



**SELEKSI DAN UJI STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU PRODUK  
REKAYASA GENETIKA (PRG) OVEREKSPRESI GEN *SoSUTI*  
GENERASI KEDUA SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

Oleh

**Qoyimatul Nikmah  
NIM 101810401023**

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



**SELEKSI DAN UJI STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU PRODUK  
REKAYASA GENETIKA (PRG) OVEREKSPRESI GEN *SoSUTI*  
GENERASI KEDUA SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Qoyimatul Nikmah  
NIM 101810401023**

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

### **PERSEMBAHAN**

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang serta Nabi Muhammad S.A.W junjungan seluruh umat manusia, kupersembahkan skripsi ini kepada:

1. Ibunda Ismunidah dan Ayahanda Palal, serta seluruh keluarga besar yang begitu banyak memberikan dukungan, nasehat dan do'a dalam menuntut ilmu;
2. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTTO**

“Sesungguhnya ilmu itu didapat dengan belajar.

Dan sabar itu didapat dengan membiasakan diri untuk bersabar.

Barangsiapa yang berusaha mencari kebaikan maka ia akan diberi. Dan barangsiapa yang berlindung diri dari kejahatan maka ia akan dilindungi dari kejahatan.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> HR. ad-Daruquthni dan al-Khathib dalam *Shahih al-Jami'*

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama: Qoyimatul Nikmah

NIM : 101810401023

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: **“Seleksi dan Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekpresi Gen *SoSUT1* Generasi Kedua secara *In Vitro*”** adalah benar-benar karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh MP3EI tahun 2014 dengan peneliti utama 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 dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Oktober 2015  
Yang menyatakan,

Qoyimatul Nikmah  
NIM 101810401023

**SKRIPSI**

**SELEKSI DAN UJI STABILITAS GENETIK TANAMAN TEBU PRODUK  
REKAYASA GENETIKA (PRG) OVEREKSPRESI GEN *SoSUT1*  
GENERASI KEDUA SECARA *IN VITRO***

Oleh

**Qoyimatul Nikmah  
NIM 101810401023**

**Pembimbing**

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

**Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP.**

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Seleksi dan Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekpresi Gen *SoSUT1* Generasi Kedua Secara *In Vitro*” 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,

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc  
NIP 19551022198212001

Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP  
NIP 196504251990022002

Anggota

Penguji I,

Penguji II,

Dra. Dwi Setyati, M.Si  
NIP 196404171991032001

Dr. Rer. nat. Kartika Senjarini  
NIP 197509132000032001

Mengesahkan  
Dekan,

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



## RINGKASAN

**Seleksi dan Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekspresi Gen *SoSUT1* Generasi Kedua Secara *In Vitro*:** Qoyimatul Nikmah, 101810401023; 2015, 32 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tebu produk rekayasa genetika (PRG) *SoSUT1* merupakan tebu hasil transformasi genetik overekspresi gen *SoSUT1* ke dalam sel tanaman tebu. Menurut beberapa referensi, tanaman memiliki stabilitas genetik pada generasi ketiga, sedangkan tanaman tebu PRG hasil transformasi genetik pada generasi ke satu masih memiliki sifat sel yang heterogen, sehingga perlu dilakukan stabilitas genetik. Stabilitas genetik pada tanaman dapat dilakukan dengan metode konvensional, namun metode ini sulit dilakukan karena biji tebu berukuran sangat kecil dan membutuhkan waktu yang lama untuk mendapatkannya. Oleh karena itu, dilakukan seleksi dan uji stabilitas genetik secara *In Vitro* melalui kultur jaringan.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biomolekuler dan Bioteknologi *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember pada bulan Juli 2014 sampai bulan Juli 2015. Dalam penelitian ini dilakukan beberapa tahapan yakni pertunasan *eksplant* dari tunas lateral dan tunas apikal tanaman tebu, mikropropagasi pada media MS+glutamin  $100 \text{ mgL}^{-1}$ , dan seleksi pada media antibiotik *hygromycin* sebanyak 3 siklus, setiap siklus masing-masing 3 minggu. Tanaman yang lolos seleksi dilakukan konfirmasi DNA melalui analisa PCR untuk mendeteksi keberadaan gen *SoSUT1* sehingga diketahui stabilitas genetiknya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman tebu PRG *SoSUT1* yang lolos seleksi menggunakan antibiotik *hygromycin* berjumlah 5 *event*, yaitu *event* T1.1,



T1.4, T2.1, T2.2, dan T3.2. Dari hasil PCR sebagian besar *plantlet* tebu PRG *SoSUT1* telah stabil dan gen *hpt II* telah diturunkan pada *plantlet* yang diperbanyak secara *In Vitro*. Tanaman tebu PRG *SoSUT1* yang positif stabil genetiknya berjumlah 26 tanaman dengan munculnya band DNA dari gen *hpt II* dengan ukuran 490 bp dan 6 tanaman masih heterogen karena tidak menunjukkan band DNA pada analisa PCR, hal ini diduga tanaman tebu tersebut mengalami *escape*.



## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Seleksi dan Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekpresi Gen *SoSUT1* Secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

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

1. Prof.Dr.Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc, selaku dosen pembimbing utama dan Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP. selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, saran dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
2. Dra. Dwi Setyati, M.Si dan Dr. Rer nat. Kartika Senjarini selaku dosen penguji atas masukan dan saran guna kesempurnaan penulisan skripsi ini;
3. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Seluruh keluarga besar yang telah begitu banyak memberikan kasih sayang, doa, dan dukungan untuk menuntut ilmu;
5. saudara-saudara tercinta pemakmur masjid Al-Hikmah Universitas Jember, Remas Nurul Haq, Remas Nurul Muttaqin yang telah memberikan ukhwah terindah dalam perjalanan hijrah dan dakwah;
6. Purnama Oktaviandari, S.P., M.P, Wimbuh Tri Widodo, S.Si, Arsetyo Rahardianto S.Si, Ana Sofyana, S.P, Eni Kusriani, S.Si dan Novita Berliana G, S.Si atas pengarahan dan bimbingan dalam menyelesaikan penelitian ini;

7. rekan-rekan kerja di Laboratorium CDAST Universitas Jember atas seluruh perhatian, dukungan dan bantuan dalam menyelesaikan penelitian ini;
8. keluarga besar biologi 2010 “BOLU” Fakultas MIPA yang telah memberi warna hidup selama kuliah;
9. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu dan memberi dukungan selama berjuang dikampus.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan karya ilmiah tertulis ini masih banyak kekurangan, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi penyempurnaan karya ilmiah tertulis ini. Semoga karya ilmiah tertulis ini bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi pengembangan ilmu biologi.

Jember, Oktober 2015

Penulis

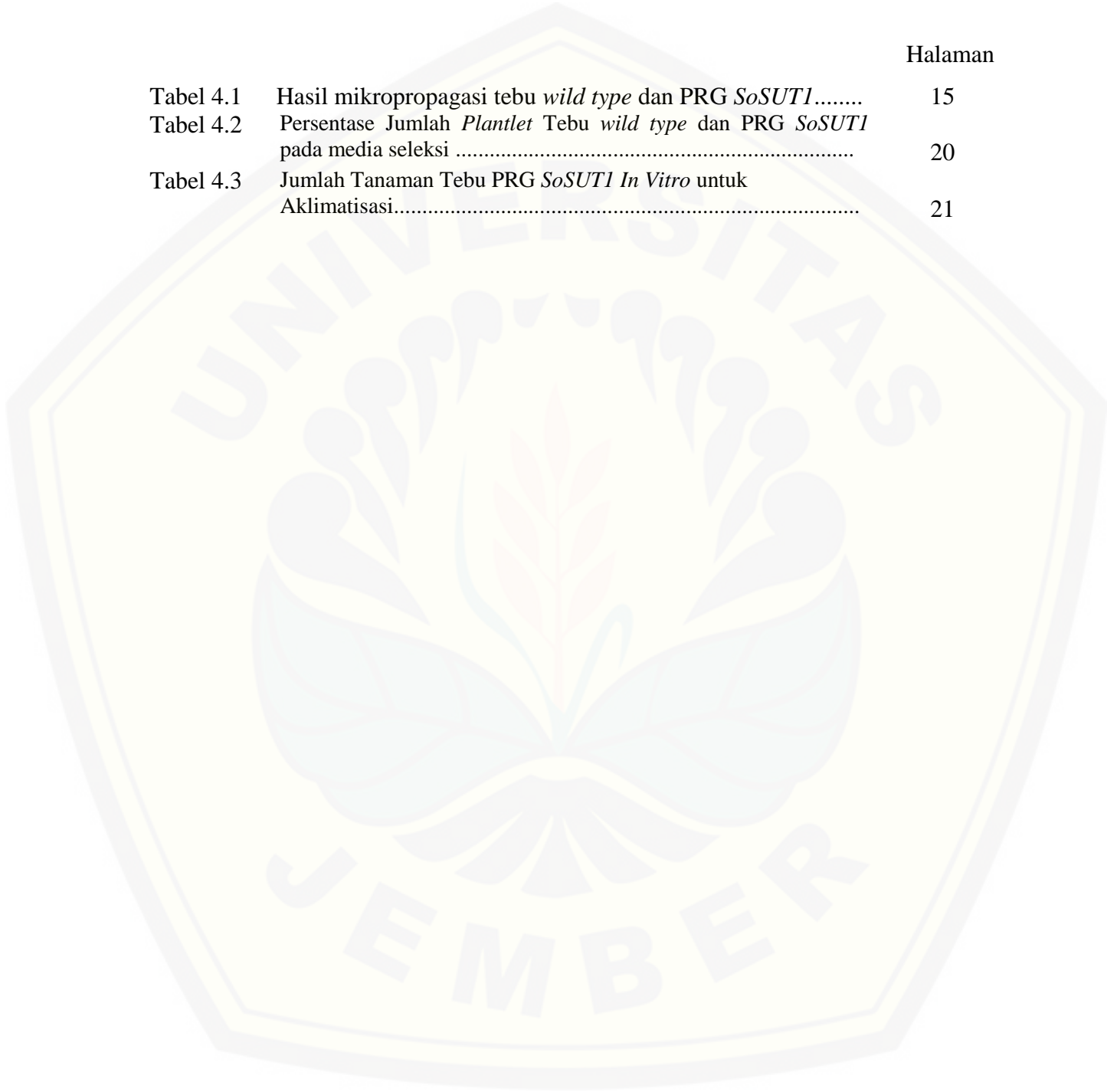
## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xvii
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Perumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekspresi Gen <i>SoSUTI</i></b> .....	4
<b>2.2 Kultur <i>In Vitro</i> Tebu</b> .....	5
<b>2.3 Seleksi dan Uji Stabilitas Genetik Tebu PRG</b> .....	7
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	9

<b>3.1</b>	<b>Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2</b>	<b>Alat dan Bahan .....</b>	<b>9</b>
<b>3.3</b>	<b>Metode Percobaan .....</b>	<b>9</b>
3.3.1	Pembuatan Media Pertumbuhan.....	9
3.3.2	Persiapan dan Sterilisasi <i>Eksplant</i> .....	11
3.3.3	Regenerasi dan mikropropagasi <i>Plantlet</i> Tebu.....	11
3.3.4	Seleksi Tebu PRG.....	11
3.3.5	Persentase Seleksi.....	11
3.3.6	Aklimatisasi Tanaman.....	12
3.3.7	Isolasi DNA Genom.....	12
3.3.6	Analisis PCR .....	13
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1</b>	<b>Mikropropagasi Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) <i>SoSUT1</i> secara <i>In Vitro</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2</b>	<b>Seleksi <i>Plantlet</i> Tebu PRG <i>SoSUT1</i> dan <i>wild type</i> Menggunakan Antibiotik <i>Hygromycin</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>4.3</b>	<b>Aklimatisasi <i>Plantlet</i> Tebu PRG <i>SoSUT1</i> dari <i>In Vitro</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>4.4</b>	<b>Analisis PCR Tanaman Tebu PRG <i>SoSUT1</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>BAB 5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Kesimpulan .....</b>	<b>25</b>
<b>5.2</b>	<b>Saran .....</b>	<b>25</b>
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>26</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>29</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil mikropropagasi tebu <i>wild type</i> dan PRG <i>SoSUT1</i> .....	15
Tabel 4.2 Persentase Jumlah <i>Plantlet</i> Tebu <i>wild type</i> dan PRG <i>SoSUT1</i> pada media seleksi .....	20
Tabel 4.3 Jumlah Tanaman Tebu PRG <i>SoSUT1 In Vitro</i> untuk Aklimatisasi.....	21



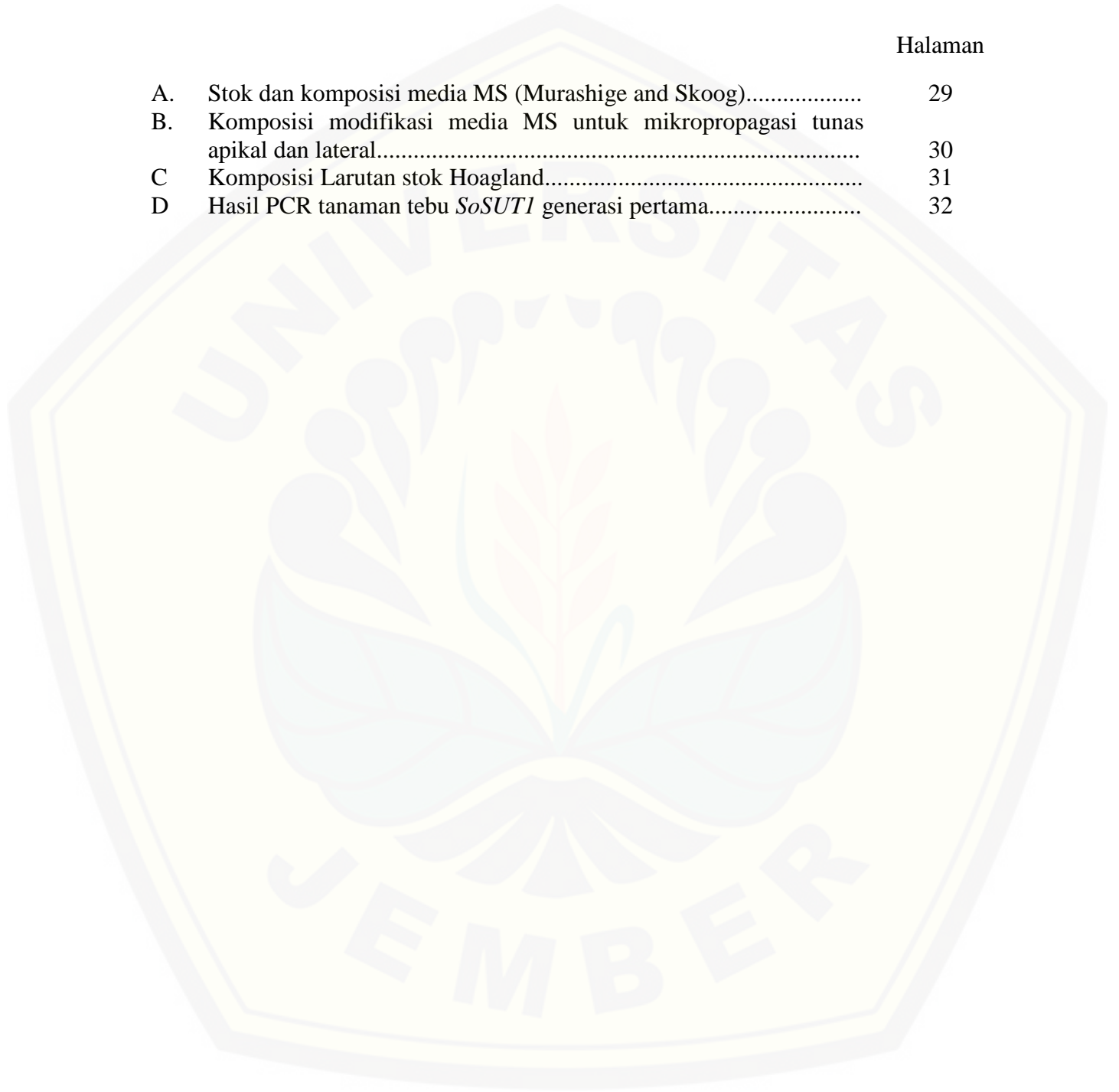



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Dendogram Filogenetik Protein <i>sucrose transporter</i> pada Tanaman Dikotil dan Monokotil.....	5
Gambar 2.2 Konstruk plasmid <i>pAct-SoSUT1</i> .....	8
Gambar 4.1 Kultur tebu dari tunas apikal pada umur yang berbeda.....	16
Gambar 4.2 Kultur tebu dari tunas lateral pada umur yang berbeda.....	17
Gambar 4.3 <i>Plantlet</i> tebu yang digunakan untuk tahap seleksi.....	18
Gambar 4.4 Perbandingan <i>plantlet</i> tebu PRG <i>SoSUT1</i> dan tebu <i>wild type</i> yang tumbuh pada seleksi antibiotik <i>hygromycin</i> .....	19
Gambar 4.5 Aklimatisasi tanaman tebu PRG <i>SoSUT1</i> .....	22
Gambar 4.6 Elektroforesis DNA hasil PCR.....	23

**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
A. Stok dan komposisi media MS (Murashige and Skoog).....	29
B. Komposisi modifikasi media MS untuk mikropropagasi tunas apikal dan lateral.....	30
C. Komposisi Larutan stok Hoagland.....	31
D. Hasil PCR tanaman tebu <i>SoSUTI</i> generasi pertama.....	32



**DAFTAR SINGKATAN**

BA	: <i>Benzil adenin</i>
bp	: Basepair
cDNA	: <i>complementary Deoxyribose Nucleic Acid</i>
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i>
GA	: <i>Gibberellic acid</i>
<i>hpt II</i>	: <i>Hygromycin Phosphotransferase II</i>
LAF	: <i>Laminar Air Flow</i>
LB	: Left Border
MS	: <i>Murashige and Skoog</i>
nos	: <i>Nopaline synthase gene</i>
<i>pAct-SoSUT1</i>	: <i>pActin Saccharum officinarum Sucrose Transporter 1</i>
PCI	: <i>Phenol Chloroform Isoamylalcohol</i>
PCR	: <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PRG	: Produk Rekayasa Genetika
RB	: Right Border
RNase	: <i>Ribonuklease</i>
SDS	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
TE	: <i>tris-EDTA</i>
UV	: <i>Ultra Violet</i>

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tebu produk rekayasa genetika (PRG) *SoSUT1* merupakan tebu hasil transformasi genetik overekspresi gen *SoSUT1* ke dalam sel tanaman tebu. Transformasi gen *SoSUT1* ke tanaman tebu dilakukan dengan cara menginsersikan plasmid *pAct* yang mengandung gen target *SoSUT1* melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Gen *SoSUT1* merupakan cDNA penyandi protein *sucrose transporter* (SUT). Protein SUT adalah protein pentransport sukrosa yang disandikan oleh gen yang disebut sebagai gen *SUT* (Aoki *et al.*, 2003). Tebu PRG *SoSUT1* menjadi tanaman transgenik yang memiliki translokasi sukrosa yang tinggi karena ekspresi dari gen *SUT* dapat berpengaruh terhadap aktivitas sukrosa yang ditranslokasikan dari jaringan asal (*source*) menuju jaringan penyimpanan (*sink*) melalui simplas atau apoplas (Shiratake, 2007; Truernit, 2001)..

Tanaman PRG dapat diketahui kestabilan insersi gennya dengan melakukan uji stabilitas genetik (Christou *et al.*, 1992). Menurut beberapa referensi, tanaman PRG secara genetik dapat stabil pada generasi keempat hingga generasi keenam (Hie dan Komari, 1996), (Wu, *et al.*, 2006). Tanaman PRG juga memiliki sifat yang heterogen pada generasi pertama (T1) (Gilbert *et al.*, (2009), termasuk tebu PRG *SoSUT1* (tidak semua tanaman mengandung gen target *SoSUT1*), sehingga tanaman perlu dilakukan stabilitas genetik untuk mendapatkan tebu yang homogen (semua tanaman mengandung gen target *SoSUT1*).

Stabilitas genetik pada tanaman PRG dapat dilakukan dengan cara penyerbukan sendiri (*selfing*) hingga generasi ketiga. Metode ini merupakan metode konvensional karena tebu merupakan tanaman yang bisa menyerbuk sendiri. Akan tetapi, biji tebu memiliki ukuran sangat kecil sehingga sulit berkecambah dan untuk mendapatkan biji membutuhkan waktu lebih dari satu tahun. Tanaman tebu juga sulit

berbunga pada daerah yang suhunya  $>25^{\circ}\text{C}$ . Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan metode seleksi secara *in vitro* melalui kultur jaringan.

Metode *in vitro* dilakukan untuk perbanyak (mikropropagasi) tanaman. Keuntungan utama dari metode *in vitro* yakni memperoleh tanaman dalam waktu yang singkat dan berjumlah banyak, bebas dari patogen dan memiliki sifat yang sama dengan induknya (Divya dan Sharma, 2012). Seleksi tanaman secara *in vitro* dapat menggunakan gen penyeleksi (*selectable marker*). Gen penyeleksi merupakan gen untuk menyeleksi atau membedakan sel, jaringan, organ atau tanaman yang transforman dari tanaman non transforman (Rahmawati, 2003).

Gen penyeleksi pada tebu PRG *SoSUT1* adalah gen *hygromycin phosphotransferase II (hpt II)* yang memiliki resistensi terhadap antibiotik *hygromycin*. Tebu PRG *SoSUT1* yang hidup pada media antibiotik *hygromycin* menandakan bahwa tanaman diduga memiliki stabilitas genetik. Keberhasilan uji stabilitas genetik ditentukan oleh terintegrasinya gen target ke dalam genom tanaman yang dapat dikonfirmasi melalui analisis PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Adanya band DNA dari gen *hptII* menunjukkan bahwa tanaman tebu memiliki stabilitas gen *SoSUT1*. Berdasarkan latar belakang tersebut, seleksi dan uji stabilitas genetik tebu PRG *SoSUT1* pada generasi kedua secara *in vitro* akan dikaji lebih lanjut.

## 1.2 Perumusan Masalah

Tebu PRG *SoSUT1* merupakan tanaman hasil transformasi genetik yang memiliki translokasi sukrosa yang tinggi, akan tetapi keberadaan gen *SoSUT1* pada generasi kedua belum diuji. Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Apakah keberadaan gen *SoSUT1* stabil pada tanaman tebu PRG generasi kedua?
2. Apakah tanaman tebu PRG *SoSUT1* generasi kedua mampu bertahan pada media seleksi secara *in vitro*?
3. Apakah tebu PRG *SoSUT1* generasi kedua telah memiliki gen yang stabil ketika dikonfirmasi menggunakan analisis PCR?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menyeleksi tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* generasi kedua dan mengkonfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* menggunakan analisis PCR.

### 1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait stabilitas genetik dari tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* pada generasi selanjutnya menggunakan metode *in vitro*.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

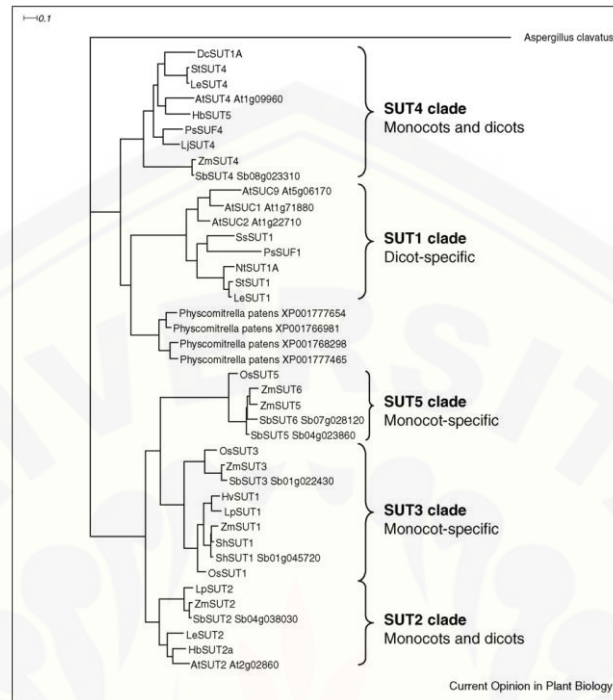
### 2.1 Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekspresi Gen *SoSUT1*

Tebu PRG overekspresi Gen *SoSUT1* merupakan tebu PRG yang telah dihasilkan dengan metode transformasi gen *SoSUT1* ke dalam genom tebu menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* oleh Dwinianti dan Sugiharto (2013). Gen *SoSUT1* pada tanaman tebu merupakan cDNA penyandi *Sucrose transporter* (SUT).

Kloning cDNA SUT1 telah dilakukan dan digunakan pada tanaman tebu. cDNA SUT1 memiliki karakter sebagai pengkode protein SUT1 yang memiliki afinitas tinggi terhadap transport sukrosa dan lebih banyak diekspresikan di daun daripada di batang (Kuhn, 2003). Sedangkan SUT2 berperan lebih banyak dalam ekspresi pada jaringan penyimpanan daripada di daun, dan belum terdeteksi memiliki afinitas terhadap transport sukrosa (Barker *et al.*, 2000).

Transport sukrosa pada tanaman terjadi melalui dua metode yaitu secara simplas melalui plasmodesmata dan secara apoplastik. Secara apoplastik, translokasi sukrosa berasal dari organ *source* (sumber) menuju phloem dan di transport dari phloem menuju organ *sink*. Transport sukrosa terdiri menjadi dua tahapan yaitu *loading* dan *unloading* sukrosa yang dipengaruhi oleh protein *sucrose transporter* (SUT) (Hariatos, 2001; Frommer and Sonniewald, 1995).

Kuhn and Grof (2010), telah berhasil mengidentifikasi 5 kelompok *sucrose transporter* berdasarkan fungsi transporter yang belum dikarakterisasi pada berbagai tanaman dikotil dan monokotil (Gambar 2.1.)



(Sumber: Kuhn and Grof, 2010)

Gambar 2.1. Dendrogram Filogenetik Protein *sucrose transporter* pada Tanaman Dikotil dan Monokotil

*Sucrose transporter* tidak hanya berperan sebagai kunci regulasi untuk proses translokasi sukrosa tetapi juga berperan sebagai transportasi sukrosa pada beberapa organisme, seperti simbiotik antara mycoriza dan *Rhizobium*, serta patogen antara nematoda dan jamur parasit (Kuhn and Grof, 2010). Penelitian secara *in vitro* pada tanaman *Arabidopsis thaliana* menunjukkan bahwa *AtSUC1* memiliki ekspresi yang penting untuk germinasi pollen dan menginduksi terbentuknya antosianin (Sivitz *et al.*, 2008).

## 2.2 Kultur *In Vitro* Tebu

Kultur *in vitro* adalah suatu metode untuk mengisolasi bagian dari tanaman seperti protoplasma, sel, jaringan, atau organ yang steril, ditumbuhkan pada media buatan yang steril, dalam botol kultur yang steril, dan dalam kondisi aseptik, sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman

yang lengkap. Kultur *in vitro* pada tanaman tebu dapat menggunakan metode mikropropagasi. Mikropropagasi adalah teknik perbanyakan untuk memproduksi tanaman tebu secara cepat pada skala komersial (Khan *et al.*, 2008).

Mikropropagasi tebu dapat menggunakan *eksplant* dari kalus dan kultur tunas. Hazmi *et al.*, (2009) menjelaskan bahwa *eksplant* dari pangkal tunas tebu *in vitro* lebih berpotensi sebagai *eksplant* transformasi daripada *eksplant* potongan gulungan daun muda (*spindel leaf*) dan kalus. Selain itu, regenerasi tebu melalui kalus rentan terhadap variasi somaklonal (Nadar and Heinz, 1977). Sedangkan mikropropagasi tebu dari kultur tunas dapat menggunakan tunas apikal dan tunas lateral.

Kultur tunas apikal merupakan cara yang dianggap paling efektif karena eksplan bebas penyakit dan infeksi virus, serta terjamin stabilitas genetiknya (Sukmadjaja *et al.*, 2012). Sedangkan penggunaan pangkal tunas tebu *in vitro* sebagai eksplan transformasi mampu meminimalisasi tingkat variasi somaklonal dan mampu membentuk tunas baru tanpa fase pengkalusan (Hazmi *et al.*, 2009).

Keberhasilan kultur *in vitro* sangat bergantung pada media yang digunakan. Media utama yang digunakan untuk kultur *in vitro* tebu adalah media *Murashige and Skoog* (MS). Media kultur *in vitro* menyediakan unsur hara makro, mikro dan karbohidrat. Hasil pertumbuhan akan lebih baik jika media ditambahkan vitamin-vitamin dan zat pengatur tumbuh (ZPT).

Zat pengatur tumbuh yang diberikan pada media berperan untuk pertumbuhan dan morfogenesis suatu kultur. Pada penelitian ini ZPT yang digunakan adalah sitokonin (BAP dan kinetin) dan Giberelin (GA3). Kombinasi sitokinin dan giberelin berperan untuk pertumbuhan batang dan perbanyakan tanaman (Divya and Sharma, 2012). Beberapa penelitian menyatakan bahwa, pemberian BAP  $2,5 \text{ mgL}^{-1}$  merupakan optimasi terbaik dalam menginduksi tunas (Nawaz *et al.*, 2013), pemberian kinetin  $2 \text{ mgL}^{-1}$  dan BAP  $1 \text{ mgL}^{-1}$  memperpanjang tunas sekitar 7,66 cm dibandingkan kontrol (Eldessoky *et al.*, 2011)

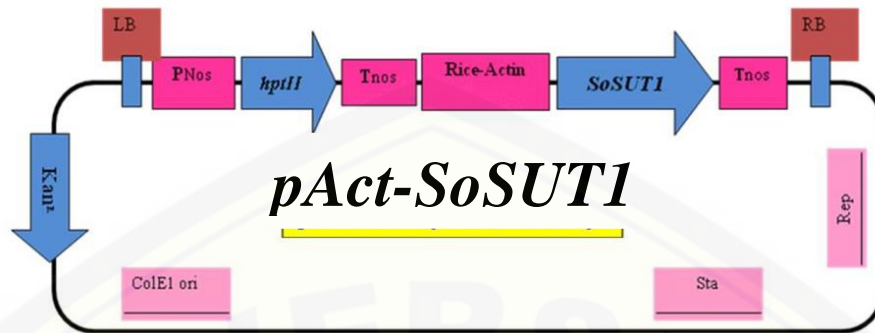
### 2.3 Seleksi dan Uji Stabilitas Genetik Tebu PRG

Seleksi dan uji stabilitas tanaman PRG merupakan tahap karakterisasi tanaman untuk mengetahui keberhasilan transformasi. Tanaman PRG tidak memiliki kestabilan genetik dikarenakan gen target tidak terintegrasi dengan stabil di dalam kromosom tanaman inang. Penelitian yang dilakukan oleh Gilbert *et al.*, (2009) pada uji lapang pertama karakterisasi tebu PRG Klon 6-1 dan Klon 6-2 yang memiliki ketahanan terhadap penyakit SCYLV (*Sugarcane Yellow Leaf Virus*) menunjukkan stabilitas gen yang berbeda dari induknya. Efisiensi transformasi yang rendah memerlukan gen penyeleksi (*selectable marker*) untuk menyeleksi tanaman PRG.

Gen *Selectable marker* adalah gen yang memiliki ketahanan terhadap antibiotik dan herbisida (Miki and McHugh, 2003). Gen *Selectable marker* yang umum digunakan adalah *neomycin phosphotransferase II (npt II)* dan *hygromycin phosphotransferase II (hpt II)*. Pada penelitian ini, gen *hpt II* digunakan untuk menyeleksi tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1*.

Tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* memiliki peta konstruk plamsid *PAct-SoSUT1* (Gambar 2.2) Dalam konstruk tersebut terlihat bahwa gen *SoSUT1* dikendalikan oleh *promoter DNA Rice actin*, bagian LB: *left border*, RB: *right border* sebagai batas gen penanda ketahanan terhadap antibiotik *hygromycin* bagian T-DNA, P-Nos: *promoter nopaline synthetase* dan bagian T-Nos: *terminator nopaline synthetase*. Konstruk *PAct-SoSUT1* yang mengandung gen *SoSUT1* kemudian ditransformasikan ke sel *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 dan digunakan untuk transformasi genetik tanaman tebu (Dwinianti dan Sugiharto, 2013).





Gambar 2.2. Konstruk plasmid *pAct-SoSUT1* (Sumber: Sugiharto, 2010)

Konstruk plasmid *pAct-SoSUT1* (Gambar 2.2) membawa gen *hpt II* yang berfungsi sebagai ketahanan terhadap antibiotik *hygromycin*. Gen *hpt II* merupakan gen yang menghasilkan enzim *hygromycin* yang dapat mendetoksifikasi aminosiklitol antibiotik *hygromycin B* (Rodriguez and Nottenburg, 2012). Gen *hpt II* juga mengkatalisis fosforilasi kelompok hidroksil dalam antibiotik *hygromycin* sehingga membuatnya menjadi tidak aktif (Brasileiro and Aragao, 2001).

Respon beberapa tanaman yang menggunakan seleksi *hygromycin* yaitu pada penelitian Nafari (2006) menunjukkan gejala nekrotik pada lingkaran daun padi yang tidak memiliki gen *hpt II*. Sedangkan pada daun padi yang tanamannya mengandung gen *hpt II* lingkaran daun tetap segar. Tangapo *et al.*, (2012) seleksi pada *eksplant Andrographis paniculata* terhadap media *hygromycin* menunjukkan kematian dengan terjadinya pencoklatan pada seluruh bagian *eksplant*.

Uji stabilitas genetik tebu PRG overekspresi gen *SoSUT1* dilakukan menggunakan teknik PCR. Teknik PCR dilakukan untuk mengamplifikasi fragmen transgen menggunakan primer spesifik yaitu sekuen *hygromycin phosphotransferase II: forward* (5'-CCG CAA GGA ATC GGT CAA TA-3) dan *reverse* (5'- CCC AAG CTG CAT CAT GGA AA-3).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomolekuler dan Bioteknologi *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember pada bulan Juli 2014 sampai bulan Juli 2015.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu alat yang disebutkan pada metode percobaan. Sedangkan bahan yang digunakan adalah tebu Bulu Lawang (BL) sebagai *wild type* dan 8 *event* tebu PRG *SoSUTI* generasi kedua *event* T1.1 ; T1.4 ; T1.7 ; T2.1 ; T2.2; T2.4 ; T3.2 ; dan T3.5, dan bahan yang disebutkan dalam metode percobaan.

### 3.3 Metode Percobaan

#### 3.3.1 Pembuatan Media Pertumbuhan

##### a. Media Tunas Apikal

Media tunas apikal yang digunakan adalah media *Murashige and Skoog* (MS) yang mengandung unsur hara makro dan mikro (Lampiran A), BA 2 mgL<sup>-1</sup>, kinetin 0,5 mgL<sup>-1</sup>, glutamin 100 mgL<sup>-1</sup> dan 2x vitamin dari komposisi MS standart (Lampiran B). selanjutnya dicampur pada beaker glass, ditambah sukrosa 30 gL<sup>-1</sup>, distirer, dan diukur pH sebesar 6,2. Selanjutnya media ditambah agar kuljar 11 gL<sup>-1</sup>. Media dimasukkan ke dalam oven selama 2 menit dan diaduk sampai homogen. Proses penuangan media ke dalam botol kultur dilakukan secara langsung setelah pengovenan. Media yang sudah disiapkan selanjutnya disterilisasi. Sterilisasi media menggunakan autoklaf pada temperatur 121<sup>0</sup>C, tekanan 15-17,5 psi dengan waktu 15 menit.



#### b. Media Tunas Lateral

Media tunas lateral yang digunakan adalah media MS, BA  $1,5 \text{ mgL}^{-1}$  dan glutamin  $100 \text{ mgL}^{-1}$  (Lampiran B) yang dicampur pada beaker glass, ditambah sukrosa  $30 \text{ gL}^{-1}$ , distirer dan diukur pH sebesar 6,2. Selanjutnya media ditambah agar kuljar  $11 \text{ gL}^{-1}$ . Media dimasukkan ke dalam oven selama 2 menit dan diaduk sampai homogen. Media yang sudah disiapkan selanjutnya disterilisasi. Sterilisasi media menggunakan autoklaf pada temperatur  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15-17,5 psi dengan waktu 15 menit. Proses penuangan media ke dalam botol kultur dilakukan di LAF dan ditambahkan GA  $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ .

#### c. Media Mikropropagasi

Media perbanyakan adalah media MS dan glutamin  $100 \text{ mgL}^{-1}$  yang dicampur pada beaker glass, ditambah sukrosa  $30 \text{ gL}^{-1}$ , distirer, dan diukur pH sebesar 6,2. Selanjutnya media ditambah phytagel  $2,5 \text{ gL}^{-1}$ . Media dimasukkan ke dalam oven selama 2 menit dan diaduk sampai homogen. Proses penuangan media ke dalam botol kultur dilakukan secara langsung setelah pengovenan. Media yang sudah disiapkan selanjutnya disterilisasi. Sterilisasi media menggunakan autoklaf pada temperatur  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15-17,5 psi dengan waktu 15 menit.

#### d. Media Seleksi

Media seleksi adalah media MS yang ditambah sukrosa  $30 \text{ gL}^{-1}$ , distirer, dan diukur pH sebesar 6,2. Selanjutnya media ditambah phytagel  $2,5 \text{ gL}^{-1}$ . Media dimasukkan ke dalam oven selama 2 menit dan diaduk sampai homogen. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditutup menggunakan aluminium foil. Media yang sudah disiapkan selanjutnya disterilisasi. Sterilisasi media menggunakan autoklaf pada temperatur  $121^{\circ}\text{C}$ , tekanan 15-17,5 psi dengan waktu 15 menit. Proses penuangan media ke dalam botol kultur dilakukan di LAF dan ditambahkan antibiotik

*hygromycin* 20 mgL<sup>-1</sup> (seleksi 1) dan antibiotik *hygromycin* 25 mgL<sup>-1</sup> (seleksi 2 dan 3).

### 3.3.2 Persiapan dan Sterilisasi *Eksplant*

*Eksplant* menggunakan tunas tebu PRG *SoSUT1* dan *wild type* berumur ± 11 bulan yang terdiri dari tunas apikal dan lateral. Tunas apikal diambil dari pucukan tebu yang disterilkan dengan alkohol 96% dan dilewatkan api bunsen sampai 3 kali. Tunas apikal dipotong hingga diameter ± 3 mm dan panjang 10 mm dengan mengelupas dan menyisakan 3 gulungan daun (*spindle leaf*) paling dalam. Selanjutnya tunas ditanam pada media tunas apikal.

Tunas lateral diambil dari 3-4 tunas yang tertutup pelepah tebu dibawah tunas apikal. Tunas-tunas tersebut disterilkan menggunakan alkohol 70% dan dipotong hingga ukuran 1,5 cm x 2 cm. Tunas lateral disterilisasi menggunakan Natrium hipoklorit (NaClO) dengan perbandingan 1:3 (NaClO:akuades steril) selama 5 menit, dibilas 2 kali dengan akuades steril dan dikeringkan selama 15 menit. Selanjutnya tunas ditanam pada media tunas lateral. Tunas apikal dan lateral disubkultur 3 minggu sekali hingga menjadi *plantlet* tebu.

### 3.3.3 Regenerasi dan Mikropropagasi *Plantlet* Tebu

Regenerasi Mikropropagasi *plantlet* tebu PRG dilakukan dengan menanam *plantlet* pada media perbanyakan yaitu pada media MS + Glutamin 100 mgL<sup>-1</sup>.

### 3.3.4 Seleksi Tebu PRG

Tahapan seleksi tebu PRG dilakukan 3 kali. Seleksi dilakukan dengan subkultur *eksplant* tebu sesudah diperbanyak pada media MS + Glutamin 100 mgL<sup>-1</sup>. Media yang digunakan dalam tahapan seleksi yaitu media MS + *hygromycin* 20 mgL<sup>-1</sup> untuk seleksi ke-1 dan MS + *hygromycin* 25 mgL<sup>-1</sup> untuk seleksi ke-2 dan ke-3.

### 3.3.5 Persentase Seleksi

Persentase seleksi dapat dihitung berdasarkan jumlah plantlet yang mampu tumbuh pada tahapan seleksi yaitu seleksi ke-1, seleksi ke-2 dan seleksi ke-3. Perhitungan persentase seleksi bertujuan untuk mengetahui jumlah plantlet yang lolos dan memiliki kestabilan gen *hpt II* pada tebu PRG. Persentase seleksi dapat dihitung berdasarkan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah plantlet yang tumbuh pada tiap tahapan seleksi}}{\text{Jumlah eksplant awal}} \times 100 \%$$

### 3.3.6 Aklimatisasi Tanaman

Aklimatisasi bertujuan untuk mengadaptasikan tanaman dari kondisi *in vitro* ke kondisi *in vivo*. Aklimatisasi dilakukan pada plantlet tebu PRG *SoSUTI* yang lolos pada seleksi 3 dengan tinggi  $\pm 3-5$  cm dan telah memiliki cukup akar. *Plantlet* dibersihkan dari sisa-sisa media agar dengan air mengalir dan direndam dalam larutan fungisida (*dithane* 0,1%) selama 15 menit, kemudian ditanam pada media pasir steril. Pemeliharaan saat aklimatisasi dilakukan dengan penyemprotan akuades dan pemberian larutan nutrisi *Hoagland* (Lampiran C). Aklimatisasi dilakukan bertahap dengan meletakkan tanaman di dalam *growth chamber* selama 2 minggu dan di *green house* selama 7 hari. Selanjutnya tanaman tebu ditanam pada polybag yang berisi campuran tanah dan kompos dengan perbandingan 1:1 dan diletakkan di *green house* tanpa naungan.

### 3.3.7 Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom tebu dilakukan dengan menggerus 0,3 gram daun tanaman tebu dengan Nitrogen cair menggunakan *mortar* dan *pestle* sampai halus. Serbuk daun dipindah ke dalam *microtube* 2 ml yang telah berisi 600  $\mu$ l buffer ekstraksi pH 8 (100 Mm Tris, 50 Mm EDTA, 500 Mm NaCl), 30  $\mu$ l SDS 20% dan 1  $\mu$ l  $\beta$ -*mercaptoetanol*, divortex sampai homogen, diinkubasi pada suhu 65°C, 10

menit. Kemudian ditambahkan 300 µl *Potassium acetate* 5 M, tube dibolak-balik perlahan (*swirling*), diinkubasi dalam es selama 10 menit. Selanjutnya, disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke *microtube* baru, ditambahkan 375 µl isopropanol, diswirling dan dipresipitasi dengan diinkubasi -20°C, selama 1 jam. Setelah proses presipitasi, dilakukan sentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit untuk mendapatkan pellet. Pellet yang didapatkan ditambah 300 µl buffer TE dan 9 µl RNase, diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Proses pemurnian DNA dilakukan dengan penambahan larutan PCI 300 µl, divortex dan disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit. Supernatan yang didapatkan, dipindahkan ke *microtube* baru, ditambah chloroform equal volume supernatan, divortex dan disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit. Lapisan bagian atas dipindah ke *microtube* baru, ditambah 0,8 x isopropanol dan 0,2 x NaAC, diswirling, diinkubasi pada -20 °C selama 1 jam. Setelah proses presipitasi, disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit. Pellet dicuci dengan 1 ml etanol 70%, disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet dikeringkan dengan *vacum dry* dan ditambahkan 30 µl buffer TE.

DNA genom hasil isolasi diukur konsentrasinya menggunakan *nanodrop*. DNA genom divisualisasi dengan elektroforesis pada 1% *agarose gel* untuk mengetahui kualitas DNA. Kemudian dilakukan analisis menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

### 3.3.8 Analisis PCR

Analisis PCR dilakukan untuk mengkonfirmasi keberadaan gen target pada tebu PRG. DNA genomik yang telah diisolasi dapat digunakan sebagai cetakan DNA. Primer sekuen yang digunakan untuk PCR adalah primer sekuen *hygromycin phosphotransferase II (hpt II)*: forward (5'-CCG CAA GGA ATC GGT CAA TA-3) dan reverse (5'- CCC AAG CTG CAT CAT GGA AA-3) yang berukuran ± 490 bp (basepair).



Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan Kappa Master Mix yang komposisinya terdiri dari i-Taq DNA *Polymerase*, dNTPs, PCR *Reaction Buffer*, Gel *loading buffer*, distilled water. Satu kali reaksi PCR memiliki total volume 10  $\mu$ l dengan lautan yang terdiri dari 2x PCR *Master Mix* 5  $\mu$ l dan ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ l. Proses PCR dilakukan sebanyak 40 siklus yang meliputi tahapan *predenaturasi* 95 °C 3 menit, *denaturasi* 95 °C 30 detik, 51 °C 30 detik, *elongation* 72 °C 1 menit, dan *final elongation* 72 °C 5 menit.

DNA yang telah teramplifikasi dengan PCR dipisahkan dengan 1% agarose gel elektroforesis yang mengandung 1,5-3  $\mu$ l *ethidium bromide* dengan tegangan 100 V selama 10-25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* (iNtRON BIOTECHNOLOGY) sebanyak 3  $\mu$ l. Hasil elektroforesis dilihat di geldoc (UV Illuminator) dan didokumentasikan dengan kamera.

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Mikropropagasi Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) *SoSUT1* secara *In Vitro*

Pada penelitian sebelumnya telah berhasil melakukan transformasi gen *SoSUT1* dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* pada *plantlet* tebu sehingga dihasilkan tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG). Tebu PRG generasi pertama yang dihasilkan berjumlah 15 tanaman yaitu *event* T1.1, T1.2, T1.3, T1.4, T1.6, T1.7, T1.8, T1.9, T1.10, T2.1, T2.2, T2.4, T3.2, T3.5, dan T3.6 seperti pada hasil analisis PCR (Lampiran D). Pada tahap aklimatisasi, tebu PRG *SoSUT1* yang tumbuh berkurang menjadi 8 *event* yaitu T1.1, T1.4, T1.7, T2.1, T2.2, T2.4, T3.2, dan T3.5, untuk *event* T1.2, T1.3, T1.6, T1.8, T1.9, T1.10, dan T3.6 mati sebelum dimikropropagasi secara *in vitro*. Mikropropagasi dilakukan dengan menggunakan *eksplant* tunas apikal dan tunas lateral tebu *wild type* dan PRG *SoSUT1*. Hasil mikropropagasi dapat dilihat pada tabel 4.1

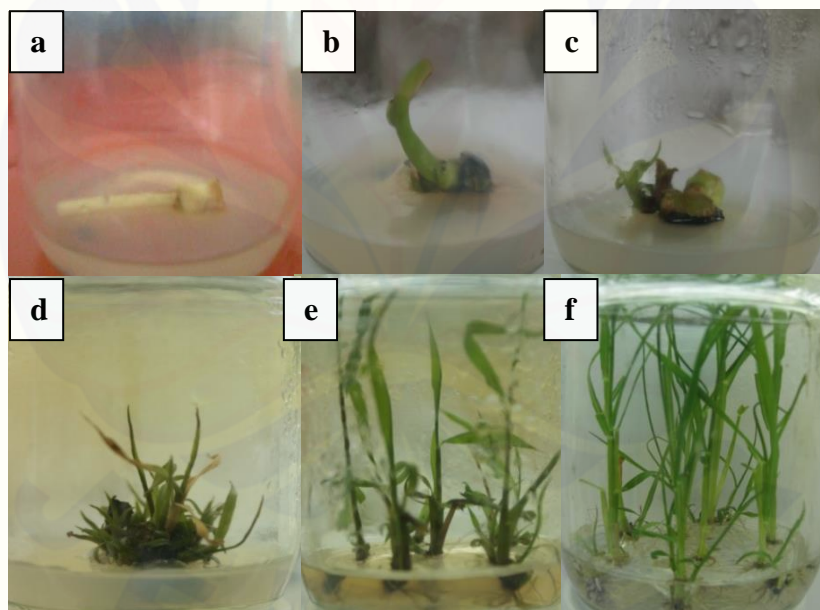
Tabel 4.1 Hasil mikropropagasi tebu *wild type* dan PRG *SoSUT1*

Event	Jumlah <i>Eksplant</i>		Tunas yang Tumbuh		Awal Muncul Tunas Adventif (Hari) ke-		$\Sigma$ <i>Plantlet</i> yang Dihasilkan	
	Tunas Apikal	Tunas Lateral	Tunas Apikal	Tunas Lateral	Tunas Apikal	Tunas Lateral	Tunas Apikal	Tunas Lateral
	<i>wild type</i>	2	8	1	7	19	0	12
T1.1	1	2	1	2	23	0	50	0
T1.4	2	5	2	4	48	0	86	0
T1.7	1	3	1	2	28	0	17	0
T2.1	1	3	0	3	0	78	0	69
T2.2	1	4	0	4	0	75	0	52
T2.4	1	3	0	2	0	76	0	9
T3.2	1	1	1	0	26	0	98	0
T3.5	2	8	1	2	30	16	40	0

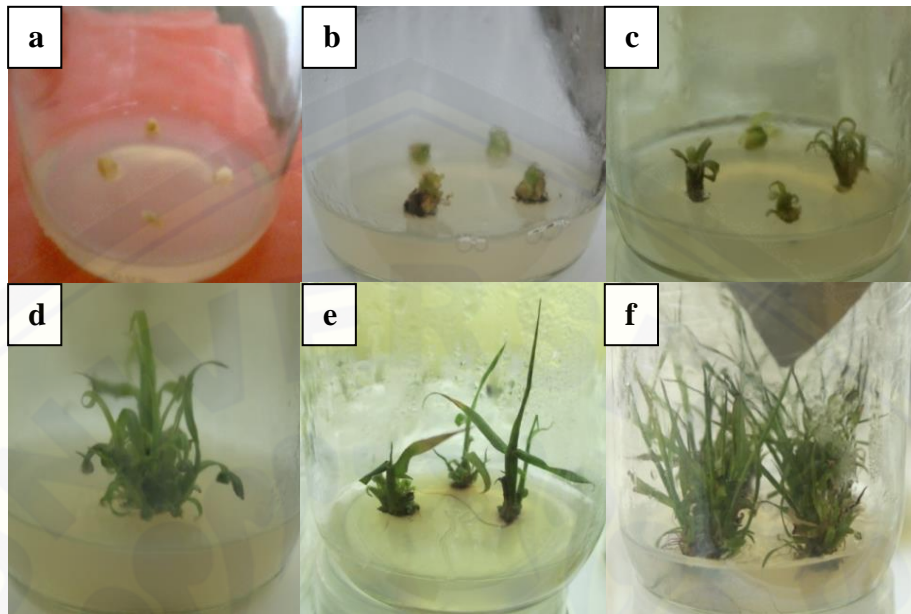


Tabel 4.1 menunjukkan bahwa dari ke-9 *event* tebu yang ditumbuhkan pada media kultur jaringan dapat beregenerasi menjadi *plantlet*. Regenerasi *plantlet* tebu diawali dengan munculnya tunas adventif. Tunas adventif dari *eksplant* tunas apikal memiliki waktu lebih cepat untuk beregenerasi yakni 19 hari, sedangkan tunas adventif dari *eksplant* tunas lateral memiliki waktu lebih lama untuk beregenerasi yakni 75 hari. Pada tahap mikropropagasi, *plantlet* yang tumbuh dari *eksplant* tunas apikal berjumlah 6 *event* dan *plantlet* yang tumbuh dari *eksplant* tunas lateral berjumlah 3 *event*. Hasil mikropropagasi tebu menunjukkan bahwa jumlah *plantlet* yang dihasilkan dari *event* tebu berbeda. Hal ini dikarenakan kemampuan regenerasi dari setiap *event* tebu tidak sama.

Proses regenerasi tebu dari *eksplant* tunas apikal ditunjukkan pada gambar 4.1 dan *eksplant* tunas lateral ditunjukkan pada gambar 4.2.



Gambar 4.1 Kultur tebu dari *eksplant* tunas apikal pada umur yang berbeda (a) kultur tebu umur 0 hari (b) kultur tebu umur  $\pm 2$  minggu (c) kultur tebu umur  $\pm 4$  minggu (d) kultur tebu  $\pm 7$  minggu (e) kultur tebu umur  $\pm 9$  minggu (f) *plantlet* umur  $\pm 12$  minggu.

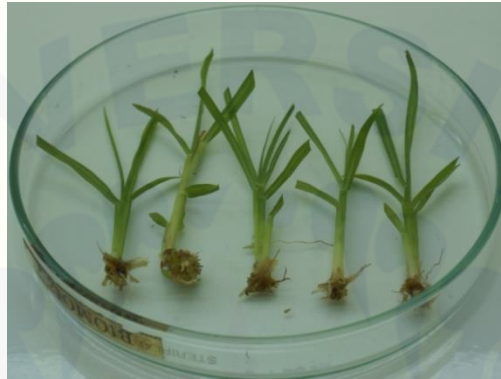


Gambar 4.2 Kultur tebu dari tunas lateral pada umur yang berbeda (a) kultur tebu umur 0 hari (b) kultur tebu umur  $\pm 4$  minggu (c) kultur tebu umur  $\pm 8$  (d) kultur tebu  $\pm 12$  minggu (e) kultur tebu umur  $\pm 15$  minggu (f) *plantlet* umur  $\pm 20$  minggu.

Regenerasi tunas apikal tebu dimulai dengan munculnya tunas adventif dari ruas apikal pada umur  $\pm 2$  minggu, pada umur  $\pm 4$  minggu mulai tumbuh daun, pada umur  $\pm 7$  minggu membentuk rumpun, dan pada umur  $\pm 12$  minggu dapat menjadi *plantlet* tebu (Gambar 4.1). Sedangkan regenerasi tunas lateral tebu dimulai dengan munculnya tunas adventif pada umur  $\pm 8$  minggu, pada umur  $\pm 12$  minggu tumbuh daun, pada umur  $\pm 15$  minggu membentuk rumpun yang kuat, dan pada umur  $\pm 20$  minggu dapat menjadi *plantlet* tebu (Gambar 4.2). *Eksplant* yang telah beregenerasi selanjutnya akan dimikropropagasi dan digunakan untuk seleksi pada media antibiotik *hygromycin* kecuali event T2.4 karena *eksplant* mati sebelum masuk pada media seleksi.

#### 4.2 Seleksi *Plantlet* Tebu PRG *SoSUT1* dan *wild type* Menggunakan Antibiotik *Hygromycin*

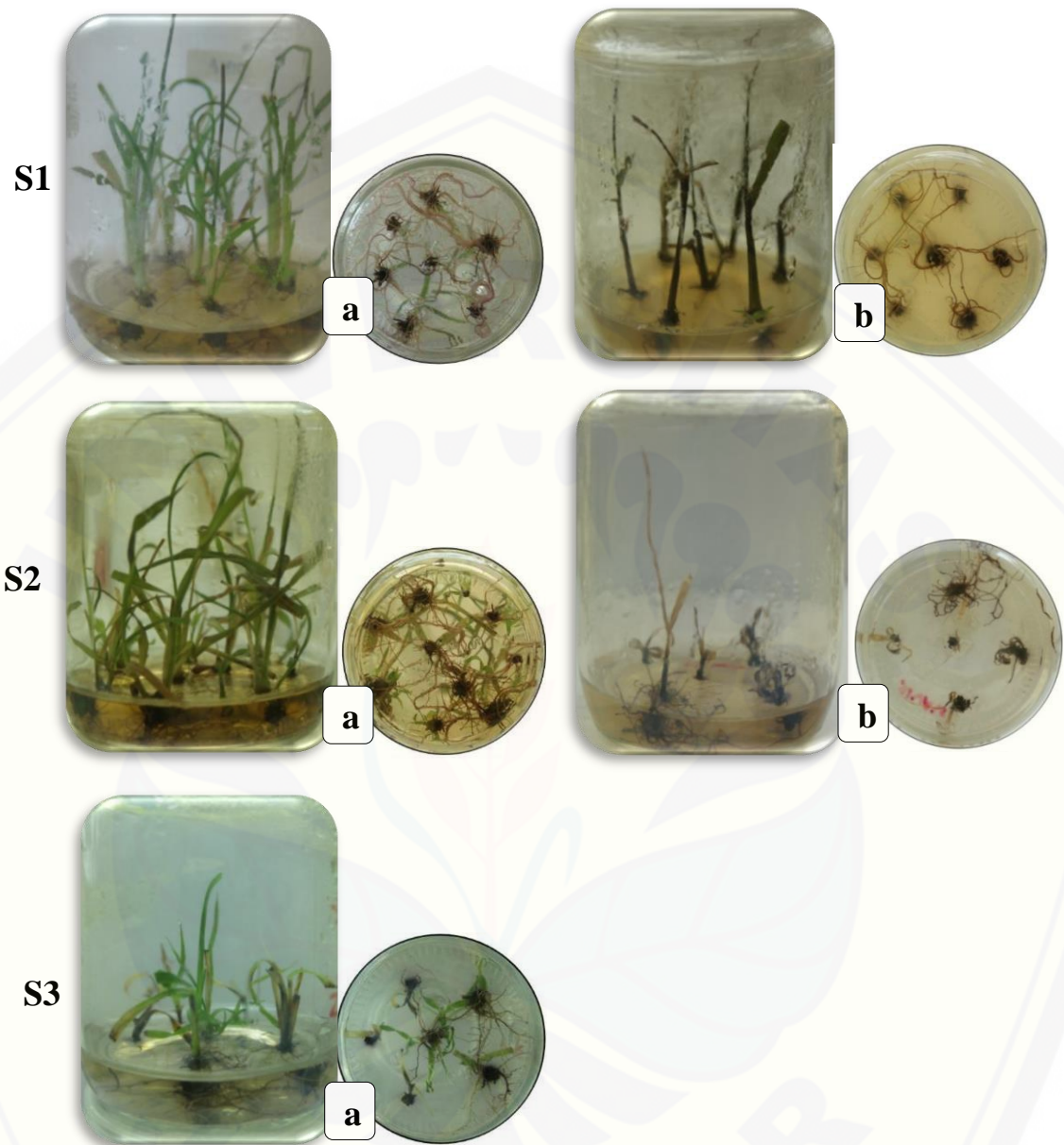
Kriteria *plantlet* tebu PRG *SoSUT1* dan *wild type* yang digunakan untuk seleksi yakni *plantlet* sehat, panjang batang  $\pm$  3-5 cm, batang kokoh, bebas dari kontaminasi mikroba dan tumbuh akar yang tampak seperti pada gambar 4.3.



Gambar 4.3 *Plantlet* tebu yang digunakan untuk tahap seleksi

Seleksi dilakukan dengan tiga kali subkultur sehingga diyakini bahwa jaringan atau sel yang hidup merupakan sel yang resisten terhadap antibiotik. Konsentrasi *hygromycin* diberikan secara bertingkat yaitu  $20 \text{ mgL}^{-1}$  (seleksi 1) dan  $25 \text{ mgL}^{-1}$  (seleksi 2 dan 3). Pemberian antibiotik ini didasarkan optimasi medium seleksi pada penelitian Dwinianti dan Sugiharto (2013). Penelitian oleh Tangapo *et al.*, (2012) pada penanaman eksplant *Andrographis paniculata* melalui medium dengan penambahan *hygromycin* pada konsentrasi 25, 30 dan  $30 \text{ mgL}^{-1}$  mengalami kematian pada minggu kedua dengan presentasi 40% dan mencapai kematian 100% pada minggu ketiga. Pada medium dengan konsentrasi *hygromycin*  $20 \text{ mgL}^{-1}$ , kematian eksplant mencapai 25% pada minggu kedua, 95% pada minggu ketiga dan 100% pada minggu keempat. Pemberian antibiotik bertingkat ini bertujuan untuk meningkatkan efektifitas antibiotik *hygromycin* dalam menyeleksi tanaman. Pertumbuhan *plantlet* tebu *wild type* dan tebu PRG pada media seleksi ditunjukkan pada gambar 4.4.





Gambar 4.4 Pertumbuhan *plantlet* tebu pada media seleksi antibiotik *hygromycin*. S1= seleksi 1 (a. Tebu PRG dan b. Tebu *wild type*); S2= seleksi 2 (a. Tebu PRG dan b. Tebu *wild type*); S3= seleksi 3 (a. Tebu PRG)

Hasil seleksi (Gambar 4.4) menunjukkan perbandingan dari 2 jenis *plantlet* tebu yaitu PRG dan *wild type*. Tebu PRG mampu tumbuh pada akhir media seleksi. Kondisi *plantlet* yang lolos seleksi 1 dengan pemberian *hygromycin* 20 mgL<sup>-1</sup> tampak

segar dan perakaran banyak, pada seleksi 2 *plantlet* tampak lebih layu dan daun menggulung karena pemberian antibiotik meningkat dengan konsentrasi *hygromycin* 25 mgL<sup>-1</sup>, pada seleksi 3 *plantlet* tampak lebih segar kembali karena sudah beradaptasi pada *hygromycin* 25 mgL<sup>-1</sup> pada seleksi 2. Proses seleksi ini menunjukkan bahwa sel *plantlet* yang lolos seleksi 3 merupakan sel transforman yang sudah homogen mengandung gen *hpt II* sebagai gen penanda. Kondisi ini berbeda dengan tebu *wild type* yang terlihat mengalami *browning* dan mati pada akhir seleksi ke 2. Tebu *wild type* yang mati dikarenakan *plantlet* tidak terinsersi gen *hpt II* sehingga tidak mampu bertahan pada media antibiotik *hygromycin*.

Persentase jumlah *plantlet* tebu PRG *SoSUT1* dan *wild type* yang lolos pada media seleksi ditunjukkan pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Persentase Jumlah *Plantlet* Tebu *wild type* dan PRG *SoSUT1* pada media seleksi

No	Event	Σ P	% P	Σ S1	% S1	Σ S2	%S2	Σ S3	%S3
1	<i>wild type</i>	12	100%	11	91,67%	0	0,00%	0	0,00%
2	T1.1	50	100%	31	62,00%	15	30,00%	8	16,00%
3	T1.4	86	100%	66	76,74%	58	67,44%	17	19,77%
4	T1.7	17	100%	13	76,47%	0	0,00%	0	0,00%
5	T2.1	69	100%	47	68,12%	41	59,42%	14	20,29%
6	T2.2	52	100%	31	59,62%	23	44,23%	19	36,54%
7	T3.2	98	100%	52	53,06%	43	43,88%	21	21,43%
8	T3.5	16	100%	16	100%	15	93,75%	6	37,50%

**Keterangan :**

P = *Plantlet*, S1 = Seleksi 1 (*hygromycin* 20 mgL<sup>-1</sup>); S2= Seleksi 2 (*hygromycin* 25 mgL<sup>-1</sup>); S3=Seleksi 3 (*hygromycin* 25 mgL<sup>-1</sup>).

Tabel (4.2) menunjukkan persentase jumlah *plantlet* tebu yang mampu bertahan pada media seleksi. *Plantlet* tebu yang dimikropropagasi menunjukkan tidak semua *plantlet* mampu tumbuh pada media seleksi antibiotik bertingkat. Jumlah *plantlet* tebu terus mengalami penurunan selama tahap seleksi. *Plantlet* yang lolos sampai media seleksi 3 ada 6 event yaitu event T1.1, T1.4, T2.1, T2.2, T3.2, dan T3.5. Sedangkan tebu *wild type* dan tebu PRG event T1.7 tidak lolos seleksi. Gritz and Davies (1983) menyatakan tingginya konsentrasi *hygromycin* dapat menghambat pertumbuhan *plantlet* dengan menghambat proses sintesis protein yaitu pada proses

translokasi tRNA dan mRNA, berkaitan dengan faktor elongasi sehingga menyebabkan *plantlet browning* dan mengalami kematian. *Plantlet* tebu PRG *SoSUT1* yang hidup pada media seleksi disebabkan *plantlet* tersebut mampu mendegradasi antibiotik *hygromycin*, sehingga tidak memiliki sifat toksik.

#### 4.3 Aklimatisasi *Plantlet* Tebu PRG *SoSUT1* dari *In Vitro*

Aklimatisasi dilakukan pada *plantlet* tebu yang telah berhasil melewati seleksi ketiga. Sebelum proses aklimatisasi, tanaman yang lolos seleksi ditumbuhkan pada media MS untuk mengkondisikan tanaman agar pertumbuhan kembali stabil setelah ditanam pada media antibiotik. Jumlah tanaman tebu yang diaklimatisasi dapat dilihat pada tabel 4.3.

Tabel 4.3 Jumlah Tanaman Tebu PRG *SoSUT1 In Vitro* untuk Aklimatisasi

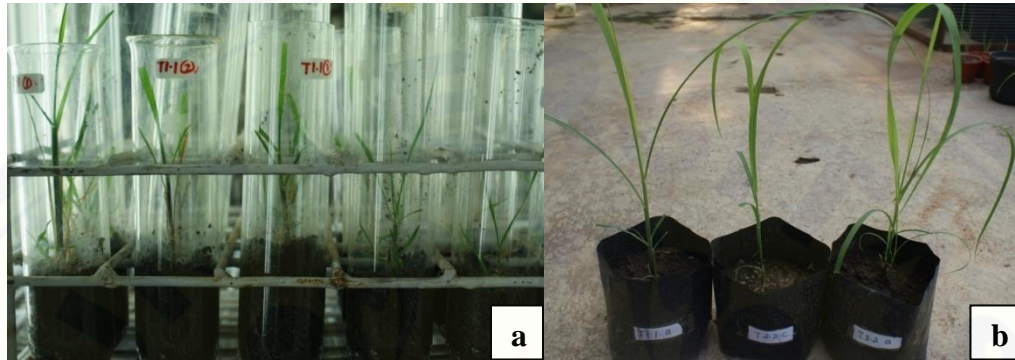
No	Event	$\Sigma$ Tebu <i>In Vitro</i>	$\Sigma$ Tebu Aklimatisasi	Kode Tanaman
1	T1.1	8	8	T1.1 (a-h)
2	T1.4	17	8	T1.4 (a-h)
3	T2.1	14	3	T2.1 (a-c)
4	T2.2	19	7	T2.2 (a-g)
5	T3.2	21	6	T3.2 (a-f)
6	T3.5	6	0	-
Total		85	32	

Tabel 4.3 menunjukkan bahwa tanaman tebu PRG *SoSUT1* yang bisa diaklimatisasi berjumlah 32 tanaman dari 85 tanaman *in vitro*. Hal ini disebabkan banyak tanaman tebu mati ketika dipindah pada media MS karena memiliki ukuran perakaran yang kecil sehingga sulit menyerap nutrisi.

Tebu yang diaklimatisasi memiliki ukuran panjang batang  $\pm$  3-5 cm, batang kokoh, dan memiliki perakaran yang baik. Proses aklimatisasi dimulai dengan menumbuhkan tanaman tebu pada media pasir steril di *Growth Chamber* (Gambar 4.5a). Pemilihan media pasir karena teksturnya yang mudah menyerap dan melepaskan air agar kelembapan tetap terjaga. Setelah berumur 2 minggu, tanaman



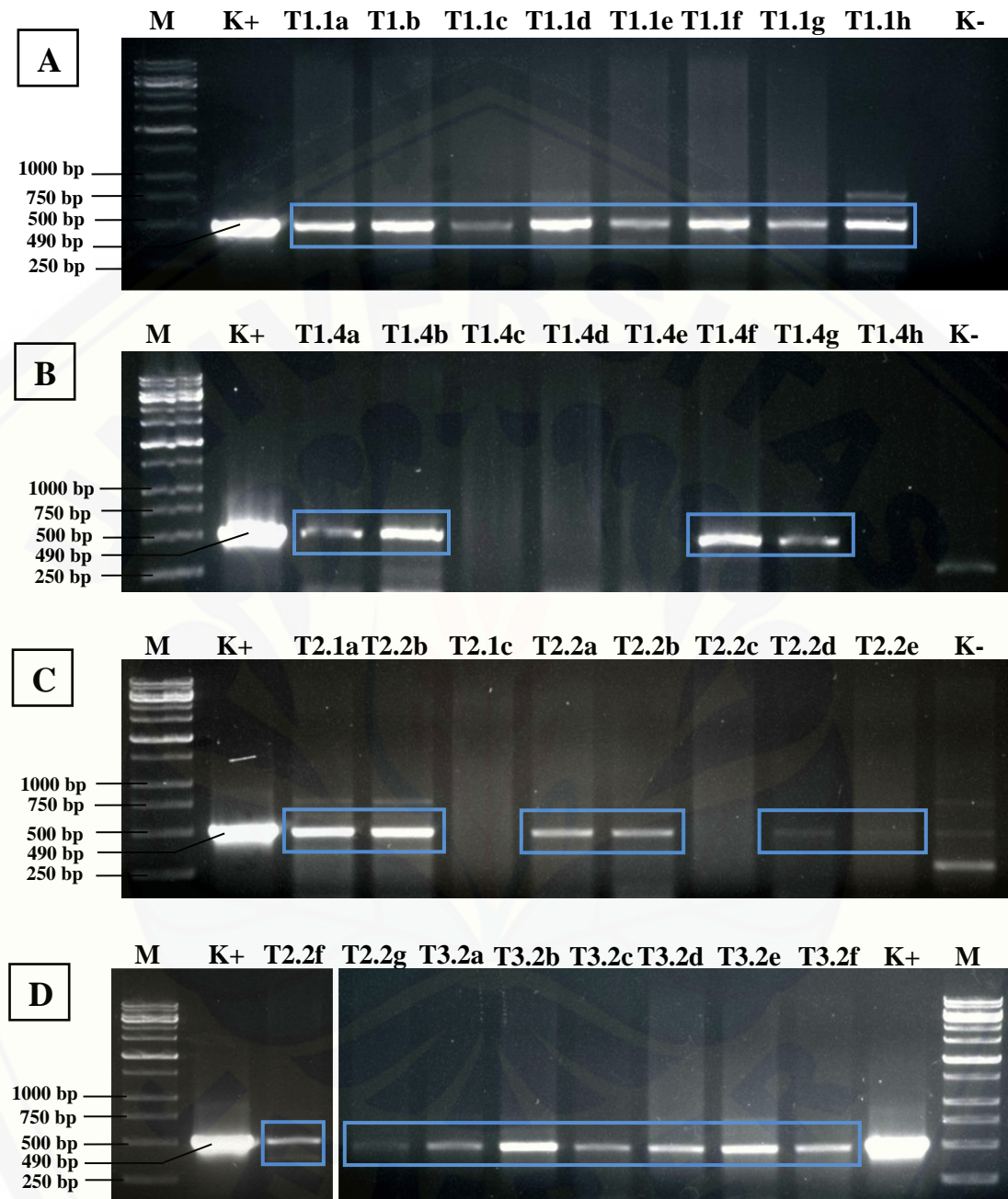
tebu ditumbuhkan pada media tanah di *Green House* (Gambar 4.5b). Tanaman tebu PRG *SoSUT1* yang berumur  $\pm 1$  bulan dapat diambil daunnya untuk isolasi DNA genom.



Gambar 4.5 Aklimatisasi Tanaman tebu PRG *SoSUT1*: a). Media pada pasir steril di *Growth Chamber*; b). Media pada tanah di *Green House*

#### 4.4 Analisis PCR Tanaman Tebu PRG *SoSUT1*

Keberhasilan stabilitas genetik ditentukan oleh terintegrasinya gen target ke dalam genom tanaman yang dapat dilakukan dengan analisis PCR. Tebu PRG *SoSUT1* yang positif stabil secara genetik telah terinsersi gen *hpt II*, sehingga dapat dikatakan juga mengandung gen target *SoSUT1*. Berdasarkan elektroforesis DNA hasil PCR (Gambar 4.6) menunjukkan bahwa 26 dari 32 tanaman tebu PRG *SoSUT1* yang positif stabil menunjukkan band DNA pada ukuran  $\pm 490$  bp sesuai dengan band DNA plasmid *pAct-SoSUT1*.



Gambar 4.6 Elektroforesis hasil PCR DNA tebu PRG *SoSUT1* menggunakan pasangan primer 1F/1R *hpt II*. M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid *pAct-SoSUT1* (kontrol positif); K-: tebu *wild type* (kontrol negatif); A: *event* T1.1 (a-h); B: *event* T1.4 (a-h); C: *event* T2.1 (a-c) dan *event* T2.2 (a-e); D: *event* T2.2 (f-g) dan *event* T3.2 (a-f).

Hasil PCR (Gambar 4.7) dari 32 tanaman tebu PRG *SoSUTI* menunjukkan bahwa tebu PRG *SoSUTI event* T1.1 semua stabil genetiknya dengan jumlah 8 tanaman, tebu *event* T1.4 menunjukkan 4 dari 8 tanaman positif stabil, tebu *event* T2.1 menunjukkan 2 dari 3 tanaman positif stabil, tebu *event* T2.2 menunjukkan 6 dari 7 tanaman positif stabil, dan tebu *event* T3.2 menunjukkan semua stabil dengan jumlah 8 tanaman, sehingga diperoleh 26 tanaman tebu PRG *SoSUTI* yang stabil genetiknya. Sedangkan 6 tanaman tidak menunjukkan band DNA, hal ini diduga tanaman tebu tersebut mengalami *escape*.

Pengertian *escape* yaitu sel-sel atau jaringan tanaman yang ditanam pada media seleksi antibiotik mampu tumbuh namun ketika dilakukan PCR tidak mengandung gen target (Rahmawati dan Hortense, 2006). Tanaman *escape* dapat disebabkan oleh kesalahan pada sistem seleksi, penyisipan gen yang tidak sempurna, atau gen yang ditransfer tidak stabil terintegrasi di dalam genom tanaman dan hilang selama proses pembelahan sel (Saini *et al.*, 2003). Fenomena *escape* pada penelitian ini menunjukkan bahwa sel tanaman tebu PRG bersifat heterogen dan belum memiliki stabilitas gen *SoSUTI*.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Tanaman tebu PRG *SoSUTI* yang lolos seleksi menggunakan antibiotik *hygromicin* berjumlah 5 *event*, yaitu *event* T1.1, T1.4, T2.1, T2.2, dan T3.2.
2. Tanaman Tebu PRG *SoSUTI* yang positif stabil genetiknya berjumlah 26 tanaman dengan munculnya band DNA dari gen *hpt II* dengan ukuran 490 bp melalui analisis PCR.

### 5.2 Saran

Mikropropagasi tanaman tebu secara *in vitro* dari *eksplant* tunas apikal dan tunas lateral menghasilkan jumlah *plantlet* yang banyak, namun tidak seragam karena kecepatan multiplikasi tidak sama. Pada penelitian selanjutnya perlu dicari *eksplant* tebu yang mempunyai waktu regenerasi dengan cepat, sehingga memperoleh jumlah *plantlet* yang seragam.



**DAFTAR PUSTAKA**

- Aoki, H., Hirose, T., Scofield, G.N., Whitfield P.R., and Furbank, R.T. 2003. The Sucrose Transporter Gene Family in Tice. *Plant Cell Physiol.* Vol. 44: 223-232.
- Barker, L., khun, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J.M., dan Frommer, W.B. 2000. SUT2, A Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *Plant Cell.* Vol. 12: 1153-1164.
- Brasileiro, A.C.M., and Aragao, F.J.L. 2001. Marker Genes for In Vitro Selection of Transgenic Plants. *Journal Biotechnology.* Vol. 3(3): 113-121.
- Christou, P., Vain, P., Kohli, A., Leech, M., Oard, J., and Linscombe, S. 1992. Introduction of Multiple Genes Into Elite Rice Varieties : Evaluation Of Transgene Stability, Gene Expression, and Field Performance of Herbicide-Resistant Transgenic Plant. *Annal of Botany.* Vol. 77: 223-235.
- Divya, and Sharma, A. 2012. Evaluation of Sugarcane through Micropropagation. *VSRD Technical & Non Technical Journal.* Vol. 3 (9): 1-4.
- Dwinianti, E.F., dan Sugiharto, B. 2013. Transformasi Gen *SoSUT1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L var. BL) Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* Strain GV 3101 Dan Eksplan Pangkal Tunas Tebu *In Vitro*. Skripsi: Universitas Jember.
- Eldessoky, D.S., Ismail, R.M., Hadi, A.A., Hadi, A., and Abdallah, N. 2011. Establishment of regeneration and transformation system of sugarcane cultivar GT54-9 (C9). *GM Crops.* Vol 2: 1-9.
- Frommer, W.B., and Sonnewald, U. 1995. Molecular Analysis of Carbon Partitioning In Solanaceous Species. *J Exp Bot.* Vol. 46: 587-607.
- Gilbert, R.A., Glynn, N.C., Comstock, J.C., and Davis, M.J. 2009. Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane transformed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. *Field Crops Research.* Vol. 111: 39-46.
- Gritz, L., and Davies, J. 1983. Plasmid-encided Hygromycin B Resistance: The Aequence of Hygromycin B Phosphotransferase Gene and Its Expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* Vol. 25 (2-3): 179-188.



- Hariatos, E., Medville, R., and Turgeon, R. 2000. Minor Vein Structure and Sugar Transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. Vol. 211: 105-111.
- Hamzi, M., Iskandar., Sumitro S. B., dan Sugiharto, B. 2009. Studi Penggunaan Pangkal Tunas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) *In-vitro* sebagai Eksplan Transformasi DNA dengan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Berk. Panel Hayati edisi khusus. Vol. 3A: 81-85.
- Hiei, Y., and Komari, T. 1996. Stable Inheritance of Transgenes in Rice Plants Transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. *Proceedings of The Third Rice Genetic Symposium*, Manila Philippines. P. 131-142.
- Khan, S.A., Hanif, Z., Irshad, U., Ahmad, R., Yasin, M., Chaudhary, M.F., Afroz, A., Javed, M.T., Rashid U., and Rashid, H. 2008. Genetic transformation of sugarcane variety HSF-240 with marker gene *GUS*. *Int. J. Agric. Biol.* Vol. 15: 1258–1264.
- Kuhn, C. 2003. A Comparison of the Sucrose Transporter System of Different Plant Species. *Plant Biol.* Vol. 5: 215-232.
- Kuhn, C., and Grof, C. PL. 2010. Sucrose Transporters of Higher Plants. *Current Opinion in Plant Biology.* Vol. 13: 1-11.
- Kusrini, E., dan Sugiharto, B. 2014. Seleksi dan Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) *Pcl4-SoSPS1* Secara *In Vitro*. Jember: Universitas Jember.
- Miki, B., and McHugh, S. 2003. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology.* Vol. 107: 193-232.
- Nadar, H. M., and Heinz, D.J. 1977. Root and Shoot Development from Sugarcane Callus Tissue. *Crop Sci.* Vol. 17: 814–816.
- Nafari, Bayu. 2006. Kestabilan Pewarisan Gen *entC* dan *pmsB* pada Padi Transgenik Generasi Ketiga. IPB: Bogor.
- Nawaz, M., Ullah, I., Iqbal, M., Javed, M. 2013. Improving in vitro leaf disk regeneration system of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) with concurrent shoot/root induction from somatic embryos. *Turkish journal of Biology.* Vol. 37: 726-732.

- Rahmawati, S. 2003. Gen Penyeleksi Alternatif untuk Transformasi Tanaman. *Buletin AgroBio*. Vol. 6(1): 26-33.
- Rahmawati, S., dan Hortense, I.S.L. 2006. Introduksi Gen *cryIB-cryIAa* ke dalam Genom Padi (*Oryza sativa*) cv. Rojolele Menggunakan Transformasi *Agrobacterium*. *Hayati*. Vol: 19-25.
- Rodriguez, R.C., and Nottenburg, C. 2003. Antibiotic Resistance Genes and Their Use in Genetic Transformation Especially in plants. *Cambia*.
- Saini, R., Jaiwal, S., and Jaiwal, P.K. 2003. Stable genetic transformation of *Vigna mungo* L. Hepper via *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell*. Vol. 21:851-859.
- Shiratake, K. 2007. Genetic of Sucrose Transporters in Plant. *Genetic, Genomes, and Genomics*.
- Sivitz, A. B., Reinders, A., and Ward, J. M. 2008. Arabidopsis Sucrose Transporter AtSUC is Important for Pollen Germination and Sucrose-Induced Anthocyanin Accumulation. *American Society of Plant Biologists*. Vol. 147: 92-100.
- Sugiharto, B. 2010. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overekspresi Gen *Sucrose Phosphat Synthase* dan *Sucrose Transporter Protein* Pada Tanaman Tebu. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi. *Unpublish*.
- Sukmadjaja, D., Mariska., Supriar, Y., Rahayu S., dan Pardal, J.S. 2012. Produksi Massal Bibit Tebu Varietas PS864 dan PS881 Dengan Stabilitas Genetik Tinggi dan Bebas Virus Hasil Kultur Apeks Untuk Pengembangan Di Sulawesi. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Tangapo, A., Marwani, E., dan Dwivani, F. 2012. Tranformasi dan Ekspresi Transien Gen Pelapor Gusa pada *Andrographis paniculata* (Burm.F.) Wallich Ex Ness. ITB: Bandung.
- Truernit, E. 2001. Plant Physiology: The Importance of Sucrose transporters. *Current Biology*. Vol. 11: 169-171.
- Wu, G., Cui, H., Ye, Y., Xia, Y., Sardana, R., Cheng, X., Li, Y., Altosaar, I., and Shu Q. 2002. Inheritance and Expression of The CryIAb Gene in BT (*Bacillus Thuringensis*) Transgenic rice. *Theor. Appl. Genet.* 104:727-734.

**Lampiran A. Stok dan komposisi media MS (Murashige and Skoog)**

Larutan Stock	Senyawa	Massa Stok (Gram)		Konsentrasi Dalam Media ( $\text{mgL}^{-1}$ )	Pemakaian (Liter)
A	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	82,5	/Liter	1650	20
B	$\text{KNO}_3$	95	/Liter	1900	20
C	$\text{CaCl}_2$	22	/250 $\text{mgL}^{-1}$	440	5
D	$\text{H}_3\text{PO}_4$	0,31	/250 $\text{mgL}^{-1}$	6,2	5
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	8,5		170	
	$\text{CoCl}_2$	0,0013		0,025	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\text{H}_2\text{O}$	0,0125		0,25	
	KI	0,0415		0,83	
E	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18,5	/250 $\text{mgL}^{-1}$	370	5
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,43		8,6	
	$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0013		0,025	
	$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7525		22,3	
F	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	1,86	/250 $\text{mgL}^{-1}$	37	5
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,39		27	
Vitamin	Myo-inositol	0,001 $\text{mgL}^{-1}$		100	5
	Pyridoxine	0,008 $\text{mgL}^{-1}$		0,5	
	Thiamin	0,08 $\text{mgL}^{-1}$		0,5	
	Agar kultur jaringan				11 $\text{gL}^{-1}$
	Phytigel				2,5 $\text{gL}^{-1}$
	Sukrosa				30 $\text{gL}^{-1}$

**Lampiran B. Komposisi modifikasi media MS untuk mikropropagasi tunas apikal dan lateral**

<b>Apikal</b>	<b>Lateral</b>
MS standart	MS standart
BA 2 mgL <sup>-1</sup>	GA 0,1 mgL <sup>-1</sup>
Kinetin 0,5 mgL <sup>-1</sup>	BA 1,5 mgL <sup>-1</sup>
Glutamin 100 mgL <sup>-1</sup>	Glutamin 100 mgL <sup>-1</sup>
2x Vitamin dari komposisi MS standart	

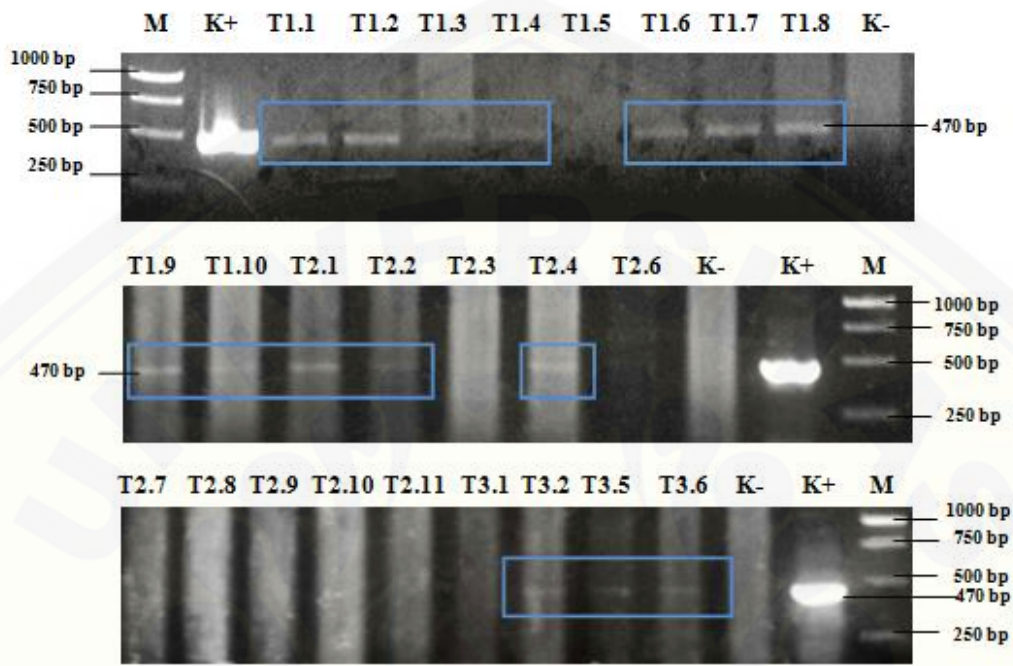
(Kusrini dan Sugiharto, 2014)

**Lampiran C. Komposisi Larutan stok Hoagland**

<b>Solution</b>	<b>Senyawa</b>	<b>Jumlah (g/ml)</b>	<b>Pemakaian/ Liter (ml)</b>
I	500 mM KNO <sub>3</sub>	5,06	15
	150 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	3,55	
II	2,5 mM KCl	18,65	1
III	150 mM CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	22,1	0,5
IV	1 M MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	24,7	2
V	1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	15,6	2
	0,3 mM FeEDTA	0,012	
	0,27 mM MnSO <sub>4</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,007	
	0,27 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> . 10H <sub>2</sub> O	0,01	



**Lampiran D. Hasil PCR tanaman tebu *SoSUT1* Generasi Pertama**



(Dwiniati dan Sugiharto, 2013)