got-got (got keliling, got lurus, got malang, jolangan/juringan) sistem pengolahan lahan ini dinamakan sistem Reynoso. Tanaman tebu yang sudah berumur 1 bulan dipindahkan ke dalam juringan yang telah disiapkan. Selanjutnya potong sedikit daun tebu bagian atas, tanam pada juringan di bagian pinggir sedalam  $\pm 5-10$  cm dengan jarak tanam antar bibit 40-50 cm.

### 3.3.1.4 Pemeliharaan

Pemeliharaan tanaman dengan secara umum mencakup segala kegiatan yang berkaitan dengan upaya menjaga kelangsungan hidup tanaman agar tetap hidup sehat dan memiliki produktivitas tinggi.

- Pemupukan dilakukan 2 kali pada usia tebu 3 dan 5 bulan menggunakan pupuk Urea dan NPK masing-masing  $\pm 9$  gram.
- Pengairan dilakukan secara berkala (setiap 1 minggu sekali) apabila air mulai mengering.
- Penggulutan dan pengendalian gulma dilakukan untuk membersihkan lahan dari segala macam jenis gulma.

### 3.3.2 Analisis Molekuler

#### 3.3.2.1 Konfirmasi Keberadaan Gen *SoSPSI* dan Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu Transgenik

##### 3.3.2.3.1 Preparasi/Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel daun dan batang dilakukan pada 32 *event* yang terdiri dari tanaman tebu hasil transformasi double gen *SoSPSI-SoSUT1*, single gen *SoSUT1*, single gen *SoSPSI* serta tanaman kontrol non-transformasi. Pengambilan sampel daun untuk analisis DNA genom dilakukan pada daun pucuk yang masih menggulung pada umur 3 bulan. Sampel disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### 3.3.2.3.2 Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom dilakukan seperti metode yang disebutkan oleh Zheng (1995) dengan menggerus 0,3 gram daun tebu dalam nitrogen cair, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam *microtube* 2ml dan ditambah 0,6 ml buffer ekstraksi (100mM Tris, 50mM EDTA, 500mM NaCl, dengan pH keseluruhan 8,0), 1,25 $\mu\text{l}$   $\beta$ -*mercapto ethanol* dan 30 $\mu\text{l}$  SDS 20% lalu divortex hingga homogen dan diinkubasi pada suhu  $65^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Setelah itu ditambah 300 $\mu\text{l}$  potasium asetat (5M) sambil dicampur dengan cara dibolak-balik secara perlahan kemudian diinkubasi dalam es selama 10 menit dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan yang didapatkan dipindah kedalam *microtube* baru dan ditambah 375 $\mu\text{l}$  isopropanol sambil dicampur dengan cara dibolak-balik secara perlahan kemudian di inkubasi selama 1 jam pada  $-20^{\circ}\text{C}$ , lalu disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  untuk mengendapkan DNA. DNA yang mengendap (pelet) dicuci dengan buffer TE (Tris EDTA) sebanyak 300 $\mu\text{l}$ .

Purifikasi DNA dilakukan dengan menambahkan 9 $\mu\text{l}$  RNA-*se*, diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam dan dilanjutkan dengan menambahkan 500 $\mu\text{l}$  PCI serta dihomogenkan dengan vorteks. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan (lapisan atas) dipindah ke *microtube* baru, dan ditambah dengan kloroform (1 supernatan : 1 kloroform) kemudian divorteks, dan sentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan (lapisan atas) dipindah ke *microtube* baru, kemudian ditambah isopropanol sebanyak 0,8 kali supernatan dan NaAc sebanyak 0,2 kali supernatan,

dibolak-balik secara perlahan. Diinkubasi pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam, disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Pelet di cuci dengan Ethanol 70% sebanyak 0,6 ml, disentrifugasi lagi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan dengan *vacum dry* selama 5 menit kemudian ditambah 30  $\mu\text{l}$  buffer TE (Tris-EDTA). DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya menggunakan Nano Vue Plus Spektrofotometer dan dianalisis menggunakan PCR.

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

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan Kit dari KAPPABIOSYSTEMS. Sebanyak 5 $\mu\text{l}$  KAPPA Mastermix Solution dicampur dengan 0,5 $\mu\text{l}$  primer forward, 0,5 $\mu\text{l}$  primer reverse, 2 $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O dan 1 $\mu\text{l}$  DNA sampel kemudian dimasukkan dalam tube PCR. Primer yang digunakan untuk konfirmasi gen *SoSPS1* adalah primer *nptII* (*the neomycin phosphotransferaseII gene*)-F (5'-GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGC C-3'), primer *nptII*-R (5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCG-3') dengan ukuran  $\pm 550\text{bp}$  sedangkan untuk mengetahui konfirmasi gen *SoSUT1* adalah primer *hptII* (*the higromycin phosphotransferase II gene*)-F (5'-TCC TGC AAG CTC CGG ATG CCT C-3'), primer *hptII*-R (5'-CGT GCA CAG GGT GTC ACG TTG C-3') dengan ukuran  $\pm 490\text{bp}$ . DNA yang teramplifikasi kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada 1% gel Agarose. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1kb Ladder (iNtRON BIOTECHNOLOGY) sebanyak 3 $\mu\text{l}$  untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Selanjutnya hasil elektroforesis divisualisasi dengan gel *image system* dari *Major Sciences*.

### 3.3.2.4 Uji Aktivitas Enzim SPS (*Sucrose Phosphate Synthase*)

Aktivitas enzim SPS diuji dengan menggunakan metode seperti yang telah dilakukan oleh Sugiharto (1996). Untuk uji aktivitas enzim, supernatan hasil sentrifugasi pada tahap ekstraksi protein terlarut dilewatkan dalam kolom kromatografi Sephadex-25. Supernatan yang telah melewati kolom kromatografi sephadex G-25 kemudian ditampung dalam microtube untuk dilakukan uji aktivitas enzim SPS. Sebanyak 50 $\mu\text{l}$  sampel hasil elusi kolom kromatografi sephadex G-25 ditambahkan 40 $\mu\text{l}$  buffer (50 mM MOP-NaOH (pH 7,5), 15 mM

MgCl<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub>O), 10µl 70 mM *fructose-6-phosphate* dan 10µl 70 mM *uridine diphosphate glucose* sebagai substrat serta 10µl 70 mM *glucose 6-phosphate* sebagai aktivator. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 70µl NaOH 0,5N dan divorteks kemudian dipanaskan dalam air selama 10 menit pada suhu 100°C. Setelah dingin ditambahkan 250µl *resorcinol* 0,1 % dalam 95% alkohol dan 750µl HCl 30% lalu dipanaskan pada suhu 80°C selama 8 menit. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm.

Pembuatan standart dilakukan dengan mengukur absorbansi sukrosa yang telah diperlakukan seperti sampel pada konsentrasi 0, 10, 30, 50, 70 dan 100 µg/µl lalu dibuat persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi sukrosa dan absorbansinya. Aktivitas enzim diperoleh dengan mengkonversikan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan regresi linier dari kurva standart sukrosa yang telah dibuat. Aktivitas enzim SPS dinyatakan dalam satuan besarnya sukrosa (µg) yang terbentuk per jumlah protein terlarut (µg) per menit pada suhu 30°C.

### **3.3.2.5 Analisis Kandungan Sukrosa Batang Tanaman Tebu Transgenik**

#### **3.3.2.5.1 Ekstraksi Sukrosa Batang**

Ekstraksi sukrosa batang dilakukan dengan menggerus 2 gram batang tebu. Nira tebu dipindah dan dimasukkan kedalam *microtube*, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu 4°C setelah itu pelet (kotoran) dibuang. Supernatan (nira) kemudian digunakan untuk analisis kandungan sukrosa batang.

#### **3.3.2.3.1 Pengukuran Kandungan Sukrosa**

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



Pembuatan standart dilakukan dengan mengukur absorbansi sukrosa yang telah diperlakukan seperti sampel pada konsentrasi 0, 10, 30, 50, 70 dan 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  lalu dibuat regresi linear hubungan antara konsentrasi sukrosa dan absorbansinya. Kandungan sukrosa diperoleh dengan mengkonversikan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan regresi linier dari standart sukrosa yang telah dibuat.(Lampiran A)

### **3.3.3 Jumlah Anakan Tebu Transgenik**

Menghitung jumlah anakan dilakukan pada saat tanaman mulai berumur 6 bulan. Perhitungan pada umur ini tanaman tebu sudah stabil pertumbuhan tunasnya. Pada fase ini biomassa tebu bertambah secara eksponensial dengan daun bertambah banyak, batang membesar diameternya, dan terutama batang bertambah panjang dengan menumbuhkan ruas-ruasnya. tunasnya (Hidayat dalam Rafikasari, 2015).

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Hasil analisis PCR pada tanaman tebu transgenik overekspresi *single* gen *SoSPS1* generasi ketiga memiliki prosentase kestabilan genetik 100%, tebu transgenik overekspresi *single* gen *SoSUT1* memiliki prosentase kestabilan genetik 73,3% dan pada tanaman tebu transgenik overekspresi *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* memiliki prosentase kestabilan genetik 50%. Analisis aktivitas enzim semua tanaman tebu transgenik overekspresi *single* gen *SoSPS1* dan overekspresi *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* mengalami peningkatan aktivitas SPS dibandingkan tanaman kontrol, sehingga rata-rata kandungan sukrosa batang lebih tinggi dibandingkan tanaman kontrol (*wildtype*). Tanaman tebu transgenik menghasilkan jumlah anakan lebih sedikit atau sama dibandingkan tanaman tebu kontrol.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan analisis ekspresi gen pada tanaman tebu hasil transformasi *single* dan *double* overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi berikutnya, untuk melihat stabilitas gen yang telah diinsersikan dan dilakukan uji keamanan pangan pada tebu transgenik yang sudah ada.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anderson, J. W., and Beardall, J. 1991. *Molecular Activities of Plant Cells. An Introduction to Plant Biochemistry*. Australia: Blackwell Scientific publications.
- Aoki, N., Hirose, T., Scofield, G.N., Whitfeld, P.R. and Furbank, R.T. 2003. The Sucrose Transporter Gene Family in Rice. *Plant. Cell Physiol.* 44: 223-232
- Barker, L., C. Kuhn., A. Weise., A. Schulz., C. Gebhardt., B. Hirner., H. Hellmann., W. Schulze., J. m. Ward., and W. F. Frommer. 2000. SUT2 a Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *Plant Cells*. Vol. 12: 1153-1164.
- Baskoro, A. 2012. *Efektifitas Transformasi Gen SoSPS1 Menggunakan Vektor Plasmid pCL4 dan Eksplan Tunas Lateral Tebu (Saccharum officinarum L.)*. Tidak Dipublikasikan. *Skripsi*. Jember: Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember
- Bradford, M. M. 1976. A Rapid and sensitive Method for The Quantitation of Microgram Quantitative of Protein Utilizing The Principle of Protein Dye Binding. *Anal Biochem*. Vol. 72: 248-254.
- Christou, P., P. Vain., A. Kohli., M. Leech., j. Oard & S. Linscombe. 1992. Introduction of Multiple Genes Into Elite Rice Varieties. Evaluation of Transgenen Stability, Gene Expression and Field Performance of Herbicide-Resistent Transgenic Plant. *Annal of Botany*. Vol 77: 223-235.
- Campbell, N. A., J. B. Reece., and L. G. Mitchell. 2000. *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- 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, Mchughen Alan. 1993. Glyphosate tolerant flax plants from Agrobacterium mediated gene tranfer. *Plant cell report* 7 (4): 281-4
- Grof, C.P.L., J.L. Huber, S.D. McNeil, L.E. Lunn & J.A Campbell . 1998. A modified assay method show leaf sucrose phosphate synthase activity is correlated with leaf sucrose content across a range of sugarcane varieties. *Aust. J. Plant Physiol.* 25 : 499-502

- Handoyo, D dan A. Rudiretna. 2000. Prinsip Umum dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Unitas*. Vol. 9: 117-29
- Huber, S. C., and Huber. 1996. Role And Regulation Of Sucrose-Phosphate Synthase In Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol, Biol*. Vol. 47:431–444.
- Indrawanto, Chandra. 2010. *Budidaya dan Pascapanen Tebu*. Jakarta: ESKA Media.
- Kuhn,C., and Christopher. 2010. Sucrose transporters of higher plants.*Current Opinion in Plant Biology*. Vol. 13:1–11.
- Kusrini, Eni. 2015. *Seleksi Dan Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Pcl4-SoSPS1 Secara In Vitro*. Tidak Dipublikasikan. *Skripsi*. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Laporte, M.M., J.A. Galagan, J.A. Shapiro, M.R. Boersig, C.K. Shewmarker and T.D. Sharkey. 1997. Sucrose Phosphate Syntase Activity and Yield Analysis of Tomato Plants Transformed with Maize Sucrose Phosphate Synthase. *Planta*. Vol. 203: 253 - 259.
- 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.
- Miswar., B. Sugiharto., J. Soedarsono., dan S. Moeljopawiro. 2005. Transformasi Gensucrose-phosphate synthase (SoSPS1) tebu (*Saccharum officinarum L.*) untuk meningkatkan sintesis sukrosa pada daun tembakau (*Nicotianatabacum L.*) *Berkala Ilmiah BIOLOGI* 4(5):337-347.
- 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*, 26 (4); 187-193 (2007)
- Mufitdhah, Nurul. 2015. *Karakterisasi Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen Sosuti Generasi Kedua*. Tidak Dipublikasikan *Skripsi*. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember
- Ningtyas, H. M. 2012. *Karakterisasi Tanaman Tebu (Saccharum officinarum l. Var bl) Transgenik Overekspresi Gen SoSUT1event A-D*. Tidak

dipublikasikan. *Skripsi*. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

- Nurhidayati., A. Basit., dan Sunawan. 2013. Hasil Tebu Pertama dan Keprasan serta Efisiensi Penggunaan Hara N dan S akibat Substitusi Amonium Sulfat. *J. Agron. Indonesia* 41 (1) : 54 - 61 (2013)
- Oktaria, N. 2012. *Metabolisme Sukrosa Pada Tanaman Tebu (Saccharum Officinarum L.) Transgenic Overekspresi Gen SoSUT1*. Tidak dipublikasikan. *Skripsi*. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Paradisa, Fragaria Vesca. 2015. *Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetik (PRG) Overekspresi Gen SoSPSI Dan SoSUT1 Secara In Vitro*. Tidak Dipublikasikan. *Skripsi*. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Purwono, S., Sudiato., dan D.Guntoro. 1997. Uji Hasil Keprasan Beberapa Varitas Tebu Lahan Kering Pada Daerah Beriklim Basah. *Bul. Agron.* 25(1): 8-12 (1997)
- Rafikasari, Rachmita. 2015. *Karakterisasi Tanaman Tebu (Saccharum Officinarum L. Var. Bl) Transgenik Double Overekspresi Gen Sosps1-Sosuti Generasi Kedua*. Tidak Dipublikasikan. *Tesis*. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.
- Rahmawati, S. dan Slametloedin, I.H. 2006. Introduksi Gen *CryIB-cryIA* dalam Genom Padi (*Oryza sativa*) cv. Rojolele Menggunakan Transformasi *Agrobacterium*. *Hayati* 13: 19-25
- Reismeyer, 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.
- Sambrook et al., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sugiharto, B., Miswar., dan U. Murdiyatmo. 2003. Overekspresi gen sucrose-phosphate synthase untuk peningkatan biosintesis sukrosa pada tanaman tebu. *Laporan Akhir RUT VIII*. Universitas Jember dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, 42p.
- 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.

Sugiharto, B., Slameto., dan Dewanti, P. 2008. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen SPS dan SUT pada Tanaman Tebu. *Laporan Penelitian Hibah Kompetensi*. Unpublished.

Sugiharto, B dan H. Safitri. 2011. A Comparison Study for Agrobacterium-Mediated Transformation Method in Sugarcane (*Saccharum spp L.*). *Jurnal Ilmu Dasar*. Vol. 12 (2): 140 – 147.

Sugiharto, B., H. Sakakibara., Sumadi., dan T. Sugiyama. 1997. Differential Expression of Two Genes for Sucrose Phosphate Synthase in Sugar Cane: Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. *Plant Cell Physiol*. Vol. 38: 961 – 965.

Utari, Sri Wiwik. 2015. Aktivitas *Sucrose Phosphate Synthase* dan Kandungan Sukrosa Pada Tanaman Tebu Trangenik Hasil Perbanyakan Secara Vegetatif. *Jurnal*. hal 33-47

Widodo, Wimbuh T. 2013. *Aktivitas Sucrose Phosphate Synthase dan Sucrose Transporter serta Akumulasi Sukrosa pada Tanaman Tebu Transgenik Overekspresi Ganda Gen SoSPS1-SoSUT1*. Tidak dipublikasikan. *Skripsi*. Jember : Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

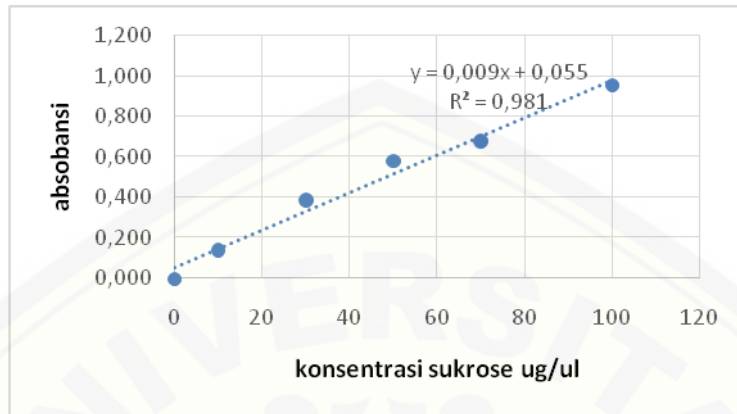
Williams L. E., R. Lemoine., and N. Sauer. 2000. Sugar transporters in higher plants a diversity of roles and complex regulation. *Trends in plant science*. Vol.5: 7.

Wiyono, A. G. 2012. *Transformasi Gen SoSUT1 Menggunakan Agrobacterium tumefaciens dan Eksplan Tunas Lateral pada Tanaman Tebu (Saccharum spp. Hybrid)*. Tidak Dipbblikasikan. *Skripsi*. Jember : FAPERTA Universitas Jember.

Worrell, A. C., J. M. Bruneau., K. Summerfelt., M. Boersig., and T. Voelker. 1991. Expression of Maize Sucrose Phosphate Synthase in Tomato Alter Leaf Carbohydrate Partitioning. *Plant Cell*. Vol. 3: 112 – 130.

Zheng, K., Huang, N., Bennet P., and Khush G. S. 1995. PCR Based Marker Assisted Selection in Rice Breeding. *IRRI news lett* 2.

Lampiran A. Kurva Standart Sukrosa

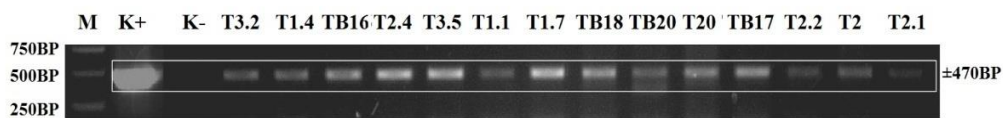


Lampiran B. Hasil PCR

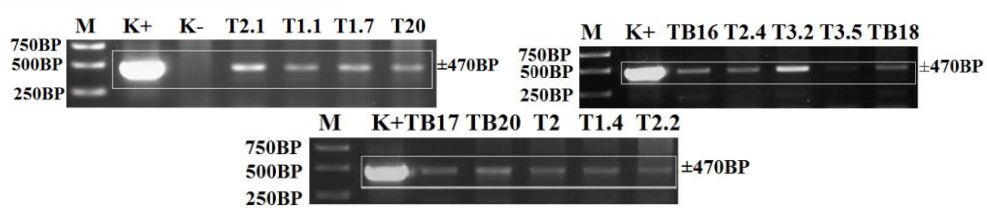
B1 . Konfirmasi PCR menggunakan pasangan primer *hptII* pada tanaman tebu hasil

transformasi gen *SoSUT1*

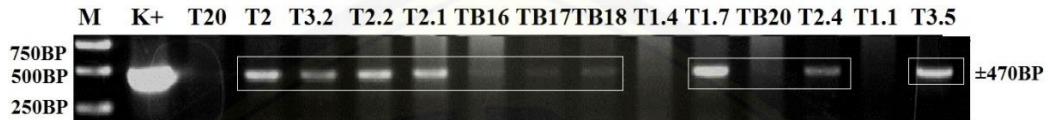
Event tebu PRG	Event Baru
T2.4	SU 2
T3.2	SU 3
TB16	SU 4
T1.4	SU 5
T3.5	SU 6
T1.7	SU 7
T2.2	SU 8
T1.1	SU 9
T.2.1	SU 10
TB20	SU 15
TB17	SU 11
TB18	SU 12
T2	SU 13
T20	SU 14



(a)



(b)

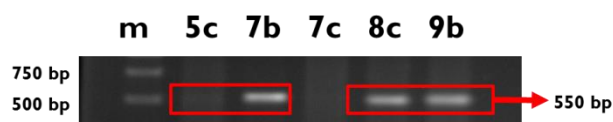
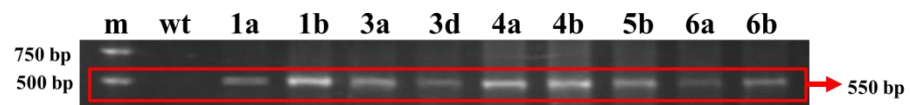
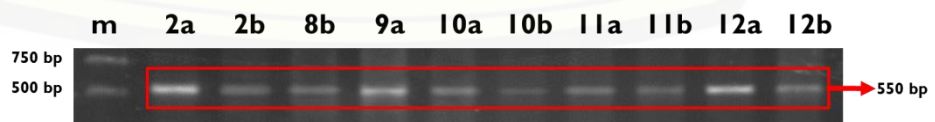


(c)

Gambar B1. 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 negative (*wildtype*); dan 14 tanaman PRG overeksresi gen *SoSUT1*. (Mufidha, 2015)

**B2. Konfirmasi PCR menggunakan pasangan primer *nptII* pada tanaman tebu transgenik *double overeksresi SoSPS1-SoSUT1* Generasi Kedua**

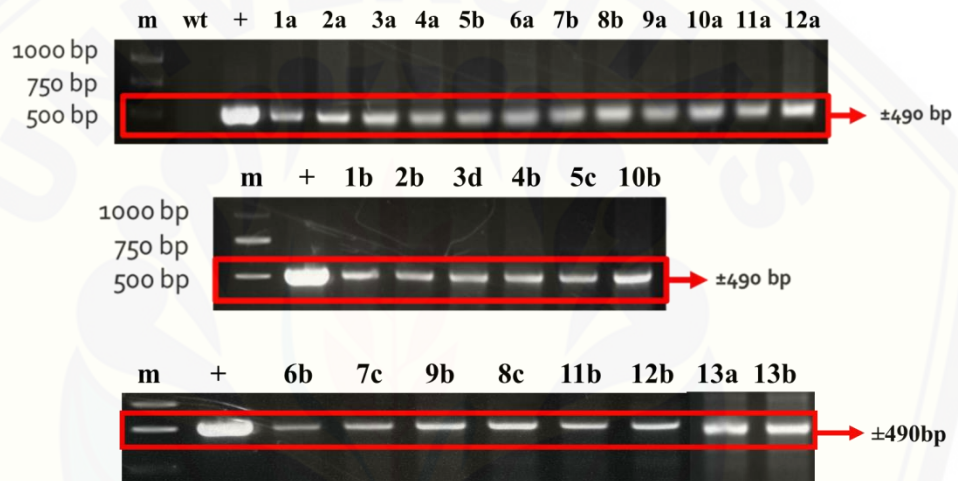
No.	Nama Event	Event Baru
1a, 1b	212bc	D1
2a, 2b	33ab	D2
3a, 3d	31a	D3
4a, 4b	31c	D4
5b, 5c	3.4	D5
6a, 6b	212ba	D6
7b, 7c	32a	D8
8b, 8c	32b	D7
9a, 9b	212bd	D9
10a, 10b	26bc	D10
11a, 11b	31b	D11
12a, 12b	32c	D12
13a, 13b	SUT.2	SU1
wt	<i>wild type</i>	





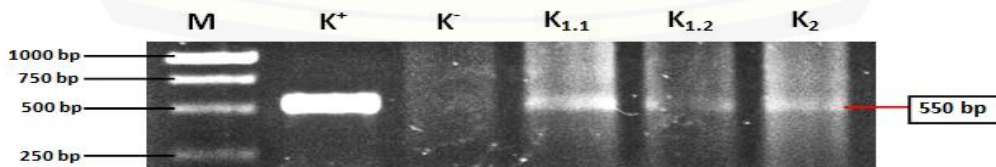
Gambar B2.1 Elektroforesis gel agarose 1% DNA hasil PCR dengan pasangan primer *nptII-F/R* dan

*template* DNA genom tanaman tebu transgenik *double overekspresi* gen *SoSPSI-SoSUT1*; wt : tanaman kontrol non-transformasi (*wild type*). (Rachmita, 2015)



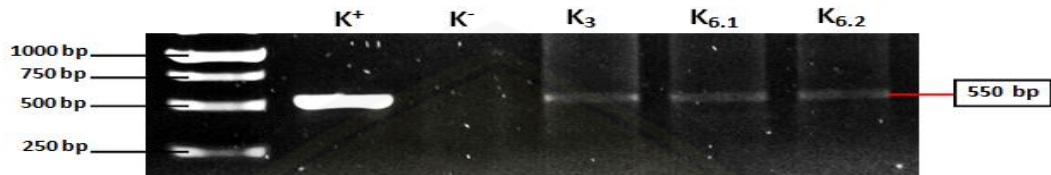
Gambar B2.2 Elektroforesis gel agarose DNA hasil PCR dengan pasangan primer *nptII-F/R* dan *template* DNA genom tanaman tebu transgenik *double overekspresi* gen *SoSPSI-SoSUT1*, + : Plasmid pActin-*SoSUT1*; wt: tanaman kontrol non-transformasi (*wild type*). (Rachmita, 2015)

### B3. Konfirmasi PCR menggunakan pasangan primer *nptII* pada tanaman tebu hasil transformasi gen *SoSPSI*



Gambar 4.10. Elektroforesis 1% gel agarose DNA hasil PCR dengan menggunakan pasangan primer *nptII-F/R* dan *template* DNA genomik tebu putatif transforman. M: Marker DNA 1 kb (*Intron Biotechnology*); K<sup>+</sup>: plasmid pCL4-*SoSPSI*; K<sup>-</sup>: tanaman kontrol (non transforman); K<sub>1.1</sub>: sampel DNA genom klon 1.1; K<sub>1.2</sub>: sampel DNA genom klon 1.2;

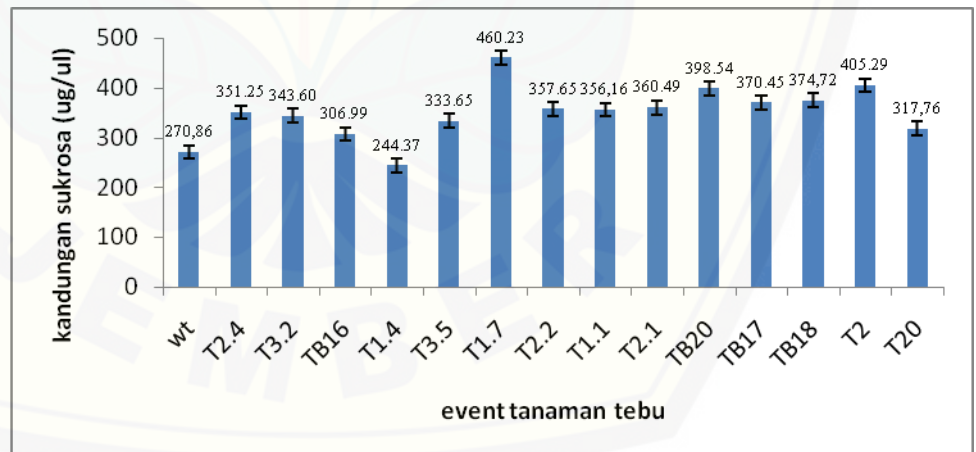
K<sub>2</sub>: sampel DNA genom klon 2.



Gambar 4.11. Elektroforesis 1% gel agarose DNA hasil PCR dengan menggunakan pasangan primer *npII-F/R* dan template DNA genomik tebu putatif transforman. M: Marker DNA 1 kb (*Fermentas*); K<sup>+</sup>: plasmid pCL4-*SoSPS1*; K<sup>-</sup>: tanaman kontrol (non transforman); K<sub>3</sub>: sampel DNA genom klon 3; K<sub>6.1</sub>: sampel DNA genom klon 6.1; K<sub>6.2</sub>: sampel DNA genom klon 6.2.

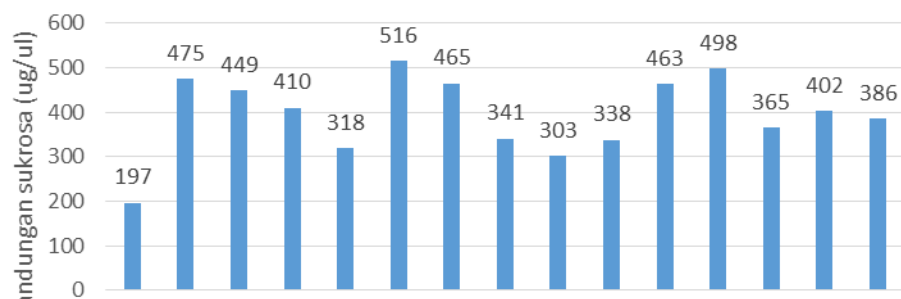
### Lampiran C. Kandungan Sukrosa

#### C.1 Kandungan Sukrosa Batang Tanaman Tebu Transgenik *Single Gen SoSUT1*



Hasil analisis rata-rata kandungan sukrosa batang umur 9 bulan pada tanaman PRG overekspresi gen *SoSUT1* dan tanaman kontrol (*wild type*) ruas ke enam. (Mufidha, 2015)

#### C.2 Kandungan Sukrosa Batang Tanaman Tebu Transgenik *double Gen SoSPS1 dan SoSUT1*



Hasil analisis kandungan sukrosa batang tanaman tebu transgenik *double overekspresi* gen *SoSPS1-SoSUT1* dan tanaman kontrol non-tranformasi (*wild type*) pada ruas ke-6 dihitung dari ruas yang paling bawah. (Rachmita, 2015)

