



**TRANSFORMASI GEN *SoSUT1* PADA TANAMAN TEBU  
(*Saccharum officinarum* L var. BL) TRANSGENIK  
OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN  
VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens***

**SKRIPSI**

Oleh :

**Almansyah Nur Sinatrya  
NIM 101510501051**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**TRANSFORMASI GEN *SoSUT1* PADA TANAMAN TEBU  
(*Saccharum officinarum* L var. BL) TRANSGENIK  
OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN  
VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens***

**SKRIPSI**

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

Oleh :

**Almansyah Nur Sinatrya  
NIM 101510501051**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

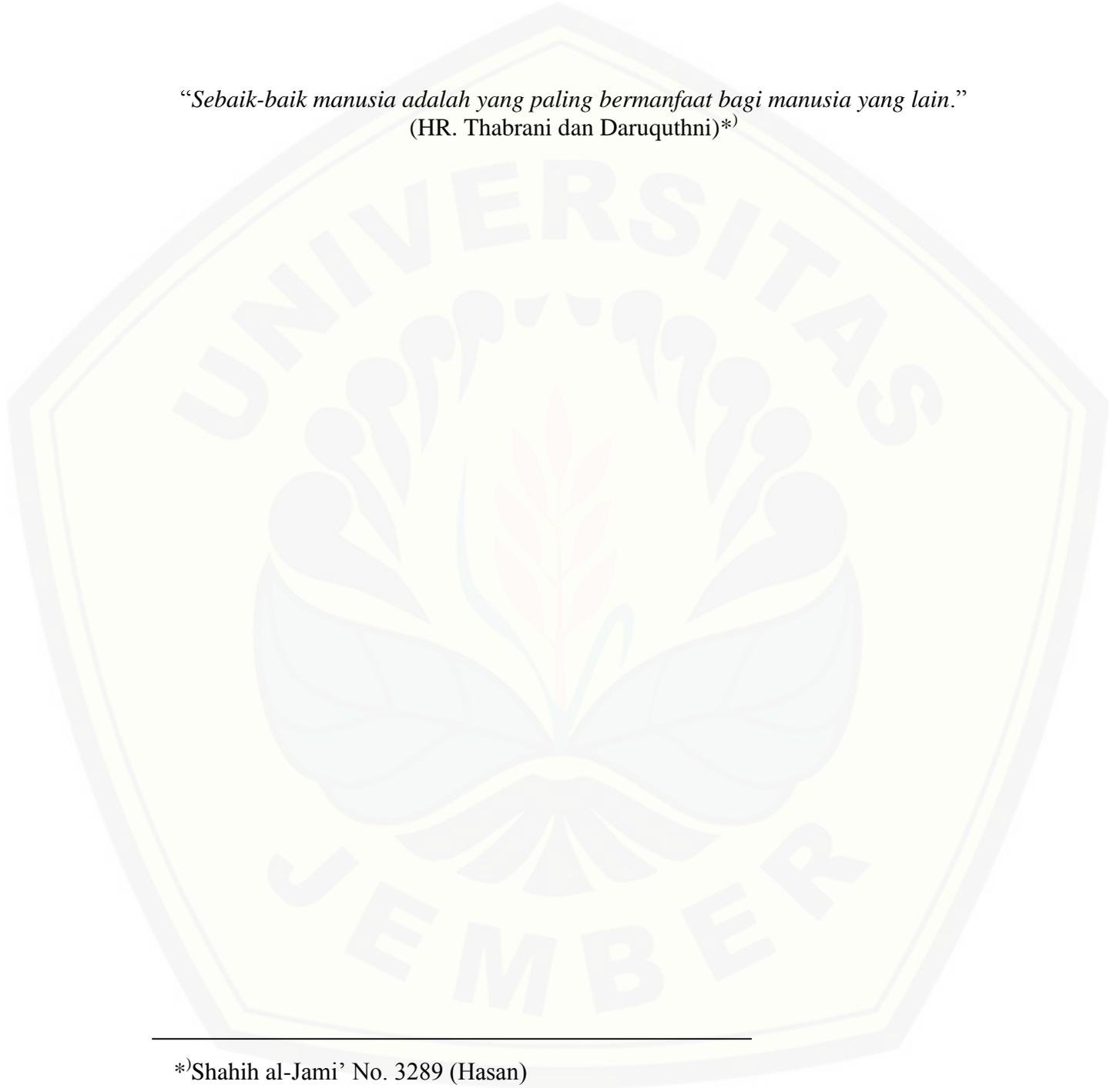
## PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, kupersembahkan skripsi ini kepada:

1. Seluruh teman, sahabat dan saudara yang dapat merasakan manfaat dari skripsi ini.
2. Ibunda Sri Mumpuni RA, Ayahanda Heri Prasetyo, Kakak Anjartika Pramodhawardani.
3. Para guru kehidupanku yang telah mengajarkan makna kehidupan melalui ilmu serta pengalaman.
4. Almamater Universitas Jember

**MOTO**

*“Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi manusia yang lain.”*  
(HR. Thabrani dan Daruquthni)\*)



---

\*Shahih al-Jami' No. 3289 (Hasan)

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Almansyah Nur Sinatrya

NIM : 101510501051

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Transformasi Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum L var. BL*) Transgenik Overekspresi Gen *SoSPS1* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.**

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

Jember, 19 Maret 2015  
Yang menyatakan,

Almansyah Nur Sinatrya  
NIM. 101510501051

**SKRIPSI**

**TRANSFORMASI GEN *SoSUT1* PADA TANAMAN TEBU  
(*Saccharum officinarum* L var. BL) TRANSGENIK  
OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN  
VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens***

Oleh

**Almansyah Nur Sinatrya**  
NIM. 101510501051

**Pembimbing:**

Pembimbing Utama : Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS  
NIP. 19650426 199403 1 001

Pembimbing Anggota : Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr. SC  
NIP. 19551022 198212 1 001

**PENGESAHAN**

Karya ilmiah skripsi berjudul “**Transformasi Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum L var. BL*) Transgenik Overekspresi Gen *SoSPS1* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens***” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 02 April 2015

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

**TIM PENGUJI**

Penguji

Ummi Sholikhah, SP., MP.  
NIP. 19781130 200812 2 001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS.  
NIP. 19650426 199403 1 001

Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr. SC.  
NIP. 19551022 198212 1 001

**MENGESAHKAN**

Dekan,

Dr. Ir. Jani Januar, M.T.  
NIP. 19590102 198803 1 002

## SUMMARY

**SoSUT1 Gene Transformation at SoSPS1 Gene Overexpression Sugarcane Transgenic Plant (*Saccharum officinarum* L var. BL) Using *Agrobacterium tumefaciens* Vector;** Almansyah Nur Sinatrya; 101510501051; Agrotechnology Department; Agriculture Faculty; University of Jember

This research aims to get the sugar cane plant products as a new stub that has a higher sucrose content. The method used is the Genetic Transformation with *SoSUT1* Gene inserted into the genome of a plant sugar cane (*Saccharum officinarum* L. var. BL) which in previous studies has been expressing *SoSPS1* gene by using *Agrobacterium tumefaciens* as gram-negative transformation bacteria vector. This research held in the laboratory of Molecular Biology and Biotechnology Division, CDAST (Center for Development of Advanced Sciences and Technology) University of Jember began November 2013 until January 2015. A preliminary study of explant reproduction associated with 5 kinds of formulation media as follows: I: MS0; II: MS0 Glutamine 50 + mgL-1; III: MS0 + Glycine 2 mgL-1; IV: MS0 Glutamine 50 + mgL-1 + Glycine 2 mgL-1; V: MS0 + 2,4-D 2 mgL-1 + BAP 2 mgL-1, it can be noted that the formulation of the best media for duplication of shoots is the use of the MS0 media + 2,4-D 2 mgL-1 + BAP 2 mgL-1 composition with the average result of the three shoots 7.67 deuteronomy plantlet. While the results of the analysis of the PCR to confirm the existence of genes transformation results *SoSUT1* also *SoSPS1* found 5 plantlet with G5, H2, H3, J2 and J3 code are positively express both of these genes, with the effectiveness of the transformation by 10% (5 plants) on the 4<sup>th</sup> transformation.

## RINGKASAN

**Transformasi Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. *BL*) Transgenik Overekspresi Gen *SoSPSI* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*; Almansyah Nur Sinatrya; 101510501051; Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian; Universitas Jember**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan produk tanaman tebu sebagai rintisan baru yang memiliki kandungan sukrosa lebih tinggi. Metode yang digunakan adalah Transformasi Genetik dengan menyisipkan Gen *SoSUT1* ke dalam genom tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L. var. *BL*) yang pada penelitian sebelumnya telah overekspresi gen *SoSPSI* dengan menggunakan vektor transformasi berupa bakteri gram negatif *Agrobacterium tumefaciens*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Bioteknologi dan Biologi Molekuler, CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember mulai November 2013 hingga Januari 2015. Penelitian pendahuluan terkait perbanyakkan eksplan dengan 5 macam formulasi media sebagai berikut: I: MS0; II: MS0 + Glutamin 50 mgL<sup>-1</sup>; III: MS0 + Glisin 2 mgL<sup>-1</sup>; IV: MS0 + Glutamin 50 mgL<sup>-1</sup> + Glisin 2 mgL<sup>-1</sup>; V: MS0 + 2,4-D 2 mgL<sup>-1</sup> + BAP 2 mgL<sup>-1</sup>, dapat diketahui bahwa formulasi media terbaik untuk perbanyakkan tunas adalah penggunaan komposisi media MS0 + 2,4-D 2 mgL<sup>-1</sup> + BAP 2 mgL<sup>-1</sup> dengan rata rata hasil 7,67 tunas dari tiga ulangan planlet. Sedangkan hasil analisis PCR untuk konfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* hasil transformasi dan gen bawaan *SoSPSI* didapati 5 planlet dengan kode G5, H2, H3, J2 dan J3 yang positif mengekspresikan kedua gen tersebut, dengan efektifitas transformasi sebesar 10% (5 tanaman) pada transformasi ke-4.

## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Transformasi Gen *SoSUTI* pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum L var. BL*) Transgenik Overekspresi Gen *SoSPSI* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*”. Penelitian ini dibiayai oleh Proyek MP3EI (Masterplan Percepatan dan Perluasan Pembangunan Ekonomi Indonesia) Tahun Anggaran 2014.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan segenap pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terimakasih kepada:

1. Ayahanda Drs. Heri Prasetyo, Ibunda Dra. Sri Mumpuni RA serta Saudari Anjartika Pramodhawardhani, SKM, yang telah dan selalu menjadi orang yang mencintai dan kucintai sepanjang hidupku.
2. Prof. Dr, Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS. dan Ummi Sholikhah, SP, MP., selaku dosen pembimbing yang dengan penuh kesabaran, dedikasi dan kasih sayang memberikan pengarahan, saran serta bimbingan dalam penelitian maupun penulisan skripsi ini.
3. Laboratorium Divisi Bioteknologi dan Biologi Molekuler, *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember.
4. Semua teman, rekan dan saudara-saudara yang telah mengajari saya bahwa hidup ini layak untuk diperjuangkan agar dapat senantiasa memberi arti.

Penulis menyadari dalam penyusunan karya ilmiah ini terdapat kekurangan, maka dengan segenap kerendahan hati penulis menerima segala kritik, masukan dan saran dari semua pihak. Akhirnya, penulis berharap skripsi dan hasil penelitian ini dapat bermanfaat.

Penulis.

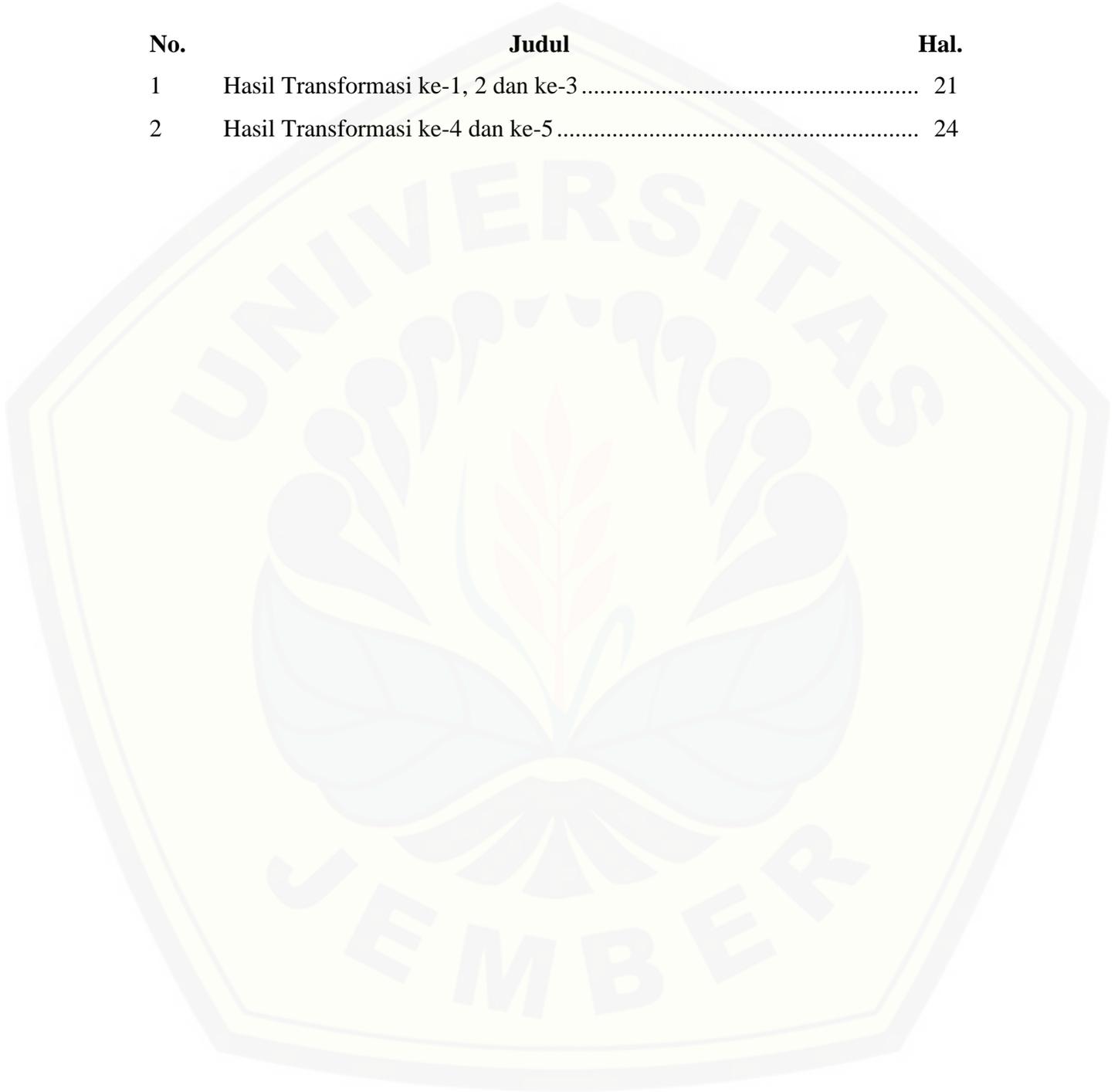
DAFTAR ISI

	Hal.
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>viii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan dan Manfaat .....	3
1.3.1 Tujuan .....	3
1.3.2 Manfaat .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Transformasi Gen Melalui <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	4
2.2 <i>Sucrose Transporter</i> (SUT) pada Tanaman .....	7
2.3 <i>Sucrose Phosphat Synthase</i> (SPS) pada Tanaman .....	8
2.4 Hipotesis.....	9
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>10</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	10

3.2 Alat dan Bahan .....	10
3.3 Prosedur Penelitian .....	11
3.3.1 Persiapan Eksplan .....	11
3.3.2 Inokulasi <i>A. tumefaciens</i> .....	11
3.3.3 Isolasi DNA Plasmid dan PCR .....	12
3.3.4 Infeksi <i>A. tumefaciens</i> pada Eksplan .....	12
3.3.5 Ko-Kultivasi.....	12
3.3.6 Eliminasi <i>A. tumefaciens</i> .....	13
3.3.7 Seleksi Eksplan <i>Putative</i> Transforman .....	13
3.3.8 Efektifitas Transformasi.....	13
3.3.9 Isolasi DNA Genom Tanaman <i>Putative</i> Transforman.....	14
3.3.10 Analisis <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i> .....	15
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>16</b>
4.1 Perbanyak Eksplan .....	16
4.2 Konfirmasi Keberadaan Plasmid <i>pAct</i> dalam <i>A. tumefaciens</i> .....	18
4.3 Transformasi Eksplan Transforman Overekspresi Gen SoSPS1 dengan Gen SoSUT1 Menggunakan Vektor <i>A. tumefaciens</i> .....	20
4.4 Analisis PCR tebu Overekspresi Gen SoSPS1 <i>Putative</i> Transforman Gen SoSUT1.....	26
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>	<b>31</b>
5.1 Kesimpulan .....	31
5.2 Saran .....	31
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>32</b>

**DAFTAR TABEL**

<b>No.</b>	<b>Judul</b>	<b>Hal.</b>
1	Hasil Transformasi ke-1, 2 dan ke-3 .....	21
2	Hasil Transformasi ke-4 dan ke-5 .....	24



DAFTAR GAMBAR

No.	Judul	Hal.
2.1	<i>Tumor inducing</i> plasmid (Ti-plasmid) pada <i>A. tumefaciens</i> (Kakkar dan Verma, 2011).....	5
2.2	Mekanisme interaksi <i>A. tumefaciens</i> dengan sel tanaman (Kakkar dan Verma, 2011).....	6
2.3	Sketsa Alur Biosintesa Sukrosa Pada Daun Tanaman (Cheikh and Brenner, 1992).....	10
3.1	Konstruk plasmid <i>pAct-SoSUTI</i> (Sugiharto, 2010).....	11
4.1	Grafik uji <i>Duncan</i> kepercayaan 95% jumlah tunas eksplan 1.1 E (6) pada minggu ke-4 setelah tanam.....	16
4.2	Elektroforesis DNA plasmid <i>A. tumefaciens</i> GV 3101 <i>pAct-SoSUTI</i> hasil PCR dengan primer 1F/1R <i>hptII</i> . Baris M: Marker 1 kb Ladder; <i>pAct</i> : DNA plasmid <i>pAct-SoSUTI</i> .....	19
4.3	Kondisi planlet tebu sebagai eksplan transformasi. a. Planlet tebu <i>in vitro</i> pada media perbanyakan; b. Planlet yang telah dipisahkan dari rumpun sebelum diambil bagian pangkal tunasnya; c. Pangkal tunas atau basal tebu <i>in vitro</i> berukuran panjang $\pm 5$ mm sebagai eksplan transformasi .....	21
4.4	Perbandingan kondisi eksplan pasca transformasi a. Kondisi eksplan pada media co-cultivasi sebelum terjadi overgrowth; b. Kondisi eksplan pada media seleksi saat terjadi overgrowth, dapat dilihat dari peledakan jumlah bakteri <i>A. tumefaciens</i> di permukaan media <i>in vitro</i> yang mengelilingi eksplan. ....	22
4.5	Proses pelukaan pada eksplan menggunakan jarum suntik steril yang bertujuan untuk memfasilitasi proses infeksi <i>A. tumefaciens</i> . ....	23

4.6	Perbandingan kondisi morfologis pada beberapa planlet hasil transformasi ke-4 dan ke-5. T4: Kondisi morfologis eksplan transformasi ke-4 pada media seleksi 5; T5: Kondisi morfologis eksplan transformasi ke-4 pada media seleksi 5.....	25
4.7	Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer 1F/1R <i>npt II</i> . M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid <i>pCl4-SoSPS1</i> (kontrol positif); G5-J6: sampel DNA tanaman tebu yang telah ditransformasi pada transformasi pertama.....	26
4.8	Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer 1F/1R <i>hpt II</i> . M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid <i>pAct-SoSUT1</i> (kontrol positif); G5-J6: sampel DNA tanaman tebu yang telah ditransformasi pada transformasi pertama.....	27
4.9	Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer 1F/1R <i>npt II</i> . M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid <i>pCl4-SoSPS1</i> (kontrol positif); B1-D4: sampel DNA tanaman tebu yang telah ditransformasi pada transformasi pertama.....	28
4.10	Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer 1F/1R <i>hpt II</i> . M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid <i>pAct-SoSUT1</i> (kontrol positif); B1-D4: sampel DNA tanaman tebu yang telah ditransformasi pada transformasi kedua .....	29

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tranformasi genetik pada tanaman merupakan salah satu cara rekayasa genetik untuk mendapatkan tanaman dengan sifat-sifat tertentu yang sesuai dengan harapan perekayasa tersebut. Pada tranformasi genetik terdapat teknik untuk memasukkan gen target yang sebelumnya telah diisolasi kepada suatu tanaman, teknik memasukkan gen target tersebut dapat dilaksanakan dengan metode langsung ataupun tidak langsung. Metode langsung yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan partikel bombardment, elektroporasi dan mikroinjeksi. Sedangkan metode tidak langsung adalah dengan memanfaatkan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Menurut Mohammed dan Abalaka (2011), metode tranformasi secara tidak langsung dengan memanfaatkan *A. tumefaciens* lebih sering digunakan daripada metode secara langsung karena kendala berupa biaya yang lebih tinggi dan perlengkapan khusus dari metode secara langsung. Selain kendala tersebut juga terdapat kendala berupa gen yang tersisip cenderung dalam jumlah salinan yang banyak.

Pemanfaatan *A. tumefaciens* sebagai vektor tranformasi genetik dalam kegiatan rekayasa genetika tanaman khususnya pada tanaman tebu telah banyak dikenal luas. Hal tersebut dikarenakan pemanfaatan *A. tumefaciens* cukup menggunakan peralatan standar laboratorium yang relatif sederhana apabila dibandingkan menggunakan metode tranformasi lainnya dengan jumlah copy gen yang diintegrasikan cukup sedikit (Le *et al.*, 2001). *A. tumefaciens* dapat ditemukan secara alami sebagai bakteri yang dapat menyebabkan tumor pada tanaman sehingga disebut bakteri patogen. Bakteri ini dapat dimanfaatkan dalam tranformasi genetik tanaman. Telah banyak publikasi penelitian sebelumnya yang melaporkan keberhasilan rekayasa genetik tanaman tebu melalui vektor bakteri *A. tumefaciens*. Seperti yang dilaporkan oleh Miswar *et al.*, (2007) yang berhasil melakukan transformasi gen

*SoSPSI* ke dalam genom tanaman tebu menggunakan vektor bakteri *A. tumefaciens*. Hal serupa juga dilaporkan oleh Arencibia *et al.*, (1998) dan Manickavasagam *et al.*, (2004) dengan keberhasilannya dalam mengekspresikan gen GUS pada kalus tanaman tebu dan tunas lateral tebu.

Pada penelitian sebelumnya telah berhasil dirakit tanaman tebu overekspresi gen *SoSPSI* menggunakan metode transformasi memanfaatkan vektor *Agroacterium tumefaciens* (Baskoro, 2012). Enzim SPS telah terbukti menjadi enzim utama yang menentukan keberlangsungan proses biosintesa sukrosa pada berbagai jenis tanaman juga termasuk pada tanaman tebu. Enzim SPS mengkatalisis pembentukan sucrose-6-phosphate (suc6P) dari fructose-6-phosphate (F6P) dan uridine-5-diphospho glucose (U-DPG) (Buchanan *et al.*, 2000). Sedangkan untuk memaksimalkan biosintesa sukrosa pada tanaman tebu dibutuhkan juga overekspresi gen *SoSUT1* yang menyandi pembentukan enzim SUT. Proses transportasi *long distance transport* sukrosa atau dari *source* ke *sink* digolongkan menjadi dua tahapan yaitu *loading* dan *unloading* sukrosa. Menurut Truernit (2001) protein *sucrose transporter* (SUT) memfasilitasi proses *loading* dan *unloading* sukrosa menuju batang, diharapkan dengan overekspresi gen *SoSUT1* dapat meningkatkan kedua proses tersebut.

## 1.2 Rumusan Masalah

Tebu overekspresi gen *SoSPSI* dapat meningkatkan biosintesis sukrosa pada tanaman tebu. Pada tebu transgenik overekspresi gen *SoSPSI* tersebut tidak terjadi peningkatan translokasi sukrosa pada batang tanaman tebu. Sehingga diperlukan overekspresi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSPSI* agar terjadi peningkatan baik translokasi maupun biosintesis sukrosa pada batang tanaman tebu sehingga dapat meningkatkan kandungan sukrosa menjadi lebih tinggi lagi.

## **1.3 Tujuan dan Manfaat**

### **1.3.1 Tujuan**

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu overekspresi ganda yaitu gen *SoSPSI* dan gen *SoSUT1* melalui transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSPSI* menggunakan *A. tumefaciens*.

### **1.3.2 Manfaat**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai rintisan varietas tanaman tebu baru dengan overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPSI* yang memiliki kandungan sukrosa tinggi pada batang tanaman tebu. Sehingga apabila varietas overekspresi ganda ini dirilis dan digunakan secara luas dapat meningkatkan produksi gula nasional.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

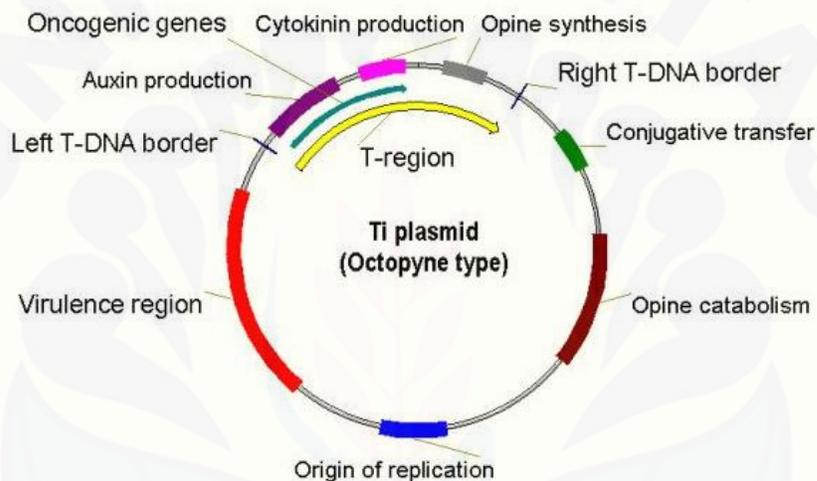
### 2.1 Transformasi Gen Melalui *A. tumefaciens*

Pengetahuan mengenai transformasi genetik akhir-akhir ini telah dimanfaatkan menjadi suatu metode yang banyak digunakan untuk mendapatkan tanaman dengan karakter yang sesuai dengan diharapkan. Metode transfer gen yang diterapkan pada tanaman dapat dilaksanakan dengan metode secara langsung (*direct method*) dan metode secara tidak langsung (*indirect method*). Contoh dari metode langsung antara lain dengan *Particle bombardment* serta *Electroporation*. Sedangkan metode tidak langsung dapat melalui pemanfaatan *A. tumefaciens* (Koichi *et al.*, 2002).

*A. tumefaciens* adalah jenis bakteri tanah Gram negatif yang berbentuk batang. Bakteri ini dapat mengakibatkan penyakit tumor pada tanaman, namun dapat dimanfaatkan sebagai vektor untuk transfer gen ke dalam sel tanaman dalam rekayasa genetik tanaman. *A. tumefaciens* secara alami, mempunyai kemampuan untuk mentransfer bagian DNA-nya yang lebih dikenal dengan T-DNA (*transfer DNA*) ke dalam genom tanaman inang sehingga menyebabkan terbentuknya tumor (*crown gall*) pada inang (De la riva *et al.*, 1998). Kemampuan *A. tumefaciens* tersebut selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk menyisipkan gen yang diinginkan ke dalam genom tanaman. Gen-gen yang memiliki peran dalam sintesis hormon dan opine digantikan dengan gen yang diinginkan dengan tujuan untuk memperbaiki sifat tanaman.

Mekanisme dalam pembentukan tumor akibat dari infeksi *A. tumefaciens* melibatkan kinerja dari 3 komponen genetik penting (De la riva *et al.*, 1998). Komponen yang pertama adalah gen virulen kromosom (*chromosomal virulence*) yang terdapat di kromosom *A. tumefaciens* yang berfungsi dalam pelekatan bakteri pada sel tanaman. Selanjutnya adalah gen virulen yang terdapat di dalam plasmid Ti (Gambar 2.1) berukuran besar (~200 kb) yang memiliki peranan dalam menginduksi

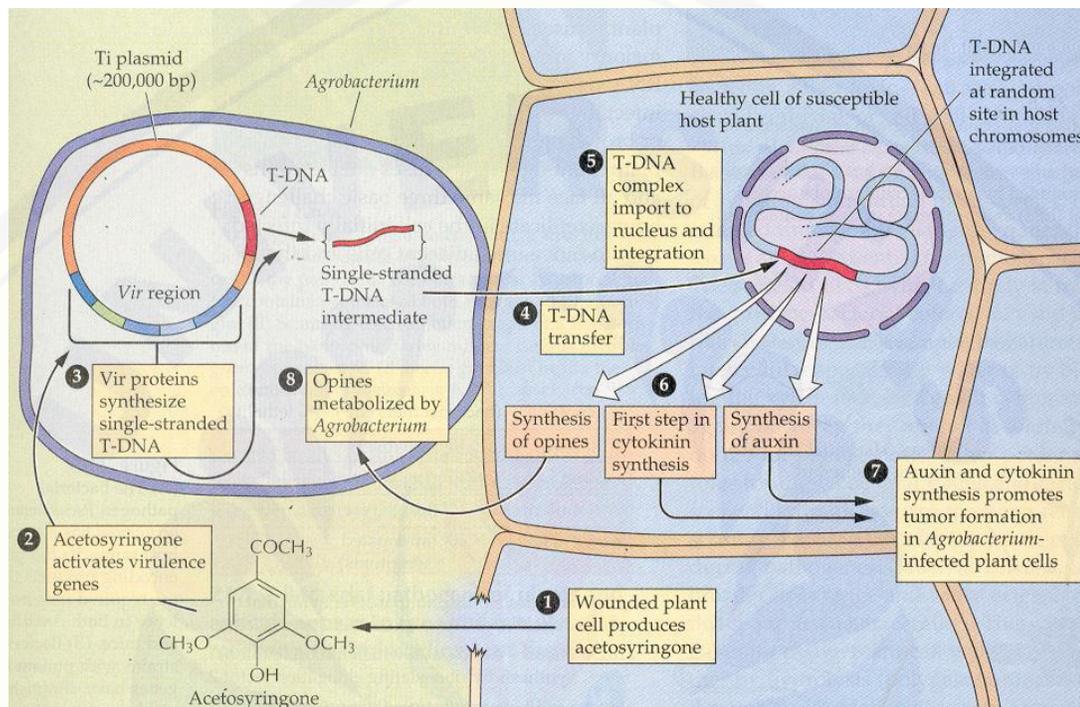
transfer dan integrasi T-DNA. Komponen terakhir adalah daerah T-DNA yang juga terletak pada plasmid Ti, daerah T-DNA ini dibatasi oleh LB (*left border*) dan RB (*right border*), mengandung gen penting bagi *A. tumefaciens*. Pada T-DNA terdapat gen yang dapat menyandikan enzim untuk proses biosintesis auksin dan sitokinin untuk pembelahan sel sehingga menyebabkan pembelahan sel yang tidak dapat dikontrol serta menyebabkan terbentuknya tumor. Selain itu, dalam T-DNA juga terdapat gen yang berperan dalam sintesis dan sekresi opine untuk pertumbuhan bakteri *A. tumefaciens* itu sendiri.



Gambar 2.1 *Tumor inducing* plasmid (Ti-plasmid) pada *A. tumefaciens* (Kakkar dan Verma, 2011).

Adapun proses interaksi antara *A. tumefaciens* dengan sel tanaman meliputi beberapa tahapan. Tahapan pertama diawali dengan sel tanaman yang terluka akan memproduksi senyawa acetosyringone. Acetosyringone tersebut akan mengaktifkan gen-gen virulen pada *A. tumefaciens*. Gen-gen virulen ini selanjutnya mensintesis *single stranded* T-DNA sehingga terjadi transfer T-DNA. Kompleks T-DNA masuk ke nukleus yang selanjutnya berintegrasi sehingga terjadi sintesis sitokinin, auksin dan juga opine. Sintesis dari auksin dan juga sitokinin dapat memacu proses pembentukan tumor pada sel tanaman yang telah terinfeksi *A. tumefaciens*. Senyawa opine yang telah terbentuk tadi digunakan oleh *A. tumefaciens* untuk proses

pertumbuhannya. Mekanisme interaksi *A. tumefaciens* dengan sel tanaman serta proses transformasi genetik oleh *A. tumefaciens* dapat digambarkan pada Gambar 2.2 di bawah ini.



Gambar 2.2 Mekanisme interaksi *A. tumefaciens* dengan sel tanaman (Kakkar dan Verma, 2011).

Pemanfaatan pangkal tunas tebu *in-vitro* sebagai eksplan untuk transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* memiliki beberapa keuntungan misalnya sumber eksplan yang selalu tersedia dalam jumlah banyak kapanpun dibutuhkan, meminimumkan tingkat variasi somaklonal serta memungkinkan melakukan infeksi secara intensif (Hazmi *et al.*, 2009). Transformasi gen GUS pada pangkal tunas tebu *in-vitro* menggunakan *A. tumefaciens* strain LBA4404 dapat menghindari terjadinya variasi somaklonal serta memungkinkan tunas tebu *in-vitro* tumbuh dengan lebih cepat, sehingga sangat potensial digunakan sebagai eksplan transformasi pada tanaman tebu (Setyati *et al.*, 2007).

## 2.2 *Sucrose Transporter (SUT) pada Tanaman*

Sukrosa pada tanaman merupakan produk akhir dari proses asimilasi karbon (C) pada fotosintesis yang terjadi di daun (Kim *et al.*, 2000) dan merupakan salah satu dari bentuk karbohidrat yang mudah ditransportasikan ke jaringan simpan atau *sink tissues* (Cheng *et al.*, 1996). Proses transportasi *long distance transport* sukrosa atau dari *source* ke *sink* digolongkan menjadi dua tahapan yaitu *loading* dan *unloading* sukrosa. Protein *sucrose transporter* (SUT) memfasilitasi proses *loading* dan *unloading* sukrosa menuju batang (Truernit, 2001). Translokasi sukrosa oleh protein SUT merupakan bentuk pengangkutan aktif yang disebut sebagai sukrosa H<sup>+</sup> *symporter* (*sucrose proton symport*) (Reismier *et al.*, 1993). Pengangkutan aktif pada translokasi sukrosa merupakan pemindahan zat terlarut yang melawan gradien konsentrasi, melintasi membran plasma dari satu sisi yang konsentrasi zat terlarutnya rendah menuju ke sisi yang konsentrasi zat terlarutnya tinggi (Chambell *et al.*, 2002).

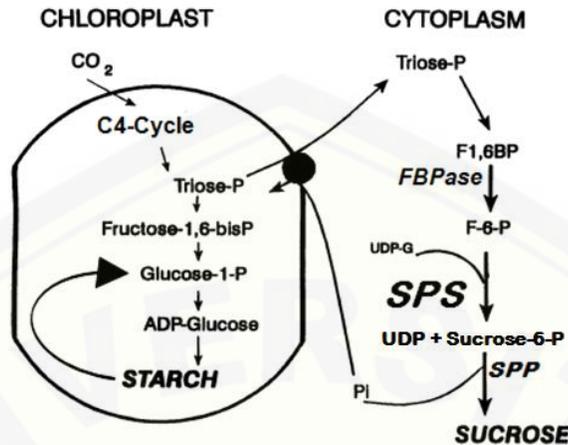
Sebagian besar tanaman melakukan translokasi hasil fotosintesis dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpanan yang terjadi secara simplasmik dan apoplasmik. Secara simplasmik, translokasi sukrosa terjadi dari sel melalui plasmodesmata, proses tersebut terjadi pada jaringan meristem dan organ tanaman yang masih tergolong muda seperti tunas. Sedangkan secara apoplasmik dapat dideskripsikan bahwa sukrosa ditranslokasi melewati dinding sel dan ruang inter selular jaringan, dimana proses ini terjadi dalam *sieve element* (pembuluh tapis) / *companion cell* (sel pengiring) (Lalonde *et al.*, 2003).

Pada tanaman ditemukan terdapat lebih dari satu gen yang menyandi *sucrose transporter* (SUT). Terdapat tiga famili protein SUT berdasarkan homologi sekuensinya dan afinitas substratnya. SUT1 merupakan gen yang mempunyai afinitas yang tinggi, tetapi daya muat pengangkutannya rendah. SUT2 mempunyai afinitas yang rendah, tetapi daya muat pengangkutannya tinggi. Sedangkan SUT4 mempunyai afinitas yang rendah serta daya angkut yang juga sangat rendah hingga hampir tidak

terdeteksi aktivitas pengangkutannya. Sementara SUT3 hanya terdapat pada tanaman tembakau dan menurut sekuensi homologinya masih termasuk dalam famili SUT1 (Kuhn, 2003). Pada tanaman tebu ditemukan dua gen yang mengkode SUT yaitu *SoSUT1* dan *SoSUT2* (Sugiharto *et al.*, 2008). Dasar dari pemilihan gen *SoSUT1* dalam proses transformasi genetik pada tanaman tebu sebagai *gene of interest* (goi) adalah karakteristik dari sub famili gen SUT.

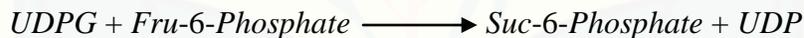
### **2.3 Sucrose Phosphat Synthase (SPS) pada Tanaman**

Akumulasi sukrosa pada tanaman juga sangat dipengaruhi oleh tingkat asimilasi karbon dan sintesa sukrosa. Pada saat ini telah ditemukan enzim yang berperan terhadap metabolisme sukrosa, beberapa diantaranya selain SUT adalah *sucrose synthase* (SuSy), *sucrose phosphate synthase* (SPS) dan *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) (Chavez *et al.*, 2000). Enzim SuSy merupakan enzim yang dapat mensintesa sukrosa sekaligus dapat mendegradasi sukrosa, akan tetapi fungsi SuSy lebih cenderung untuk mendegradasi sukrosa dibandingkan mensintesa sukrosa (Huber and Huber, 1996). Sedangkan enzim SPS dan SPP adalah enzim yang memiliki fungsi terkait untuk mensintesa sukrosa, karena enzim SPS memproduksi senyawa sucrose-6-phosphate yang merupakan substrat bagi enzim SPP untuk memproduksi sukrosa (Gambar 2.3). Peningkatan aktivitas SPS dapat meningkatkan substrat bagi SPP, sehingga aktivitas SPP juga dapat ditingkatkan (Echeverria *et al.*, 1997).



Gambar 2.3 Sketsa Alur Biosintesa Sukrosa Pada Daun Tanaman (Cheikh and Brenner, 1992).

SPS telah terbukti menjadi enzim utama yang menentukan keberlangsungan proses biosintesa sukrosa pada berbagai jenis tanaman juga termasuk pada tanaman tebu (Sugiharto *et al.*, 1996; Grof *et al.*, 2007). Enzim SPS mengkatalisis pembentukan sucrose-6-phosphate (suc6P) dari fructose-6-phosphate (F6P) dan uridine-5-diphospho glucose (U-DPG) seperti reaksi dibawah ini (Buchanan *et al.*, 2000):



Selanjutnya phosphate pada sucrose-6-phosphate diputus oleh enzim SPP melalui mekanisme defosforilasi sehingga dihasilkan sukrosa. Enzim SPS juga menjadi penentu dari kemampuan daun untuk melakukan sintesis sukrosa yang kemudian ditranslokasikan ke bagian tanaman lain seperti, biji, buah, akar serta umbi untuk kelangsunga dari proses pertumbuhannya (Walker and Huber, 1989; Chris *et al.*, 1999).

## 2.4 Hipotesis

Transformasi gen *SoSUT1* dengan vektor *A.tumefaciens* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSPS1* dapat menghasilkan tanaman tebu transforman double ekspresi gen *SoSUT1* sekaligus gen *SoSPS1*.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Bioteknologi dan Biologi Molekuler, *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember dimulai pada bulan November 2013 hingga Januari 2015.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan standar dalam laboratorium kultur jaringan dan biologi molekuler seperti *Laminar Air Flow*, Spektrofotometer, *Shaker*, *PCR*, *Nano Drop*, dan lain lain. Sedangkan bahan utama yang digunakan yaitu tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) *in-vitro* varietas Bulu Lawang (BL) overekspresi gen *SoSPSI*, biakan bakteri *A. tumefaciens* strain GV 3101 sebagai pembawa konstruk plasmid *pAct-SoSUT*.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Persiapan Eksplan

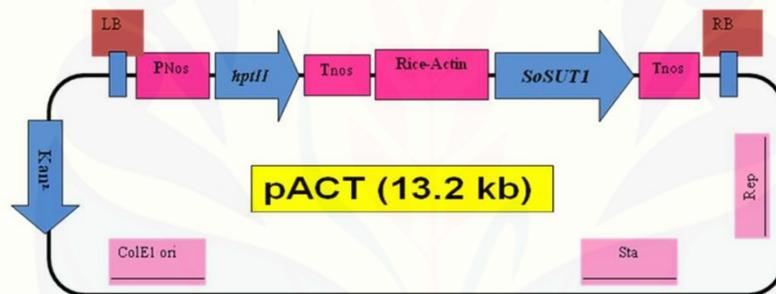
Pada penelitian pendahuluan ini dilakukan formulasi komposisi media dengan penambahan hormon tertentu untuk melihat perbedaan efektifitas penggunaan hormon tersebut dalam perbanyakan eksplan untuk keperluan transformasi genetik. Penelitian pendahuluan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan satu faktor yaitu formulasi media dengan 5 taraf dan 3 ulangan untuk setiap taraf.

Seluruh formulasi media yang digunakan ditambahkan antibiotik (MS + Kanamycin 25 mgL<sup>-1</sup>) disubkultur setiap 4 minggu sekali. Planlet yang digunakan merupakan planlet tebu overekspresi gen *SoSPSI* hasil penelitian Baskoro (2012), sehingga pada perbanyakannya ditambahkan antibiotik Kanamycin 30g/L<sup>-1</sup> dengan tujuan screening eksplan transforman. Subkultur dilakukan hingga planlet *in-vitro* berjumlah ± 50 planlet untuk setiap kali transformasi. Planlet tebu (*S. officinarum* L.)

var. Bulu Lawang (BL) overekspresi gen *SoSPSI* tersebut ditumbuhkan pada media perbanyakan dengan 5 macam formulasi media sebagai berikut: I: MS0; II: MS0 + Glutamin 50 mgL<sup>-1</sup>; III: MS0 + Glisin 2 mgL<sup>-1</sup>; IV: MS0 + Glutamin 50 mgL<sup>-1</sup> + Glisin 2 mgL<sup>-1</sup>; V: MS0 + 2,4-D 2 mgL<sup>-1</sup> + BAP 2 mgL<sup>-1</sup>.

### 3.3.2 Inokulasi *A. tumefaciens*

*A. tumefaciens* strain GV 3101 yang digunakan merupakan biakan murni yang sebelumnya sudah diinsersi gen *SoSUT1* dalam plasmid *pAct-SoSUT1*. Plasmid *pAct-SoSUT1* mengandung bagian LB: *left border*, RB: *right border* sebagai batas bagian T-DNA, P-Nos: *promoter nopaline synthetase*, *hptII*: *hygromycin phospho transferase gene*, T-Nos: *terminator nopaline synthetase*, *Promoter Rice actin*, *SoSUT1*: *Saccharum officinarum sucrose transporter* (Gambar 3).



Gambar 3.1 Konstruksi plasmid *pAct-SoSUT1* (Sugiharto, 2010).

Bakteri *A. tumefaciens* tersebut didapatkan dari *gliserol stock* yang diambil 50 µl untuk diinokulasi ke dalam media YEP selektif (kanamycin 50 mgL<sup>-1</sup>, rifampycin 100 mgL<sup>-1</sup>, streptomycin 30 mgL<sup>-1</sup>) cair 2 ml dan diinkubasi shaker 150 rpm, suhu 28<sup>0</sup>C selama 24 jam. Selanjutnya biakan bakteri diinokulasi sebanyak satu ose dengan cara streak kuadran pada media YEP selektif padat dan diinkubasi pada suhu 28<sup>0</sup>C selama 48 jam.

### 3.3.3 Isolasi DNA Plasmid dan PCR

Isolasi DNA plasmid bertujuan untuk melakukan konfirmasi keberadaan gen target pada plasmid yang diinsersikan pada *A. tumefaciens*. Teknik isolasi DNA plasmid menggunakan metode yang disebutkan dalam Sambrook *et al.* (1989).

Pellet DNA yang didapatkan dilarutkan dalam 20 µl buffer TE dan diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. DNA plasmid hasil isolasi digunakan sebagai *template* untuk analisis dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan divisualisasi pada 1% gel elektroforesis.

### 3.3.4 Infeksi *A. tumefaciens* pada Eksplan

Single koloni biakan *A. tumefaciens* pada media YEP selektif padat diinokulasikan pada media YEP selektif cair 2 ml dan diinkubasi shaker 150 rpm, 28°C selama 48 jam. Starter dituang ke dalam YEP selektif cair 50 ml, diinkubasi shaker 150 rpm, 28°C hingga mencapai kerapatan sel ( $OD_{600} = 0,4-0,6$ ).

Sebanyak 50-100 eksplan, diambil bagian pangkal dari planlet tebu ± 0,5 cm dari media perbanyakan, ditampung pada cawan petri yang berisi MS<sub>0</sub> cair. Kemudian ditusuk-tusuk menggunakan *syringe* steril. Eksplan dipindahkan ke dalam media YEP cair yang telah diinokulasi *A. tumefaciens* dan ditambah *acetosyringone* 100 mgL<sup>-1</sup>, diinkubasi shaker 150 rpm, suhu 28°C, selama 15 menit. Eksplan dibilas dengan *aquadest* steril 50 ml, dikeringkan diatas cawan petri yang telah diletakkan tisu dan kertas saring steril diatasnya. Selanjutnya eksplan ditumbuhkan pada media kokultivasi.

### 3.3.5 Ko-kultivasi

Ko-kultivasi dilakukan setelah proses infeksi yang bertujuan untuk memberi kesempatan *A. tumefaciens* tumbuh bersama dengan eksplan. Selama tahapan ko-kultivasi, integrasi plasmid ke dalam genom tanaman dapat berlangsung. Media ko-

kultivasi yang digunakan yaitu (MS + 100 mgL<sup>-1</sup> acetosyringone). Pada tahapan ko-kultivasi ini, eksplan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 3 hari pada suhu 24°C.

### 3.3.6 Eliminasi *A. tumefaciens*

Eliminasi dilakukan dengan tujuan mencegah ledakan pertumbuhan (*overgrowth*) bakteri pada eksplan sesudah ko-kultivasi. Eksplan dari media ko-kultivasi dicuci dengan larutan cefotaxime 500 mg L<sup>-1</sup> sebanyak 3 kali yang dilanjutkan dengan membilas eksplan menggunakan aquades steril setiap pencucian eksplan. Eksplan kemudian ditiriskan di kertas saring steril dan ditanam pada media eliminasi (MS + cefotaxime 500 mg L<sup>-1</sup>). Pada tahapan ini eksplan diinkubasi selama 7 hari dalam kondisi terang.

### 3.3.7 Seleksi Eksplan *Putative* Transforman

Tahapan seleksi eksplan *putative* transforman dilakukan sebanyak 5 kali. Seleksi dilakukan dengan subkultur eksplan tebu sesudah eliminasi pada media seleksi dan di inkubasi pada suhu 24°C dengan penyinaran cahaya lampu 1000-2000 lux. Media yang digunakan dalam tahapan seleksi yaitu media MS + cefotaxime 500 mg L<sup>-1</sup> + hygromycin 10 mgL<sup>-1</sup> untuk seleksi ke-1 dan ke-2. Sedangkan untuk seleksi ke-3, ke-4 media MS + cefotaxime 500 mg L<sup>-1</sup> + kanamicyn 30 mgL<sup>-1</sup> + hygromycin 20 mgL<sup>-1</sup>. Sedangkan untuk seleksi ke-5 media yang digunakan yaitu media MS + cefotaxime 500 mg L<sup>-1</sup> + kanamicyn 50 mgL<sup>-1</sup> + hygromycin 20 mgL<sup>-1</sup>.

### 3.3.8 Efektifitas Transformasi

Efektifitas transformasi yang telah dilakukan dapat dihitung berdasarkan jumlah planlet yang mampu tumbuh pada tiap tahapan transformasi yaitu selama tahap kokultivasi, eliminasi dan lima periode seleksi. Perhitungan efektifitas transformasi bertujuan untuk mengetahui persentase keefektifan proses transformasi

genetik. Efektifitas transformasi selama lima periode seleksi dihitung berdasarkan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah planlet yang tumbuh pada tiap tahapan transformasi}}{\text{Jumlah eksplan awal}} \times 100\%$$

### 3.3.9 Isolasi DNA Genom Tanaman *Putative Transforman*

Isolasi genom DNA dilakukan dengan menggunakan metode Zheng *et al*, (1995). Isolasi DNA genom dilakukan dengan menggerus 0,5 gram daun tebu menggunakan *liquid nitrogen*, kemudian serbuk dipindah ke ependorf 2 ml dan ditambahkan 1 ml *buffer ekstraksi* (100 mM tris + 50 mM EDTA + 500 mM NaCl). Selanjutnya divortex dan ditambahkan 20% SDS 50 µl serta 1,25 µl β-mercaptoethanol, lalu diinkubasi 65°C selama 10 menit. Setelah itu ditambahkan 500 µl potassium acetat (5 M) dan diinkubasi di es selama 10 menit, kemudian di sentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan di transfer ke ependorf baru dan ditambahkan 625 µl isopropanol lalu di inkubasi -20°C selama 1 jam. Kemudian pellet dipindahkan pada ependorf baru dan ditambahkan 500 µl *buffer TE*, 15 µl RNAase, serta PCI (*phenol chloroform isoamil*) 500 µl. Supernatan yang didapatkan dipindahkan pada ependorf baru lalu ditambahkan chloroform (*equal volume*). Selanjutnya supernatan dipindahkan pada ependorf baru lagi, kemudian ditambahkan 0,8x isopropanol dan 0,2x NaAC, supernatan lalu diinkubasi -20°C selama 1 jam untuk presipitasi DNA. Sesudah inkubasi, pellet DNA dicuci dengan 70% etanol PA (*pro analysis*) dan dikeringkan dengan *vacuum dry* kemudian diberi 50 µl *buffer TE*, yang kemudian sampel di ukur konsentrasinya dengan menggunakan *spectrofotometer* pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

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

Analisis PCR dilakukan untuk konfirmasi keberadaan gen target pada plasmid yang diinsersikan pada *A. tumefaciens* dan mendeteksi keberadaan gen target pada genom tanaman yang telah ditransformasi. Analisis PCR gen *SoSUTI* dilakukan menggunakan satu pasang primer 1F/1R *hptII*, primer *forward* dengan sekuen primer *hpt-F* (5'-CCGCAAGGAATCGGTCAATA-3') dan primer *reverse* dengan sekuen primernya *hpt-R* (5'-CCCAAGCTGCATCATCGAAA-3') dari *hptII* (*hygromycin phosphotransferase*) berukuran 470 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*. Dalam satu kali reaksi memiliki total volume 20 µl dengan larutan yang terdiri dari 2X *PCR Master Mix* 10 µl, masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) 1 µl, *DNA template* 2 µl dan ddH<sub>2</sub>O 6 µl. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus yang meliputi tahapan antara lain *pre-denaturation* 94°C selama 2 menit, *denaturation* 94°C selama 20 detik, *annealing* 59°C selama 10 detik, *elongation* 72°C selama 50 detik dan *final elongation* 72°C selama 5 menit.

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

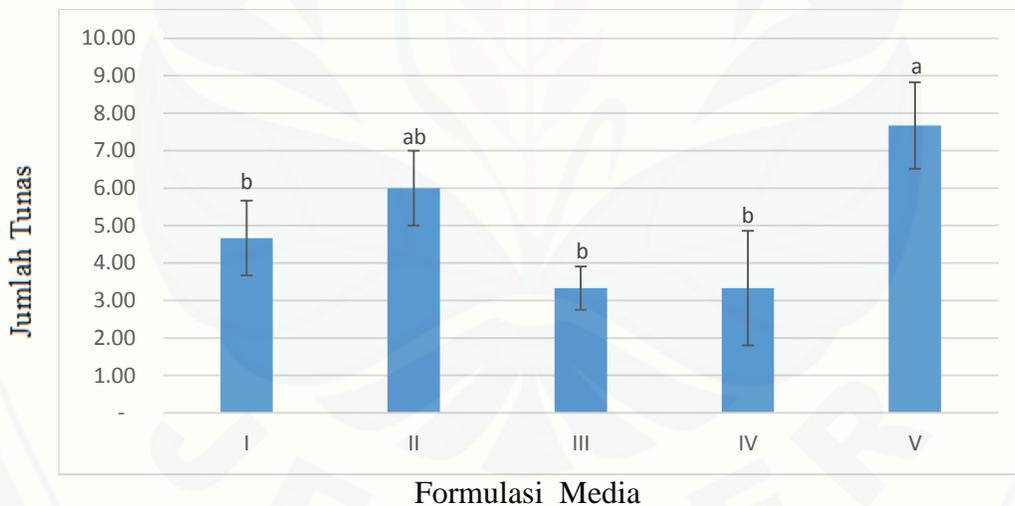
Pada tanaman yang telah dianalisis PCR dan dinyatakan positif transforman, dilakukan perhitungan efektifitas transformasi tanaman positif transforman. Efektifitas transformasi tanaman positif transforman dihitung berdasarkan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah tanaman yang positif transforman}}{\text{Jumlah eksplan awal}} \times 100$$

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Perbanyakkan Eksplan

Sebelum memulai kegiatan transformasi pada penelitian ini diawali dengan percobaan pendahuluan mengenai perbanyakkan eksplan. Perbanyakkan eksplan transformasi dilakukan secara *in vitro* dengan lima macam perlakuan formulasi media yaitu: I: MS0; II: MS0 + Glutamin 50 mgL<sup>-1</sup>; III: MS0 + Glisin 2 mgL<sup>-1</sup>; IV: MS0 + Glutamin 50 mgL<sup>-1</sup> + Glisin 2 mgL<sup>-1</sup>; dan V: MS0 + 2,4-D 2 mgL<sup>-1</sup> + BAP 2 mgL<sup>-1</sup> dengan eksplan awal adalah planlet *in vitro* tebu event 1.1E(6). Planlet tersebut merupakan planlet tebu overekspresi gen *SoSPS1* hasil penelitian Baskoro (2012), sehingga pada perbanyakannya ditambahkan antibiotik *Kanamycin* 30g/L<sup>-1</sup> dengan tujuan screening eksplan transforman. Pada pengamatan jumlah tunas minggu ke-4 didapatkan hasil yang berbeda signifikan berdasarkan uji *Duncan* taraf kepercayaan 95%.



Gambar 4.1 Grafik uji *Duncan* kepercayaan 95% jumlah tunas eksplan 1.1 E (6) pada minggu ke-4 setelah tanam.

Pada grafik di atas dapat dilihat bahwa respon pertumbuhan terbaik adalah penggunaan komposisi media MS0 + 2,4-D 2 mgL<sup>-1</sup> + BAP 2 mgL<sup>-1</sup> dengan rata rata hasil 7,67 tunas dari tiga ulangan planlet yang diperbanyak menggunakan formulasi

media tersebut. Pemberian notasi berdasarkan hasil uji *Duncan* dengan tingkat kepercayaan 95% menyatakan bahwa perlakuan formulasi media MS0 + 2,4-D 2 mgL<sup>-1</sup> + BAP 2 mgL<sup>-1</sup> berbeda sangat nyata apabila dibandingkan dengan perlakuan formulasi media ke-I: MS0. ke-III: MS0 + Glisin 2 mgL<sup>-1</sup>; dan media ke-IV: MS0 + Glutamin 50 mgL<sup>-1</sup> + Glisin 2 mgL<sup>-1</sup>; namun berbeda tidak nyata apabila dibandingkan dengan perlakuan media ke-II yaitu MS0 + Glutamin 50 mgL<sup>-1</sup>.

Penambahan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin saja dalam media MS0 hanya akan menyebabkan pertumbuhan kalus. Pada tanaman jenis monokotil, zat pengatur tumbuh golongan auksin dengan konsentrasi 1-10 mg/l berperan dalam menghambat proses diferensiasi sel sehingga pembentukan organ dapat dihambat dan hanya menghasilkan kalus. 2.4-D berperan dalam memacu *hipermethylasi* pada DNA, sehingga pembelahan sel selalu dalam fase mitosis, dengan demikian maka pembentukan kalus menjadi optimal (Meneses *et al.*, 2005).

Sama halnya dengan BAP yang merupakan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin. Uzelac *et al* (2012) menyatakan bahwa satu potongan jaringan parenkhim batang yang dikulturkan dengan tanpa diberi sitokinin, maka selnya itu tumbuh menjadi besar tetapi tidak membelah. Menurut Turgeon (1982) walaupun sitokinin disintesis dalam meristem akar tetapi sitokinin dalam jumlah kecil akan sedikit mempengaruhi terjadinya pembelahan di dalam areal organ (organogenesis). Penambahan sitokinin berupa BAP yang terlalu tinggi telah dilaporkan Restanto (1998) jumlah tunas akan menurun dan ke arah terbentuknya kalus akan semakin meningkat. Apabila sitokinin ditambahkan bersama-sama dengan auksin, maka sel itu dapat membelah sehingga diharapkan dapat menghasilkan tunas yang lebih banyak. Sitokinin akan meningkatkan sitokenesis dari sel pada saat fase mitosis pada tanaman *in vitro* (Turgeon, 1982) sehingga merangsang terbentuknya organogenesis pada sel. Akan tetapi penambahan sitokinin dan BAP secara bersamaan dengan konsentrasi tertentu pada penelitian kali ini dapat menghasilkan jumlah tunas yang lebih banyak dengan perbedaan signifikan apabila dibandingkan dengan formulasi media lainnya.

## 4.2 Konfirmasi Keberadaan Plasmid *pAct* dalam *Agrobacterium tumefaciens*

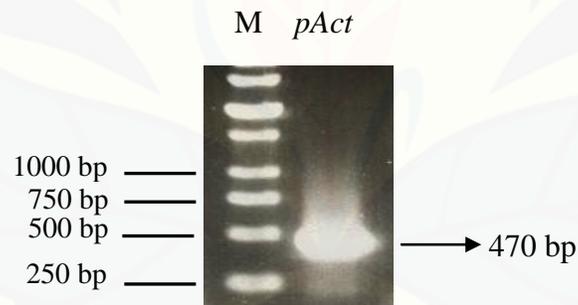
*A. tumefaciens* secara alami, mempunyai kemampuan untuk mentransfer bagian DNA-nya yang lebih dikenal dengan T-DNA (*transfer DNA*) ke dalam genom tanaman inang menyebabkan terbentuknya tumor (*crown gall*) pada inang (De la riva *et al.*, 1998). Kemampuan *A. tumefaciens* tersebut selanjutnya dapat dimanfaatkan untuk menyisipkan gen yang diinginkan ke dalam genom tanaman. Plasmid *pAct-SoSUT1* dibawa oleh vektor bakteri yaitu *A. tumefaciens*. Bakteri vektor telah dikenal sebagai agen yang umum digunakan dalam kegiatan transformasi materi genetik. Hal tersebut dikarenakan *A. tumefaciens* dalam keadaan liar memiliki kemampuan mentransfer materi genetik yang merupakan penyebab penyakit *crown gall* pada tumbuhan. Sehingga *A. tumefaciens* dapat pula disebut sebagai agen etiologis. Penelitian sebelumnya telah mampu menggantikan posisi materi genetik yang menyebabkan tumor tersebut dengan beberapa plasmid tertentu yang diinginkan untuk dapat ditransfer ke genom tanaman, dalam hal ini plasmid *pAct* pembawa gen *SoSUT1*. Berdasarkan kemampuan tersebut diharapkan hanya posisi diskrit kecil yang dikenal dengan daerah T-DNA dapat ditransfer ke sel sel tanaman.

Plasmid merupakan molekul DNA yang berbentuk sirkuler berukuran kecil dan terletak di luar kromosom yang terdapat pada sel prokariot khususnya bakteri. Gen yang terdapat pada plasmid tersebut pada umumnya tidak memiliki peranan khusus dalam kelangsungan hidup dan pertumbuhan bakteri itu sendiri, namun seringkali ditemukan mengkode sintesis protein untuk resistensi terhadap antibiotik. *A. tumefaciens* yang membawa plasmid *pAct* diindikasikan dapat bertahan dalam media YEP dengan antibiotik penyeleksi pertumbuhannya, yaitu *rifamycin* 100 mgL<sup>-1</sup> dan *kanamycin* 50 mgL<sup>-1</sup> (Saputra, 2011).

Penambahan antibiotik *rifamycin* 100 mgL<sup>-1</sup> dan *kanamycin* 50 mgL<sup>-1</sup> bertujuan untuk menyeleksi pertumbuhan bakteri pembawa plasmid, dikarenakan bakteri *wild type* atau bakteri liar yang tidak membawa plasmid *pAct* yang tumbuh tidak dapat bertahan dan mati pada kondisi media yang terdapat kedua macam

antibiotik tersebut. Sedangkan pada *A. tumefaciens* pembawa plasmid *pAct* disisipkan pula gen penyandi sintesis protein ketahanan terhadap antibiotik *rifamycin* 100 mgL<sup>-1</sup> dan *kanamycin* 50 mgL<sup>-1</sup> yang dikonstruksi pada plasmid *pAct* yang dibawahnya yaitu gen *nptII* (*neomycin phosphotransferase*) untuk *kanamycin*. Gen yang dikonstruksi pada plasmid tersebut berfungsi untuk menghambat kerusakan sel melalui proses fosforilasi senyawa aminoglikosida yang dihasilkan oleh *kanamycin*, sehingga *A. tumefaciens* pembawa plasmid *pAct* tersebut tetap hanya dapat bertahan hidup namun juga tumbuh pada media yang mengandung antibiotik penyeleksi.

Susunan atau konstruksi plasmid *pAct* juga disisipkan gen *hptII* (*hygromycin phosphotransferaseII*) yang menyandi sintesis protein ketahanan terhadap *hygromycin*. Untuk memastikan keberadaan plasmid tersebut dalam *A. tumefaciens* maka dilakukan isolasi plasmid yang selanjutnya dianalisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sehingga diketahui kebenaran tentang keberadaan plasmid *pAct* yang dibawa oleh *A. tumefaciens* (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 Elektroforesis DNA plasmid *A. tumefaciens* GV 3101 *pAct-SoSUT1* hasil PCR menggunakan primer 1F/1R *hptII*. Baris M: Marker 1 kb Ladder; *pAct*: DNA plasmid *pAct-SoSUT1*

Pada Gambar 4.2 dapat diketahui bahwa keberadaan pita DNA target yaitu *hptII* dari jarak antara primer *forward* dan *reverse* dengan panjang 470bp (*base pair*). Masing-masing primer hanya mampu mendeteksi DNA secara spesifik maka DNA lain tidak akan dapat teramplifikasi. Hasil amplifikasi pada gambar di atas menunjukkan bahwa *A. tumefaciens* strain GV3101 yang digunakan dalam kegiatan

transformasi kali ini telah positif membawa konstruk plasmid *pAct* dengan indikasi visualisasi gen *hptII* yang tampak berpendar. Sehingga diharapkan kegiatan transformasi pada genom tanaman dapat menyisipkan T-DNA yang mengandung gen penyandi ketahanan terhadap antibiotik *hygromycin* dan sekaligus gen *SoSUT1*.

#### **4.3 Transformasi Eksplan Transforman Overekspresi Gen *SoSPSI* dengan Gen *SoSUT1* menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*.**

Secara umum kegiatan transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* memiliki beberapa tahapan yang dapat mempengaruhi keberhasilannya meliputi penggunaan kerapatan bakteri, infeksi, kokultivasi, eliminasi dan seleksi. Selain hal tersebut perbanyakan planlet dan pemilihan eksplan juga berperan penting dalam menunjang kelancaran dan keberhasilan kegiatan transformasi untuk mendapatkan tingkat efisiensi transformasi yang tinggi. Pada Gambar 4.3 tampak kondisi planlet transforman *SoSPSI* yang sehat dan berukuran layak untuk digunakan sebagai eksplan transformasi. Planlet transforman *SoSPSI* yang sehat memiliki karakteristik berupa batang yang tampak kokoh dan berwarna hijau segar menandakan planlet tersebut tahan terhadap antibiotik *kanamycin*  $30\text{mgL}^{-1}$  yang digunakan, juga memiliki daun dan perakaran yang tumbuh optimal.



Gambar 4.3 Kondisi planlet tebu sebagai eksplan transformasi. a. Planlet tebu *in vitro* pada media perbanyakan; b. Planlet yang telah dipisahkan dari rumpun sebelum diambil bagian pangkal tunasnya; c. Pangkal tunas atau basal tebu *in vitro* berukuran panjang  $\pm 5$  mm sebagai eksplan transformasi.

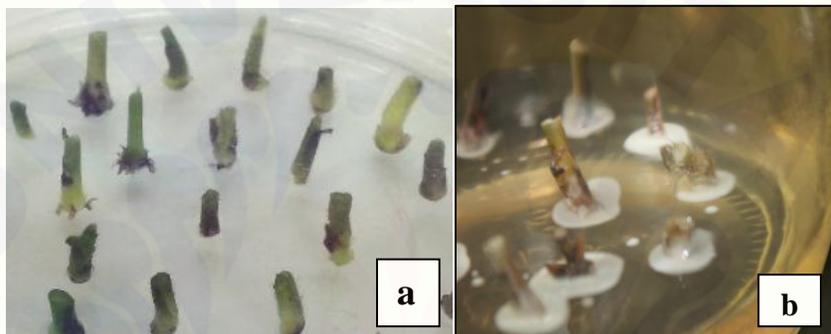
Penggunaan basal atau pangkal tunas tebu *in vitro* sebagai eksplan transformasi dikarenakan bagian tersebut merupakan jaringan meristematis yang masih aktif membelah.

Secara keseluruhan pada penelitian ini dilakukan sebanyak 5 kali kegiatan transformasi dengan jumlah 50 eksplan pada setiap kali transformasi. Pada transformasi pertama, kedua dan ketiga tidak didapatkan satupun planlet transforman, sehingga efisiensinya sangat rendah (Tabel 4.1).

Tabel 4.1. Hasil transformasi ke-1, 2 dan ke-3

Transformasi	Efisiensi Tahapan Transformasi						
	Co-Cultivasi	Eliminasi	S1	S2	S3	S4	S5
1	50	50	47	4	2	2	0
	100%	100%	94%	8%	4%	4%	0%
2	50	50	40	8	2	0	0
	100%	100%	80%	16%	4%	0%	0%
3	50	50	50	22	0	0	0
	100%	100%	100%	44%	0%	0%	0%

Pada tabel 4.1 dapat dijelaskan bahwa rendahnya presentase keberhasilan transformasi yang dilakukan diakibatkan tingginya fenomena *overgrowth* bakteri *A.tumefaciens* pada eksplan dan media penyeleksi. *Overgrowth* dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan eksplan hingga berujung pada kematian sel dan jaringan seperti ditunjukkan pada Gambar 4.4. Tampak pada gambar tersebut eksplan tidak dapat menumbuhkan tunas diakibatkan karena terjadinya *overgrowth*.



Gambar 4.4 Perbandingan kondisi eksplan pasca transformasi a. Kondisi eksplan pada media co-cultivasi sebelum terjadi overgrowth; b. Kondisi eksplan pada media seleksi saat terjadi overgrowth, dapat dilihat dari peledakan jumlah bakteri *A. tumefaciens* di permukaan media *in vitro* yang mengelilingi eksplan.

*Overgrowth A.tumefaciens* dapat mengakibatkan pasokan nutrisi bagi eksplan sangat jauh berkurang karena sifatnya sebagai parasit yang juga turut memanfaatkan nutrisi khususnya sukrosa pada media *in vitro* untuk proses metabolisme dan pertumbuhannya. Sehingga mengakibatkan kompetisi pemanfaatan nutrisi antara koloni *A.tumefaciens* dengan eksplan transformasi (Mannan *et.al*, 2009). Untuk mengantisipasi pertumbuhan koloni *A.tumefaciens* tersebut maka ditambahkan antibiotik *ceffotaxime*  $500\text{mgL}^{-1}$  pada media seleksi sebagai tindakan pencegahan sebelum *overgrowth* terjadi dengan harapan penggunaan antibiotik *ceffotaxime*  $500\text{mgL}^{-1}$  dapat meningkatkan penghambatan biosintesis di dinding sel bakteri dengan mengikat satu atau lebih penisilin pengikat protein (*PBP*s).

Meskipun pada faktanya tetap terjadi ledakan pertumbuhan pada media, hal tersebut dapat dipengaruhi oleh penggunaan kerapatan bakteri yang lebih tinggi dari batas optimal untuk kegiatan transformasi. Berdasarkan hasil pembacaan alat spektrofotometer, kerapatan bakteri yang digunakan untuk transformasi ke-1 adalah  $OD_{600} = 0.7$ , transformasi ke-2  $OD_{600} = 0.8$  dan ke-3  $OD_{600} = 0.9$ . Tingginya angka pengukuran tersebut diakibatkan oleh proses penggojokan *starter* bakteri 2 ml dalam media YEP + antibiotik yang terlalu lama. *Overgrowth* juga dapat diakibatkan proses pelukaan (Gambar 4.4) menggunakan jarum steril pada eksplan yang terlalu dalam. Hal tersebut memungkinkan bakteri dapat bersembunyi dan bertahan hidup dalam jaringan eksplan sehingga tidak terjangkau oleh antibiotik *ceffotaxime*  $500 \text{ mgL}^{-1}$  yang berfungsi sebagai *eliminator* bakteri *A.tumefaciens* pada media seleksi *in vitro*.



Gambar 4.5 Proses pelukaan pada eksplan menggunakan jarum suntik steril yang bertujuan untuk memfasilitasi proses infeksi *A.tumefaciens*.

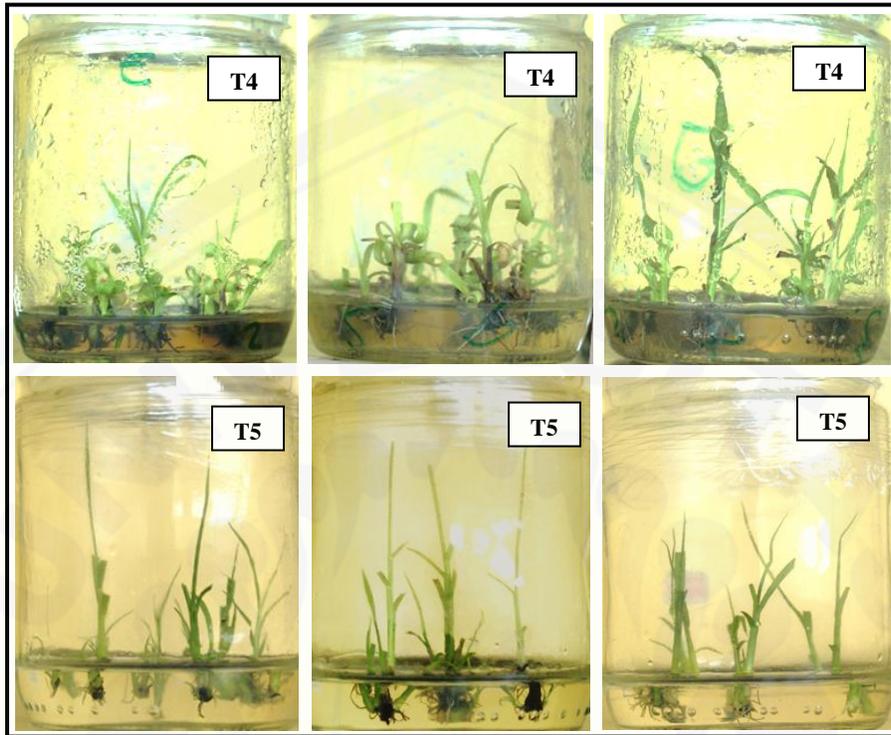
Beberapa penyebab *overgrowth* dan berujung kegagalan pada transformasi ke-1, 2 dan ke-3 tersebut selanjutnya dilakukan evaluasi dan koreksi yang bertujuan agar dapat memperoleh produk berupa planlet *in vitro* yang putative transforman. Perbaikan yang digunakan adalah penggunaan kerapatan bakteri yang lebih rendah dan penusukan yang lebih perlahan dan tidak terlalu dalam. Selanjutnya dilakukan lagi kegiatan transformasi sebanyak 2 kali (Tabel 4.2) dengan masing masing jumlah eksplan pada setiap transformasi sebanyak 50 eksplan.

Tabel 4.2 Hasil transformasi ke-4 dan ke-5

Transformasi	Efisiensi Tahapan Transformasi						
	Co-Cultivasi	Eliminasi	S1	S2	S3	S4	S5
4	50	50	41	36	24	20	12
	100%	100%	82%	72%	48%	40%	24%
5	50	50	40	30	18	15	10
	100%	100%	80%	60%	36%	30%	10%

Hasil transformasi ke-4 dan ke-5 dapat menghasilkan planlet *putative* transforman dengan presentase efisiensi transformasi 24% (12 planlet) untuk transformasi ke-4 dan 20% (10 planlet) untuk transformasi ke-5. *Putative* transforman sendiri adalah istilah yang digunakan untuk menyebut planlet yang telah lolos hingga tahapan akhir seleksi, namun belum dianalisis PCR untuk memastikan terinsersinya gen target pada sel tanaman. Pada dua transformasi selanjutnya ini didapatkan beberapa planlet *putative* transforman yang mampu bertahan hingga lolos media seleksi ke-5 dengan komposisi media berupa MS + *cefotaxime* 500 mgL<sup>-1</sup> + *kanamicyn* 50 mgL<sup>-1</sup> + *hygromicyn* 20 mgL<sup>-1</sup>.

Kondisi planlet *putative* yang telah lolos dari media seleksi 5 bervariasi. Meskipun secara umum beberapa planlet dari transformasi ke-4 dan ke-5 dapat dinyatakan hidup dan mampu bertahan dari cekaman antibiotik *hygromycin* dan *kanamycin* tinggi namun kondisi morfologisnya berbeda beda (Gambar 4.6). Perbedaan kondisi morfologis yang ditunjukkan pada Gambar 4.6 dapat dikaitkan dengan mekanisme lolosnya planlet-planlet tersebut dari serangkaian media seleksi yang diberikan.



Gambar 4.6 Perbandingan kondisi morfologis pada beberapa planlet hasil transformasi ke-4 dan ke-5. T4: Kondisi morfologis eksplan transformasi ke-4 pada media seleksi 5; T5: Kondisi morfologis eksplan transformasi ke-4 pada media seleksi 5.

Gambar 4.6 menunjukkan perbedaan kondisi antara planlet T4 dan T5. Indikator yang menjadi pembeda antara planlet T4 dan T5 adalah tampak terdapat penggulungan pada beberapa ruas daun yang menunjukkan perwujudan mekanisme adaptasi terhadap antibiotik *hygromycin*  $20 \text{ mgL}^{-1}$  yang diberikan. Sedangkan untuk warna pada planlet T4 ataupun T5 meskipun ukurannya tidak seragam namun memiliki warna yang hijau segar, hal tersebut mengindikasikan planlet T4 dan T5 merupakan planlet overekspresi gen *SoSPS1* yang memiliki pola ketahanan tertentu terhadap cekaman antibiotik *kanamycin*  $50 \text{ mgL}^{-1}$ .

Tampak planlet T5 menunjukkan pola ketahanan tertentu terhadap cekaman antibiotik *kanamycin*  $50 \text{ mgL}^{-1}$  dan *hygromycin*  $20 \text{ mgL}^{-1}$  yang disebabkan oleh terinsersinya plasmid *pAct* ke sel planlet yang pada dasarnya memiliki ketahanan

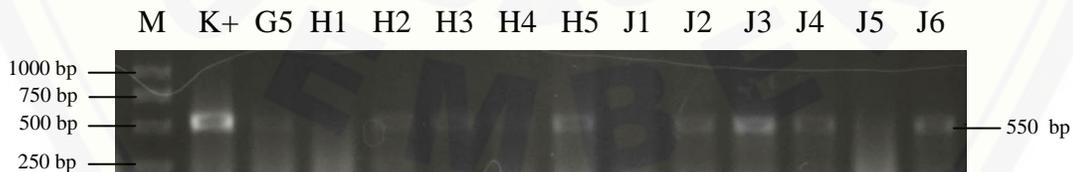
terhadap cekaman antibiotik *kanamycin* 50 mgL<sup>-1</sup> karena merupakan planlet overekspresi gen *SoSPS1* hasil penelitian Baskoro (2012).

#### 4.4 Analisis PCR Tebu Overekspresi Gen *SoSPS1* Putative Transforman gen *SoSUT1*

Seluruh planlet yang telah lolos hingga seleksi 5 baik hasil transformasi ke-4 ataupun ke-5 selanjutnya dianalisis PCR untuk memastikan keberadaan gen target yang telah diinsersikan melalui transformasi sekaligus keberadaan gen target bawaan planlet yang digunakan sebagai eksplan. Analisa PCR ini menggunakan *template* DNA genom yang telah diisolasi dari planlet *putative* transforman. Gel agarose pada elektroforesis ini membantu pemisahan dengan membentuk matrik yang rapat untuk memisahkan DNA atas ukurannya yang berbeda-beda. Arus listrik pada alat mengalir dari kutub negatif ke kutub positif membantu pergerakan DNA pada gel agarose.

Brown (1995), menyatakan bahwa panjang primer 8 basa nukleotida mampu berpasangan dengan fragmen DNA meskipun bukan merupakan fragmen DNA target. Tetapi dengan penggunaan panjang primer 17-30 basa nukleotida, pasangan primer mampu mendeteksi fragmen target secara spesifik. Panjang primer satu dengan yang lain tidak boleh lebih dari 3 kb dan panjang ideal diantara keduanya kurang dari 1 kb.

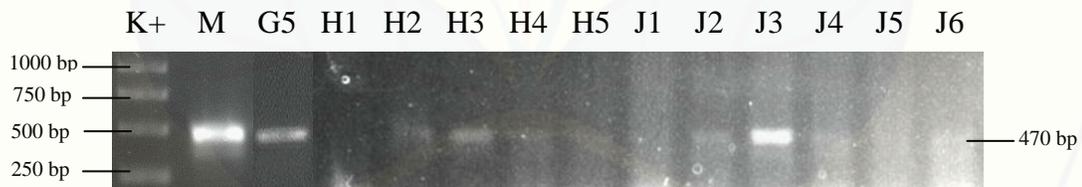
Pada transformasi ke-4 sebanyak 12 template DNA dari 12 planlet putative transforman diamplifikasi dan divisualisasi untuk mengetahui keberadaan gen *SoSPS1* dengan menggunakan elektroforesis gel agarose (Gambar 4.7).



Gambar 4.7 Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer 1F/1R *npt II*. M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid *pCl4-SoSPS1* (kontrol positif); G5-J6: sampel DNA tanaman tebu

Berdasarkan Gambar 4.7 dapat dilihat dari ke-12 template DNA yang dianalisis PCR terdapat 9 kode tanaman *putative* yang dapat dinyatakan sebagai positif ekspresi gen *SoSPS1* dengan terlihatnya *band* (pita DNA hasil amplifikasi PCR) *nptII* sepanjang 550 bp. Kesembilan tanaman tersebut memiliki kode G5, H2, H3, H4, H5, J2, J3, J4 dan J6. Sedangkan kode H1, J1 dan J5 tidak dapat dinyatakan sebagai transforman *SoSPS1* karena tidak terdapat visualisasi pita band hasil amplifikasi. Kontrol positif yang digunakan adalah isolat plasmid *pCl4-SoSPS1* yang diisolasi dari *A.tumefaciens* transforman.

Sedangkan untuk konfirmasi gen *SoSUT1* pada transformasi ke-4 tetap menggunakan sampel template DNA yang sama dengan analisis sebelumnya tetapi dengan menggunakan pasangan primer yang berbeda. Konfirmasi gen *hptII* untuk mengindikasikan keberadaan gen *SoSUT1* menggunakan satu pasang primer *hptII* yang memiliki jarak diantara keduanya sebesar 470 bp. Primer yang digunakan disusun berdasarkan *sequence* lengkap *Hygromycin B Phosphotransferase* untuk mendeteksi keberadaan gen *hptII* penyandi protein ketahanan terhadap *hygromycin*. DNA genom *putative* transforman hasil isolasi selanjutnya diamplifikasi dan dideteksi keberadaannya menggunakan elektroforesis gel agarose (Gambar 4.8).



Gambar 4.8 Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer 1F/1R *hpt II*. M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid *pAct-SoSUT1* (kontrol positif); G5-J6: sampel DNA tanaman tebu

Penggunaan isolat plasmid dari *A.tumefaciens* transforman sebagai kontrol positif dan marker DNA dalam visualisasi hasil PCR ditujukan agar *band* hasil konfirmasi tanaman *putative* transforman sesuai dengan keberadaan *band* plasmid (kontrol positif) dan memiliki ukuran yang sesuai dengan ukuran marker.

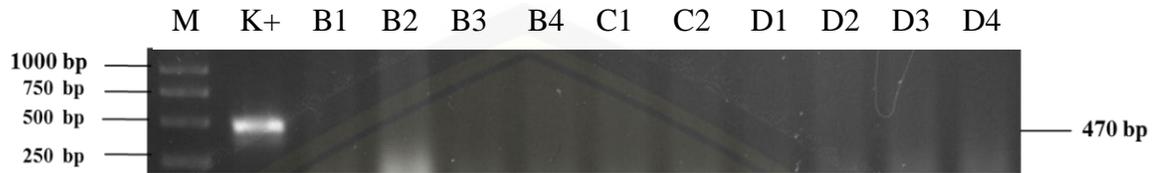
Berdasarkan Gambar 4.8, 12 sampel DNA yang diamplifikasi terdapat 5 sampel yang dinyatakan positif transforman *SoSUT1*. Konfirmasi tersebut didasarkan pada tampaknya visualisasi gen *hptII* sepanjang 470 bp yang terdapat dalam konstruk plasmid *pAct-SoSUT1* yang ditransformasikan pada eksplan. Kode sampel tanaman tersebut adalah G5, H2, H3, J2 dan J3. Kelima tanaman tersebut selanjutnya dapat dinyatakan sebagai tanaman yang transforman ekspresi ganda gen *SoSPS1* sekaligus gen *SoSUT1*. Efektifitas transformasi ke-4 ini memiliki presentase akhir sebesar 10% dari jumlah eksplan awal yang digunakan sebanyak 50 eksplan.

Pada transformasi ke-5 juga dilakukan analisis PCR untuk mengkonfirmasi keberadaan gen *SoSPS1* dan gen *SoSUT1* pada 10 tanaman *putative* transforman yang telah lolos serangkaian media seleksi antibiotik. Pada transformasi ke-5 ini sebanyak 10 template DNA dari 10 planlet *putative* transforman diamplifikasi dan divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis gel agarose (Gambar 4.9).



Gambar 4.9 Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer 1F/1R *npt II*. M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid *pCl4-SoSPS1* (kontrol positif); B1-D4: sampel DNA tanaman tebu

Pada Gambar 4.9 tampak bahwa dari 10 kode sampel DNA genom yang diamplifikasi terdapat 8 kode sampel yang dinyatakan positif transforman gen *SoSPS1* dengan terlihatnya *band nptII* sepanjang 550 bp. Kedelapan tanaman tersebut memiliki kode B3, B4, C1, C2, D1, D2, D3 dan D4. Sedangkan kode B1 dan B2 tidak dapat dinyatakan sebagai transforman *SoSPS1* karena tidak terdapat visualisasi pita band hasil amplifikasi.



Gambar 4.10 Elektroforesis DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer 1F/1R *hpt II*. M: Marker 1 kb ladder; K+: DNA plasmid *pAct-SoSUT1* (kontrol positif); B1-D4: sampel DNA tanaman tebu

Gambar 4.10 merupakan hasil elektroforesis DNA dengan menggunakan pimer 1F/1R *hptII* pada transformasi ke-5. Konfirmasi gen *SoSUT1* dengan indikator keberadaan gen *hptII* pada transformasi ke-5 ini, tampak hasil yang berbeda dengan hasil amplifikasi gen *hptII* pada transformasi ke-4. Tidak ada satupun dari kesepuluh sampel yang diamplifikasi menunjukkan visualisasi keberadaan gen target ketahanan terhadap *hygromycin hptII* sebagai indikasi keberadaan gen *SoSUT1*.

Pada media seleksi, suatu eksplan dapat menumbuhkan satu atau lebih tunas hingga menjadi planlet (Arencibia *et al.*, 1998). Indukan eksplan tersebut akan dimungkinkan mati sebelum tahapan seleksi usai. Tunas baru tersebut bisa saja tidak mati akibat cekaman antibiotik selama masa seleksi sehingga disebut *putative*. Penyebab bertahannya bukan karena tunas tersebut transforman namun karena tunas tersebut mendapatkan makanan dari eksplan indukan yang masih hidup hingga menjelang fase seleksi berakhir. Sehingga sekalipun kesepuluh eksplan tersebut lolos seleksi dan dinyatakan *putative*, tetapi hasil amplifikasi dan elektroforesis menunjukkan tidak adanya gen target ketahanan terhadap *hygromycin hptII* sebagai indikasi keberadaan gen *SoSUT1*. Hal tersebut menyebabkan kesepuluh tanaman *putative* dari transformasi ke-5 tidak dapat disebut sebagai tanaman dengan ekspresi ganda gen *SoSPSI* dan *SoSUT1*. Nilai Efektifitas Transformasi pada transformasi ke-5 ini memiliki presentase 0%. Hanya diketahui 8 tanaman dengan kode B3, B4, C1,

C2, D1, D2, D3 dan D4 yang dinyatakan positif gen transforman gen *SoSPSI* dengan terlihatnya visualisasi *band nptII* sepanjang 600 bp (Gambar4.9).



## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil transformasi didapatkan kesimpulan bahwa penggunaan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai vektor pembawa plasmid *pAct-SoSUT1* dalam transformasi pada eksplan tebu overekspresi gen *SoSPS1* mendapatkan tanaman transforman ekspresi ganda gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*, dengan efektifitas transformasi sebesar 10% (5 tanaman) pada transformasi ke-4.

### 5.2 Saran

Penggunaan kerapatan bakteri yang tidak melebihi  $OD_{600} = 0,6$  serta pelukaan yang lebih berhati-hati, keduanya bertujuan untuk mengantisipasi terjadinya *overgrowth*, sehingga meningkatkan presentase efektifitas transformasi pada penelitian serupa selanjutnya.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Arencibia, A. D., E. R. Carmona., P. T. Llez., M. T. Chan., S. M Yu., L. E. Trujillo., P. Oramas. 1998. An Efficient Protocol for Sugarcane (*Saccharum spp. L.*) Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research*. 7: 213 – 222.
- Baskoro, Aji. 2012. Efektifitas Transformasi Gen *SoSPSI* Menggunakan Vektor Plasmid *pCLA* dan Eksplan Tunas Lateral Tebu (*Saccharum officinarum L.*). Skripsi. Jurusan Budidaya Pertanian. Universitas Jember.
- Brown, T.A. 1995. *Gene Cloning An Introduction*. Chapman & Hall. London
- Buchanan, B. B., W. Gruissem., R. L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. America
- Campbell, N.A., J.B Reece dan L.G. Mithcell. 2002. *Biologi Jilid 1*. Terjemahan oleh Rahayu. Jakarta: Erlangga.
- Chavez, B. A. T., J. J. Valdez-Alarco'n., M. Marti'nez-Trujillo., L. Chen., B. Xoconostle-Ca'zares., W. J. Lucas., L. Herrera-Estrella. 2000. Tissue-Specific and Developmental Pattern of Expression of The Rice *SPSI* Gene. *Plant Physiology*. (124). 641-653.
- Cheikh, N., and Brenner, M. L. 1992. Regulation of Key Enzymes of Sucrose Biosynthesis in Soybean Leaves: Effect of Dark and Light Conditions and Role of Gibberellins and Abscisic Acid. *Plant Physiol*. 100: 1230-1237.
- Cheng, W.H., K. H. Im, and P. S. Chourey. 1996. Sucrose Phosphate Synthase Expression at The Cell and Tissue Level is Coordinated With Sucrose Sink to Source Transitions in Maize Leaf. *Plant Physiol*. Vol. 111 : 1021-1029.
- Chris, P., A. Cairns, J. Gallagher, J. Farrar, D. Tomos, and O. Koroleva. 1999. Sweetness and Light: the Role of Sucrose in Higher Plants. *Iger innovations* 6-9.
- De la Riva, G. A., J. Gonzalez-Cabrera, R. Vazquez-Padron dan C. Ayra-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A Natural Tool for Plant Transformation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 1 (3): 118 - 133.

- Echeverria, Ed., Salvucci, M. E., P. Gonzalez., C. Paris., and C. Salerno. 1997. Physical and Kinetic Evidence for an Association between Sucrose-Phosphate Synthase and Sucrose-Phosphate Phosphatase. *Plant Physiol.* 115: 223 – 227.
- Grof, C. P. L., P.L. Albertson., J. Bursle., J.M. Perroux., G.D. Bonnet., J.M. Manners. 2007. Sucrose-Phosphate Synthase, a Biochemical Marker of High Sucrose Accumulation in Sugarcane. *Crop Science.* Vol:47.
- Hazmi, M., Iskandar, S. B. Sumitro dan B. Sugiharto. 2009. Studi Penggunaan Pangkal Tunas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Sebagai Eksplan Transformasi DNA dengan Faktor *Agrobacterium tumefaciens*. *Berk. Penel. Hayati Edisi Khusus.* Vol. 3: 81–85.
- Huber, S.C. and J.L Huber. 1996. Role of Sucrose Phosphate Synthase in Sucrose Metabolism in Leaves. *Plant Physiol.* 89:518-524.
- Kakkar, A dan V. K. Verma. 2011. *Agrobacterium* Mediated Biotransformation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* Vol. 1 (7): 29-35.
- Kim, Mahe, Brangeon and Prioul. 2000. Amaize Vacuolar Invertase IVR2 is Induced By Water Stress. Organ / Tissue Spesificity and Diurnal Modulation of Expression. *Plant Physiol.* Vol. 124: 71-84.
- Koichi, T., C. H. Bag, M. S. Seo, I. J. Song, T. P. Lim, P. S. Song dan H. Y. Lee. 2002. Overcoming of Barriers to Transformation in Monocot Plants. *J. Plant Biotechnology.* Vol. 4: 135 - 141.
- Kuhn, C. 2003. A Comparison of the Sucrose Transporter System of Different Plant Species. *Plant Biol.* Vol. 5: 215-232.
- Lalonde, Tegeder, Frommer and Patrick. 2003. Phloem Loading and Unloading of Sugar and Amino Acids. *Plant Cell Environ.* Vol. 5: 37-53.
- Le, V.Q., Belles-Isles J, Dusabenyagasani M, dan Tremblay FM. 2001. An Improved Procedure For Production Of White Spruce (*Picea glauca*) Transgenic Plants Using *Agrobacterium tumefaciens*. *J.Exp.Bot.*52: 2089 –2095.
- Mannan, A., T. Noor Syed., and B. Mirza. 2009. Factors Affecting *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation of *Artemisia Absinthium* L. *Pakistan Journal Bot.* Vol 41. (6):3239-3246.

- Manickavasagam, M., Ganapathi, A., Anbazhagan, V. R., Sudhakar, B., Selvaraj, N., A.Vasudevan A., and Kasthuriengan S, 2004. *Agrobacterium* mediated Genetic Transformation and Development Of Herbicide Resistant Sugarcane (*Saccharum species hybrids*) Using Axillary Buds. *Plant Cell Rep.*23: 134–143.
- Miswar., B. Sugiharto., J. Soedarsono., S. Moeljapawiro. 2007. Transformasi gen *Sucrose Phospate Synthase (SoSPSI)* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* untuk Meningkatkan Sintesis Sukrosa Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Jurnal Hayati.* 12:137-143.
- Meneses, A., D. Flores, M. Munoz, G. Arrieta, A.M. Espinosa. 2005. Effect of 2.4-D, Hydric stress and light on indica rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Rev Biol Trop (Int J)* 53(3-4): 361-368.
- Mohammed dan Abalaka. 2011. *Agrobacterium* Transformation: A Boost to Agricultural Biotechnology. *Journal of Medical Genetics and Genomics.* Vol. 3 (8): 126 – 130.
- Reismeir, B. Hirner and W.B.Formmer. 1993. Potato Sucrose Transporter Expression in Minor Veins Indicated a Role in Phloem Loading. *The Plant Cell.* Vol. 5: 1591-1598.
- Restanto, D. P. 1998. Studi Regenerasi Kedelai secara In Vitro. Laporan Penelitian (Tidak dipublikasikan). Lembaga Penelitian Universitas Jember. Jember.
- Sambrook, J., E.F Fritsch and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2<sup>nd</sup> Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA
- Saputra, B.A. 2011. Respon EKsplan Tomat (*Lycopersicon esculentum* mill.) Terhadap Transformasi Gen SoSUT1 dengan Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Skripsi (Tidak dipublikasikan). Jurusan Budidaya Pertanian. Universitas Jember.
- Setyati, S., P. Oktaviandari, M. Hazmi dan B. Sugiharto. 2007. Studi Perbandingan Metode Transformasi DNA Menggunakan Vector *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Tebu (*Saccharum hybrid*). *Berk. Penel. Hayati.* Vol. 13: 39 - 44.

- Sugiharto, B., T. Handoyo, dan Sumadi. 1996. Variabilitas Genetik Dalam Enzim Fotosintetik Dan Enzim Metabolisme Sukrosa Pada Beberapa Varietas Tebu. *Zuriat*. 7: 76–78.
- Sugiharto, B., Slameto dan Dewanti, P. 2008. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overeksresi Gen SPS dan SUT Pada Tanaman Tebu. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi(Tidak dipublikasikan). Universitas Jember.
- Sugiharto, B. 2010. Peningkatan Produksi Gula Melalui Overeksresi Gen *Sucrose Phosphat Synthase* dan *Sucrose Transporter Protein* Pada Tanaman Tebu. Laporan Penelitian Hibah Kompetensi(Tidak dipublikasikan). Universitas Jember.
- Truernit, E. 2001. Plant Physiology: The Importance of Sucrose transporters. *Current Biology*. Vol. 11: 169-171.
- Turgeon, R. 1982. Cytokinesis, Cell Expansion, and the Potential for Cytokinin-Autonomous Growth in Tobacco Pith. *Plant Physiol*. 70: 1071-1074.
- Uzelac, D. Janošević, D. Stojičić dan S. Budimir. 2012. Effect of Cytokinins on Shoot Apical Meristem in *Nicotiana tabacum*. *Arch. Biol. Sci.*, 64 (2) : 511-516.
- Walker, J.L and S.C. Huber. 1989. Purification and Preliminary Characterization of Sucrose Phosphate Synthase Using Monoclonal Antibodies. *Plant Physiol*. 89:518-524.
- Zheng, K., Huang, N., Bennet P., And Khush G. S. 1995. PCR-Based Marker Assisted Selection in Rice Breeding. *IRRI news lett* 2.