



**KARAKTERISASI TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L. Var. BL)
TRANSGENIK OVEREKSPRESI GEN *SoSUT1 EVENT A-D***

SKRIPSI

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

Oleh

**Hidayah Murtiyaningsih
NIM 081810401023**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2013**

PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan syukur alhamdulillah, saya persembahkan skripsi ini kepada:

1. Ibunda Endang S. dan Ayahanda Mulyani, saya ucapkan terimakasih yang tak terhingga atas segala pengorbanan, kasih sayang, dan do'a yang selalu mengalir;
2. Emi Fadillah dan Ach. Musthofa atas semangat yang telah diberikan;
3. seluruh keluarga besar yang telah begitu banyak memberikan dorongan dan dukungan dalam setiap langkahku;
4. semua guru-guru yang telah mendidik dan memberikan ilmunya, terimakasih yang tak terhingga atas ilmu yang diberikan;
5. Almamater Universitas Jember.

MOTO

“...Jadikanlah sabar dan shalatmu sebagai penolongmu, sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar”

(Al-Baqarah: 153)

“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)

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

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hidayah Murtiyaningsih

NIM : 081810401023

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Karakterisasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. Var. BL) Transgenik Overekspresi Gen *SoSUT1 Event A-D*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh PT. Perkebunan Nusantara XI dan MP3EI tahun 2012 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 20 Maret 2013

Yang Menyatakan,

Hidayah Murtiyaningsih

NIM 081810401023

SKRIPSI

**KARAKTERISASI TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L. Var. BL)
TRANSGENIK OVEREKSPRESI GEN *SoSUT1 EVENT A-D***

Oleh

Hidayah Murtiyaningsih

NIM 081810401023

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Esti Utarti S.P., M.Si.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Karakterisasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. Var. BL) Transgenik Overekspresi Gen *SoSUT1 Event A-D*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Jember pada :
Hari, tanggal :
Tempat : Fakultas MIPA Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

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

Esti Utarti, S.P, M.Si.
NIP 1970030319999032001

Anggota

Penguji I,

Penguji II,

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

Dra. Dwi Setyati, M.Si.
NIP 196404171991032001

Mengesahkan
Dekan,

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

RINGKASAN

Karakterisasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. Var. BL) Transgenik Overekspresi Gen *SoSUT1 Event A-D*; Hidayah Murtiyaningsih; 081810401023; 2013; 29 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Sukrosa merupakan produk utama fotosintesis yang dihasilkan dari proses asimilasi karbon. Sukrosa disintesis di sitosol yang dikatalisis oleh enzim *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS). Sukrosa yang dihasilkan ditransport ke organ penyimpanan dan digunakan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Transport sukrosa tersebut difasilitasi oleh protein *Sucrose Transporter* (SUT) yang terletak di membran sel. Besarnya kandungan sukrosa pada organ penyimpanan salah satunya dipengaruhi oleh tingkat transportasinya. Aktivitas transport sukrosa merupakan hal penting untuk memindahkan sukrosa dari organ fotosintesis (*source*) ke organ non fotosintesis (*sink*). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter pada tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1*, yang berhubungan dengan ekspresi gen *SoSUT1* yang terinsersi ke dalam genom tanaman tebu. Karakterisasi yang dilakukan meliputi analisis DNA genom dengan PCR, analisis protein SUT1 dan SPS1 dengan *western blot*, dan analisis kandungan sukrosa.

Konfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* pada tebu transgenik dilakukan menggunakan analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer *hygromycin phospho transferaseII (hptII)*, dan dilakukan pada 28 event tanaman transgenik hasil perbanyakan secara stek batang. Analisis protein SUT1 dan SPS1 dilakukan dengan metode *western blot* untuk mengetahui ekspresi gen *SUT1* pada tingkat translasi. Pada penelitian ini juga dilakukan analisis sukrosa pada organ daun dan batang tebu, untuk mengetahui pengaruh gen *SoSUT1* yang telah terinsersi

terhadap kandungan sukrosa batang tebu yang merupakan organ penyimpanan pada tanaman tebu.

Hasil analisis PCR dengan primer *hptII* menunjukkan bahwa dari semua tanaman yang dianalisis, terdapat 13 tanaman tebu positif transgenik *SoSUT1* dengan ukuran amplifikasi 470 bp, sedangkan 15 tanaman lainnya menunjukkan hasil negatif. Hasil analisis *western blot* protein *sucrose transporter1* (SUT1) terhadap 13 tanaman transgenik menunjukkan terdapat 9 *event* tanaman yang mengalami peningkatan kandungan protein, ditandai dengan tebalnya pita protein dibandingkan dengan kontrol. Analisis protein *sucrose phosphate synthase1* (SPS1) menunjukkan bahwa tanaman transgenik memiliki kandungan protein yang cenderung sama dengan kontrol. Hasil analisis sukrosa daun menunjukkan bahwa pada semua *event* tanaman transgenik memiliki persentase kandungan sukrosa lebih rendah dibandingkan tebu kontrol. Hasil analisis sukrosa batang pada ruas ke 3 dan ke 8 mengalami peningkatan persentase kandungan sukrosa apabila dibandingkan dengan tanaman kontrol.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, hidayah dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Karakterisasi Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. Var. BL) Transgenik Overekspresi Gen *SoSUT1 Event A-D*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

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

1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc selaku dosen pembimbing utama dan Esti Utarti, S.P., M.Si selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, saran, maupun bimbingan dalam penelitian dan penulisan skripsi ini;
2. Kahar Muzakhar, S.Si, Ph.D selaku dosen penguji I dan Dra. Dwi Setyati, M.Si selaku dosen penguji II yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Sri Mumpuni W., S.Pd, M.Si. selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing dan memberikan nasehat selama penulis menjadi mahasiswa;
4. seluruh keluarga besarku yang telah begitu banyak memberikan dorongan dan dukungan dalam setiap jalanku;
5. Purnama Okviandari, S.P, M.P. dan rekan-rekan kerja; Edia, Frengky S.P, Rinda, beserta para seniorku Anandang S.P, Aji Baskoro S.P, A. Fudhaili S.Si, Nurul Holifah S.Si, Nina Oktaria S.Si, Aditiya S.Si, serta adik-adik (Anna, Wimbuh, Novita, Dina, Eni, Fadrian, Rizky Obama, Ifan) yang telah memberikan masukan dan semangat selama menjalankan tugas akhir;

6. teman-teman yang banyak memberi motivasi penulis; A. Rasit, Azizah, Luluk, TBV group (Ika Agus, Syubbanul Wathon., Imam Hanafy), Niar, Lutfiya, Mikrobiologi group (Arif, Dewi, Mada) dan semua teman-teman biologi angkatan 2008 Omfalomesenterika yang telah menambah warna hidup selama ini;
7. teman-teman kost jalak satu; pupus, setiya, kiki serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

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

Jember, Maret 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah.....	2
1.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Tujuan Penelitian.....	3
1.4.2 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Asimilasi Karbon dan Sintesis Sukrosa Tanaman Tebu.....	4
2.2 Akumulasi Sukrosa pada Organ Penyimpanan (<i>sink</i>).....	6
2.3 Tanaman Transgenik Overekspresi Gen <i>SoSUT1</i>.....	8
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	10

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	10
3.2 Bahan dan Alat.....	10
3.3 Metode Penelitian.....	10
3.3.1 Pengambilan Sampel Tanaman.....	10
3.3.2 Isolasi DNA Genom Tanaman	11
3.3.3 Analisis PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	12
3.3.4 Ekstraksi Protein.....	13
3.3.5 Pengukuran Total Protein Terlarut (TPT)	14
3.3.6 Analisis SDS-PAGE dan <i>Western Blot</i>	14
3.3.7 Ekstraksi dan Analisis Kandungan Sukrosa.....	15
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Analisis PCR untuk Konfirmasi Keberadaan Overekspresi Gen <i>SoSUT1</i> pada Tanaman Tebu.....	17
4.2 Analisis <i>Western Blot</i> Protein <i>Sucrose Transporter1</i> (SUT1).....	18
4.3 Analisis <i>Western Blot</i> Protein <i>Sucrose Phosphate Synthase1</i>.....	20
4.4 Analisis Kandungan Sukrosa Daun.....	21
4.5 Analisis Kandungan Sukrosa Batang.....	22
BAB 5. PENUTUP	25
5.1 Kesimpulan.....	25
5.2 Saran.....	25
DAFTAR PUSTAKA.....	26
LAMPIRAN	30

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Mekanisme asimilasi karbon pada tanaman C4 yang terjadi di dua sel..... 4
Gambar 2.2	<i>Long distance transport</i> sukrosa dari <i>source</i> ke <i>sink</i> 7
Gambar 3.3.3	Peta konstruk plasmid pAct yang memiliki gen penanda yaitu gen <i>hptII</i> yang menyandikan ketahanan terhadap antibiotik higromicin..... 13
Gambar 4.1	Elektroforesis 1% gel agarose DNA hasil PCR dengan pasangan primer <i>hptII</i> -1F/1R dan <i>template</i> sampel DNA genom tanaman tebu transgenik overekspresi gen <i>SoSUT1</i> dan kontrol..... 18
Gambar 4.2	Hasil analisis <i>western blot</i> protein SUT1 pada tanaman tebu transgenik overekspresi gen <i>SoSUT1</i> dan kontrol dengan konsentrasi 30 µg..... 19
Gambar 4.3	Hasil analisis <i>western blot</i> protein SPS1 pada tanaman tebu transgenik dan tanaman kontrol dengan konsentrasi 20 µg..... 20
Gambar 4.4	Hasil analisis kandungan sukrosa pada organ daun..... 21
Gambar 4.5	Hasil analisis kandungan sukrosa pada batang tebu ruas ke 3 dan ke 8..... 23

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Kurva standart sukrosa dan BSA	30
B. Kandungan sukrosa daun dan batang	31
C. Komposisi buffer	33
D. <i>Event</i> tanaman transgenik	34
E. Tanaman yang menunjukkan hasil negatif pada elektroforesis gel agarosa.....	34

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sukrosa merupakan produk utama fotosintesis yang dihasilkan dari proses asimilasi karbon di daun (Campbell *et al.*, 2000). Sukrosa disintesis di sitosol dan dikatalisis oleh enzim *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) yang mengkatalisis reaksi penggabungan antara UDP *glucose* dan *Fructose-6-Phosphate* (Huber and Huber, 1996). Sukrosa yang dihasilkan kemudian digunakan sebagai sumber karbon serta sumber energi untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman, dan juga ditransport ke organ penyimpanan (*sink*) (Lakitan, 2010).

Transportasi sukrosa dari organ fotosintesis (*source*) menuju organ non fotosintesis (*sink*) diperantarai oleh protein pentransport sukrosa yang terletak di membran plasma (Rae *et al.*, 2005). Protein tersebut dinamakan dengan protein *Sucrose Transporter* (SUT) (Riesmeier *et al.*, 1992). Pada tanaman tebu protein *sucrose transporter1* disandikan oleh gen *SoSUT1* (*Saccharum officinarum Sucrose Transporter1*). Aktivitas transport sukrosa merupakan hal penting, karena besarnya sukrosa yang dapat diakumulasikan pada organ penyimpanan selain ditentukan oleh tingkat sintesisnya juga ditentukan oleh proses transportasi dari *source* ke *sink*. Kuhn *et al.* (2003) melaporkan bahwa dengan melakukan penghambatan ekspresi gen *SUT1* pada kentang dapat menurunkan produksi kentang, karena dapat menghentikan translokasi sukrosa. Hackel *et al.* (2006) juga melaporkan bahwa dengan melakukan overekspresi gen *SUT1* pada tomat dapat meningkatkan translokasi sukrosa ke organ (penyimpanan) *sink*.

Pada penelitian sebelumnya gen *SoSUT1* telah berhasil diisolasi dari tanaman tebu (Sugiharto *et al.*, 2010), dan ditransformasikan ke dalam sel tanaman tebu sehingga diduga menghasilkan tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* (Wiyono, 2012). Overekspresi gen *SoSUT1* pada tebu bertujuan untuk mendapatkan

tanaman tebu yang memiliki daya transport sukrosa tinggi sehingga akumulasi sukrosa di batang meningkat. Tanaman transgenik overekspresi gen *SoSUT1* yang didapatkan adalah *event* A, B1, B3, B4, C1, C2, dan D (Wiyono, 2012). Tanaman transgenik *event* A sampai D yang diperoleh tersebut belum dikarakterisasi sebelumnya. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang karakterisasi pada tanaman transgenik tersebut untuk mengetahui ekspresi gen *SoSUT1* yang terinsersi ke dalam genom tanaman tebu, dalam hubungannya dengan akumulasi sukrosa pada tanaman tebu.

1.2 Rumusan Masalah

Secara alami tanaman tebu telah memiliki gen *SoSUT1*, namun dengan dilakukannya transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu, diduga tanaman tersebut dapat mengalami ekspresi berlebih atau overekspresi. Overekspresi *SoSUT1* diharapkan dapat meningkatkan kandungan protein SUT1 yang memiliki peran penting dalam hal transportasi sukrosa. Pada penelitian sebelumnya telah didapatkan tanaman transgenik gen *SoSUT1 event* A, B1, B3, B4, C1, C2, dan D, namun belum dikarakterisasi, sehingga perlu dilakukan karakterisasi untuk mengetahui ekspresi dari gen *SoSUT1*.

1.3 Batasan Masalah

Karakterisasi yang dilakukan meliputi uji keberadaan overekspresi gen *SoSUT1* dengan analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*), penentuan kandungan protein SUT1 dan SPS1 dengan *western blot* dan analisis kandungan sukrosa untuk mengetahui kandungan sukrosa daun dan batang dengan uji *sellivanof*.

1.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.4.1 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakter pada tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1*, terutama pada ekspresi protein SUT1 dan kandungan sukrosa batang.

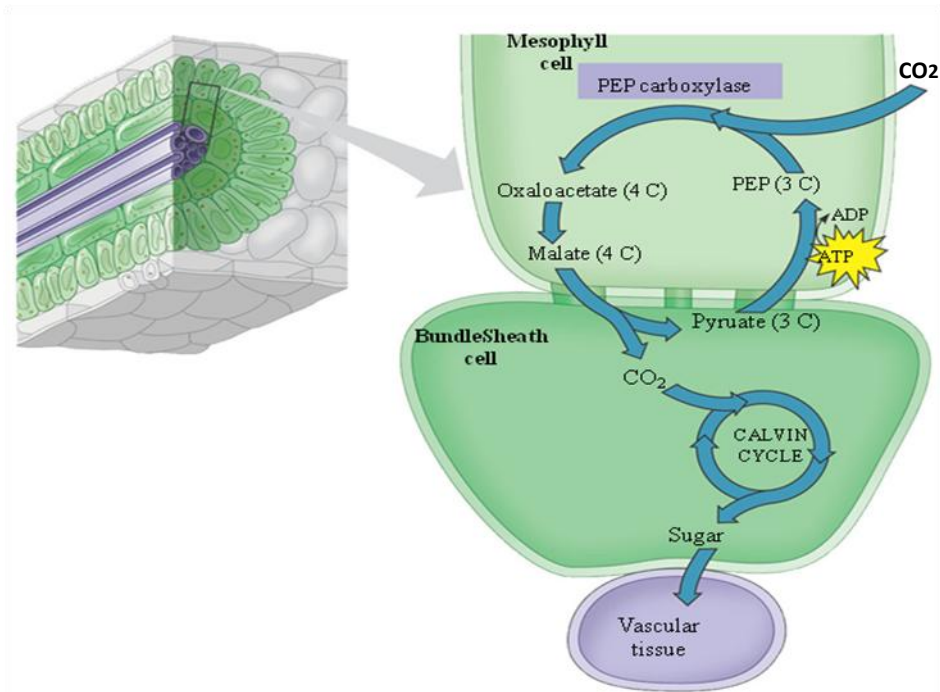
1.4.2 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai peranan overekspresi gen *SoSUT1* terhadap peningkatan kandungan protein SUT1 dan kandungan sukrosa batang.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Asimilasi Karbon dan Sintesis Sukrosa pada Tanaman Tebu

Tanaman tebu berdasarkan asimilasi karbonnya digolongkan sebagai tanaman C₄. Dinamakan C₄ karena hasil pertama pada asimilasi karbon berupa molekul yang memiliki 4 atom karbon (oksaloasetat). Tanaman C₄ memiliki karakteristik anatomi daun yang dikenal dengan tipe Kranz, memiliki dua sel yang berbeda yaitu sel mesofil dan *bundle sheath cell* yang keduanya memiliki kloroplas untuk melakukan fotosintesis (Anderson and Beardall, 1991).



Gambar 2.1. Mekanisme asimilasi karbon pada tanaman C₄ yang terjadi pada dua sel yaitu mesofil dan *bundle sheath cell* (Campbell *et al.*, 2000)

Jalur asimilasi karbon tanaman C₄ ditunjukkan pada gambar 2.1. Dimulai dari CO₂ masuk melalui stomata ke sel mesofil dan diubah menjadi HCO₃. Aktifitas

PEPC (*Phosphoenol Pyruvate Carboksilase*) pada mesofil akan mereaksikan HCO_3 dengan PEP (3C) sehingga menjadi asam oksaloasetat (4C). Oksaloasetat dengan bantuan NADP *malate dihidrogenase* menghasilkan asam malat yang merupakan asam 4 atom karbon. Asam malat kemudian ditransfer ke dalam *bundle sheath cell*. Asam empat karbon (C4) mengalami dekarboksilasi yang dikatalisis oleh NADP *malic acid* dan melepaskan CO_2 dan piruvat. Piruvat merupakan asam 3 karbon yang akan dikembalikan lagi ke dalam sel mesofil sedangkan CO_2 masuk dalam proses siklus calvin (Buchanan *et al.*, 2000).

Pada siklus calvin CO_2 direaksikan dengan RuBP (*ribulose bisphosphate*) membentuk senyawa 3-PGA (*3 phospho glyceric acid*) yang dikatalisis oleh *ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase* (rubisco). Mekanisme fiksasi CO_2 yang terjadi di *bundle sheath cell* ini sangat menguntungkan bagi tanaman C4, karena dapat menghindari terjadinya proses fotorespirasi yang merupakan proses pemborosan energi (Buchanan *et al.*, 2000). Senyawa 3-PGA lalu dikonversikan menjadi triosa phosphate (triosa-P) yang menjadi titik persimpangan penggunaan senyawa fotosintat untuk sintesis sukrosa atau pati. Sebagian triosa phosphate digunakan untuk membentuk pati di kloroplas dan ada yang dikeluarkan dari kloroplas untuk membentuk sukrosa di dalam sitosol. Proses keluarnya triosa phospat dari kloroplas menuju sitosol difasilitasi oleh protein *triose phosphate translocator* (TPT) (Buchanan *et al.*, 2000).

Alokasi penggunaan triosa phospat untuk sintesis sukrosa dan pati merupakan titik awal pengaturan sintesis sukrosa dan pati. Sintesis sukrosa dalam tanaman dapat meningkat apabila penggunaan triosa-P untuk sintesis pati dalam kloroplas dapat ditekan. Dalam pembentukan satu molekul sukrosa dibutuhkan empat molekul triosa-P yang dihasilkan dari asimilasi karbon pada proses fotosintesis. Empat triosa-P tersebut dikonversikan menjadi 2 molekul *2-glyceraldehyde-3-P* dan 2 molekul *2-dihydroxyacetone-P* yang dikatalisis oleh enzim *triose-P-isomerase*. Kemudian dari molekul ini akan dibentuk *fructose, 1-6 bisphosphate* yang dikatalisis oleh *aldolase*. Selanjutnya terjadi pelepasan phosphate sehingga membentuk dua

molekul *fructose-6-phosphate* (F6P) yang dikatalisis oleh *FBPase*. *Fructose-6-phosphate* (F6P) yang terbentuk sebagian dikonversikan menjadi *glucose -1-P* yang dikatalisis oleh *hexose-P-isomerase* dan *glucose-P-mutase*. Kemudian *glucose-1-P* akan bereaksi dengan *Uridin triposphate* (UTP) untuk membentuk *UDP-glucose*, yang merupakan substrat pada sintesis sukrosa (Anderson and Beardall, 1991).

Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa *sucrose phosphate syntase* (SPS) merupakan enzim kunci yang menentukan sintesis sukrosa (Huber and Huber, 1996). Signora *et al.* (1998) juga melaporkan pada *Arabidopsis thaliana* yang ditransformasi SPS memiliki kenaikan aktivitas enzim SPS sampai tiga kali, sehingga kandungan sukrosanya meningkat. Enzim SPS mengkatalisis reaksi penggabungan antara *uridine diphosphate glucose* (UDPG) dan *fructose-6-phosphate* (F6P) yang menghasilkan *sucrose-6-phosphate* (S6P), selanjutnya S6P dihidrolisis oleh SPP (*Sucrose Phosphate Phosphatase*) membentuk sukrosa bebas dan phosphate anorganik (Pi) pada akhir reaksi.

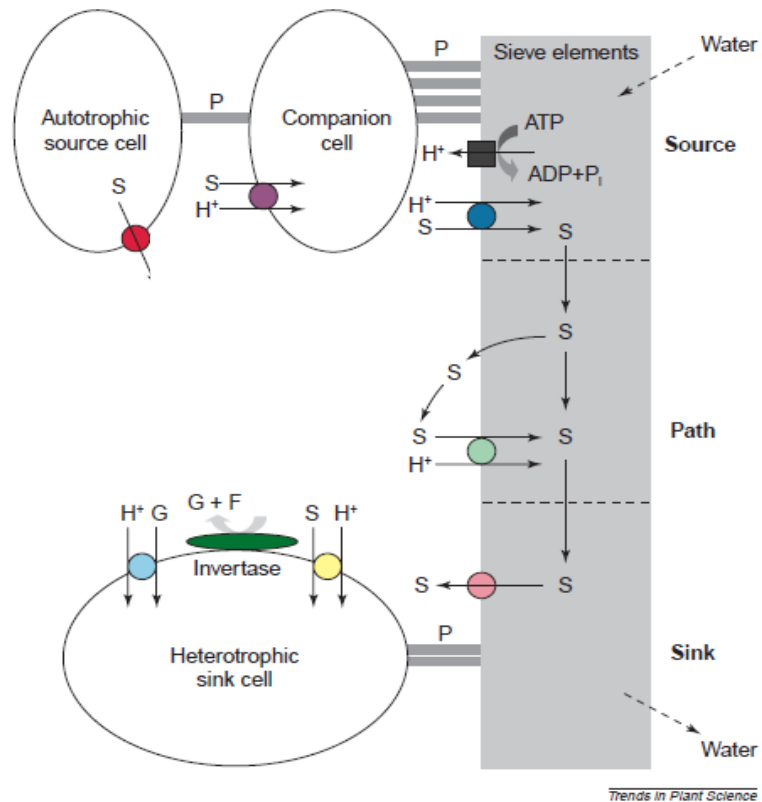
2.2 Akumulasi Sukrosa pada Organ Penyimpanan (*sink*)

Sukrosa merupakan gula disakarida yang tersusun dari glukosa dan fruktosa (Harrison, 2012). Sukrosa merupakan hasil akhir dari proses fotosintesis yang terjadi di daun (Campbell *et al.*, 2000), dan digunakan sebagai sumber kerangka karbon dan energi bagi organ tanaman seperti buah, batang, akar dan bunga (Lemoine, 2000). Jaringan yang mengekspor sukrosa sering disebut sebagai *source* dan jaringan yang mengimpor sebagai *sink* (Truernit, 2001).

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

(dari organ *source* menuju floem) dan *unloading* (dari floem menuju organ *sink*) (Ayre, 2011).

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



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

Transportasi sukrosa dari *source* ke *sink* terjadi secara apoplasmik dan simplasmik (Lalonde *et al.*, 2003). Sukrosa yang disintesis di sitosol akan bergerak secara apoplasmik melalui *sucrose transporter*. Apoplasmik merupakan translokasi sukrosa melewati ruang interselluler jaringan, proses ini terjadi dalam CC/SE (*companion cell/sieve elemen*), kemudian sukrosa akan memasuki sel pengiring (*companion cell*) melalui *sucrose transporter*. Sedangkan simplasmik merupakan translokasi sukrosa dari sel ke sel melalui plasmodesmata, yang terjadi pada jaringan meristem dan organ tanaman yang masih muda. Secara simplas, sukrosa yang sudah berada di dalam sel pengiring (*companion cell*), akan memasuki *sieve element* floem melalui plasmodesmata. Sukrosa dari *sieve element* floem akan bergerak menuju jaringan penyimpan (*sink*) melalui aliran massa, seperti terlihat pada Gambar 2.2.

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

2.3 Tanaman Transgenik Overekspresi Gen *SoSUT1*

Gen *SoSUT1* merupakan gen penyandi protein *sucrose transporter* (*SUT1*) pada tanaman tebu yang memiliki peran penting terhadap transportasi sukrosa dari organ fotosintesis ke organ nonfotosintesis. Penelitian mengenai *sucrose transporter* pertama kali dilakukan oleh Riesmeier *et al.* (1992) dengan mengisolasi cDNA *SUT* dari bayam. Semenjak penelitian tersebut, banyak penelitian dilakukan mengenai protein *SUT* untuk mempelajari peranan protein *SUT* pada tanaman. Misalnya pada

tanaman tembakau (Lemoine *et al.*, 1999), padi (Aoki *et al.*, 2003) dan tomat (Hackel *et al.*, 2006).

Isolasi cDNA *SoSUTI* dari tanaman tebu juga telah dilakukan (Sugiharto *et al.*, 2010) kemudian ditransformasikan ke dalam sel tanaman tebu menggunakan plasmid *pAct-SoSUTI* dan pangkal tunas tebu invitro (Wiyono, 2012). Transformasi tersebut bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu yang memiliki tingkat translokasi sukrosa tinggi melalui overekspresi gen *SUTI*. Pada hakekatnya, tanaman tebu sudah memiliki gen *SUTI* endogen, namun dengan dilakukannya transformasi gen *SoSUTI* diharapkan tanaman tebu mengalami ekspresi berlebih atau overekspresi. Riesmeier *et al.* (1994) melaporkan bahwa dengan melakukan overekspresi gen pengkode *sucrose transporter* (gen *SUTI* pada tanaman kentang) dapat meningkatkan laju transportasi sukrosa, sehingga meningkatkan kemampuannya untuk mengakumulasikan sukrosa di organ penyimpanan.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Dasar, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember mulai Bulan Juli 2012 sampai Januari 2013.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L. varietas BL) transgenik overekspresi gen *SoSUT1* yang berjumlah 28 *event*, yang berasal dari 7 *event* A, B1, B3, B4, C1, C2, D dan tanaman tebu kontrol non transgenik var. BL (Lampiran D). Bahan kimia yang digunakan antara lain Tris base, *Boric Acid*, EDTA, NaCl, SDS, β -Mercaptoethanol, PCR Kit dari *Roche*, nitrogen cair, agarosa, aquades, etanol, metanol, *ethidium bromide*, primer *hptII 1F/1R*, BSA, reagen bradford, MOPS, NaOH, $MgCl_{2,6}H_2O$, DTT, PMSF, PVP, reagen sellivanof, APS, Temed, gliserol, *bromophenol blue*, *skim milk*, antibodi primer SUT1 dan SPS1, antibodi sekunder, BCIP dan NBT.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain mortar-stamper, tabung mikrosentrifuge, mikropipet, mikrotip, tabung reaksi, gelas ukur, *beaker glass*, botol falcon, sentrifugasi, waterbath, pH meter, vorteks, spektrofotometer, inkubator, PCR. Alat elektroforesis gel agarosa, UV transiluminator, alat elektroforesis SDS-PAGE, alat *western blot*, dan *rotary* evaporator.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun dan batang dilakukan pada 28 *event* tanaman transgenik hasil perbanyakan secara stek batang. Pengambilan sampel sel daun untuk

analisis DNA genom, protein serta sukrosa dilakukan pada daun ketiga (dihitung dari pucuk) yang membuka sempurna. Pengambilan sampel batang tebu untuk analisis sukrosa dilakukan pada ruas ketiga dan ke delapan yang dihitung dari ruas bawah (di atas permukaan tanah). Sampel disimpan pada suhu -20°C sebelum dilakukan analisis.

3.3.2 Isolasi DNA Genom Tanaman

Isolasi DNA genom tanaman dilakukan dengan cara menggerus sampai halus 0,5 gram daun tebu menggunakan mortar-stamper dengan menambahkan N_2 cair (Zheng *et al.*, 1995). Serbuk yang didapatkan dipindahkan ke tabung mikrosentrifuge dan ditambahkan 1 ml buffer ekstraksi (Lampiran C), 50 μl SDS 20% dan 1,25 μl β -Mercaptoethanol. Campuran dihomogenkan menggunakan vorteks dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Campuran ditambahkan dengan 500 μl Potasium acetat 5M dan dihomogenkan dengan teknik *swirling* (membolak balik tabung mikrosentrifuge). Campuran diinkubasi dalam es selama 10 menit dan disentrifugasi 12.000 rpm pada suhu 4°C , selama 10 menit. Supernatan dipindah ke tabung mikrosentrifuge dan ditambahkan 625 μl isopropanol, dihomogenkan dengan teknik *swirling* dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam. Selanjutnya disentrifugasi ulang, supernatan dibuang dan pada pellet yang dihasilkan, ditambah dengan 500 μl buffer TE (Lampiran C) dan 15 μl RNA-se (purifikasi DNA). Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

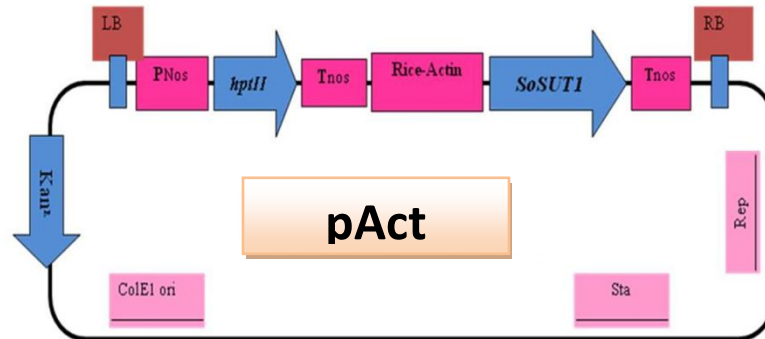
Campuran ditambah dengan PCI 500 μl kemudian divorteks dan disentrifugasi 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dipindah ke tabung mikrosentrifuge dan ditambahkan chloroform (*equal volume*), divorteks lalu disentrifuge kembali. Supernatan dipindah ke eppendorf baru, ditambahkan isopropanol dan NaAC. Diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam, disentrifuge 12.000 rpm, 4°C , selama 10 menit. Pellet dicuci dengan ethanol 70 % 1 ml dan disentrifuge 12.000 rpm, 4°C , selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet dikeringkan dengan *vacum dry* selama 10 menit, kemudian dilarutkan dengan 50 μl

buffer Tris EDTA (Lampiran C). DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya dengan menggunakan spektrophotometer pada panjang gelombang 260 nm dan digunakan untuk analisis PCR.

3.3.3 Analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan PCR Kit dari *Roche Master Mix* yang komposisinya terdiri dari *Taq DNA Polimerase*, *Magnesium chloride*, 2 kali konsentrasi reaksi buffer dan nukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP masing-masing 0,4 mM). Dalam satu kali reaksi memiliki total volume 25 µl dengan larutan yang terdiri dari *Roche Master Mix* 12,5 µl, masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) 1,5 µl, template genom 2,5 µl dan ddH₂O 7 µl. PCR dilakukan berdasarkan primer yang digunakan, untuk mengetahui keberadaan gen *SoSUT1* digunakan primer forward (5' CCGCAAGGAATCGGTCAATA-3) dan reverse (5'CCCAAGCTGCATCATGGAAA-3) dari *hptII* (*hygromycin phospho transferase*) sesuai dengan peta konstruk Gambar 3.3.3. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus yang meliputi tahapan antara lain predenaturasi 95 °C selama 4 menit, denaturasi 95 °C selama 30 detik, *annealing* 58 °C selama 30 detik, *elongation* 72 °C selama 2 menit dan final *elongation* 72 °C selama 7 menit. Hasil dari PCR adalah amplifikasi selektif dari lokasi DNA yang dipilih (Brown, 1995).

DNA yang telah teramplifikasi oleh PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel agarosa 1%. Elektroforesis gel agarose memiliki prinsip pemisahan senyawa berdasarkan berat molekulnya dibawah medan listrik. Elektroforesis dilakukan dengan cara mencampurkan sebanyak 50 ml TBE (Lampiran C) ditambah 0,5 gram agarose dan 3 µl *ethidium bromide*, hingga menjadi gel. Sampel dimasukkan pada sumuran gel lalu dialiri arus listrik dengan tegangan 100 Volt selama 20-25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb Ladder (*intron biotechnology*) sebanyak 5 µl untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat di UV mini transiluminator dan didokumentasikan dengan kamera.



Gambar 3.3.3 Peta konstruk plasmid pAct-*SoSUT1* yang memiliki gen penanda yaitu gen *hptII* yang menyandikan ketahanan terhadap antibiotik higromisin.

3.3.4 Ekstraksi Protein

Ekstraksi protein dilakukan pada dua fase, yaitu ekstraksi untuk *soluble* protein dan *insoluble* protein. Ekstraksi enzim SPS (*soluble* protein) dilakukan dengan cara menggerus 1 gram sampel daun tebu beku menggunakan mortal-stamper dingin dengan bantuan N₂ cair sampai menjadi serbuk. Sampel kemudian ditambah dengan 3 ml buffer ekstraksi SPS (Lampiran C) dan 10 % PVP (vinylpolypyrrolidone). Sampel disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4 °C, selama 10 menit untuk memisahkan supernatan dan pellet. Supernatan hasil ekstraksi digunakan untuk analisis *western blot* SPS, sedangkan pellet digunakan untuk analisis protein SUT (*insoluble* protein).

Ekstraksi protein SUT1 tebu dilakukan dengan cara mencuci pellet hasil ekstraksi dengan buffer SPS (Lampiran C). Pencucian dilakukan sebanyak 2 kali. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit suhu 4 °C. Pellet yang didapatkan ditambah dengan 150 µl buffer solubilisasi (Lampiran C). Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Selanjutnya, supernatan yang sudah diperoleh ditampung dalam tabung mikrosentrifuge dan disimpan di *frrezer* -80 °C, sebelum dilakukan analisis SDS-PAGE dan *western blot* protein SUT1.

3.3.5 Pengukuran Total Protein Terlarut (TPT)

Total protein terlarut ditentukan dengan metode Bradford (1976). Reagen Bradford diambil sebanyak 950 μ l dan ditambahkan H₂O sampai volumenya mencapai 1 ml (sebagai *blank*). Campuran didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar untuk menyempurnakan pewarnaan. Sampel yang akan diukur total protein terlarutnya diambil sebanyak 50 μ l, dan ditambah dengan Reagen Bradford sebanyak 950 μ l. Campuran diinkubasi selama 10 menit untuk menyempurnakan pewarnaan. Warna yang terbentuk dari campuran tersebut diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Nilai absorbansi yang didapat kemudian dihitung dengan rumus yang terdapat pada kurva standart BSA (*Bovine Serum Albumin*).

3.3.6 Analisis SDS-PAGE dan *Western Blot*

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Elektrophoresis*) merupakan teknik pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya, dibawah pengaruh medan listrik. Terdapat dua gel pada SDS-PAGE, yaitu *separating* dan *stacking*. Pembuatan gel dilakukan dengan cara mencampurkan Acrylamid 30 %, LGB yang memiliki komposisi (Lampiran C) pada gel *separating*, UGB (Lampiran C) pada gel *stacking*, ddH₂O, APS dan Temed. Sampel protein ditambah dengan buffer sampel (Lampiran C) dengan perbandingan 1 : 1. Sampel didenaturasi selama 3 menit. Sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel lalu dialiri arus listrik 40-70 Volt selama 3 jam melalui buffer elektroda (Lampiran C) (Sambrook *et al.*, 2001).

Analisis *western blot* dilakukan setelah protein SUT1 dan SPS1 dipisahkan dengan SDS-PAGE. *Western blot* merupakan metode yang digunakan untuk mendeteksi protein spesifik dengan prinsip pemberian antibodi primer dan antibodi sekunder (Sambrook *et al.*, 2001). Gel hasil elektroforesis ditransfer ke membran nitroselulosa dengan buffer transfer (Lampiran C) melalui aliran listrik sebesar 250 mA, suhu 4 °C selama 2 jam. Membran kemudian dicuci dengan TBS (*Tris Buffered Saline*) (Lampiran C) sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Membran kemudian diblocking dengan cara direndam dalam TBS dengan 4 % *skim milk* selama

30 menit. Kemudian diberikan antibodi I (antibodi primer SUT1 (Holifah, 2012) untuk protein *Sucrose transporter1* dan antibodi primer SPS1 untuk protein SPS1) dalam 40 ml TBS *skim milk* 0,5 %. Membran diinkubasi pada *shaker* selama 24 jam dan ditambahkan NaN_3 0,02 %. Proses selanjutnya adalah mencuci membran dengan TBS sebanyak 3 kali masing-masing 5 menit. Kemudian diberi antibodi II dalam TBS *skim milk* dan diinkubasi selama 1 jam. Sebelum pewarnaan, membran dicuci lagi dengan TBS dan alkalin phosphat pH 9,5 (Lampiran C). Pewarnaan dilakukan dengan pemberian 100 μl BCIP (*Bromo Chloro Indolyl Phosphate disodium salt*) dan 50 μl NBT (*Nitro Blue Tetrazolium chloride*) yang dilarutkan dalam 10 ml buffer alkalin phosphat pH 9,5.

3.3.7 Ekstraksi dan Analisis Kandungan Sukrosa

Ekstraksi sukrosa daun dilakukan dengan cara menggerus 2 gram sampel daun menggunakan N_2 cair dan dilarutkan dalam 5 ml buffer MCW (Metanol Chloroform Water). Campuran diinkubasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Campuran dihomogenkan dan disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan bahan yang terlarut dan tidak terlarut. Supernatan yang diperoleh ditampung dalam botol *falcon*. Perlakuan ini diulang 5x sampai pellet yang tersisa berwarna putih. Supernatan yang diperoleh dievaporasi menggunakan rotary evaporator sampai methanol kloroform menguap sehingga yang tersisa hanya larutan berpelarut air. Cairan hasil evaporasi digunakan untuk uji kandungan sukrosa.

Ekstraksi sukrosa batang dilakukan dengan cara memotong ruas batang tebu transgenik *SoSUT1* dan tanaman kontrol dengan berat masing-masing 2 gram. Batang tebu digerus pada kondisi dingin (4°C). Nira yang dihasilkan ditampung dalam tabung mikrosentrifuge, kemudian disentrifugasi 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit untuk memisahkan kotoran dengan nira. Supernatan yang dihasilkan kemudian digunakan untuk analisis sukrosa batang.

Pengujian sukrosa dilakukan dengan menambahkan 70 μl 1 N NaOH pada 10 μl sampel. Campuran dihomogenkan, kemudian dipanaskan 100°C selama 10

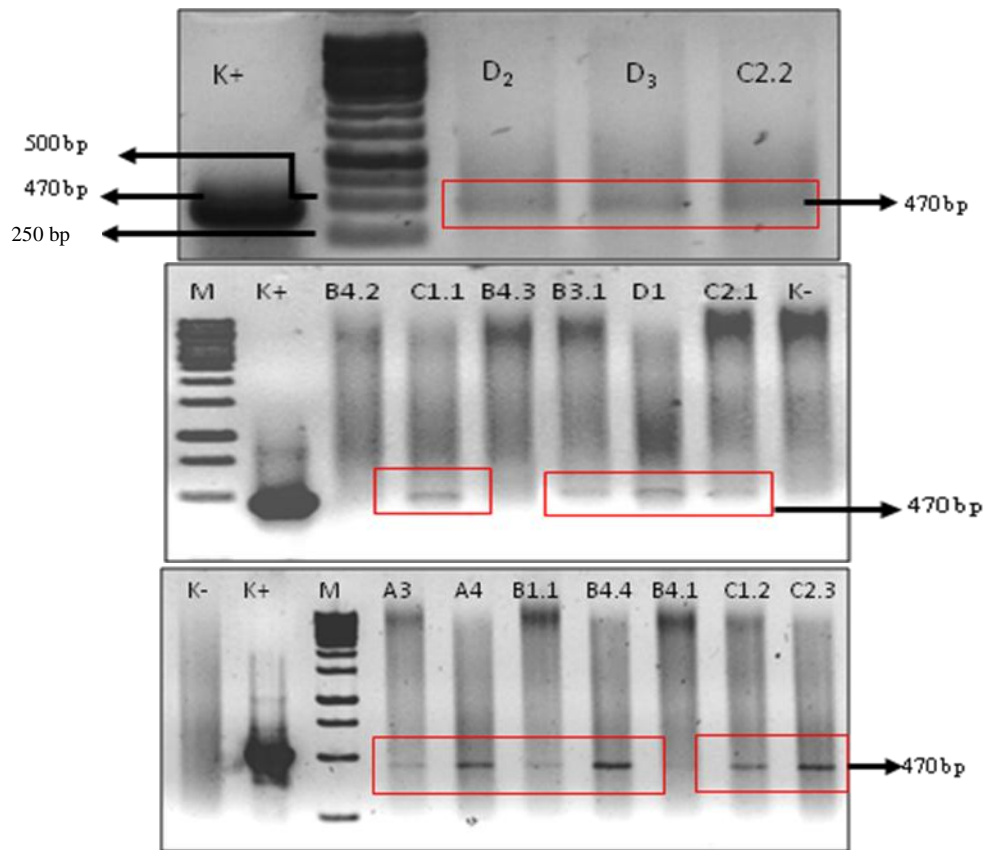
menit. Setelah dingin, campuran ditambah dengan 0,1 % resorcinol dalam 95 % alkohol sebanyak 250 μ l dan 750 μ l HCl 30 %. Campuran diinkubasi pada suhu 80 °C selama 8 menit. Campuran didiamkan pada suhu ruang hingga dingin, kemudian warna yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Absorbansi yang diperoleh dihitung untuk mendapatkan konsentrasi sukrosa dengan cara diplotkan dengan kurva standart sukrosa. Pembuatan kurva standart sukrosa dilakukan dengan mengukur absorbansi pada beberapa konsentrasi larutan sukrosa. Konsentrasi sukrosa yang digunakan adalah 0, 5, 10, 15, 20, 25, 50 μ g/ μ l. Kurva standart ditentukan dengan mengkorelasikan kedua faktor yaitu konsentrasi dan absorbansi yang diperoleh.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis PCR untuk Konfirmasi Keberadaan Overekspresi Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu

Pada penelitian ini diperoleh 28 *event* tebu transgenik (Lampiran D) yang dihasilkan dari perbanyakan secara stek batang. Tebu transgenik tersebut berasal dari *event* A, B1, B3, B4, C1, C2, D yang diperoleh peneliti sebelumnya (Wiyono, 2012). Hasil analisis PCR dari 28 tanaman tebu transgenik tersebut menunjukkan terdapat 13 tanaman positif transgenik *SoSUT1*, sedangkan 15 tanaman lainnya negatif. Tanaman tebu positif transgenik tersebut adalah *event* A3, A4, B1.1, B3.1, B4.4, C1.1, C1.2, C2.1, C2.2, C2.3, D1, D2 dan D3 yang ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA pada hasil analisis elektroforesis gel agarose dengan ukuran 470 bp. Ukuran 470 bp tersebut sesuai dengan ukuran DNA plasmid pAct-*SoSUT1* yang digunakan sebagai kontrol positif (Gambar 4.1). Munculnya Pita DNA tersebut menunjukkan bahwa pada DNA genom daun tebu yang menjadi *template* dalam analisis PCR, telah terinsersi gen target yaitu gen *SoSUT1*, dengan primer *hptII*. Penggunaan pasangan primer *hptII*-F/R dikarenakan pada peta konstruk plasmid pAct-*SoSUT1* terdapat *selectable* marker berupa gen *hptII* (Gambar 3.3.3), yang dapat mengamplifikasi DNA *hptII* dengan ukuran 470 bp.

Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa tidak semua tanaman yang dianalisis hasilnya positif transgenik *SoSUT1*. Terdapat 15 tanaman yang menunjukkan hasil negatif, yaitu tidak terdapat pita DNA dengan ukuran 470 bp pada gel agarosa (Lampiran E). Tanaman tersebut diduga mengalami *chimera*, yaitu penyebaran gen yang ditransformasikan tidak merata pada seluruh jaringan (Yasmeen *et al*, 2009). Dari Gambar 4.1 juga menunjukkan bahwa tanaman tebu kontrol (*wild type*) menunjukkan hasil negatif, hal tersebut dikarenakan pada tanaman kontrol tidak dilakukan transformasi, sehingga tidak memiliki gen *hptII*.

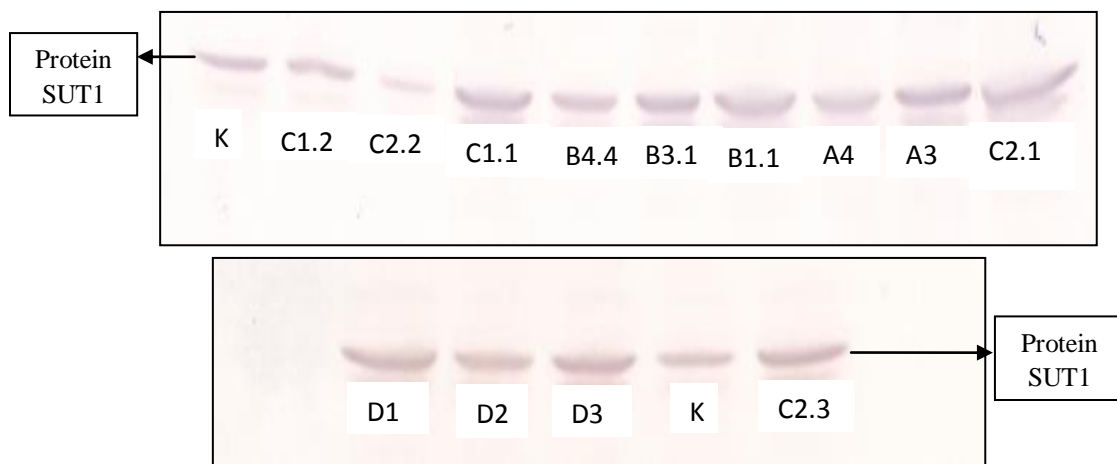


Gambar 4.1 Elektroforesis 1% gel agarose DNA hasil PCR dengan pasangan primer *hptII*-1F/1R dan *template* sampel DNA genom tanaman tebu. M: Marker, K⁺: DNA plasmid pAct, K⁻ : tanaman kontrol (*wild type*), dan *event* A sampai D merupakan tanaman transgenik overekspresi gen *SoSUT1*.

4.2 Analisis Western Blot Protein *Sucrose Transporter1* (SUT1)

Eksresi dari gen *SoSUT1* pada tingkat protein dapat dianalisis dengan *western blot* menggunakan antibodi spesifik, yaitu antibodi primer SUT1 untuk mendeteksi protein SUT1 pada tanaman. Analisis *western blot* dilakukan pada 13 tanaman yang positif transgenik setelah dianalisis dengan PCR dan tanaman kontrol sebagai pembanding. Pengukuran besar kandungan protein SUT1 pada tanaman transgenik dilihat secara kualitatif dan dibandingkan dengan tanaman kontrol. Berdasarkan hasil analisis *western blot* menunjukkan bahwa protein SUT1 terdeteksi

pada tanaman tebu transgenik maupun tebu kontrol (Gambar 4.2). Hal ini menunjukkan bahwa secara alami tanaman sudah memiliki gen *SUT1* endogen. Pada beberapa tanaman tebu transgenik yang dianalisis menghasilkan pita protein SUT1 lebih tebal dibandingkan tanaman tebu kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa gen *SoSUT1* yang ditransformasikan pada tanaman tebu dapat diekspresikan pada tingkat translasi membentuk protein, sehingga terjadi peningkatan kandungan protein SUT1.

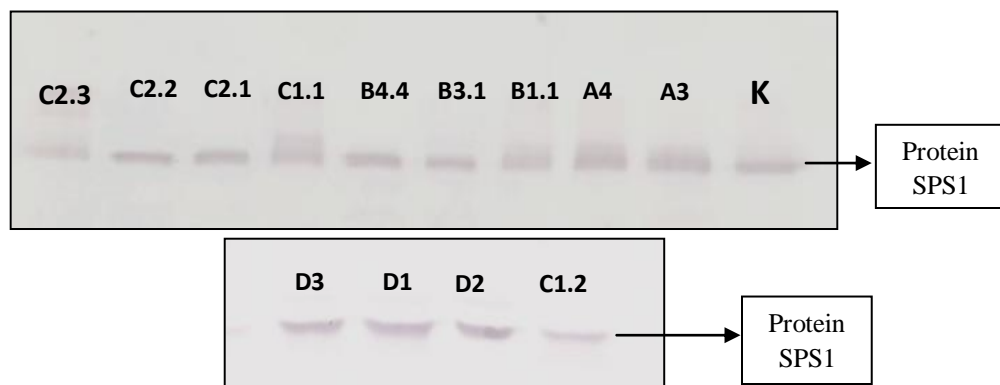


Gambar 4.2 Hasil analisis *western blot* protein SUT1 pada tanaman tebu transgenik overekspresi gen *SoSUT1* dan kontrol dengan konsentrasi 30 μg , menggunakan antibodi primer SUT1 dan antibodi 2 *Goat Anti-Rabbit IgG Phosphatase Conjugated*.

Tanaman transgenik yang mengalami peningkatan kandungan protein apabila dilihat secara kualitatif antara lain *event* C1.1, B1.1, B3.1, A3, C2.1, D1, D2, D3 dan C2.3 (Gambar 4.2). Hasil peningkatan protein SUT1 pada 9 tanaman transgenik tersebut diduga akibat hasil akumulasi ekspresi gen penyandi *SUT1* endogen dan *SUT1* eksogen, sehingga dikatakan mengalami overekspresi. Sebaliknya pada tanaman tebu kontrol yang tidak ditransformasi, protein yang dihasilkan hanya berasal dari ekspresi gen *SoSUT1* endogen saja. Peningkatan kandungan protein SUT1 pada tanaman tebu transgenik diharapkan dapat meningkatkan translokasi dan akumulasi sukrosa pada organ penyimpanan.

4.3 Analisis *Western Blot* Protein *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS1)

Hasil analisis *western blot* SPS1 ditampilkan pada Gambar 4.3. Analisis *Western blot* protein SPS1 bertujuan untuk melihat pengaruh gen *SoSUT1* yang telah diinsersikan pada genom tanaman tebu terhadap kandungan protein SPS1 pada tanaman transgenik tersebut. Untuk melihat pengaruh gen tersebut, dilakukan pengukuran kandungan protein SPS1 dengan *western blot* menggunakan antibodi spesifik SPS1.

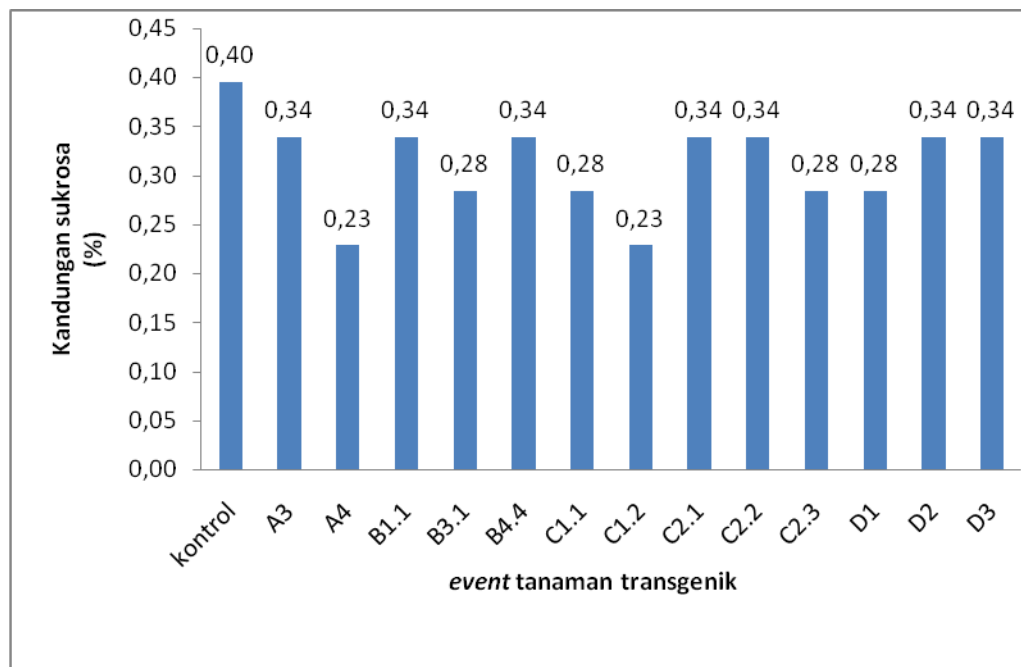


Gambar 4.3 Hasil analisis *western blot* protein SPS1 pada tanaman tebu transgenik dan kontrol dengan konsentrasi 20 μg , menggunakan antibodi primer SPS1 dan antibodi 2 *Goat Anti-Rabbit IgG Phosphatase Conjugated*.

Pada Gambar 4.3 menunjukkan bahwa protein SPS1 terekspresi pada tanaman kontrol maupun tanaman transgenik. Protein SPS1 yang tertransfer pada membran nitroselulosa dapat diikat oleh antibodi spesifik yaitu antibodi SPS1, sehingga protein SPS1 secara kualitatif dapat terdeteksi dalam bentuk pita. Pita yang terbentuk mengindikasikan besarnya kandungan protein SPS1. Kandungan protein SPS1 terdeteksi hampir sama antara tanaman transgenik *SUT1* dengan tanaman kontrol. Hal ini ditunjukkan dengan tebal pita protein dari *event* tanaman transgenik yang hampir sama dengan kontrol, yang berarti bahwa overekspresi gen *SUT1* tidak berpengaruh pada protein lainnya.

4.4 Analisis Kandungan Sukrosa Daun

Tujuan analisis sukrosa daun adalah untuk mengetahui besar kandungan sukrosa pada organ daun tebu, yang merupakan lokasi sintesis sukrosa. Analisis sukrosa daun dilakukan pada tanaman transgenik dan juga tanaman kontrol. Nilai persentase kandungan sukrosa disajikan pada Gambar 4.4. Pada gambar tersebut menunjukkan bahwa persentase kandungan sukrosa daun pada semua *event* tanaman transgenik lebih rendah apabila dibandingkan dengan tanaman kontrol. Tanaman kontrol memiliki persentase sebesar 0,4 %, sedangkan persentase dari tanaman transgenik berkisar antara 0,34 %, 0,28 % dan 0,23 %.



Gambar 4.4 Hasil analisis kandungan sukrosa pada organ daun.

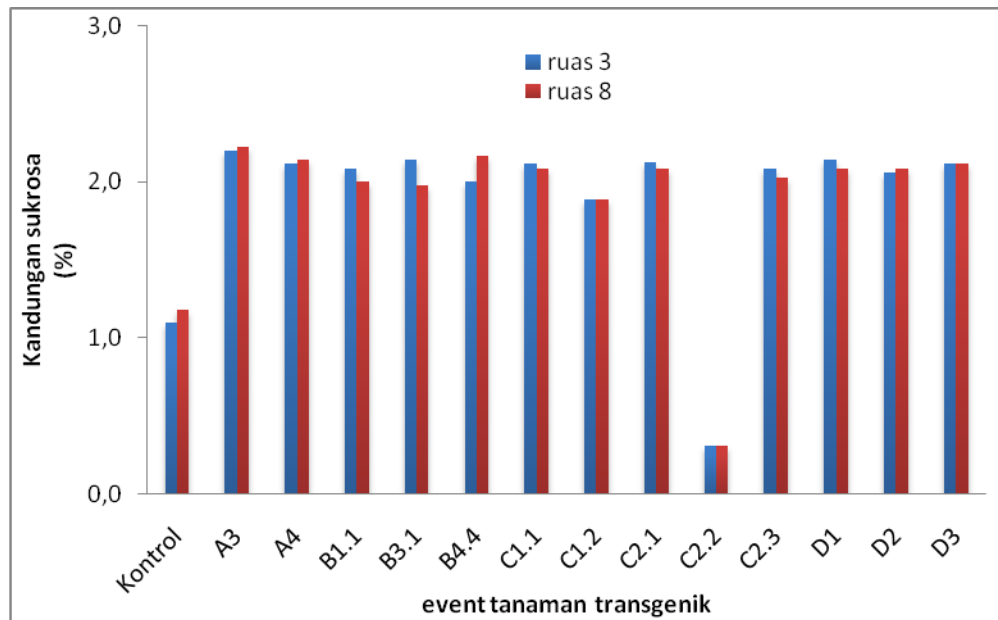
Tinggi rendahnya kandungan sukrosa di daun dipengaruhi oleh enzim SPS, invertase dan *Sucrose transporter*. SPS berfungsi mengkatalisis reaksi penggabungan antara *uridine diphosphate glucose* (UDPG) dan *fructose-6-phosphate* (F6P) sehingga membentuk sukrosa. Sukrosa yang dihasilkan sebagian dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim invertase (Jin *et al.*, 2009). Selain itu, sukrosa yang ada di

daun (*source*) juga ditransportasikan ke organ penyimpanan (*sink*) oleh protein translokator *Sucrose transporter*. Pada penelitian ini rendahnya sukrosa pada organ daun diduga diakibatkan oleh protein translokator sukrosa. Hal tersebut didukung oleh data hasil analisis *western blot* protein SUT1, bahwa kandungan protein lebih tinggi pada tanaman transgenik apabila dibandingkan dengan kontrol. Overekspresi protein SUT1 pada tanaman tebu transgenik tersebut diduga menyebabkan sukrosa pada daun menurun, karena sebagian telah tertransport ke organ penyimpanan (*sink*).

4.5 Analisis Kandungan Sukrosa Batang

Hasil analisis sukrosa batang ditunjukkan pada Gambar 4.5. Sukrosa merupakan gula yang menjadi produk utama dari proses fotosintesis dan ditranslokasikan dari jaringan asal (*source*) melalui floem menuju jaringan penyimpanan (*sink*). Analisis sukrosa batang bertujuan untuk mengetahui besar kandungan sukrosa batang yang merupakan organ penyimpanan dan hasil akhir dari proses akumulasi sukrosa pada tanaman tebu.

Analisis sukrosa batang dilakukan pada ruas 3 dan ruas 8 (dihitung dari ruas bawah) dengan tujuan untuk membandingkan kandungan sukrosa pada ruas bawah dan ruas atas. Persentase kandungan sukrosa batang pada ruas 3 dan 8 pada semua *event* tanaman transgenik maupun kontrol menunjukkan hasil yang hampir sama, hal tersebut menunjukkan bahwa tanaman tebu dikatakan telah masak. Indrawanto *et al.* (2010) menyatakan bahwa proses pemasakan tebu berjalan dari ruas bawah ke ruas pucuk. Pada tebu yang belum masak, kadar gula pada ruas atas lebih rendah, dikarenakan sukrosa digunakan untuk pertumbuhan. Namun pada hasil penelitian ini persentase kandungan sukrosa ruas ke 8 hampir sama dengan ruas ke 3, sehingga ini menunjukkan bahwa tanaman tebu telah mengalami pemasakan sampai ruas ke 8.



Gambar 4.5 Hasil analisis kandungan sukrosa pada batang tebu ruas ke 3 dan ke 8.

Gambar 4.5 juga menunjukkan bahwa persentase kandungan sukrosa batang pada *event* tanaman transgenik mengalami peningkatan dibandingkan tanaman tebu kontrol. Persentase kandungan sukrosa pada tanaman kontrol sebesar 1,1 % pada ruas ke 3, dan 1,2 % pada ruas ke 8. *Event* yang mengalami peningkatan persentase kandungan sukrosa paling tinggi adalah *event* A3, dengan persentase pada ruas 3 dan ruas 8 adalah sama yaitu sebesar 2,2 %.

Hasil analisis *western blot* protein SPS1 menunjukkan ketebalan pita protein hampir sama antara tanaman transgenik dan kontrol. Enzim SPS1 berperan dalam biosintesis sukrosa di daun, namun kandungan sukrosa di daun tanaman transgenik lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Hal ini mengindikasikan bahwa terdapat peran protein *sucrose transporter* yang mentranslokasi sukrosa dari organ daun (*source*) ke batang (*sink*), yang dibuktikan juga dengan kandungan sukrosa pada batang tanaman transgenik lebih besar daripada kontrol. Apabila dikorelasikan dengan hasil analisis *western blot* protein SUT1, *event* A3 memiliki pita protein lebih

tebal dibandingkan kontrol, yang berarti bahwa kandungan protein SUT1 lebih besar, yang menunjukkan adanya overekspresi gen *SoSUT1*.

Khusus untuk tanaman tebu *event C2.2* memiliki persentase kandungan sukrosa batang yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol, yaitu 0,3 % pada ruas 3 dan ruas 8. Tanaman transgenik *event C2.2* diduga terinfeksi hama kutu bulu putih (*Ceratovacuna lanigera*). Hal ini dibuktikan dengan munculnya koloni berwarna putih di antara pelepah dan batang. Joshi *et al.* (2004) melaporkan bahwa hama ini menyerap sukrosa di antara pelepah dan batang sehingga hasil fotosintesis tidak dapat ditranslokasikan ke organ penyimpanan (*sink*).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa 13 tanaman tebu terdeteksi positif transgenik *SoSUT1* dengan ukuran 470 bp. Hasil analisis *western blot* protein *sucrose transporter* (SUT1) menunjukkan terdapat 9 tanaman yang mengalami peningkatan kandungan protein, ditandai dengan tebalnya pita protein dibandingkan dengan kontrol. Analisis protein *sucrose phosphate synthase* (SPS1) menunjukkan bahwa tanaman transgenik memiliki kandungan protein yang cenderung sama dengan kontrol. Hasil analisis sukrosa daun menunjukkan bahwa pada semua *event* tanaman transgenik memiliki kandungan sukrosa lebih rendah dibandingkan tebu kontrol, sedangkan hasil analisis sukrosa batang mengalami peningkatan pada semua *event*.

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut mengenai karakterisasi tanaman transgenik, perlu dilakukan uji aktivitas enzim invertase yang mempunyai fungsi dalam pendegradasi sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa.

DAFTAR PUSTAKA

Buku

- Anderson, J. W. and Beardall, J. 1991. *Molecular Activities of Plant Cells. An Introduction to Plant Biochemistry*. Australia: Blackwell Scientific publications.
- Brown, T. A. 1995. *Gene Cloning an Introduction*. Great Britain: Alden Press, Oxford.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem and R. L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of plant physiologist.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, dan L. G. Mitchell. 2000. *Biologi*. Jakarta: Erlangga.
- Indrawanto C., Purwono, Siswanto, Syakir M., Rumini W. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Tebu*. Jakarta: ESKA Media.
- Lakitan, B. 2010. Dasar- dasar fisiologi tumbuhan. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada.
- Sambrook *et al.*, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Tidak Diterbitkan

- Holifah, N. 2012. Pembuatan Antibody Poliklonal Protein *Sucrose Transporter* Menggunakan Antigen Protein Rekombinan SUT1 dari Tanaman Tebu (*saccharum officinarum* L.). *Skripsi*. FMIPA Universitas Jember.
- 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*.

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

Terbitan Berkala

Aoki, N., T. Hirose., G. N. Scofield., P.R. Whitfeld and R. T. Furbank. 2003. The Sucrose Transporter Gene Family in Rice. *Plant Cell Physiol.* Vol. 44:223–232.

Ayre, B. 2011. Membrane-Transport Systems for Sucrose in Relation to Whole-Plant Carbon Partitioning. *Molecular Plant.* Vol. 4:377–394.

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.

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.

Echeverria, E., Salvucci, P. Gonzales, G. Paris and G. Salerno. 1997. Physical and kinetic evidence for an association between sucrose phosphate synthase and sucrose phosphate phosphatase. *Plant physiol.* Vol. 115: 223-227.

Hackel, A., N. Schauer, F. Carrari, A. R. Fernie, B. Grimm and C. Kuhn. 2006. Sucrose transporter LeSUT1 and LeSUT2 inhibition affects tomato fruit development in different ways. *Plant Journal.* Vol. 45: 180-192.

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.

Jin, Y., An Ni, D., and Ruan, Y. L. 2009. Posttranlational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level. *The Plant Cell.* Vol. 21: 2072-2089.

Joshi, S., Viraktamath, C. A. 2004. The sugarcane woolly aphid, *Ceratovacunan lanigera* Zehntner (Hemiptera: Aphididae): its biology, pest status and control. *Current Science.* VOL. 87: 3.

- Koch, K. E. 1996. Carbohydrate Modulated Gene Expression in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* Vol. 47: 509-540.
- 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.
- Kuhn, C., and Christopher. 2010. Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology.* Vol. 13:1–11.
- Lalonde, M., M. Tegeder, W. Throne-holst, B. Frommer, J. W. Patrick.. 2003. Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell and Environment.* Vol. 26:37–56.
- Lemoine, R. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta.* Vol. 1465:246-262.
- Rae A. L., J. M. Perroux, C. P. L. Grof. 2005. Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem: a potential role for the ShSUT1 sucrose transporter. *Planta.* Vol. 220: 817–825.
- 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.
- Reismeyer, 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.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., dan Frommer. W. B. 1994. Evidence for An Essential Role of The Sucrose Transporter in Phloem Loading and Assimilate Partitioning. *The EMBO Journal.* Vol. 13: 1-7.
- Sauer, N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters.* Vol. 581: 2309–2317.
- Shiratake, K. 2007. Genetics Of Sucrose Transporter in Plants. *Genes genomes and Genomics Global Science Books.* Vol. 1(1): 73-80.
- Truernit, E. 2001. Plant physiology: The importance of sucrose transporters. *Current Biology.* Vol. 11:169–R171.

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

Yasmeen, A., B. Mirza , S. Inayatullah, N. Safdar, M. Jamil, S. Ali and M. F. Choudhry. 2009. In Planta Transformation of Tomato. *Plant mol biol rep* 27: 20-28.

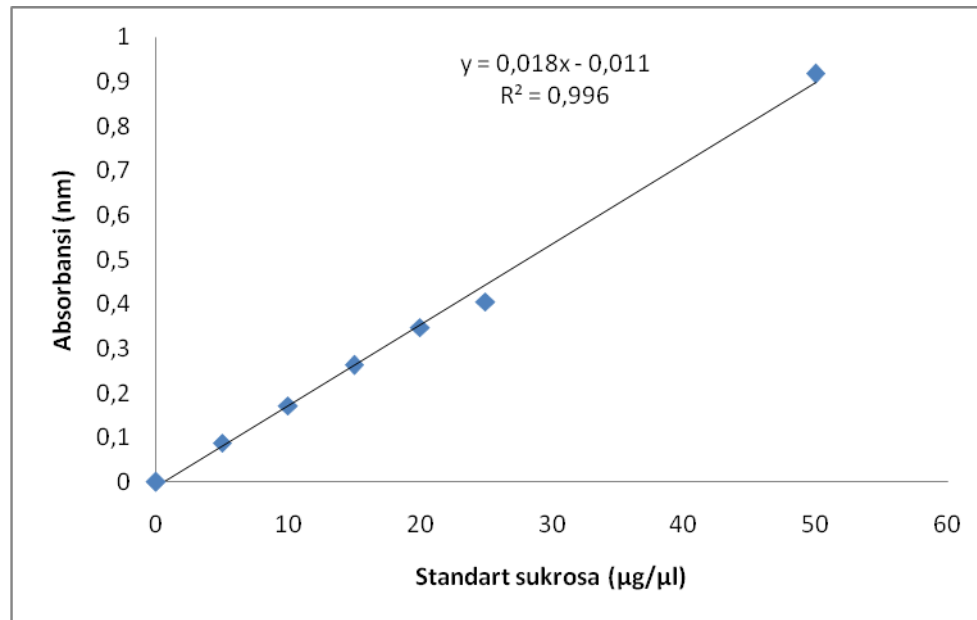
Zheng, K., Huang, N., Bennet P., and Khush G. S. 1995. PCR Based Marker Assisted Selection in Rice Breeding. IRRI news lett 2.

Internet

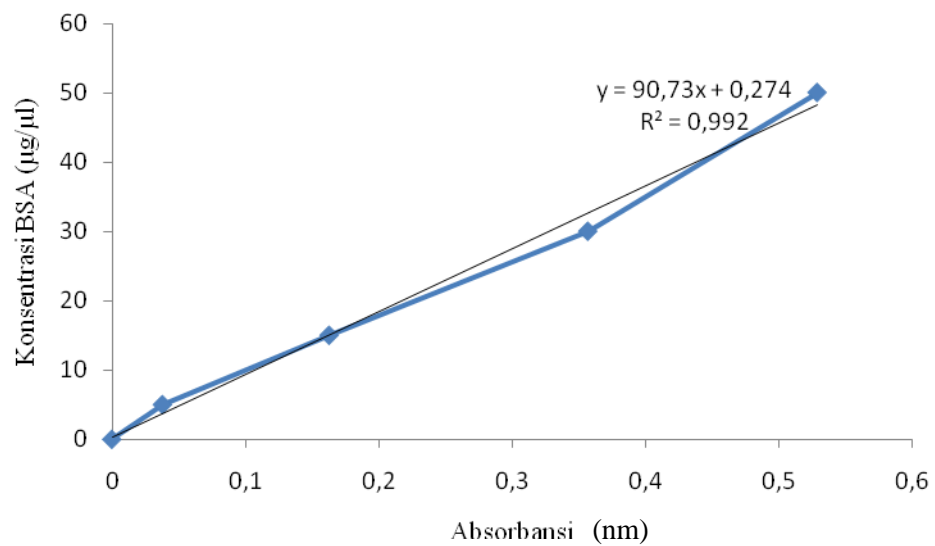
Harrison, Karl. 2012. *Sucrose*. Online (<http://www.chem.ox.ac.uk/mom/Carbohydrates/sucrose.html>). Diakses tanggal 30 Maret 2012.

Lampiran A. Kurva Standart

A.1 Kurva Standart Sukrosa



A.2 Kurva Standart BSA



Lampiran B. Kandungan Sukrosa

B.1 Kandungan Sukrosa Daun

<i>Event</i>	Absorbansi	Kandungan sukrosa	
		($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	A (%)
Kontrol	0,70	4,0	0,40
A3	0,63	3,4	0,34
A4	0,44	2,3	0,23
B1	0,62	3,4	0,34
B3	0,50	2,8	0,28
B4	0,60	3,4	0,34
C1.1	0,52	2,8	0,28
C1.2	0,45	2,3	0,23
C2.1	0,60	3,4	0,34
C2.2	0,63	3,4	0,34
C2.3	0,54	2,8	0,28
D1	0,52	2,8	0,28
D2	0,59	3,4	0,34
D3	0,62	3,4	0,34

Keterangan :

A: kandungan sukrosa (%)

B.2 Kandungan Sukrosa Batang

<i>Event</i>	Ruas	Absorbansi	Kandungan sukrosa	
			($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	A (%)
A3	3	0,78	22,0	2,2
	8	0,79	22,3	2,2
A4	3	0,75	21,1	2,1
	8	0,76	21,4	2,1
B1	3	0,74	20,9	2,1
	8	0,71	20,0	2,0
B3	3	0,76	21,4	2,1
	8	0,70	19,8	2,0
B4	3	0,71	20,0	2,0
	8	0,77	21,7	2,2
C1.1	3	0,75	21,1	2,1
	8	0,74	20,9	2,1
C1.2	3	0,67	18,9	1,9
	8	0,67	18,9	1,9
C2.1	3	0,75	21,3	2,1
	8	0,74	20,9	2,1
C2.2	3	0,1	3,1	0,3
	8	0,1	3,1	0,3
C2.3	3	0,74	20,9	2,1
	8	0,72	20,3	2,0
D1	3	0,76	21,4	2,1
	8	0,74	20,9	2,1
D2	3	0,73	20,6	2,1
	8	0,74	20,9	2,1
D3	3	0,75	21,1	2,1
	8	0,75	21,1	2,1
Kontrol	3	0,5	14,2	1,4
	8	0,413	11,8	1,2

Keterangan :

A: kandungan sukrosa (%)

Lampiran C. Komposisi Buffer

Buffer	Bahan	Konsentrasi
<i>Buffer</i> Ekstraksi DNA pH 8,0	Tris base	100 mM
	EDTA	50 mM
	NaCl	500 mM
<i>Buffer</i> Tris EDTA	Tris base	10 mM
	EDTA	1 mM
<i>Buffer</i> TBE	Tris Base	89 mM
	Boric Acid	89 mM
	Titriplex	0,5 M
<i>Buffer</i> Ekstraksi Enzim SPS	MOPS-NaOH (pH 7,5)	50 mM
	MgCl ₂ .6H ₂ O	10 mM
	EDTA	1 mM
	DTT	2,5 mM
	PMSF	10 µM
<i>Buffer</i> Ekstraksi (solubilisasi) Protein SUT	Tris-base pH 8,5	50 mM
	EDTA	1 mM
	SDS	2 %
	Sucrose	30 %
	DTT	5 mM
<i>Lower Gell Buffer</i>	Tris-Cl pH 8,80	1,5 M
	SDS	0,4 %
<i>Upper Gell Buffer</i>	Tris-Cl pH 6,80	0,5 M
	SDS	0,4 %
<i>Buffer Loading/ Sampel</i>	Tris-Cl pH 6,8	0,5 M
	SDS	10 %
	Gliserol	10 %
	<i>Bromophenol Blue</i>	0,5 %
<i>Buffer</i> Elektroda SDS-PAGE	Glycine	192 mM
	Tris base	25 mM
	SDS	0,1 %
<i>Buffer</i> Elektroda <i>Western Blot</i>	Tris Base	25 mM
	Glycine	19,2 mM
	Methanol	20 %
<i>Buffer</i> TBS (<i>Tris Buffered Saline</i>)	Tris base	25 mM
	NaCl	150 mM
	KCl	3 mM
<i>Buffer</i> Alkalin Pospat pH 9,5	Tris base	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM

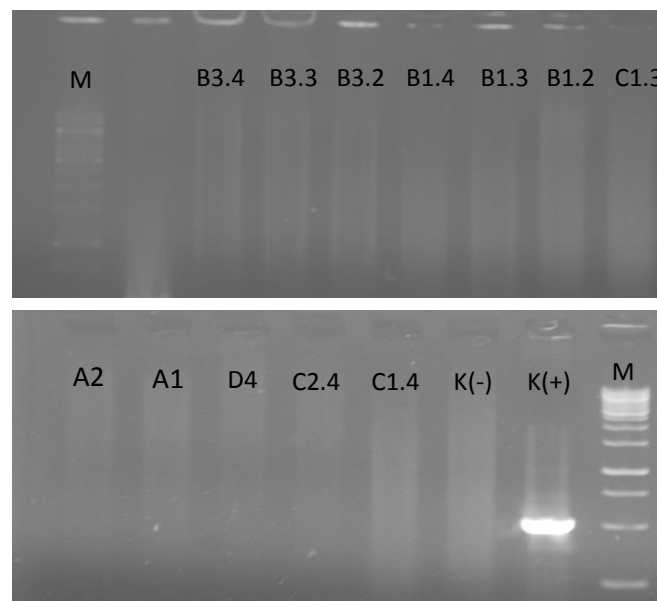
Lampiran D. *Event* Tanaman Transgenik

Indukan	Hasil Perbanyakan (tanaman yang dianalisis)			
A	A1	A2	A3*	A4*
B1	B1.1*	B1.2	B1.3	B1.4
B3	B3.1*	B3.2	B3.3	B3.4
B4	B4.1	B4.2	B4.3	B4.4*
C1	C1.1*	C1.2*	C1.3	C1.4
C2	C2.1*	C2.2*	C2.3*	C2.4
D	D1*	D2*	D3*	D4

Keterangan :

Tanda bintang (*) : 13 tanaman positif transgenik overekspresi gen *SoSUT1*

Lampiran E. Tanaman yang Menunjukkan Hasil Negatif



Keterangan:

M : marker DNA,

K(+) : DNA plasmid pAct-*SoSUT1*,

K(-) : tanaman non transforman,

Event A2, A1,D4, C2.4, C1.4, C1.3, B1.2, B1.3, B1.4, B3.2, B3.3, B3.4: tanaman yang menunjukkan hasil negatif (tidak terdapat pita DNA).