

**PENGEMBANGAN TEBU PRODUK REKAYASA GENETIK SUT
DENGAN INSERSI GEN SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE**

**DEVELOPMENT OF GENETICALLY MODIFIED PRODUCTS SUGARCANE
WITH INSERTING GENE FOR SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE**

Mohamad Syaifudin Aswan

Prodi Pendidikan Biologi FP MIPA, IKIP PGRI Jember

E-mail: aswan.chely@gmail.com

Abstrak

Tebu produk rekayasa genetika SUT (PRG SUT) merupakan tebu overekspresi gen SoSUT1 yang diketahui mampu meningkatkan produksi *Sucrose transporter* (SUT). SUT merupakan protein membrane yang berfungsi sebagai protein transporter sukrosa dari jaringan asimilasi ke jaringan penyimpanan. Peningkatan translokasi sukrosa harus diimbangi dengan peningkatan sintesis sukrosa di organ asimilasi. SoSPS1 merupakan gen pengkode *Sucrose phosphate synthase* yang merupakan enzim kunci dalam sintesis sukrosa di sitosol. Insersi gen SoSPS1 pada tebu Produk rekayasa genetika SUT dipandang perlu untuk mendapatkan tebu dengan sintesis sukrosa tinggi. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu produk rekayasa genetic *SUT - SPS*. Insersi gen SoSPS1 menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 pembawa konstruk pKYS-SoSPS1. Parameter keberhasilan penelitian ini adalah terintegrasinya konstruk pKYS-SoSPS1 kedalam genom tanaman Tebu PRG SUT dengan uji ketahanan terhadap media seleksi antibiotik dan analisis PCR. Penelitian ini berhasil mendapatkan 10 tanaman tebu PRG SUT-SPS.

Kata Kunci: Tebu PRG SUT, insersi genetic, *Sucrose phosphate Synthase*

Abstract

Sugarcane of genetically modified products SUT are SoSUT1 gene overexpression sugarcane that is known to increase the production of Sucrose transporter (SUT). SoSUT1 gene is coding Sucrose transporter (SUT) protein. SUT is a membrane protein that serves as sucrose transporter protein from the assimilation tissues to the storage tissues. To get sugarcane with high sucrose content, Increasing translocation of sucrose should be offset by increasing synthesis of sucrose in the assimilation organs. SoSPS1 gene is a gene sucrose phosphate synthase coding that is a key enzyme in the sucrose synthesis in the cytosol. Transformation of SoSPS1 gene uses Agrobacterium tumefaciens LBA4404 carrier pKYS -SoSPS1 on sugar cane of genetically modified products event 2 and 20 is deemed necessary to get the sugar cane with high sucrose synthesis. This research aims to get sugarcane with the overexpression of SoSPS1 gene in sugar cane PRG SUT event 2 and 20. The success of this research is the integration of the pKYS- SoSPS1 construct into genom of target plant by the resistance test to antibiotic selection and PCR analysis. This research succeeded to get 10 SUT- SPS transgenic sugarcane.

Keywords: *Genetic Transformation, Sugarcane Event 2 and 20, Sucrose phosphate Synthase*

Pendahuluan

Tebu (*Saccharum officinarum L.*) merupakan tumbuhan penghasil gula (Sukrosa). Akumulasi sukrosa pada tanaman dipengaruhi oleh tingkat asimilasi karbon dan sintesanya (Caves *et al.*, 2000) serta dipengaruhi oleh laju transportasi sukrosa dari organ asimilasi (*source*) ke organ penyimpanan (*sink*) (Khun & Cristopher., 2010). Enzim yang berperan dalam sintesis sukrosa, diantaranya adalah *Sucrose phosphate synthase* (SPS) dan *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) Caves.,*at al* (2000). SPS berperan mengkatalisis *UDP-glucose* dan *Fructose-6-phosphat* menjadi *Sucrose-6-phospate* yang merupakan substrat SPP untuk membentuk sukrosa (Cheikh & Brenner, 1992).

Aktivitas SPS berkorelasi nyata dengan pertumbuhan dan produksi gula (Sugiharto.,1997). SPS pada tanaman berperan dalam meningkatkan laju sintesis sukrosa (Hubber & hubber 1992). Gen pengkode untuk SPS secara alami telah dimiliki oleh beberapa tanaman, pada tebu disebut dengan gen *Saccharum officinarum Sucrose Phosphate Synthase* (SoSPS1).

Metode

Persiapan Eksplan

Planlet *in-vitro* tebu PRG SUT event 2 dan 20 diperbanyak pada media

Transportasi sukrosa dari organ asimilasi (*source*) ke organ penyimpanan (*sink*) difasilitasi oleh protein *Sucrose Transporters* (SUT) (Miswar *et al.*, 2007) . Gen pengkode protein SUT pada tebu disebut dengan gen *Saccharum officinarum Sucrose Transporter* (SoSUT).

Tebu Produk rekayasa genetik (PRG) SUT merupakan tebu *overekspresi* gen SoSUT1 hasil Inseri gen SoSUT1 pada penelitian sebelumnya. Tebu tersebut memiliki tingkat transport sukrosa yang tinggi. Peningkatan transport sukrosa perlu diimbangi dengan peningkatan sintesis sukrosa. Inseri gen *sucrose phosphate syntase* tebu PRG SUT menjadi alternatif untuk mendapatkan tebu dengan tingkat sintesis dan translokasi sukrosa tinggi. Inseri gen SoSPS1 pada tebu PRG SUT menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 dengan konstruk plasmid pKYS-SoSPS1. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tebu PRG SUT –SPS. Penelitian ini berhasil mendapatkan 10 tebu PRG SUT-SPS.

Murashige Skoog (MS) + 2mg^l⁻¹ 2,4D + 2mg^l⁻¹ BAP + Hygromycin 20 mg^l⁻¹. Planlet disubkultur setiap 3 minggu sekali hingga mendapatkan 100 planlet *in-vitro* pada masing-masing *event*.

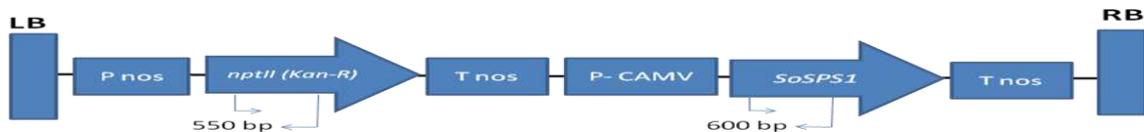
Pengkulturan *Agrobacterium*

Koloni tunggal dari *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 ditumbuhkan pada 2 ml YEP (Yest Ekstrak Pepton) yang mengandung antibiotik rifampicin 50 mgL⁻¹, kanamisin 50 mgL⁻¹, dan Streptomycin 30 mgL⁻¹, kemudian diinkubasi pada orbital seker dengan suhu 28°C kecepatan 150 rpm selama 24 jam.

Konfirmasi pKYS-SOSPS1 pada *Agrobacterium*

Keberadaan gen target pada *Agrobacterium* harus ketahu sebelum insersi gen dilakukan. Konfirmasi genetic diawali dengan isolasi DNA,

teknik isolasi DNA plasmid dari sel bakteri dilakukan berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989). DNA hasil isolasi digunakan sebagai cetakan DNA dalam analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Analisis PCR bertujuan untuk konfirmasi keberadaan konstruk pKYS-SoSPS1 dengan menggunakan pasangan primer (*forward* dan *reverse*) *nptII*. Primer *nptII* digunakan untuk konfirmasi gen penyeleksi *nptII*. T-DNA dari konstruk plasmid pKYS-SoSPS1 yang mengandung gen SoSPS1 dapat di lihat pada gambar 1. Hasil PCR dikonfirmasi dengan elektroforesis gel agarosa dan divisualisasi dengan *Gel Imaging System*.



Gambar 1. Bagian T-DNA dari konstruk plasmid pKYS-SoSPS1 yang mengandung gen SoSPS1 dan gen ketahanan antibiotik Kanamycin (*nptII*)

Infeksi dan Kokultivasi

Starter *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 yang mengandung konstruk *pKYS-SoSPS1* sebanyak 2 ml disubkultur dalam 50 ml YEP cair yang mengandung antibiotik penyeleksi Kanamycin 50 mgL⁻¹, Rifampicin 100 mgL⁻¹, dan Steptomycin 30 mgL⁻¹, diinkubasi *shaker* 150 rpm pada suhu 28°C hingga kerapatan sel (OD₆₀₀) mencapai 0,7.

Planlet yang berjumlah 100 batang dipotong dan diambil bagian

pangkal sepanjang 0,5 cm. Setelah itu, bagian ventral eksplan di lukai dengan 3 sampai 6 tusukan jarum steril. Infeksi dilakukan dengan cara merendam eksplan pada 50 ml media YEP cair yang berisi kultur *A. tumefaciens* dengan penambahan 100 mgL⁻¹ *acetosyringone*, inkubasi *shaker* dilakukan pada kecepatan 120 rpm, suhu 28°C, dengan kondisi gelap, selama 15 menit. Eksplan hasil inkubasi dikering anginkan lalu ditanam pada media kokultivasi selama 3 hari dengan kondisi gelap.

Eliminasi *Agrobacterium*

Planlet dari media kokultivasi dicuci dengan *cefotaxime* 500 mgL⁻¹ dan dibilas 100 ml aquades steril. Eksplan ditanam pada media eliminasi yang terbuat dari MS + *cefotaxime* 500 mgL⁻¹ dan diinkubasi pada kondisi terang selama 7 hari.

Tahapan seleksi merupakan tahap setelah eliminasi. Tahap ini membutuhkan waktu 5 siklus inkubasi dengan masing-masing siklus 21 hari dengan kondisi terang. Tanaman tebu yang dapat tumbuh hingga seleksi ke 5 disebut sebagai tanaman *putative transforman* dan dilanjutkan dengan analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Isolasi DNA Genom dan Analisa PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Isolasi DNA genom dilakukan pada 0,2 gr daun. Isolasi menggunakan *Genomic DNA Purification Kit Promega*. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya menggunakan *nano value plus* dan kemudian dianalisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan sepasang primer *nptII* (*Neomycin phosphotransferase*) yaitu *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 mengamplifikasi DNA sepanjang 550 bp dan primer *hptII* (*Hygromycin phosphotransferase*) -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.

DNA hasil amplifikasi dipisahkan dengan agarose gel 1% elektroforesis yang mengandung 1,5µl EtBr (*Ethidium Bromide*) dengan tegangan 100 Volt selama 25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 kb Ladder sebanyak 3µl. Hasil elektroforesis dilihat dan di dokumentasikan menggunakan alat *Gel Imaging System*.

Aklimatisasi Tebu Transforman

Aklimatitasi dilakukan dengan dua tahap, pertama pangkal planlet tebu di cuci dengan air mengalir lalu ditanam pada tabung aklimatisasi dengan media pasir steril dan di inkubasi pada *growth chamber* selama ±2 minggu. Aklimatisasi tahap kedua tanaman tebu transforman di pindah ke *green house* dengan media tanah dan pupuk dalam *poly bag*. Pemeliharaan tanaman selama aklimatisasi tahap pertama dilakukan dengan pemberian larutan nutrisi *Hoagland* (pH 6,5).

Hasil dan Pembahasan

Perbanyakan planlet dan Eksplan untuk Inseri

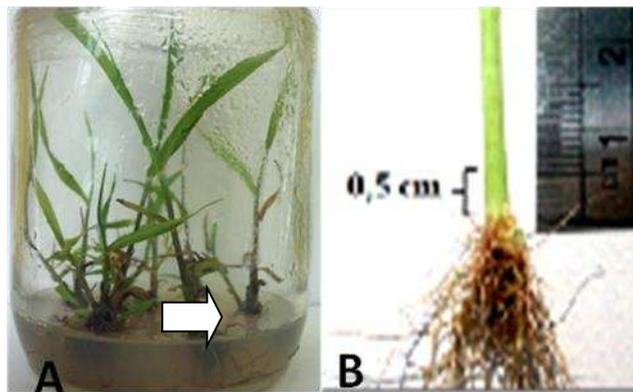
Proses perbanyakan planlet membutuhkan waktu ± 5 bulan dengan subkultur setiap 3 minggu sekali. Perbanyakan planlet dilakukan untuk

memenuhi ± 100 eksplan pada masing-masing event dalam proses Inseri.

Eksplan yang digunakan dalam proses Inseri genetik adalah pangkal planlet tebu *in vitro*. Penggunaan eksplan dari pangkal planlet dalam Inseri genetik pada tebu PRG lebih efektif dibandingkan dengan penggunaan kalus. Hal ini sesuai dengan teori Hazmi *et al.*, (2009) yang menyatakan bahwa pangkal planlet merupakan jaringan meristematik yang aktif membelah sehingga memerlukan waktu yang relatif singkat untuk beregenerasi. Penggunaan pangkal tunas tebu *in-vitro* sebagai eksplan untuk

Inseri genetik menggunakan *A. tumefaciens* memiliki beberapa keuntungan misalnya sumber eksplan selalu tersedia dalam jumlah banyak, meminimalisir tingkat variasi somaklonal dan memungkinkan melakukan infeksi secara intensif.

Planlet yang dipilih sebagai bahan eksplan memiliki kriteria tinggi ± 5 cm, kokoh, dan minimal memiliki 3 helai daun. Eksplan diambil dari pangkal planlet dengan panjang 0,5cm yang diukur dari pangkal batang. (gambar 2)



Gambar 2. Planlet hasil perbanyakan. A) Gambar yang ditunjukkan oleh anak panah merupakan planlet yang memenuhi kriteria untuk dijadikan bahan eksplan dan B) bagian planlet yang diambil untuk eksplan

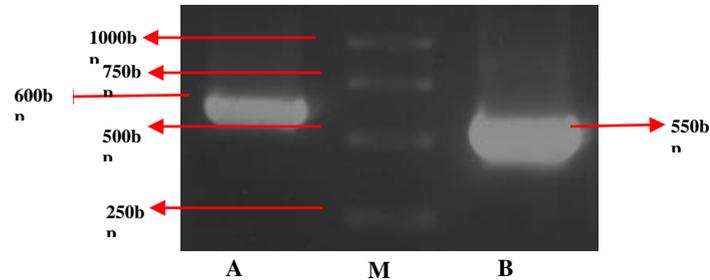
Konfirmasi Keberadaan Konstruk *pKYS-SoSPS1* dalam *Agrobacterium tumefaciens*

Konfirmasi keberadaan konstruk *pKYS-SoSPS1* dalam *Agrobacterium tumefaciens* dilakukan melalui analisis PCR. Konfirmasi dilakukan untuk memastikan keberadaan gen *SoSPS1* dan *hptII* dalam plasmid bakteri. Hasil PCR dan dilanjutkan dengan elektroforesis gel agarose 1% menunjukkan bahwa,

dengan menggunakan primer SPS terdapat pita DNA dengan ukuran 600bp, sedangkan dengan primer *nptII* terdapat pita DNA dengan ukuran 550 bp. Pita DNA dengan ukuran 600 bp tersebut sesuai dengan panjang DNA *SoSPS1* yang teramplifikasi dengan primer SPS, sedangkan pita DNA dengan ukuran 550 bp sesuai dengan ukuran DNA hasil amplifikasi dengan primer *nptII*. Hasil analisis PCR ini menunjukkan bahwa bakteri *A.*

tumefaciens LBA4404 yang digunakan sebagai vektor dalam Inseri mengandung konstruk *pKYS-SoSPS1*.

Gen SoSPS1 sebagai *Gen of Interest* (*Goi*) dan gen *nptII* yang berperan sebagai gen penyeleksi. (Gambar.3)



Gambar 3. Hasil PCR DNA Plasmid menggunakan Primer SPS dan *hptII*

Inseri Tebu PRG event 2 dan 20 dengan gen SoSPS1

Inseri genetik pada penelitian ini dilakukan dengan cara menginsersikan gen SoSPS1 pada eksplan tebu Produk Rekayasa Genetik Event 2 dan 20. Inseri dilakukan dengan tahapan sebagai berikut: infeksi, kokultivasi, eliminasi dan seleksi. Tahap infeksi memanfaatkan peran *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 dengan konstruk *pKYS-SoSPS1*.

Agrobacterium tumefaciens yang digunakan untuk menginfeksi planlet dengan kepadatan 0,7 pada OD₆₀₀. Kepadatan tersebut adalah yang optimal. Hal ini sesuai dengan penelitian Setyati (2007) yang menyatakan bahwa kepadatan populasi *Agrobacterium tumefaciens* yang digunakan pada proses Inseri tanaman tebu adalah kisaran 0,5- 1. Pada kisaran OD tersebut diketahui bahwa bakteri berada pada fase logaritmik sehingga proses infeksi lebih optimal. Menurut Mannan *et al*, (2009) menyatakan bahwa kepadatan bakteri yang terlalu rendah dapat mengurangi frekwensi

insersi T-DNA, sedangkan jika terlalu tinggi dapat mengganggu regenerasi tanaman.

Kokultivasi bertujuan untuk memberikan kesempatan kepada *Agrobacterium* untuk dapat tumbuh bersama dengan eksplan, sehingga proses transfer T-DNA dapat terjadi. Hasil penelitian pada akhir tahap kokultivasi diketahui bahwa dengan kepadatan bakteri pada OD 0,7 tidak terjadi *over growt* atau pertumbuhan bakteri yang berlebih sehingga eksplan masih dapat beregenerasi dengan menghasilkan tunas.

Eliminasi merupakan tahap setelah kokultivasi. Eliminasi bertujuan untuk membebaskan eksplan dari *Agrobacterium*. Dari hasil pengamatan pada tahap eliminasi diketahui bahwa dengan penambahan cefotaxim 500 mg^l⁻¹ pada media MS0 semua eksplan telah terbebas dari *Agrobacterium*. 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⁻¹.

Seleksi merupakan tahap setelah eliminasi. Seleksi bertujuan untuk mengeliminasi planlet non transforman. Tahap seleksi merupakan faktor kunci yang menentukan keberhasilan metode Inseri genetik. Tebu PRG event 2 dan 20 merupakan tanaman positif transforman overekspresi gen *SoSoSUTI* melalui Inseri menggunakan konstruk plasmid *pAct-SoSUTI* pada penelitian sebelumnya. Pada tanaman tersebut terdapat gen *hptII*, yaitu gen penyandi protein yang bertanggung jawab dalam ketahanan terhadap antibiotik higromycin. Antibiotik higromycin dapat mengganggu sintesis protein pada tanaman sehingga akan menghambat pertumbuhan tanaman. Menurut Arago and Brasileiro, (2002) Gen *hptII* menyandi enzim *hygromycin-4-fosfotransferase* yang dapat memfosforilasi gugus hidroksil dari antibiotik higromycin kemudian menjadi inaktif sehingga tidak toksik pada tanaman.

Planlet tebu PRG event 2 dan 20 kemudian dilakukan Inseri menggunakan gen *SoSPS1* sehingga mengandung gen penyeleksi *nptII*, yaitu gen penyandi protein yang bertanggung jawab dalam ketahanan terhadap antibiotik kanamycin. 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.

Tahap seleksi pada penelitian ini menggunakan Antibiotik kanamycin 50 mg⁻¹ dan Higromisin 20 mg⁻¹. Hasil uji ketahanan eksplan terhadap cekaman antibiotik sampai dengan 5 kali seleksi di ketahui bahwa, tebu PRG event 20 dari 100 eksplan yang di infeksi berhasil mendapatkan 10 planlet atau memiliki efektifitas Inseri 10%, sedangkan pada event 2 dari 100 eksplan yang di infeksi mendapatkan 12 planlet atau efektifitas tranformasi 12%.

Planlet yang dapat tumbuh dan beregenerasi pada media seleksi diduga telah terinsersi gen *nptII* dan *hptII*, sehingga planlet tersebut mampu menginaktivasi aminoglycosida yang dihasilkan oleh kanamycin dan higromisin. Hal ini sesuai dengan teori Matthews *et al.* (1995) yang menyatakan bahwa gen *nptII* yang telah terinsersi kedalam genom tanaman akan mensintesis enzim *neomycin phosphotransferase II* yang dapat memfosforilasi kanamycin sehingga menjadi inaktif. Sedangkan Menurut Arago and Brasileiro, (2002) Gen *hptII* menyandi enzim *hygromycin-4-fosfotransferase* yang dapat memfosforilasi gugus hidroksil dari antibiotik higromycin kemudian menjadi inaktif sehingga tidak toksik pada tanaman.

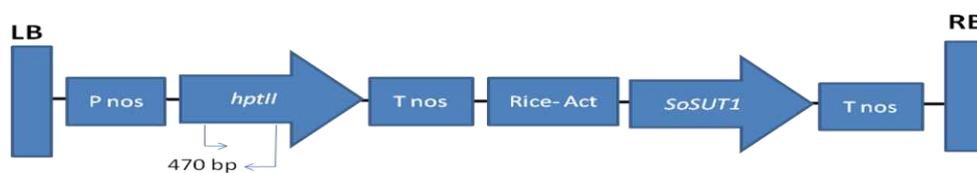


Gambar 4. Kondisi tanaman tebu yang dapat tumbuh pada cekaman antibiotik pada media seleksi

Analisis PCR Tanaman Tebu PRG Hasil Inseri

Keberhasilan dari proses Inseri genetik ditandai dengan terintegrasinya gen target kedalam genom tanaman. Konfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* dan *SoSPS1* yang terkandung dalam tanaman putatif transforman dilakukan dengan mendeteksi keberadaan gen penyeleksi *nptII* dan *hptII*. Hal ini

sesuai dengan peta konstruk (Gambar 1) bahwa gen *SoSPS1* berada dalam satu kaset T-DNA dengan gen ketahanan antibiotik *nptII*, sehingga keberadaan gen *SoSPS1* bisa dideteksi dengan gen *hptII*. Analisis PCR menggunakan primer F-R *hptII* didasarkan karena gen *SoSUT1* berada dalam satu kaset T-DNA dengan gen ketahanan antibiotik *hptII* (Gambar 5).



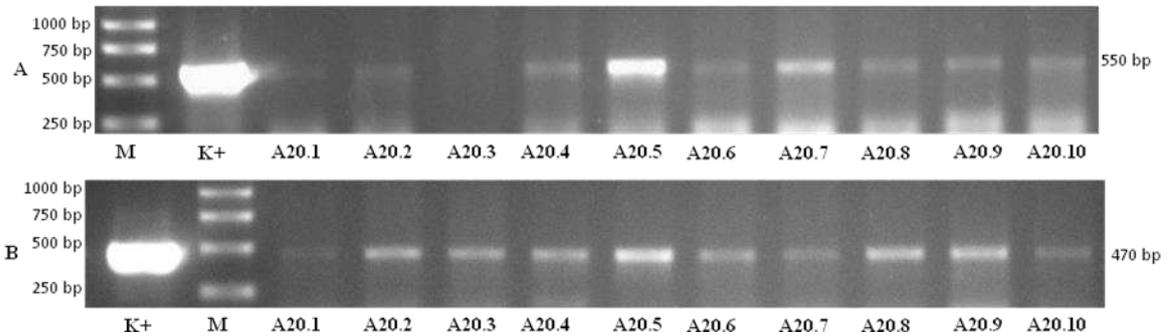
Gambar 5. Bagian T-DNA dari konstruk plasmid pAct-SoSUT1 yang mengandung gen SoSUT1 dan gen ketahanan antibiotik hygromycin

Berdasarkan hasil analisis PCR dengan primer *nptII*, tanaman tebu PRG event 20 yang mengandung gen *nptII* terdapat pada 9 tanaman, yaitu A20.1, A20.3, A20.4, A20.5, A20.6, A20.7, A20.8, A20.9. dan A20.10. Hasil analisis

lanjutan dengan mengkonfirmasi keberadaan gen *SoSUT1* dengan primer *hpt-F/R* menunjukkan bahwa dari 10 sampel yang diuji, semuanya positif mengandung gen *hptII*. Data dari kedua uji PCR tersebut dapat di ketahui bahwa

tebu PRG event 20 yang positif terinsersi gen SoSUT1 dan SoSPS1 terdapat pada 9 tanaman yaitu: A20.1,

A20.3, A20.4, A20.5, A20.6, A20.7, A20.8, A20.9, dan A20.10. (gambar 6)

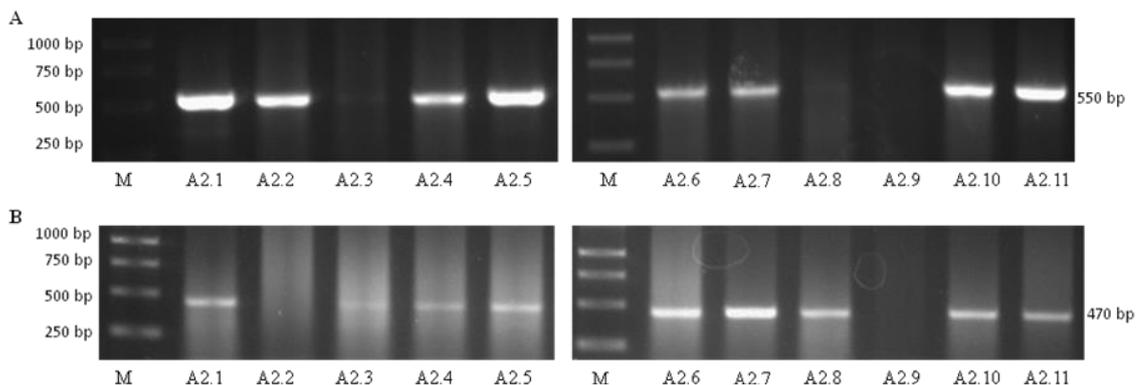


Gambar 6. Pita DNA hasil PCR dengan pasangan primer *npt-F/R* dan *hpt-F/R* pada sampel tebu transforman dari tebu PRG event 20

Berdasarkan hasil PCR sampel tebu PRG event 2 yang berhasil terinsersi gen *nptII* terdapat pada event A2.1, A2.2, A2.5, A2.6, A2.7, A2.8, A2.9, A2.11, A2.12 dan A2.13. keberhasilan ini didukung dengan adanya pita tunggal DNA dengan ukuran 550bp. Sedangkan yang positif mengandung gen *hptII* adalah pada event A2.1, A2.3,

A2.4, A2.5, A2.6, A2.7, A2.8, A2.10, dan A2.11 (Gambar 7).

Data dari kedua uji PCR tersebut dapat diketahui bahwa tebu PRG event 2 yang positif terinsersi gen SoSUT1 dan SoSPS1 terdapat pada 7 tanaman yaitu A2.1, A2.5, A2.6, A2.7, A2.8, A2.11, dan A2.12.



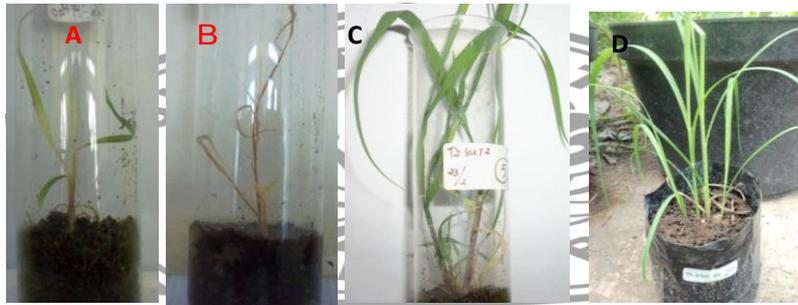
Gambar 7. Pita DNA hasil PCR dengan pasangan primer *npt-F/R* dan *hpt-F/R* pada sampel tebu transgenik dari tebu PRG event 2.

Aklimatisasi Tebu Transforman

Hasil pengamatan, aklimatisasi tahap I pada event 20 dari 9 tanaman

yang dapat beradaptasi pada lingkungan hanya 3 tanaman yaitu A20.1, A20.5 dan A20.9, sedangkan pada aklimatisasi tahap II, dari ke 3 tanaman tersebut dapat tumbuh dengan baik. Pada event

2 dari 7 tanaman semuanya dapat beradaptasi dengan baik, kondisi tanaman secara umum dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Kondisi planlet pada saat aklimatisasi. A dan B Planlet yang tidak mampu beradaptasi pada 7 dan 14 hari setelah tanam. C dan D planlet yang mampu beradaptasi dengan lingkungan

Penyebab Kematian tanaman pada saat aklimatisasi disebabkan oleh infeksi jamur. Zulkarnain (2011) mengatakan bahwa, Lingkungan *in vitro* dicirikan dengan kelembapan yang tinggi, bebas dari patogen, suplai hara yang optimal, intensitas cahaya yang rendah dan suplai hara yang cukup pada

media. Sedangkan pada kondisi *in-vivo* memiliki kondisi sangat berbeda, sehingga tanaman mudah mengalami stres dan terinfeksi oleh mikro organisme yang berakibat pada kematian. Hal ini yang diduga sebagai penyebab kematian pada sebagian besar planlet yang berasal dari event 20.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Berdasarkan hasil Inseri telah didapatkan tanaman tebu PRG SoSPS1 pada tebu event 2 sebanyak 7 tanaman yaitu event A2.1, A2.4, A2.5, A2.6, A2.7, A2.10, dan A2.11, sedangkan pada event 20 mendapatkan 3 tanaman

yaitu pada event A20.1, A20.5 dan A20.9.

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 transforman.

Daftar Pustaka

Arago, F. and Brasileo, C. 2002. Positive, Negative and Marker-free Strategies for Transgenic Plant

- Selection. *Braz. J. Plant Physiol.* Vol. 14 (1): 1-10.
- 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.* Vol.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.* Vol.100: 1230-1237.
- Hazmi, M. 2009. Pengembangan metode Inseri melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada eksplan pangkal tunas tebu *in vitro*. *Disertasi* (tidak dipublikasikan). Universitas Brawijaya. Malang.
- Huber, S.C. and J.L Huber. 1996. Role of sucrose phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiol.* Vol.89:518-524.
- Kuhn, C. and Christopher. 2010. Sucrose transporters of higher plants. *Current Opinion in Plant Biology.* Vol.13 :1-11.
- Mannan,A.,T. Noor Syed.,and B. Mieza.2009. Factor affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated Transformation of *Artemisia absinthium* L. *Pakistan Journal Bot.* Vol.41 (6):3239-3246
- Manickavasagam, M., A. Ganapathi, V. R. Anbazhagan, B. Sudhakar, N. Selvaraj, A. Vasudevan, dan S. Kasthuriengan. 2004. *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation and Development of Herbicide-Resistant Sugarcane (Saccharum species hybrids) Using Axillary Buds. *Plant Cell Rep.* Vol. 23: 134 - 143.
- Mathias, R.J. and L.A. Boyd, 1986. Cefotaxime Stimulates Callus Growth, Embryogenesis and Regeneration in Hexaploid Bread Wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell). *Plant Sci.* Vol. 46:217-223.
- Matthews, B. F., J.A. Saunders, J.S. Gebhardt, J. J. Lin dan S.M. Koehler. 1995. Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols: Reporter Genes and Transient Assays for Plants. *Plant Sciences.* Vol. 55: 147 - 162.
- Miswar. 2007. Peningkatan biosintesis sukrosa tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) melalui overekspresi gen *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS). *Disertasi* (tidak dipublikasikan). Universitas Jember. Jember.
- Setyati, S., P. Oktaviandari, M. Hazmi dan B. Sugiharto. 2007. Studi perbandingan metode Inseri dna menggunakan vector *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman tebu (*Saccharum hybrid*). *Berk. Penel. Hayati.* Vol.13: 39 - 44.
- Zulkarnain,H. 2011. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta:PT Bumi Aksara
- Sugiharto, B., H. Sakakibara., Sumadi., T. Sugiyama. 1997. Differential expression of two genes for sucrose phosphate synthase in sugarcane: molecular cloning of two cDNAs and comparative analysis of gene expression. *Plant Cell Physiol.* Vol.38 : 961-965.
- Zulkarnain, H. 2011. *Kultur Jaringan Tanaman*. Jakarta:PT Bumi Aksara