



**TRANSFORMASI GEN *SoSUT1* PADA TANAMAN TEBU PRODUK  
REKAYASA GENETIKA OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1*  
EVENT 2.2.B MENGGUNAKAN  
*Agrobacterium tumefaciens***

**SKRIPSI**

Oleh  
**Dwi Ratna Pujasih**  
**NIM 101810401039**

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



**TRANSFORMASI GEN *SoSUT1* PADA TANAMAN TEBU PRODUK  
REKAYASA GENETIKA OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1*  
EVENT 2.2.B MENGGUNAKAN  
*Agrobacterium tumefaciens***

**SKRIPSI**

Diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk  
menyelesaikan Program Sarjana pada Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Jember

Oleh  
**Dwi Ratna Pujiasih**  
**NIM 101810401039**

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

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Ayahanda Husen dan Ibunda Suswati atas segala do'a, semangat, dan kasih sayang yang telah diberikan selama ini;
2. Ananta Agus Tri Handoko yang senantiasa memberikan kasih sayang dan dukungan dengan penuh ikhlas;
3. Kakakku tercinta Ika Hesti Agustin, S.Si, M.Si dan Marsidi, S.Si, M. Si yang telah begitu banyak memberikan motivasi dalam menuntut ilmu;
4. Para Guru sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi yang telah memberikan bimbingan, ilmu yang bermanfaat, serta motivasi dengan penuh kesabaran;
5. Almamater Universitas Jember.

## MOTTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”

(Surat Al-Baqarah, ayat 286)<sup>i</sup>

“ Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh

(urusan) yang lain.”

(Surat Alam nasyrah, ayat 6 dan 7)<sup>ii</sup>

- 
- i. Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. Al-Qur'an dan Terjemahan. Bandung: CV. Aljumanatul 'Ali-art
  - ii. Yayasan Penyelenggara Penterjemah/ Pentafsir Al-Qur'an. 1971. Al-Qur'an dan Terjemahan. Saudi Arabia

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dwi Ratna Pujiasih

NIM : 101810401039

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul **“Transformasi Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPS1* Event 2.2.B Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*”** adalah benar-benar karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh MP3EI tahun 2014 atas nama Prof. Dr. Bambang Sugiharto M.agr.Sc. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juni 2015

Yang menyatakan,

Dwi Ratna Pujiasih  
NIM 101810401039

**SKRIPSI**

**TRANSFORMASI GEN *SoSUT1* PADA TANAMAN TEBU PRODUK  
REKAYASA GENETIKA OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1*  
EVENT 2.2.B MENGGUNAKAN  
*Agrobacterium tumefaciens***

Oleh

**Dwi Ratna Pujiasih  
NIM 101810401039**

**Pembimbing:**

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

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “ Transformasi gen *SoSUTI* pada Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi gen *SoSPS1 Event 2.2.B* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, Tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam 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,

Dr. rer.nat. Kartika Senjarini  
NIP. 197509132000032001

Dra. Dwi Setyati, M.Si  
NIP 196404171991032001

Mengesahkan  
Dekan,

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

## RINGKASAN

**Transformasi Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPS1 Event 2.2.B* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens***; Dwi Ratna Pujiasih, 101810401039; 2015; 32 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Sukrosa merupakan produk akhir dari proses fotosintesis yang ditranslokasi ke berbagai jaringan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi pertumbuhan tanaman. Pada tanaman tebu, sukrosa ditranslokasikan dari jaringan fotosintetik (*source tissues*) ke jaringan penyimpanan (*sink tissues*) yang berupa batang. Proses translokasi sukrosa tersebut difasilitasi oleh protein SUT. Protein SUT jenis SUT1 lebih berpotensi dalam meningkatkan akumulasi sukrosa pada tanaman, karena memiliki afinitas lebih tinggi terhadap substrat jika dibandingkan dengan protein SUT yang lain yaitu SUT2, SUT3, dan SUT4.

Enzim SPS (*Sucrose Phosphate Synthase*) merupakan enzim kunci dalam pembentukan sukrosa di sitosol sel jaringan fotosintetik. Oleh karena itu, tanaman overekspresi gen *SPS* memiliki tingkat biosintesis sukrosa yang tinggi. Pada penelitian sebelumnya, overekspresi gen *SoSPS1* dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada tanaman tebu. Pada penelitian tersebut juga diketahui bahwa tanaman tebu positif transforman gen *SoSPS1* yang memiliki tingkat ekspresi tertinggi adalah *event 2.2.B*.

Peningkatan biosintesis sukrosa perlu diimbangi dengan proses transportasinya menuju organ batang, agar diperoleh tanaman tebu dengan kandungan gula yang tinggi. Oleh karena itu transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1 event 2.2.B* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* menjadi alternatif untuk meningkatkan proses translokasi sukrosa, yang diharapkan dapat mengalami peningkatan kandungan sukrosa pada organ batang. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu PRG gen *SoSUT1* dari tanaman tebu overekspresi gen *SoSPS1*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi persiapan eksplan untuk transformasi, kultur *A. tumefaciens*, isolasi DNA plasmid dan PCR, infeksi

*A.tumefaciens* pada eksplan, ko-kultivasi, eliminasi *A. tumefaciens*, seleksi eksplan putatif transforman, isolasi DNA genom tanaman putatif transforman, dan analisis PCR.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada transformasi I dihasilkan 19 tanaman putatif transforman dan pada transformasi II dihasilkan 12 tanaman putatif transforman. Berdasarkan analisis PCR, tanaman positif mengandung gen *SoSUT1* adalah sebanyak 11 tanaman dari transformasi I (22%) dan 5 tanaman dari transformasi II (7,40%). Efektivitas transformasi gen *SoSUT1* rata-rata adalah sebesar 14,7%. Selain itu diketahui bahwa tanaman positif mengandung gen *SoSPS1* adalah sebanyak 14 tanaman dari transformasi I dan 5 tanaman dari transformasi II. Tanaman yang mengandung kedua gen *SoSUT1* dan *SoSPS1* adalah sebanyak 10 tanaman dari transformasi I dan 1 tanaman dari transformasi II.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Transformasi Gen *SoSUT1* Pada Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPS1 Event 2.2.B* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*”. 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 pengarahannya, saran dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr. rer.nat. Kartika Senjarini selaku dosen penguji I dan Dra. Dwi Setyati, M.Si selaku dosen penguji II atas masukan dan saran guna kesempurnaan penulisan skripsi ini;
3. Proyek MP3E1 tahun 2014 atas nama Prof. Dr Bambang Sugiharto yang telah membiayai pelaksanaan tugas akhir hingga terselesaikannya skripsi ini;
4. Drs. Siswanto, M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
5. seluruh keluarga besarku yang telah begitu banyak memberikan, kasih sayang, doa, dukungan dan motivasi untuk lebih bersemangat dalam menggapai cita-cita.
6. Purnama Oktaviandari, S.P., M.P atas pengarahannya dan bimbingan dalam menyelesaikan penelitian ini;
7. rekan-rekan kerja di Lab. Biologi Molekuler: Nurul Mufitdah, S.Si *Fragaria Vesca* Paradisa, Wardatus Sholehah, S.Si, Qoyimatul Nikmah,

Putri Eka Devi A. R., Ahmil Sholeh, S.Si, Derta Bagus R.S., Almansyah, SP., Firdha Narulita Alfian, SP., Narita Ayu M., S.Si, Kunti Anis Azizah, dan adik-adik lab (Intan, Retna, Wulan, Retno, Iffah, dan Ryan) 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 di kampus.

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, Juni 2015

Penulis

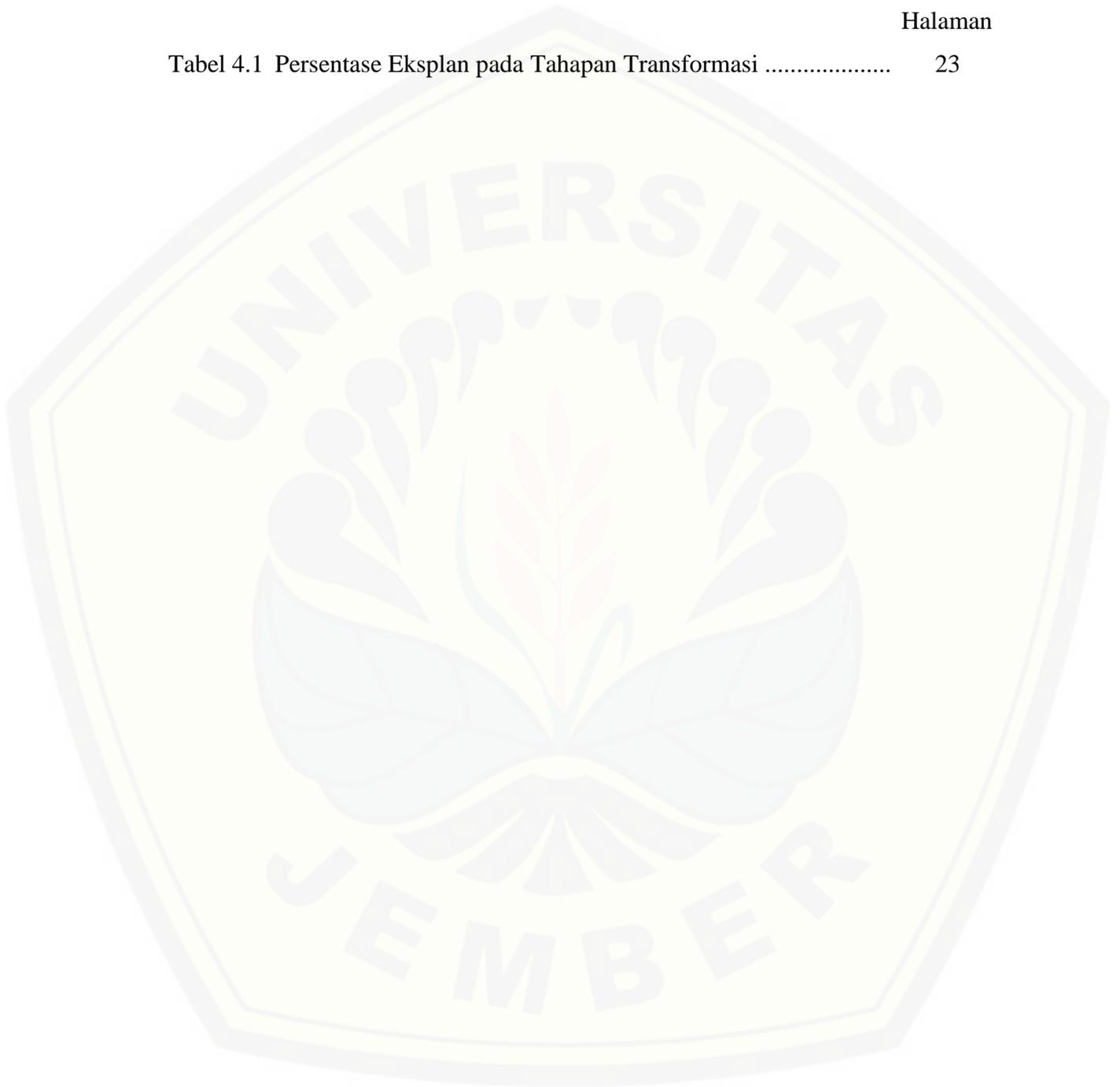
DAFTAR ISI

|  | Halaman   |
|--|-----------|
| HALAMAN JUDUL .....  | i         |
| HALAMAN PERSEMBAHAN .....  | ii        |
| HALAMAN MOTTO .....  | iii       |
| HALAMAN PERNYATAAN .....   | iv        |
| HALAMAN PEMBIMBING .....   | v         |
| HALAMAN PENEKESAHAN .....  | vi        |
| RINGKASAN .....  | vii       |
| PRAKATA .....  | ix        |
| DAFTAR ISI .....   | xi        |
| DAFTAR TABEL .....   | xiii      |
| DAFTAR GAMBAR .....  | xiv       |
| DAFTAR LAMPIRAN .....  | xv        |
| DAFTAR SINGKATAN .....   | xvi       |
| <b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Latar Belakang .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Permasalahan .....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>1.3 Tujuan dan Manfaat .....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>2.1 Proses Sintesis dan Translokasi Sukrosa pada Tanaman .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>2.2 Transformasi genetik menggunakan <i>A. tumefaciens</i> .....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>2.3 Tanaman Tebu PRG Overekspresi Gen <i>SoSPS1 event 2.2.B</i><br/>    dan Perbanyak Eksplan Tanaman Tebu.....</b> | <b>9</b>  |
| <b>BAB 3. METODE PENELITIAN .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>   | <b>12</b> |
| <b>3.2 Alat dan Bahan .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>3.3 Prosedur Penelitian .....</b>   | <b>12</b> |
| 3.3.1 Persiapan Eksplan .....  | 13        |
| 3.3.2 Kultur <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dan Plasmid pAct-  |           |

|   |           |
|---|-----------|
| <i>SoSUTI</i> .....   | 13        |
| 3.3.3 Isolasi DNA Plasmid dan Konfirmasi keberadaan gen<br><i>hptII</i> .....                                     | 14        |
| 3.3.4 Infeksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Pada Pangkal Tunas<br>Tebu .....                                   | 14        |
| 3.3.5 Kokultivasi, Eliminasi, dan Seleksi Transforman Tebu ....   | 15        |
| 3.3.6 Isolasi DNA Genom Tanaman Putatif Transforman .....   | 15        |
| 3.3.7 Analisis PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) .....   | 16        |
| <b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....  | <b>17</b> |
| <b>4.1 Eksplan Pangkal Tunas Tebu <i>in vitro</i> Untuk Transformasi ....</b>                                     | <b>17</b> |
| <b>4.2 Konfirmasi Keberadaan Gen <i>hptII</i> dalam <i>A. tumefaciens</i> .....</b>                               | <b>18</b> |
| <b>4.3 Transformasi Gen <i>SoSUTI</i> pada Tanaman Tebu .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>4.4 Hasil Analisis PCR Tanaman Tebu PRG Overekspresi gen<br/>        <i>SoSPSI</i> dan <i>SoSUTI</i> .....</b> | <b>24</b> |
| <b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>5.1 Kesimpulan</b> .....   | <b>27</b> |
| <b>5.2 Saran</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....   | <b>28</b> |
| <b>LAMPIRAN</b> .....   | <b>33</b> |

**DAFTAR TABEL**

|  | Halaman |
|--|---------|
| Tabel 4.1 Persentase Eksplan pada Tahapan Transformasi ..... | 23      |

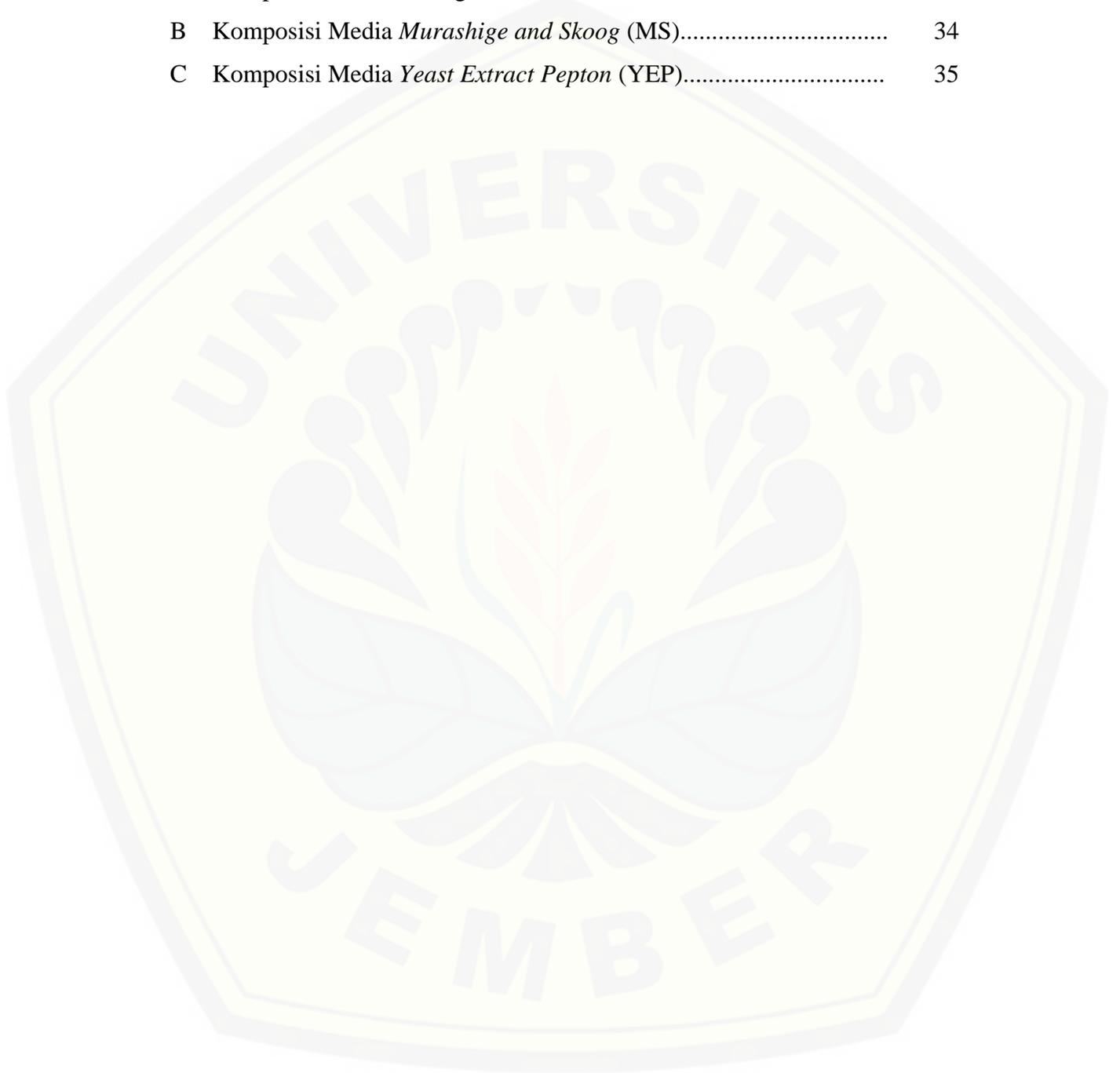


DAFTAR GAMBAR

|   | Halaman |
|---|---------|
| Gambar 2.1 Kontribusi <i>Sucrose Transporter</i> dalam <i>long-distance transport</i> dari jaringan sumber ke jaringan pengguna.....  | 4       |
| Gambar 2.2 <i>Tumor inducing</i> (Ti) Plasmid pada <i>A. tumefaciens</i> .....  | 6       |
| Gambar 2.3 Mekanisme Transformasi Genetik pada Tanaman oleh <i>A. tumefaciens</i> .....   | 7       |
| Gambar 2.4 Hasil analisis tanaman tebu PRG overekspresi gen <i>SoSPS1</i> ..  | 10      |
| Gambar 3.1 Peta Konstruk Plasmid pAct- <i>SoSUT1</i> .....  | 13      |
| Gambar 4.1 Tunas tebu PRG overekspresi gen <i>SoSPS1 event 2.2.B</i> .....  | 18      |
| Gambar 4.2 Hasil PCR menggunakan primer F-R <i>hptII</i> dan DNA template yang diisolasi dari bakteri <i>A. tumefaciens</i> strain GV 3101.....                                     | 18      |
| Gambar 4.3 Eksplan tanaman tebu <i>in-vitro event 2.2.B</i> setelah proses transformasi.....  | 21      |
| Gambar 4.4 Eksplan tebu <i>in-vitro event 2.2.B</i> yang mengalami hambatan <i>overgrowth A. tumefaciens</i> .....  | 22      |
| Gambar 4.5 Tanaman tebu yang lolos media seleksi.....   | 23      |
| Gambar 4.6 Hasil elektroforesis gel <i>agarose 1%</i> DNA hasil PCR dengan menggunakan pasangan primer <i>hptII</i> F/R dan <i>template</i> DNA genom tebu hasil transformasi.....  | 25      |
| Gambar 4.7 Bagian T-DNA dari konstruk plasmid pCLA- <i>SoSPS1</i> yang mengandung gen <i>SoSPS1</i> dan gen ketahanan antibiotik <i>kanamycin nptII</i> .....                       | 26      |
| Gambar 4.8 Hasil elektroforesis gel <i>agarose 1%</i> DNA hasil PCR dengan menggunakan pasangan primer <i>nptII</i> F/R dan <i>template</i> DNA genom tebu hasil Transformasi ..... | 27      |

**DAFTAR LAMPIRAN**

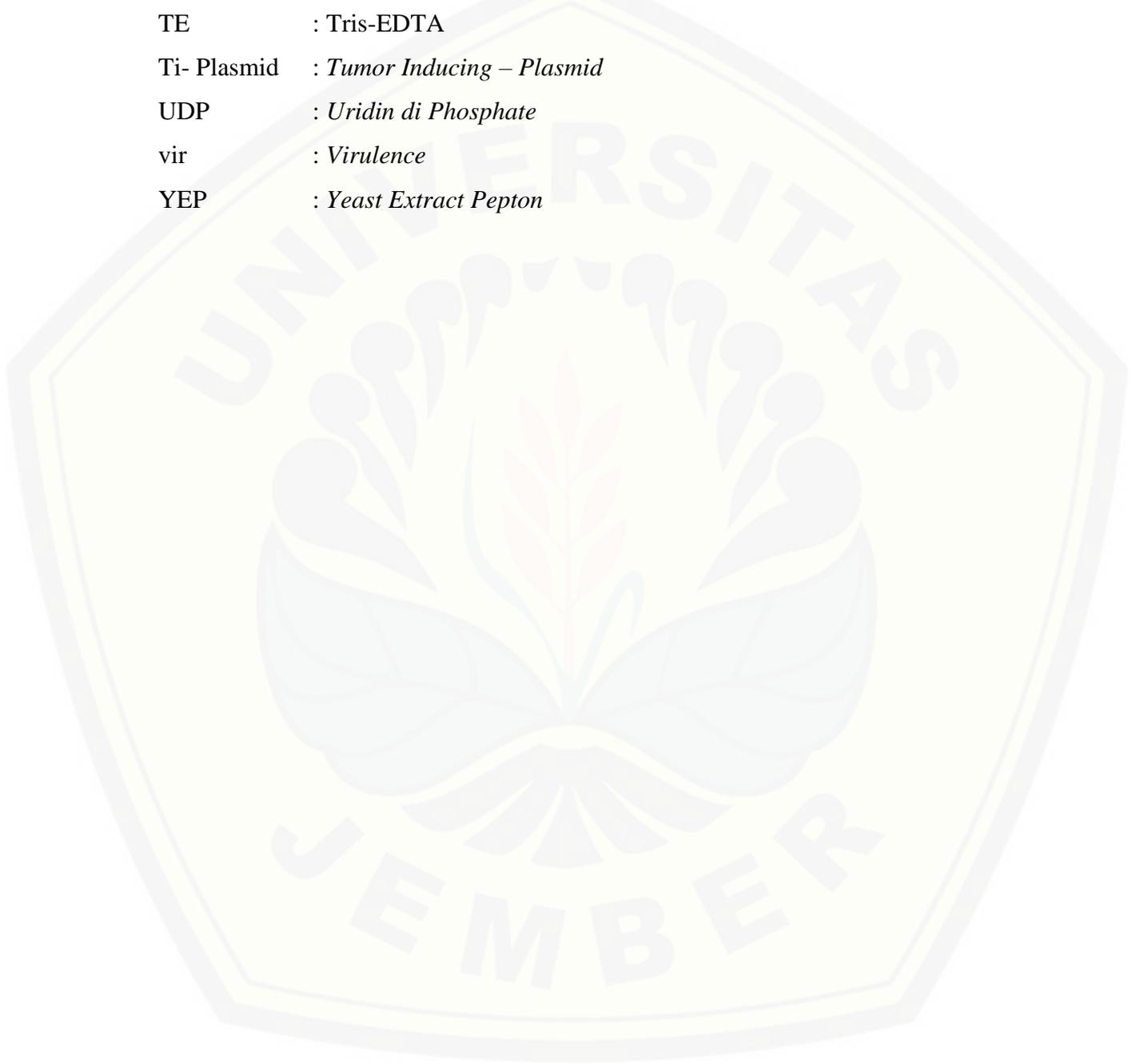
|  | Halaman |
|--|---------|
| A Komposisi Larutan Hoagland.....                        | 33      |
| B Komposisi Media <i>Murashige and Skoog</i> (MS).....   | 34      |
| C Komposisi Media <i>Yeast Extract Pepton</i> (YEP)..... | 35      |



**DAFTAR SINGKATAN**

|                    |  |
|--------------------|--|
| ATP                | : <i>Adenosin Tri Phosphate</i>                            |
| BL                 | : <i>Bulu Lawang</i>                                       |
| bp                 | : <i>basepair</i>  |
| Chv                | : <i>Chromosomal virulence</i>                             |
| ddH <sub>2</sub> O | : <i>Double Distilled Hydrogen Oxide (water)</i>           |
| DNA                | : <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>                          |
| EDTA               | : <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic acid</i>                |
| EtBr               | : <i>Ethidium Bromide</i>                                  |
| F                  | : <i>Forward</i>   |
| <i>hptII</i>       | : <i>Hygromycin Phosphotransferase II</i>                  |
| kb                 | : <i>kilo basepair</i>                                     |
| LB                 | : <i>Left Border</i>                                       |
| MS                 | : <i>Murashige and Skoog</i>                               |
| NaCl               | : <i>Natrium Chloride</i>                                  |
| NLS                | : <i>Nuclear Localization Signal</i>                       |
| <i>nos</i>         | : <i>nopaline synthase</i>                                 |
| NPC                | : <i>Nuclear Pore Complex</i>                              |
| <i>nptII</i>       | : <i>neomycin phosphotransferase II</i>                    |
| OD                 | : <i>Optical Density</i>                                   |
| PCI                | : <i>Phenol Chloroform Isoamylalcohol</i>                  |
| PCR                | : <i>Polymerase Chain Reaction</i>                         |
| Pi                 | : <i>Phosphate anorganik</i>                               |
| PRG                | : <i>Produk Rekayasa Genetika</i>                          |
| R                  | : <i>Reverse</i>   |
| RB                 | : <i>Right Border</i>                                      |
| rpm                | : <i>Rotation per Minute</i>                               |
| SDS                | : <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>                            |
| SE/ CC             | : <i>Sieve Element/ Companion Cell</i>                     |
| <i>SoSPS1</i>      | : <i>Saccharum officinarum Sucrose Phosphat Synthase I</i> |

|               |  |
|---------------|--|
| <i>SoSUT1</i> | : <i>Saccharum officinarum Sucrose Transporter I</i> |
| SPS           | : <i>Sucrose Phosphat Synthase</i>                   |
| SUT           | : <i>Sucrose Transporter</i>                         |
| T-DNA         | : <i>Transferred – Dextyribose Nucleic Acid</i>      |
| TE            | : <i>Tris-EDTA</i>                                   |
| Ti- Plasmid   | : <i>Tumor Inducing – Plasmid</i>                    |
| UDP           | : <i>Uridin di Phosphate</i>                         |
| vir           | : <i>Virulence</i>                                   |
| YEP           | : <i>Yeast Extract Pepton</i>                        |



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sukrosa merupakan produk akhir dari proses fotosintesis (Akin, 2006) yang ditranslokasi ke berbagai jaringan untuk memenuhi kebutuhan nutrisi pertumbuhan tanaman (Williams *et al.*, 2000). Pada tanaman tebu, protein SUT berfungsi sebagai translokator sukrosa dari jaringan fotosintetik (*source tissues*) ke jaringan penyimpan (*sink tissues*) yang berupa batang (Miswar *et al.*, 2007).

Secara filogenetik, gen penyandi protein SUT pada tanaman dibagi menjadi tiga subfamili yaitu SUT1, SUT2, dan SUT4. Berdasarkan homologi sekuensi dan afinitas terhadap substrat, protein SUT1 memiliki afinitas tinggi terhadap substrat tetapi kapasitas pengangkutannya rendah. SUT2 memiliki afinitas dan kapasitas pengangkutan rendah. SUT4 memiliki afinitas yang rendah namun kapasitas pengangkutannya tinggi. Selain itu ditemukan gen SUT3 yang hanya dapat diisolasi dari tanaman tembakau dan termasuk di dalam golongan SUT1 (Kuhn, 2003). Berdasarkan karakter tersebut, SUT1 lebih berpotensi dalam meningkatkan akumulasi sukrosa pada tanaman.

Enzim SPS (*Sucrose Phosphate Synthase*) merupakan enzim kunci dalam pembentukan sukrosa di sitosol sel jaringan fotosintetik. Oleh karena itu, tanaman overekspresi gen *SPS* memiliki tingkat biosintesis sukrosa yang tinggi. Pada penelitian Baskoro (2012), overekspresi gen *SoSPS1* dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada tanaman tebu. Pada penelitian tersebut juga diketahui bahwa tanaman tebu positif transforman gen *SoSPS1* yang memiliki tingkat ekspresi tertinggi adalah *event 2.2.B*.

Peningkatan biosintesis sukrosa perlu diimbangi dengan proses transportasinya menuju organ batang, agar diperoleh tanaman tebu dengan kandungan gula yang tinggi. Oleh karena itu transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1 event 2.2.B* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* menjadi alternatif untuk mendapatkan tanaman tebu dengan kandungan gen ganda yaitu *SoSUT1* dan *SoSPS1*, yang diharapkan dapat mengalami peningkatan kandungan sukrosa pada organ batang.

Peran gen *SUTI* dalam proses akumulasi sukrosa telah dibuktikan dalam penelitian Riesmeier *et al.* (1994) bahwa overekspresi gen *SUTI* pada tanaman kentang dapat meningkatkan laju transportasi sukrosa, sehingga meningkatkan kemampuannya dalam mengakumulasi sukrosa pada organ penyimpanan. Selain itu penghambatan ekspresi gen *SUTI* pada tanaman kentang dengan teknik antisense juga berpengaruh terhadap pengurangan berat segar selama tahap awal perkembangan umbi (Kuhn *et al.*, 2003). Teknik tersebut juga berpengaruh pada penurunan translokasi sukrosa dan perkembangan buah tomat (Hackel *et al.*, 2006).

## 1.2 Permasalahan

Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI event 2.2.B* memiliki tingkat ekspresi yang tinggi, sehingga terjadi peningkatan aktivitas enzim SPS dan sintesis sukrosa pada daun. Namun demikian pada organ batang tanaman tersebut tidak terjadi kenaikan kandungan sukrosa karena proses translokasinya belum ditingkatkan. Oleh karena itu perlu dilakukan transformasi gen *SoSUTI* pada tanaman overekspresi gen *SoSPSI* agar terjadi peningkatan baik biosintesis maupun translokasi sukrosa sehingga dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada organ batang tanaman tebu.

## 1.3 Tujuan dan Manfaat

### 1.3.1 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu PRG gen *SoSUTI* dari tanaman tebu overekspresi gen *SoSPSI event 2.2.B*.

### 1.3.2 Manfaat

Mendapatkan tanaman tebu PRG *double* overekspresi gen *SoSUTI* dan *SoSPSI* dengan rendemen tinggi.

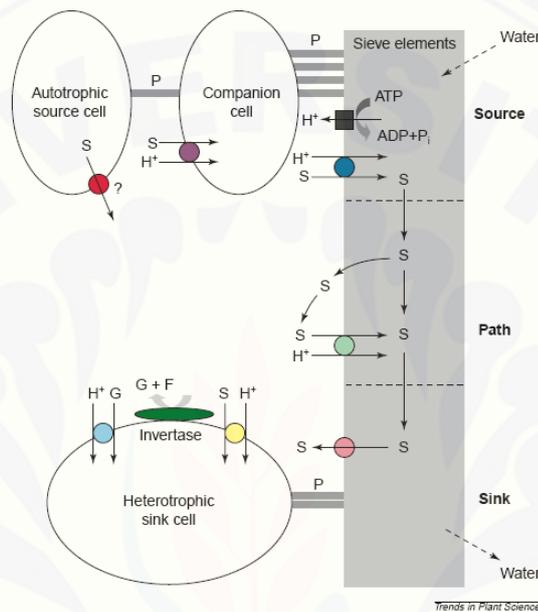
## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Proses Sintesis dan Translokasi Sukrosa pada Tanaman

Proses fotosintesis atau fiksasi CO<sub>2</sub> pada tumbuhan tingkat tinggi berlangsung di dalam sel mesofil daun (*source tissues*) (Campbell *et al.*, 2002) dan menghasilkan produk akhir berupa molekul sukrosa dan pati. Peran sukrosa dalam tanaman merupakan sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan dan perkembangan (Laporte, *et al.*, 1997). Proses akumulasi dan metabolisme sukrosa ditentukan oleh enzim *sucrose shynthase*, *invertase*, dan *sucrose phosphate shynthase* (Lontom *et al.*, 2008). *Sucrose Shynthase* mengkatalis reaksi pembentukan Fruktosa dan UDP-Glukosa dari sukrosa dan UDP. Enzim *invertase* mengkatalis reaksi pemecahan sukrosa menghasilkan glukosa dan fruktosa (Koch, 2004). Sedangkan untuk membentuk satu molekul sukrosa dibutuhkan empat molekul triosa-P yang diperoleh dari proses fotosintesis. Empat molekul triosa-P akan dikonversikan menjadi dua molekul Fruktosa-1,6-Biphosphate oleh enzim *FBPase*. Enzim *FBPase* mengkatalis reaksi perubahan fruktosa-1,6BP menjadi dua molekul fruktosa-6P yang sebagian dikonversi menjadi UDP-Glukosa (Buchanan *et al.*, 2000). *Sucrose phosphate shynthase* merupakan enzim kunci dalam pembentukan sukrosa yang berlangsung di sitosol. Enzim SPS mengkatalis reaksi pengubahan UDP-glukosa dan fruktosa-6P menjadi sukrosa-6P dan H<sup>+</sup>. Reaksi tersebut berlanjut dengan pelepasan gugus fosfat dari molekul sukrosa oleh enzim *sucrose phosphat phosphatase* (SPP) menghasilkan sukrosa dan Pi (Pattanayak, 1999).

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman yang mengakumulasi sukrosa pada organ batang. Sukrosa yang berada pada floem batang kemudian akan digunakan sebagai sumber energi untuk pertumbuhan dan perkembangan sel sekaligus disimpan pada organ pengguna (*sink tissues*) (Hussain *et al.*, 2004). Translokasi molekul gula terutama sukrosa dapat terjadi dengan proses *long distance transport*. Proses tersebut melibatkan kompleks pembuluh floem dan sel pendamping (Gambar 2.1). Setelah proses sintesis, sukrosa akan ditranslokasikan menuju sel yang membutuhkan secara simplas

yaitu melalui plasmodesmata dan secara apoplas yaitu difasilitasi oleh protein SUT. Protein SUT merupakan protein yang memfasilitasi proses transport sukrosa pada tanaman (Wiyono, 2012). Transportasi molekul sukrosa oleh protein SUT adalah bentuk pengangkutan aktif yang disebut juga sebagai sukrosa-H<sup>+</sup> symporters (Williams *et al.*, 2000).



Gambar 2.1 Kontribusi *sucrose transporter* dalam *long-distance transport* dari jaringan sumber ke jaringan pengguna (Williams *et al.*, 2000).

Setelah sukrosa masuk dalam pembuluh floem akan menyebabkan terjadinya penyerapan air ke dalam pembuluh floem sehingga mendesak aliran menuju sel-sel pengguna. Sukrosa masuk ke dalam sel pengguna melalui plasmodesmata atau difasilitasi oleh protein SUT. Proses pengangkutan aktif sukrosa oleh protein SUT membutuhkan energi berupa ATP. Selanjutnya proton bersama dengan sukrosa akan melekat pada protein SUT dan masuk ke dalam sel (Williams *et al.*, 2000). Sukrosa yang masuk ke dalam sel pengguna selanjutnya disimpan atau digunakan dalam proses metabolisme.

Gen penyandi protein SUT telah dikenal pada banyak spesies tanaman selain tebu *SoSUT1* dan *SoSUT2* (Sugiharto *et al.*, 2008) antara lain: pada gandum *TaSUT1* (Aoki *et al.*, 2004), padi *OsSUT1* (Matsukura *et al.*, 2000), Arabidopsis

*AtSUT2*, *AtSUT3*, dan *AtSUT4* (Stadler and Sauer, 1996), pada tomat *LeSUT1* dan *LeSUT4* (Barker *et al.*, 2000), dan pada tanaman kentang *StSUT1*, *StSUT2*, dan *SuSUT4* (Kuhn *et al.*, 1999).

## 2.2 Transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*

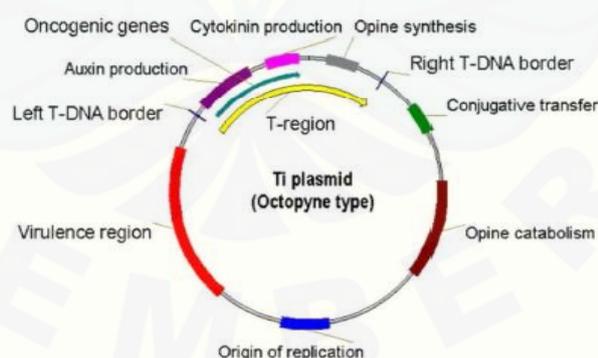
Perkembangan hasil pertanian melalui pendekatan bioteknologi dimulai sejak era 1980-an dan secara eksponensial naik hingga abad ke- 21. Dasar bioteknologi adalah rekombinasi gen, yaitu penggabungan fragmen DNA organisme satu ke dalam genom organisme lain. Molekul DNA yang terintegrasi ke dalam genom akan diekspresikan membentuk sifat baru (Huckket, 2008). Langkah penting dalam teknik rekayasa genetika adalah mengidentifikasi dan mengisolasi gen target; penempatan gen target pada vektor plasmid agar gen tersebut dapat ditransfer dalam genom organisme penerima; dan juga regenerasi jaringan organisme penerima khususnya tanaman secara *in vitro* sebagai sumber eksplan (Nasir *et al.*, 2000).

Teknik memasukkan gen baru ke dalam genom tanaman telah dikembangkan beberapa tahun kemudian seperti elektroporasi, mikroinjeksi *gene gun*, hingga ditemukan sistem Plasmid Ti (*Tumor-inducing*) bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (Huckket, 2008). *A. tumefaciens* merupakan bakteri gram negatif yang hidup alami dalam kondisi aerob di dalam tanah. Sifat patogen bakteri tersebut berhubungan dengan plasmid Ti yang dimilikinya. Plasmid Ti mengandung gen yang menginduksi pembentukan tumor pada tanaman (Mulyaningsih, 2009) hingga diketahui menyebabkan penurunan hasil panen tanaman pertanian seperti anggur, apel, dan *cherry* (Guo *et al.*, 2011).

Proses pembentukan tumor pada tanaman melibatkan beberapa komponen penting di dalam sel *Agrobacterium*. Komponen pertama adalah T-DNA (*transferred DNA*), yaitu fragmen DNA yang akan ditransfer ke dalam genom tanaman yang terkandung di dalam plasmid Ti (Gambar 2.2) (Lee and Gelvin, 2008). Daerah T-DNA dibatasi oleh sekuen DNA berulang pada sisi kanan dan kiri yang berukuran 25 bp. T-DNA mengandung dua macam gen: yang pertama adalah gen *oncogenic*, yaitu gen penyandi enzim yang berperan dalam produksi

auksin dan sitokinin. Hormon-hormon tersebut mengakibatkan pembelahan sel yang tidak terkendali sehingga mengakibatkan terbentuknya tumor. Gen yang kedua adalah gen yang berperan dalam sintesis *opines*. *Opines* merupakan senyawa kompleks yang diproduksi dan disekresikan oleh sel tumor, senyawa tersebut berfungsi sebagai sumber karbon dan nitrogen bagi *A.tumefaciens* (De La Riva *et al.*, 1998).

Komponen kedua adalah gen virulence (*Vir*), yaitu daerah yang berukuran 35-40 bp dalam plasmid Ti. Gen *Vir* terletak di sebelah batas kiri T-DNA. Gen *Vir* terdiri dari gen *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virG*, dan *virH*. Gen-gen *vir* tersebut menyandi protein virulensi yang berfungsi untuk menginduksi proses transfer dan integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman. Gen-gen *vir* yang paling penting memproduksi protein virulensi untuk mempengaruhi proses transfer adalah *virA*, B, D, dan G (Mulyaningsih, 2009). Sedangkan untuk meningkatkan efisiensi transfer adalah gen *virC* dan *virE* (De La Riva *et al.*, 1998). Komponen yang ketiga adalah gen *chromosomal virulence (chv)* yang terdiri atas *chvA*, *chvB*, *pscA*, dan *att*. Gen-gen tersebut berada di dalam kromosom dan bertanggung jawab dalam perlekatan bakteri pada sel tanaman, dengan memproduksi protein  $\beta$ -1,2-glukan.

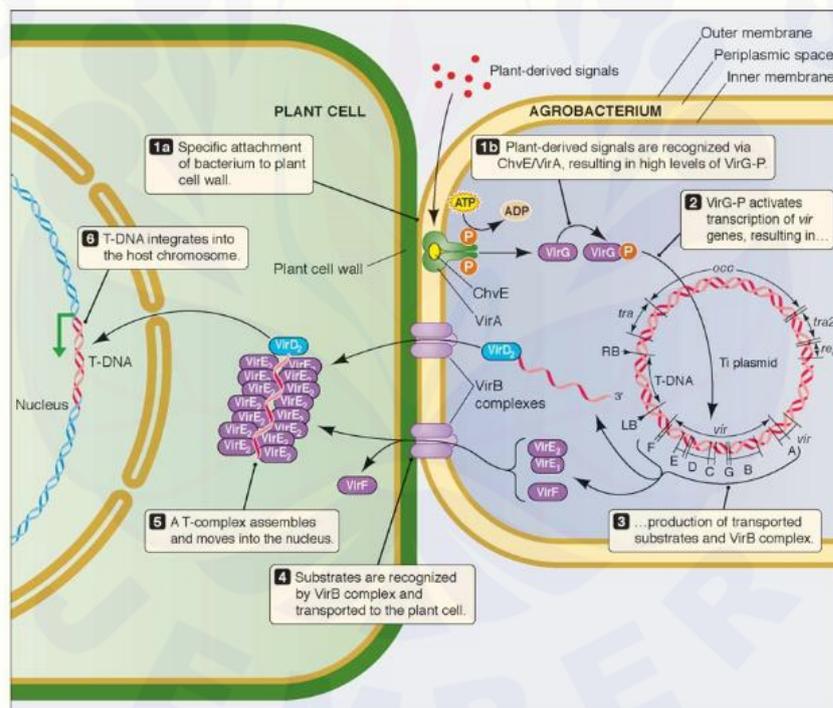


Gambar 2.2 *Tumor inducing* (Ti) Plasmid pada *A.tumefaciens* (Kakkar dan Verma, 2011).

Proses tranfer T-DNA dari *A. tumefaciens* ke sel tanaman (Gambar 2.3) meliputi: induksi ekspresi gen virulensi oleh senyawa fenolik tanaman ketika luka; produksi T-strand oleh kompleks protein *virD1/ D2*; produksi T-kompleks

(penggabungan T-strand dan *virE*); keluarnya T-kompleks dari sel bakteri; pemasukan T-kompleks dalam jaringan tanaman menuju inti sel; dan integrasi gen dalam kromosom tanaman (Kakkar and Verma, 2011).

Pada mekanisme transformasi genetik oleh *A.tumefaciens* sel tanaman yang luka akan menghasilkan senyawa monosiklik fenolik *acetosyringone* yang menginduksi gen *vir* dan molekul gula yang dapat dikenali oleh protein *chvE*. Senyawa *acetosyringone* dapat mengaktifkan protein periplasma *virA*. Selanjutnya *virA* bersama dengan protein *chvE* bekerja sama dalam fosforilasi *virG*, sehingga *virG* teraktivasi dan menstimulus proses ekspresi gen-gen *vir* lainnya pada tingkat transkripsi (Kakkar and Verma, 2011).



Gambar 2.3 Mekanisme Transformasi Genetik pada Tanaman oleh *A. tumefaciens* (McCullen dan Binns, 2006).

Di samping itu, *Right border* (RB) dan *Left Border* (LB) yang mengapit T-DNA menjadi target *virD1/ virD2 endonuclease*. Enzim *virD1/ virD2 endonuclease* dapat mengenali urutan RB dan LB sebagai tempat inisiasi dan

terminasi pengkopian T-DNA sehingga terbentuk *single strand* (ss) T-DNA. Ujung 5' ss T-DNA terikat kuat oleh protein *virD2*. Protein *virD2* memberikan sifat polar bagi ss T-DNA. Protein *virB* membentuk saluran pada membran dan juga bertindak sebagai ATP-ase guna menyediakan energi dalam proses transport ss T-DNA. Gen-gen *vir* lainnya seperti *virE1*, *virF*, dan *virD4* juga berfungsi untuk membantu proses transport T-DNA dari sel *Agrobacterium* menuju sel tanaman (Kakkar and Verma, 2011). Protein *virE2* berasosiasi dengan ss T-DNA membentuk T-complex yang nantinya akan memasuki nukleus tanaman melalui Nuclear Pore Complex (NPC). Protein *virD2* dan *virE2* mengandung Nuclear Localization Signal (NLS) yang dapat mengenali NPC. Ketika T-complex sudah memasuki nukleus, maka protein-protein yang membawa T-DNA akan terlepas. Sehingga T-DNA akan terintegrasi ke dalam genom tanaman (Tzfira and Citovsky, 2006).

Penelitian tentang bakteri *A. tumefaciens* kemudian menghasilkan informasi bahwa bakteri tersebut dapat menjadi agen biologis transfer DNA yang dikenal sebagai proses transformasi. Transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* saat itu hanya terbatas pada tanaman dikotil (Huckket, 2008), karena bakteri tersebut diketahui sebagai penyebab tumor (*crown gall*) pada tanaman dikotil (Mulyaningsih, 2009). Pada tahun 1980-an telah dilakukan transformasi genetik pada tanaman tembakau (Barton *et al.*, 1983). Transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* juga telah dilakukan pada tanaman kedelai (Lee *et al.*, 2012).

Transformasi genetik pada tanaman monokotil awalnya menggunakan metode *gene gun*, namun metode tersebut dapat menimbulkan pemasukan gen secara random (Huckket, 2008). Penelitian lebih intensif menghasilkan pemahaman tentang mekanisme transfer DNA oleh bakteri *A. tumefaciens*, sehingga tidak hanya berlaku untuk tanaman dikotil tetapi juga efisien untuk tanaman monokotil (Rahmawati, 2006).

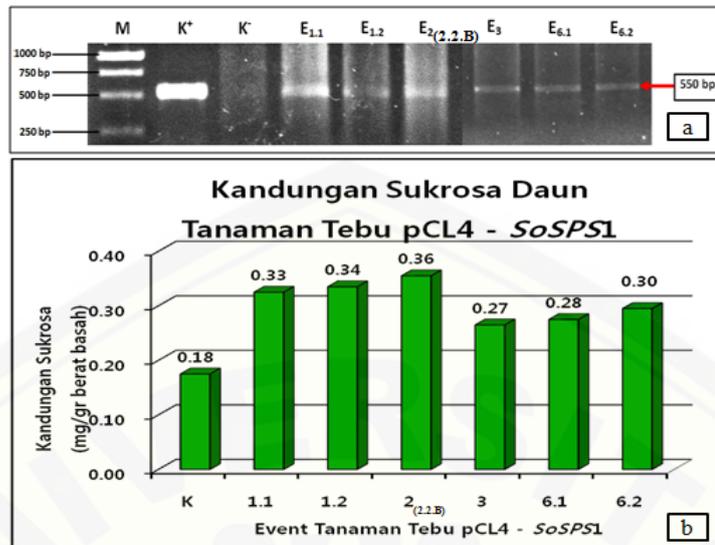
Kebutuhan pangan terbesar masyarakat dunia diketahui berasal dari tanaman monokotil spesifik suku Poaceae. Hal tersebut menjadi dasar dalam peningkatan hasil pertanian golongan rumput-rumputan melalui perbaikan sifat

tanaman secara genetik (Zombori *et al.*, 2011). Keberhasilan transformasi genetik pada tanaman monokotil pertama kali dilaporkan oleh Hiei, *et al.* (1997), yang telah menggunakan jaringan meristem tanaman padi. Selain itu beberapa kultivar padi lainnya juga berhasil ditransformasi menggunakan *A. tumefaciens* (Toki, 1997), di Indonesia sendiri hanya padi varietas Rojolele yang telah berhasil ditransformasi (Rahmawati, 2006). Kemudian hal yang sama juga dilaporkan oleh Takavar *et al.* (2010) yang telah berhasil melakukan transformasi genetik pada tanaman jagung.

Transformasi genetik pada tanaman tebu pertama kali dilakukan oleh Arencibia *et al.* (1998) dengan menggunakan kalus embrionik sebagai eksplan. Kemudian perkembangan penelitian perbaikan sifat tanaman tebu juga dilakukan di wilayah Afrika selatan (Watt *et al.*, 2010), salah satunya tahan terhadap herbisida (Huckket, 2008).

### **2.3 Tanaman Tebu PRG Overekspresi Gen *SoSPSI event 2.2.B* dan Perbanyak Eksplan Tanaman Tebu**

Tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI* merupakan tebu varietas BL yang telah ditransformasi dengan gen *SoSPSI* dalam konstruk plasmid pCL4-*SoSPSI* menggunakan *A. tumefaciens* strain GV3101. Tanaman tebu positif transforman gen *SoSPSI* yang didapatkan meliputi *event 1.1*, *1.2*, *2 (2.2.B)*, *3*, *6.1*, dan *6.2* (Baskoro, 2012). Berdasarkan analisis kandungan sukrosa daun pada keenam *event* tanaman tersebut diketahui bahwa tanaman *event 2 (2.2.B)* memiliki kandungan sukrosa daun tertinggi (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 Hasil Analisis tanaman tebu PRG overekspresi gen *SoSPS1*: a: analisis PCR, b: analisis kandungan sukrosa pada daun (Sumber: Baskoro, 2012).

Penggunaan eksplan transformasi turut mempengaruhi keberhasilan proses transformasi. Oleh karena itu, untuk mendapatkan hasil transformasi yang baik maka eksplan yang digunakan harus bersifat mudah diinfeksi oleh *A. tumefaciens*, mampu beregenerasi, dan dapat meminimalisir terjadinya penyimpangan genetik. Penggunaan pangkal tunas tebu *in vitro* sebagai eksplan transformasi didasarkan pada kelebihanannya yaitu mengurangi variasi somaklonal. Variasi somaklonal dapat terjadi karena proses regenerasi eksplan yang melalui kultur kalus, sehingga pangkal tunas tebu *in vitro* menjadi alternatif penggunaan eksplan karena terinisiasi dari tunas aksiler tanpa melalui fase kalus (Hazmi, 2009). Selain itu kelebihan regenerasi secara langsung dari bagian tanaman tanpa melalui fase kalus adalah memerlukan waktu lebih pendek dan memiliki efisiensi transformasi yang lebih tinggi (Manickavasagam *et al.*, 2004).

Perbanyakkan eksplan diperlukan dalam persiapan proses transformasi. Hal tersebut dipengaruhi oleh komposisi media tanam yang digunakan. Media tanam dengan penambahan glisin  $2 \text{ mg l}^{-1}$  telah umum digunakan untuk menginduksi tunas tanaman *in vitro* (Yusnita *et al.*, 2013). Senyawa glisin berfungsi untuk meningkatkan pertumbuhan sel (Saad and Elshahed, 2012). Selain itu ukuran

eksplan juga berpengaruh terhadap efektivitas transformasi. Eksplan yang terlalu kecil memiliki daya tahan yang rendah ketika dikulturkan (Wattimena *et al.*, 1991) sehingga keberhasilan untuk tumbuh juga kecil. Oleh karena itu, untuk memperbesar tunas, maka digunakan senyawa glutamin sebagai bahan tambahan media tanam *in vitro*. Menurut Asharo *et al.* (2013) senyawa glutamin berfungsi untuk donor nitrogen dalam biosintesis komponen organik bernitrogen seperti klorofil dan nukleotida, selain itu glutamin sebagai asam amino prekursor dalam pembentukan asam amino yang lainnya. Pemberian glutamin dengan konsentrasi 50-100 mg l<sup>-1</sup> dapat menunjukkan respon pertumbuhan dan perkembangan eksplan yang meningkat, hal tersebut ditandai dengan badan tunas yang membengkak dan berwarna hijau segar



### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Bioteknologi CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember pada Bulan Juni 2014 sampai dengan Maret 2015.

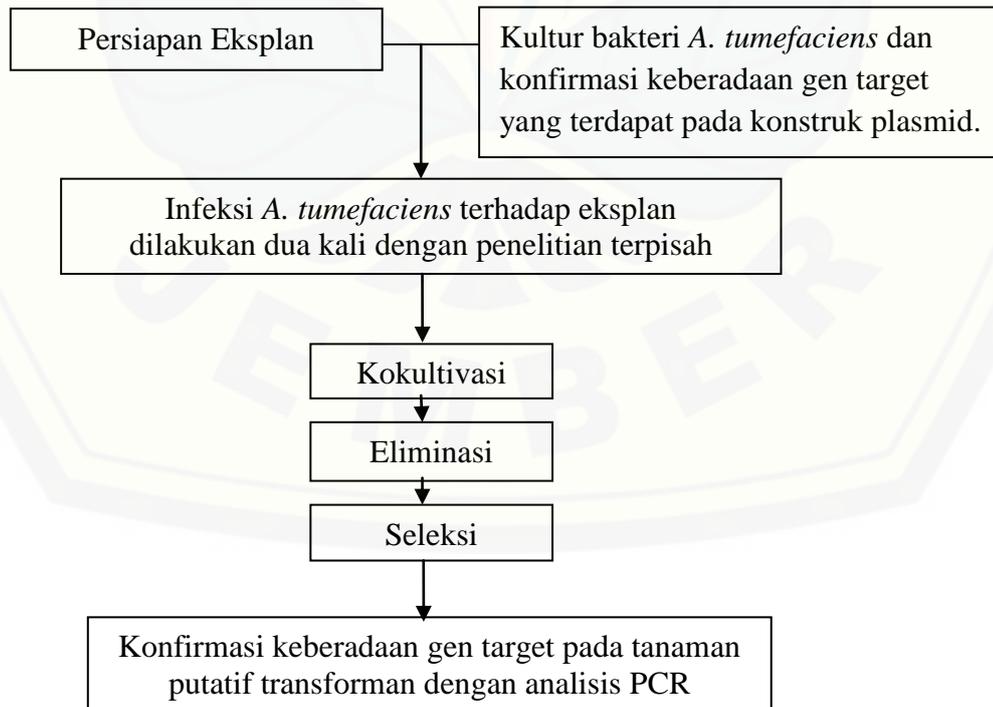
#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah alat standart kultur jaringan, alat isolasi DNA genom dan isolasi DNA plasmid, alat kultur bakteri, serta alat transformasi yang disebutkan dalam prosedur penelitian.

Bahan yang digunakan adalah planlet tebu *in vitro* var. Bulu Lawang (BL) PRG overekspresi gen *SoSPSI event 2.2.B* dan biakan bakteri *A.tumefaciens* strain GV3101 yang mengandung konstruk gen pAct-*SoSUT1*.

#### 3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan menurut alur penelitian berikut ini:

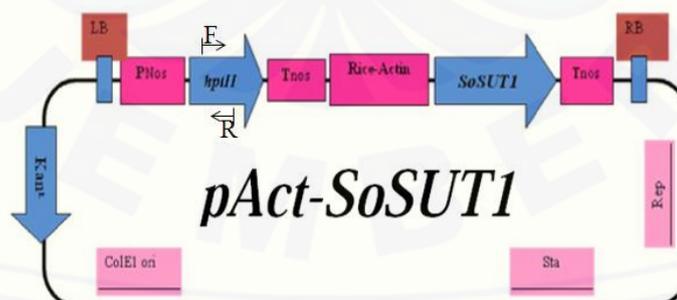


### 3.3.1 Persiapan Eksplan

Planlet tebu *in vitro* var. BL overekspresi gen *SoSPS1 event 2.2.B* ditumbuhkan pada media seleksi MS<sub>0</sub> (*Murashige and Skoog*) yang ditambah *Kanamycin* 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> dan *Glutamin* 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> untuk memperbesar tunas dan *Glisin* 2 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> untuk perbanyak. Selanjutnya planlet disubkultur setiap 3 minggu sekali. Proses subkultur dilakukan sampai planlet berjumlah ±50 dan bagian pangkal tunas digunakan sebagai sumber eksplan transformasi. Satu tahapan transformasi dibutuhkan ±50 eksplan.

### 3.3.2 Kultur *Agrobacterium tumefaciens* dan Plasmid pAct-SoSUT1

Transformasi dilakukan dengan menggunakan *A. tumefaciens* strain GV3101 yang mengandung plasmid pAct yang terinsersi oleh gen *Sucrose Transporter (SoSUT1)*. Peta konstruk plasmid pAct-SoSUT1 dapat dilihat pada Gambar 3.1. Biakan *A. tumefaciens* yang diperoleh dari *gliserol stock* diinokulasikan sebanyak 50µl pada media YEP (*Yeast Extract Peptone*) cair 2 ml yang mengandung antibiotik *Kanamycin* 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, *Rifampicin* 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, dan *Gentamycin* 12,5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>. Tahap selanjutnya adalah inkubasi biakan pada media YEP 2 ml dengan cara digojog dengan kecepatan 150 rpm, suhu 28°C semalam. Selain itu biakan *A.tumefaciens* juga diinokulasikan pada media YEP padat dengan komposisi antibiotik yang sama dan diinkubasi di tempat gelap dengan suhu 28°C selama 48 jam.



Gambar 3.1 Peta konstruk plasmid pAct-SoSUT1 yang tersusun oleh batas T-DNA yaitu LB: *Left Border* dan RB: *Right Border*, P-Nos: *Promoter Nopaline synthetase*, hptII: *Hygromycin Phosphotransferase gene*, T-nos: *Terminator Nopaline Synthetase*, Promoter Rice Actin, SoSUT1: *Sucrose Transporter* pada tanaman tebu, Sta: *plasmid stability*, Rep dan ColE1-ori: *double origin of replication* for plasmid in *Agrobacterium* (Sumber: Sugiharto, 2010).

### 3.3.3 Isolasi DNA Plasmid dan Konfirmasi keberadaan gen *hptII*

Isolasi plasmid dilakukan untuk konfirmasi keberadaan gen *hptII* yang terkandung dalam plasmid pAct dari *A. tumefaciens*. Teknik isolasi plasmid dari sel bakteri dilakukan berdasarkan metode yang disebutkan dalam Sambrook *et al.* (1989). Langkah awal isolasi plasmid adalah menumbuhkan sel-sel bakteri *A.tumefaciens* yang mengandung konstruk plasmid pAct-*SoSUT1* pada media YEP cair 2 ml dan digojog pada suhu 28°C semalam. Setelah itu sel dipanen, kemudian dilakukan ekstraksi plasmid dari sel. DNA plasmid yang dihasilkan dilarutkan dalam 20µl buffer TE. DNA diamplifikasi dengan alat PCR dan dikonfirmasi dengan elektroforesis 1% gel agarosa, selanjutnya divisualisasi dengan *Gel Imaging System*.

### 3.3.4 Infeksi *Agrobacterium tumefaciens* Pada Pangkal Tunas Tebu

Koloni tunggal *A. tumefaciens* GV3101 yang mengandung konstruk pAct-*SoSUT1* diinokulasikan pada media YEP cair 2 ml yang mengandung antibiotik *Kanamycin* 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, *Rifampicin* 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, dan *Gentamycin* 12,5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, dan diinkubasi *shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C semalam. Starter sebanyak 2 ml disubkultur dalam media YEP cair 50 ml yang mengandung antibiotik yang sama, diinkubasi *shaker* 150 rpm pada suhu 28°C hingga kerapatan sel (OD<sub>600</sub>) mencapai 0,5-1.

Planlet yang berjumlah ±50 dipotong bagian pangkal sepanjang 0,5 cm. Eksplan hasil pemotongan ditampung dalam MS<sub>0</sub> cair 50 ml, kemudian dipindahkan pada petri disk steril dan dilukai dengan jarum steril sebanyak 3-6 kali. Setelah itu eksplan diinfeksi dengan cara direndam pada media YEP cair 50 ml yang berisi kultur *A. tumefaciens* dengan penambahan 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> *acetosyringone*. Senyawa *acetosyringone* digunakan untuk menginduksi proses infeksi, kemudian digojog dengan kecepatan 120 rpm, suhu 28°C, pada kondisi gelap, selama 15 menit untuk proses infeksi. Eksplan hasil inkubasi disaring dan dibilas dengan akuades steril 50 ml, lalu ditiriskan pada tisu steril ±15 menit dan ditanam pada media kokultivasi.

### 3.3.5 Kokultivasi, Eliminasi, dan Seleksi Transforman Tebu

Eksplan hasil transformasi ditumbuhkan pada media kokultivasi untuk menumbuhkan *A. tumefaciens* bersama dengan eksplan. Media kokultivasi terdiri dari media MS<sub>0</sub> dengan penambahan 100 mgL<sup>-1</sup> *acetosyringone*. Eksplan selanjutnya diinkubasi pada tempat gelap dengan suhu 25°C selama 3 hari.

Eksplan sesudah diinkubasi pada media kokultivasi selanjutnya dicuci terlebih dahulu dengan *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> dalam 100 ml aquades, lalu dibilas dengan aquades steril. Perlakuan tersebut diulang sebanyak tiga kali, lalu eksplan dikeringkan diatas kertas saring steril selama ±15 menit. Penanaman eksplan kemudian dilakukan pada media eliminasi yang terdiri dari MS<sub>0</sub> yang mengandung *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup>, lalu diinkubasi pada kondisi terang pada suhu 25°C selama 7 hari.

Proses seleksi transforman tebu dilakukan dengan cara menanam eksplan dari media eliminasi ke dalam media seleksi. Tahapan seleksi dilakukan sebanyak lima kali. Seleksi 1 pada media yang mengandung MS<sub>0</sub> + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> + *hygromycin* 10 mgL<sup>-1</sup>. Seleksi 2 sampai 3 menggunakan media yang mengandung MS<sub>0</sub> + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> + *hygromycin* 20 mgL<sup>-1</sup>, dan seleksi 4 sampai 5 menggunakan MS<sub>0</sub> + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> + *hygromycin* 20 mgL<sup>-1</sup> + *kanamycin* 50 mgL<sup>-1</sup>. Pada tahap seleksi dibutuhkan waktu 5 siklus, inkubasi masing-masing siklus selama 21 hari dalam kondisi terang. Tanaman tebu yang lolos sampai seleksi ke 5 disebut sebagai tanaman tebu putatif transforman.

### 3.3.6 Isolasi DNA Genom Tanaman Putatif Transforman

Tahap ini dilakukan untuk mengawali proses konfirmasi keberadaan gen target dalam genom tanaman. Isolasi DNA genom dilakukan dengan menggerus daun tebu dengan nitrogen cair sampai halus. Serbuk daun dimasukkan dalam *microtube*, kemudian ditambahkan 500 µl Buffer ekstraksi (0,2 M Tris-Cl; 0,25 M NaCl; 0,25 M EDTA; 2,5 ml SDS 10%; dan 13,75 ml H<sub>2</sub>O) lalu divortex. Setelah itu ditambahkan 500 µl PCI dan *swirling* sampai terbentuk dua lapisan, kemudian disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk dipindahkan pada eppendorf baru lalu ditambah isopropanol sebanyak

0,8 x volume supernatan dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Setelah disentrifuge, pelet dicuci dengan ethanol 70% sebanyak 1 ml, lalu disentrifuge kembali. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan selama 15 menit, lalu ditambahkan 30 $\mu\text{l}$  buffer TE. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya menggunakan *nano vue plus* dan kemudian dianalisis PCR.

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

Analisis PCR dilakukan untuk deteksi keberadaan gen target yang telah terinsersi ke dalam genom tanaman. PCR dilakukan menggunakan sepasang primer *hptII* (*Hygromycin phosphotransferase*) yaitu *hptII-F* (5'-CCG CAA GGA ATC GGT CAA TA-3'), primer *hptII-R* (5'-CCC AAG CTG CAT CAT CGA AA-3') yang akan menghasilkan fragmen DNA sebesar 470 bp dan *nptII* (*neomycin phosphotransferase II*) *nptII-F* (5'-GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGCC-3') dan *nptII-R* (5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCG-3') yang akan meamplifikasi DNA sepanjang 550 bp.

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan *Kapa Master Mix*. Pada satu kali reaksi total volume yang digunakan adalah 20 $\mu\text{l}$ . Pada campuran tersebut terdiri dari PCR *Master Mix* 10  $\mu\text{l}$ , primer *forward* dan *reverse* masing-masing 1  $\mu\text{l}$ , DNA *template* 2  $\mu\text{l}$ , dan ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu\text{l}$ . Proses PCR dilakukan sebanyak 40 siklus yang terdiri dari tahap *pre-Denaturation*:  $95^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit, *Denaturation*:  $95^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, *Annealing*:  $58^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, *Extention*:  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *Final- Extention*:  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit untuk primer *nptII*. Program untuk primer *hptII* adalah *pre-Denaturation*:  $95^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit, *Denaturation*:  $95^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, *Annealing*:  $50^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, *Extention*:  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit, *Final- Extention*:  $72^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit.

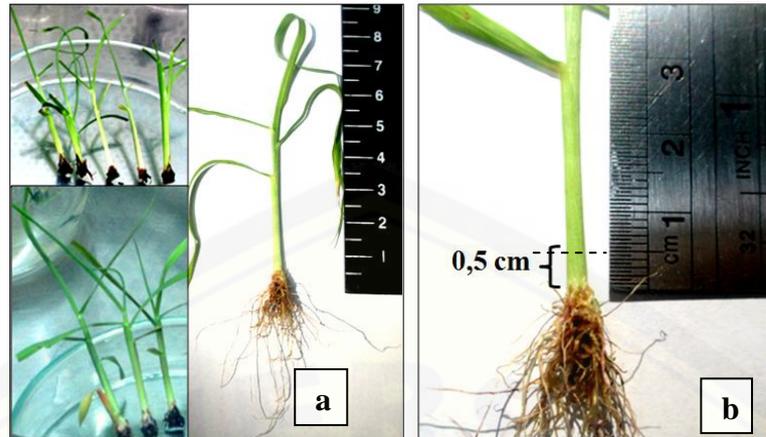
DNA yang sudah diamplifikasi selanjutnya dipisahkan dengan *agarose gel* 1% elektroforesis yang mengandung 1,5 $\mu\text{l}$  EtBr (*Ethidium Bromide*) dengan tegangan 100 Volt selama 25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 kb *Ladder* sebanyak 3 $\mu\text{l}$  untuk memudahkan dalam pembacaan *band* DNA. Hasil elektroforesis dilihat dan didokumentasikan menggunakan alat *Gel Imaging System*.

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Eksplan Pangkal Tunas Tebu *in vitro* Untuk Transformasi

Tebu *in vitro* var. BL PRG overekspresi gen *SoSPS1 event 2.2.B* ditanam pada media  $MS_0 + kanamycin\ 50\ mg\ l^{-1}$  dengan penambahan glisin  $2\ mg\ l^{-1}$  yang berguna untuk meningkatkan jumlah tunas. Antibiotik *kanamycin* dengan konsentrasi  $50\ mg\ l^{-1}$  digunakan untuk seleksi tanaman yang mengandung gen *npt* pada T-DNA plasmid *pCL4-SoSPS1*, yaitu gen ketahanan terhadap antibiotik *kanamycin*. Menurut Carrer *et al.*, (1993), konsentrasi  $50\ mg\ l^{-1}$  *kanamycin* sudah dapat digunakan untuk menyeleksi tanaman positif transforman karena mampu menghambat pertumbuhan tanaman yang bukan transforman. Tanaman tebu *in vitro* selanjutnya ditanam pada media  $MS_0 + kanamycin\ 50\ mg\ l^{-1}$  dengan penambahan glutamin  $100\ mg\ l^{-1}$  yang bermanfaat untuk memperbesar tunas sehingga dapat digunakan untuk sumber eksplan transformasi.

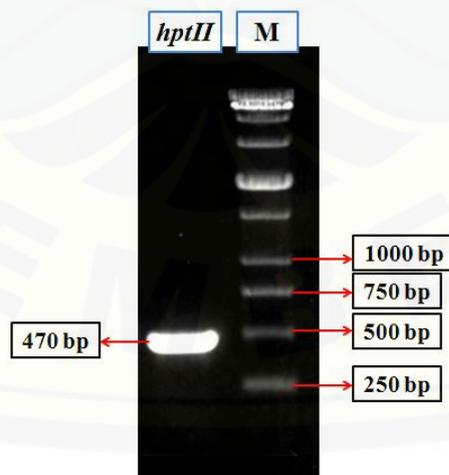
Proses perbanyak tunas membutuhkan waktu selama  $\pm 4$  bulan dengan dilakukan tahap subkultur selama 3 minggu sekali. Perbanyak tunas dilakukan untuk memenuhi kebutuhan eksplan transformasi, setiap transformasi dibutuhkan  $\pm 50$  tunas. Media perbanyak digunakan secara bertahap, yang pertama yaitu media  $MS_0 + kanamycin\ 50\ mg\ l^{-1} + glisin\ 2\ mg\ l^{-1}$ . Pada media tersebut dapat dihasilkan 1-6 tunas setiap satu kali subkultur. Media perbanyak yang kedua adalah media  $MS_0 + kanamycin\ 50\ mg\ l^{-1} + glutamin\ 100\ mg\ l^{-1}$ . Pada media tersebut dihasilkan 1-3 tunas. Kriteria tunas yang digunakan untuk transformasi adalah tunas yang memiliki tinggi  $\pm 5$  cm, kokoh, memiliki jumlah daun minimal 3 helai, dengan pangkal tunas yang membengkak. Eksplan yang digunakan adalah bagian pangkal tunas tebu dengan ukuran panjang 0,5 cm, diukur dari pangkal akar ke arah pucuk (Gambar 4.1). Penggunaan eksplan pangkal tunas tebu memungkinkan proses transformasi terjadi lebih efektif karena pangkal tunas tebu terdiri dari jaringan meristem yang aktif membelah dan memerlukan waktu relatif singkat untuk beregenerasi (Manickavasagam *et al.*, 2004).



Gambar 4.1 Tunas tebu PRG overekspresi gen *SoSPSI event 2.2.B* (a) Tunas tebu hasil perbanyakan secara *in vitro* berumur 3-4 minggu. (b) bagian pangkal tunas berukuran 0,5 cm yang dijadikan sebagai eksplan transformasi.

#### 4.2 Konfirmasi Keberadaan Gen *hptII* dalam *Agrobacterium tumefaciens*

Konfirmasi keberadaan gen *hptII* pada konstruk plasmid *pAct-SoSUT1* yang terkandung dalam *A. tumefaciens* dilakukan melalui analisis PCR. Pada analisis PCR tersebut digunakan *template* DNA plasmid dan primer *Forward* (F) dan *Reverse* (R) *hptII*. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa terdapat pita DNA berukuran 470 bp yang ditentukan berdasarkan Marker 1kb DNA *Ladder* (Gambar 4.2). Panjang DNA tersebut sesuai dengan panjang DNA *hptII* yang teramplifikasi dengan pasang primer *F-R hptII*.



Gambar 4.2 Hasil PCR menggunakan primer F-R *hptII* dan DNA *template* yang diisolasi dari bakteri *A. tumefaciens* strain GV 3101: M: DNA marker 1 kb *Ladder*, *hptII*: fragmen DNA *hptII* yang terdapat dalam konstruk plasmid *pAct-SoSUT1*.

Hasil analisis PCR tersebut menunjukkan bahwa konstruk plasmid pAct-*SoSUT1* telah terkandung dalam sel bakteri *A. tumefaciens* strain GV 3101, sehingga dapat digunakan sebagai vektor transformasi pada tanaman tebu.

### 4.3 Transformasi Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu

Persiapan awal transformasi dilakukan proses kultur bakteri *A. tumefaciens* pada media YEP dengan menggunakan komponen tambahan yaitu antibiotik *rifampicin* 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, *gentamicin* 12,5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, dan *kanamycin* 50 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>. Antibiotik *gentamycin* berfungsi sebagai penyeleksi strain *Agrobacterium* yaitu GV 3101. Antibiotik *rifampicin* berfungsi sebagai penyeleksi sel bakteri *Agrobacterium*. Antibiotik *kanamycin* berfungsi sebagai penyeleksi sel *Agrobacterium* yang mengandung konstruk plasmid dengan gen ketahanan terhadap *kanamycin*.

Kepadatan *A. tumefaciens* yang digunakan dalam proses transformasi adalah sebesar 0,7. Kepadatan tersebut adalah kepadatan bakteri optimal yang tidak menimbulkan *overgrowth* di segala tahapan transformasi. Menurut Setyati (2007) kepadatan populasi *A. tumefaciens* yang digunakan pada proses transformasi tanaman tebu adalah berkisar 0,5-1,0, pada kisaran tersebut diketahui bahwa bakteri *A. tumefaciens* berada pada fase logaritmik sehingga proses infeksi lebih optimal. Menurut Mannan *et al.* (2009) kepadatan populasi bakteri yang terlalu rendah dapat mengurangi frekuensi insersi T-DNA, sedangkan kepadatan yang terlalu tinggi dapat mengganggu regenerasi tanaman.

Setelah dilakukan proses infeksi oleh *A. tumefaciens* dalam media 50 ml media YEP+ *acetosyringone* 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>, eksplan harus dikeringkan terlebih dahulu sebelum masuk dalam media kokultivasi agar dapat meminimalkan kemungkinan terjadinya kontaminasi bakteri atau jamur. Penambahan senyawa *acetosyringone* 100 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> bertujuan untuk mengaktifasi protein *virG* dan gen virulen lainnya yang bertanggung jawab dalam proses transfer dan integrasi DNA target ke dalam genom tanaman. Inkubasi dalam kondisi gelap pada media kokultivasi dapat menginduksi pertumbuhan tunas bagian pucuk (etiolasi). Menurut Manickavasagam *et al.* (2004) jika inkubasi selama lebih dari tiga hari akan

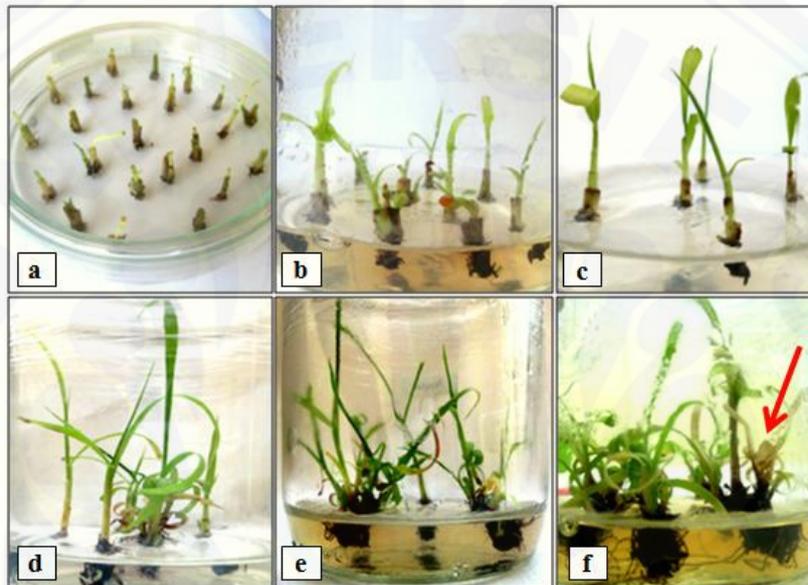
menyebabkan penurunan efisiensi transformasi karena pertumbuhan bakteri yang berlebihan dan kemudian mempengaruhi kematian eksplan. Pada hari ketiga, eksplan event 2.2.B sudah menunjukkan adanya pertumbuhan tunas (Gambar 4.3).

Setelah kokultivasi, eksplan ditanam pada media eliminasi yang mengandung *cefotaxime* 500 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>. Antibiotik *cefotaxime* digunakan untuk mengeliminasi bakteri *A. tumefaciens*. Menurut Mathias and Boyd (1986) *cefotaxime* merupakan antibiotik golongan sefalosporin yang aktif menghambat sintesis peptidoglikan terutama bakteri gram negatif. Selain itu, menurut Manickavasagam *et al.* (2004) konsentrasi *cefotaxime* optimal untuk mengeliminasi sel *A. tumefaciens* dan tidak bersifat toksik untuk eksplan adalah sebesar 500 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup>.

Setelah melalui tahap eliminasi, selanjutnya eksplan memasuki tahap seleksi yang bertujuan untuk menyeleksi tanaman yang sudah mengandung gen target. Konsentrasi *hygromycin* secara bertingkat 10-20 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> pada media seleksi bertujuan untuk meningkatkan efektifitas antibiotik tersebut dalam menyeleksi tanaman yang ditransformasi. Tahap seleksi merupakan faktor kunci yang menentukan keberhasilan metode transformasi genetik. Fragmen DNA target yang terintegrasi dalam genom tanaman dan berbagai macam antibiotik yang digunakan pada tiap media seleksi menjadi penyeleksi baik bagi tanaman yang transforman maupun tanaman yang tidak transforman.

Tebu *in vitro* event 2.2.B sebelumnya merupakan tanaman positif transforman overekspresi gen *SoSPS1* melalui transformasi menggunakan konstruk plasmid pCLA-*SoSPS1* (Baskoro, 2012). Pada tanaman tersebut terdapat gen *nptII*, yaitu gen penyandi protein yang bertanggung jawab dalam ketahanan terhadap antibiotik *kanamycin*. Antibiotik *kanamycin* dapat mengganggu sintesis protein pada tanaman sehingga akan menghambat pertumbuhan tanaman. Menurut Matthews *et al.* (1995), mekanisme gen *nptII* dalam ketahanan terhadap antibiotik *kanamycin* adalah dengan mensintesis enzim *neomycin phosphotransferase II* yang dapat memfosforilasi *kanamycin* sehingga menjadi inaktif.

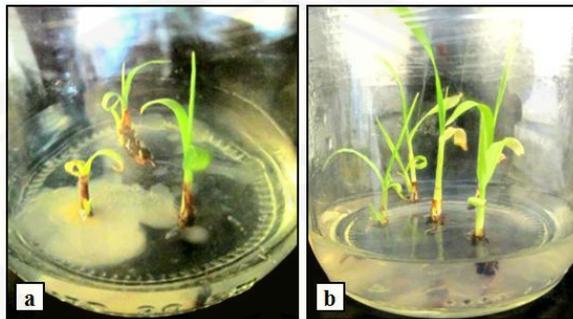
Tebu *in vitro* event 2.2.B kemudian telah ditransformasi menggunakan gen *SoSUT1* sehingga mengandung gen penyeleksi *hptII*, yaitu gen penyandi protein yang bertanggung jawab dalam ketahanan terhadap antibiotik *hygromycin*. Menurut (Arago and Brasileiro, 2002) Gen *hptII* menyandi enzim *hygromycin-4-fosfotransferase* yang dapat memfosforilasi gugus hidroksil dari antibiotik *hygromycin* kemudian menjadi inaktif sehingga tidak toksik pada tanaman.



Gambar 4.3 Eksplan tanaman tebu *in-vitro* event 2.2.B setelah proses transformasi pada media kokultivasi umur 3 hari (a), eksplan tebu pada media eliminasi umur 5 hari (b), eksplan tebu pada media seleksi I umur 1 hari (c), eksplan tebu pada media seleksi II umur 8 hari (d), eksplan tebu pada media seleksi III umur 18 hari (e), dan eksplan tebu pada media seleksi IV umur 1 minggu (f) bagian yang ditunjuk panah merupakan bagian planlet yang mengalami albino dan akhirnya mati.

Berdasarkan gambar 4.3 eksplan mampu untuk tumbuh baik dan membentuk tunas hingga pada seleksi III, namun ada pula tunas yang mengalami pencokelatan dan mati sejak masa seleksi I. Hal tersebut dikarenakan tunas tidak terinsersi T-DNA yang mengandung gen ketahanan *hptII* sehingga tidak mampu bertahan ketika ada paparan antibiotik *hygromycin*. Menurut Pangestu (2011) Antibiotik *hygromycin* dapat menghambat pertumbuhan tanaman melalui penghambatan sintesis protein sehingga menyebabkan *browning* dan mati.

Selain karena pengaruh antibiotik, pengurangan jumlah tunas pada awal masa seleksi juga disebabkan oleh kematian karena terjadinya *overgrowth* *A.tumefaciens*. Pada transformasi I terjadi *overgrowth* pada 6 eksplan ketika berada pada tahap seleksi I (Gambar 4.4).



Gambar 4.4 Eksplan tebu *in-vitro* event 2.2.B yang mengalami hambatan pertumbuhan karena *overgrowth* *A.tumefaciens* pada media seleksi I (a) dan tanaman tebu event 2.2.B yang sehat pada media seleksi I (b).

Selanjutnya ketika berada pada seleksi IV-V anakan tunas mulai menunjukkan gejala albino yaitu memudarnya warna hijau pada daun sampai berwarna putih dan akhirnya mati, hal ini disebabkan oleh terganggunya metabolisme kloroplas yang disebabkan paparan antibiotik *kanamycin*. Menurut Miswar (2007) antibiotik *kanamycin* dapat mengganggu sintesis protein yang berguna dalam biogenesis kloroplas, yaitu dengan cara mengikat sub unit ribosom dan mengganggu proses translasi mRNA sehingga menyebabkan etiolasi dan klorosis pada tanaman. Anakan tunas yang mati kemungkinan tidak memiliki gen ketahanan *nptII* dari induknya yang telah lolos pada media perbanyakan tunas sebelum masa infeksi. Sebaliknya tunas dan anakan tunas yang mengandung gen ketahanan *nptII* akan terus hidup walaupun berada dalam paparan antibiotik *kanamycin*. Peran dua jenis antibiotik yaitu *hygromycin* ( $10 \text{ mg l}^{-1}$  dan  $20 \text{ mg l}^{-1}$ ) dan *kanamycin* ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) sebagai agen penyeleksi terhadap gen *hptII* dan *nptII* terlihat pada hasil transformasi (Tabel 4.1).

Efektivitas transformasi didasarkan pada jumlah planlet yang hidup selama tahap kokultivasi, eliminasi, dan lima siklus seleksi dengan menggunakan rumus:

$$\text{Efektivitas Transformasi} = \frac{\text{Jumlah tanaman yang lolos tiap tahapan transformasi}}{\text{Jumlah eksplan awal}} \times 100\%$$

dan yang positif mengandung gen *SoSUT1* dengan menggunakan rumus:

$$\text{Efektivitas Transformasi} = \frac{\text{Jumlah tanaman yang positif transforman}}{\text{Jumlah eksplan awal}} \times 100\%$$

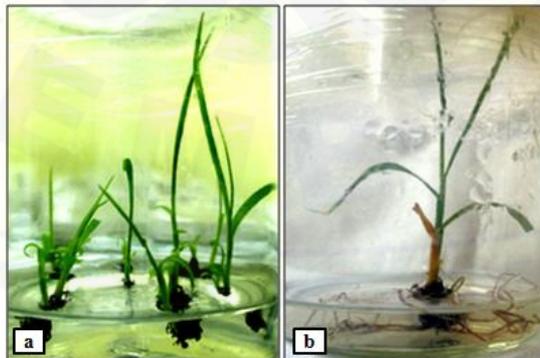
Pada transformasi I dari persentase 100% eksplan menjadi 38% eksplan yang lolos seleksi. Pada transformasi II dari 100% eksplan hanya terdapat 18% yang lolos dari media seleksi.

Tabel 4.1 Persentase Eksplan pada Tahapan Transformasi

| Transformasi | Perhitungan | K    | E    | S.1 | S.2 | S.3 | S.4 | S.5 | Lolos |
|--------------|-------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| I            | Persentase  | 100% | 100% | 86% | 58% | 56% | 54% | 48% | 38%   |
|              | Σ Eksplan   | 50   | 50   | 43  | 29  | 28  | 27  | 24  | 19    |
| II           | Persentase  | 100% | 90%  | 51% | 48% | 42% | 37% | 31% | 18%   |
|              | Σ Eksplan   | 67   | 60   | 34  | 32  | 28  | 25  | 21  | 12    |

**Keterangan:** K= Kokultivasi, E= Eliminasi, dan S= Seleksi (5 siklus).

Tanaman yang lolos dari media seleksi dapat disebut sebagai tanaman putatif transforman (Gambar 4.5). Tanaman lolos seleksi memiliki kondisi yang segar dengan warna daun hijau segar dan perakaran yang baik. Pada transformasi I dengan jumlah eksplan awal sebanyak 50 eksplan, terdapat 19 eksplan yang lolos dari media seleksi. Pada transformasi II dengan jumlah eksplan awal sebanyak 67 eksplan, hanya terdapat 12 eksplan yang lolos dari media seleksi. Selanjutnya pada tanaman putatif transforman tersebut dilakukan isolasi DNA genom untuk digunakan sebagai *template* dalam analisis PCR.



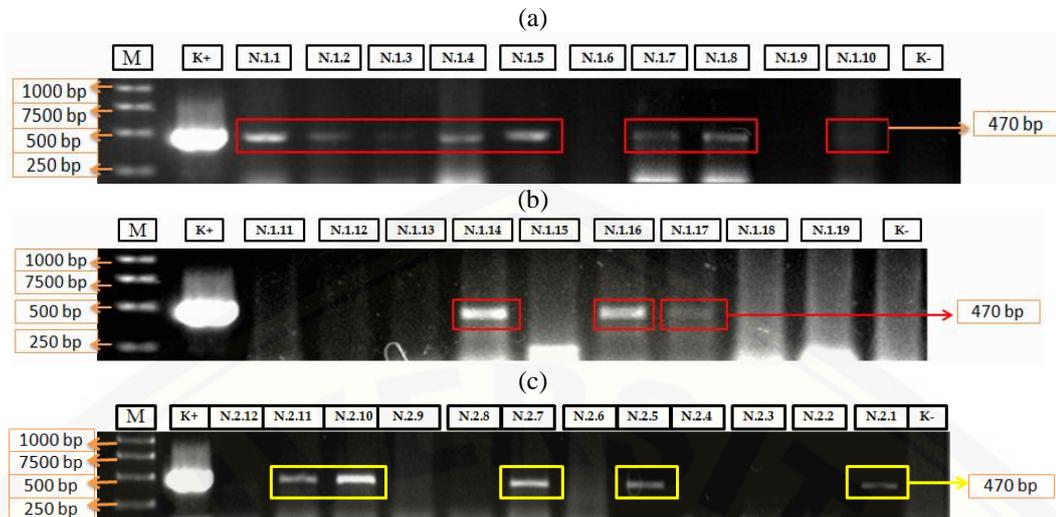
Gambar 4.5 Tanaman tebu yang lolos media seleksi (a) dan tanaman tebu yang siap untuk aklimatisasi (b).

## 4.4 Hasil Analisis PCR Tanaman Tebu PRG Overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*

Keberhasilan transformasi genetik ditentukan oleh terintegrasinya gen target dalam genom tanaman. Tahapan untuk mendeteksi apakah gen target sudah terintegrasi pada genom tanaman adalah dengan melakukan isolasi genom dan analisis PCR. Isolasi DNA genom dan analisis PCR dilakukan pada 19 tanaman putatif transforman yang telah lolos seleksi transformasi I dan 12 tanaman putatif transforman yang lolos seleksi transformasi II.

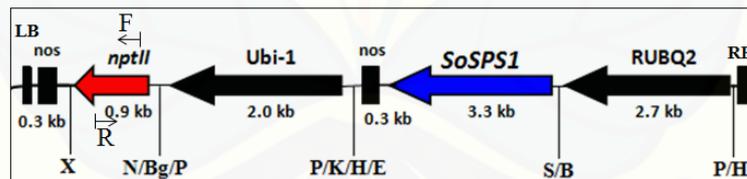
Konfirmasi gen target *SoSUT1* dan *SoSPS1* yang terkandung dalam tanaman putatif transforman adalah dengan mendeteksi keberadaan gen penyeleksi menggunakan pasangan primer untuk gen *hptII* dan *nptII*. Hal ini sesuai dengan peta konstruk (Gambar 3.1 hal. 14) bahwa gen *SoSUT1* berada dalam satu kaset T-DNA dengan gen ketahanan antibiotik *hptII*, sehingga keberadaan gen *SoSUT1* bisa dideteksi dengan gen *hptII*. Bila digunakan primer gen *SoSUT1* maka akan teramplifikasi juga gen *SoSUT1* endogenus, sehingga akan sulit dideteksi keberhasilan transformasi.

Berdasarkan hasil analisis PCR menggunakan primer *hptII* (Gambar 4.6) tanaman tebu yang telah mengandung gen *SoSUT1* hasil transformasi I adalah sebanyak 11 tanaman, yaitu event N.1.1 sampai N.1.5, N.1.7, N.1.8, N.1.10, N.1.14, N.1.16, dan N.1.17. Sedangkan pada hasil transformasi II adalah sebanyak 5 tanaman, yaitu event N.2.1, N.2.5, N.2.7, N.2.10, dan N.2.11. Jumlah total tanaman positif gen *SoSUT1* adalah sebanyak 16 tanaman. Efektivitas transformasi gen *SoSUT1* pada transformasi I adalah sebesar 22%, sedangkan pada transformasi II adalah sebesar 7,40%, sehingga efektivitas transformasi rata-rata adalah sebesar 14,7%.



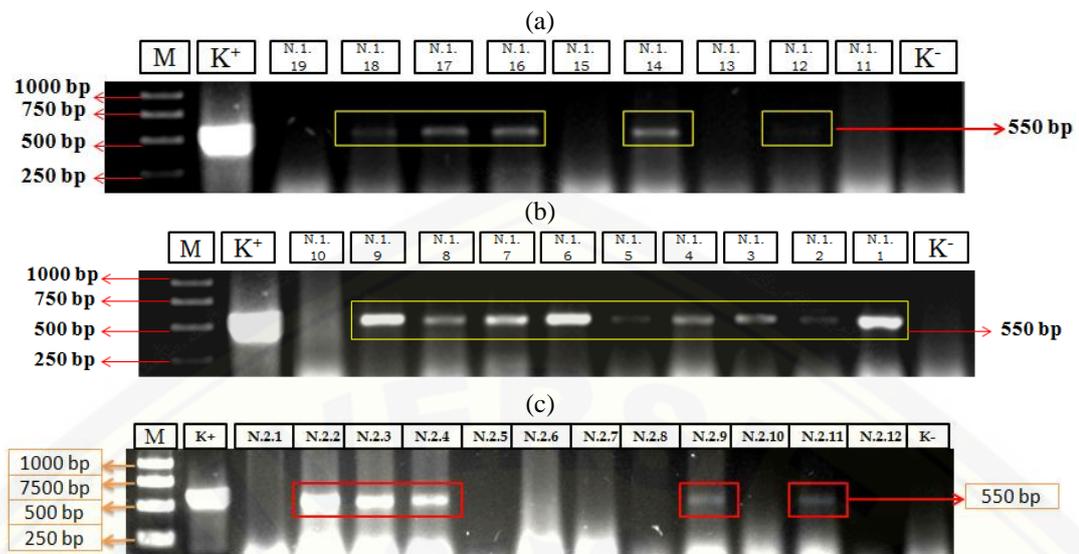
Gambar 4.6 Hasil elektroforesis gel *agarose* 1% DNA hasil PCR dengan menggunakan pasangan primer *hptII* F/R dan *template* DNA genom tebu hasil transformasi, M: Marker DNA 1 Kb *Ladder*; K+: Plasmid pAct-*SoSUT1*; K-: Tanaman kontrol transforman *SoSPS1*; a dan b: analisis pada tanaman hasil transformasi I; c: analisis pada tanaman hasil transformasi II.

Selanjutnya untuk melihat apakah tanaman hasil transformasi juga mengandung gen *SoSPS1*, maka dilakukan analisis PCR menggunakan primer F-R *nptII*. Hal ini dikarenakan gen *SoSPS1* berada dalam satu kaset T-DNA dengan gen ketahanan antibiotik *nptII* (Gambar 4.7).



Gambar 4.7 Bagian T-DNA dari konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* yang mengandung gen *SoSPS1* dan gen ketahanan antibiotik *kanamycin nptII* (Sumber: Baskoro, 2012).

Berdasarkan hasil analisis PCR menggunakan primer *nptII* (Gambar 4.8) tanaman tebu yang masih stabil mengandung gen *SoSPS1* hasil transformasi I adalah sebanyak 14 tanaman, yaitu *event* N.1.1 sampai N.1.9, N.1.12, N.1.14, N.1.16, N.1.17, dan N.1.18. sedangkan pada hasil transformasi II adalah sebanyak 5 tanaman, yaitu *event* N.2.2, N.2.3, N.2.4, N.2.9, dan N.2.11. Jumlah total tanaman positif mengandung gen *SoSPS1* adalah sebanyak 19 tanaman.



Gambar 4.8 Hasil elektroforesis gel *agarose* 1% DNA hasil PCR dengan menggunakan pasangan primer *nptII* F/R dan *template* DNA genom tebu hasil Transformasi, M: Marker DNA 1 Kb *Ladder*; K+: Plasmid pCL4-*SoSPSI*; K-: Tanaman kontrol non transforman; a dan b: hasil analisis pada tanaman hasil transformasi I; dan c: hasil analisis pada tanaman hasil transformasi II.

Hasil analisis tanaman tebu putatif transforman pada transformasi I, dari 19 tanaman putatif transforman terdapat 10 tanaman yang positif mengandung kedua gen *SoSUTI* dan *SoSPSI* yaitu *event* N.1.1, N.1.2, N.1.3, N.1.4, N.1.5, N.1.7, N.1.8, N.1.14, N.1.16, dan N.1.17. Pada transformasi II hanya terdapat satu tanaman positif transforman kedua gen *SoSUTI* dan *SoSPSI* yaitu *event* N.2.11. Jumlah total tanaman positif mengandung kedua gen tersebut sebanyak 11 tanaman. Tanaman tebu yang lolos media seleksi namun ketika dideteksi tidak mengandung gen *SoSUTI* atau pun gen *SoSPSI*, dikatakan sebagai tanaman tebu non transforman yang terlindung oleh sel-sel transforman. Hal ini dikarenakan tanaman tersebut mengandung gen target secara random dalam jaringan, sehingga belum bersifat homogen (Dong and McHughen, 1993).

Keberadaan fragment DNA *hptII* sebesar 470 bp dan DNA *nptII* sebesar 550 bp hasil PCR menunjukkan integrasi konstruk plasmid pAct-*SoSUTI* pada genom tebu hasil transformasi sehingga dapat dikatakan sebagai tanaman tebu PRG *stacked gene SoSUTI* dan *SoSPSI*. *Stacked gene* merupakan istilah dalam perakitan tanaman dengan menggunakan lebih dari 1 gen.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 KESIMPULAN

Telah dihasilkan 31 tanaman putatif transforman dari transformasi I dan II. Berdasarkan analisis PCR tanaman putatif transforman, tanaman yang positif mengandung gen *SoSUT1* adalah sebanyak 16 dan tanaman positif mengandung gen *SoSPS1* adalah sebanyak 19 tanaman. Selain itu, tanaman yang mengandung kedua gen *SoSUT1* dan *SoSPS1* adalah sebanyak 11 tanaman.

### 5.2 SARAN

Perlu dilakukan analisis lebih lanjut secara fisiologis mengenai pengaruh overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan *SoSPS1* terhadap tingkat sintesis, translokasi, dan akumulasi sukrosa pada batang tanaman tebu positif transforman.

**LAMPIRAN A. Komposisi Larutan Hoagland**

| Larutan Stok | Bahan   | Jumlah<br>(g/ ml) | Pengambilan<br>(ml/L) |
|--------------|---|-------------------|-----------------------|
| 1            | 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              |                       |
| 2            | 2,5 M KCl   | 18,65             | 1                     |
| 3            | 150 mM CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O                       | 22,1              | 0,5                   |
| 4            | 1 M MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                          | 24,7              | 2                     |
| 5            | 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O           | 15,6              | 2                     |
|              | 0,3 mM EDTA Fe Sodium   | 0,012             |                       |
|              | 0,27 mM MnSO <sub>4</sub> .6H <sub>2</sub> O                      | 0,007             |                       |
|              | Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O | 0,01              |                       |

**LAMPIRAN B. Komposisi Media *Murashige and Skoog* (MS)**

| Larutan Stok | Bahan   | Jumlah (g/ L) | Pengambilan (ml/ L) |
|--------------|---|---------------|---------------------|
| A            | NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     | 82,5          | 20                  |
| B            | KNO <sub>3</sub>                                    | 95            | 20                  |
| C            | CaCl <sub>2</sub>                                   | 88            | 5                   |
|              | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 1,24          |                     |
|              | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 34            |                     |
| D            | CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O                | 0,0052        | 5                   |
|              | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O | 0,005         |                     |
|              | KI  | 0,166         |                     |
|              | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 74            |                     |
| E            | ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 1,72          | 5                   |
|              | CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O                | 0,0052        |                     |
|              | MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 3,01          |                     |
| F            | Na <sub>2</sub> EDTA                                | 7,44          | 5                   |
|              | FeSO <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O                | 5,56          |                     |
| Vitamin      | Myo-inositol  | 0,001         | 5                   |
|              | Pyridoxin   | 0,004         |                     |
|              | Tyamin HCl  | 0,0004        |                     |
|              | Sukrosa   | 30            |                     |
|              | Phytigel  | 2,5           |                     |

**LAMPIRAN C. Komposisi Media *Yeast Extract Peptone* (YEP)**

| Bahan                  | Jumlah (g/ L) |
|------------------------|---------------|
| Yeast Extract          | 10            |
| Pepton                 | 10            |
| Sodium Chloride (NaCl) | 5             |
| Agar untuk Bakteri     | 14            |

