

# KONSTRUKSI TEBU (*Saccharum officinarum* L.) RENDEMEN TINGGI MELALUI PEMBUNGKAMAN GEN *CELL WALL INVERTASE (cwinv9)*

**WILHELMUS TERANG ARGASANJAYA**



**PROGRAM STUDI ILMU TANAH  
FAKULTAS PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2023**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



### *@Hak cipta milik IPB University*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi dengan judul “Konstruksi Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Rendemen Tinggi Melalui Pembungkaman Gen *Cell Wall Invertase (cwinv9)*” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Maret 2023

Wilhelmus Terang Arga Sanjaya  
A161180048

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## RINGKASAN

WILHELMUS TERANG ARGA SANJAYA. “Konstruksi Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Rendemen Tinggi Melalui Pembungkaman Gen *Cell Wall Invertase* (*cwinv9*)”. Dibimbing oleh DWI ANDREAS SANTOSA, DIDY SOPANDIE, GIYANTO.

Indonesia merupakan negara importir gula terbesar di dunia dalam 5 tahun terakhir. Tuntutan pemenuhan kebutuhan gula nasional semakin meningkat seiring dengan pertumbuhan penduduk dan pertumbuhan ekonomi nasional. Meskipun upaya peningkatan produksi gula nasional telah dilakukan melalui program ekstensifikasi lahan tebu dan revitalisasi pabrik gula, kurangnya ketersediaan bibit tebu unggul masih menjadi kendala yang perlu diatasi. Pengembangan bibit unggul melalui program pemuliaan tanaman telah dilakukan, namun belum cukup memenuhi kebutuhan bibit tebu unggul rendemen tinggi yang sesuai dengan berbagai kondisi lahan di Indonesia. Upaya pengembangan varietas tebu unggul melalui pendekatan modifikasi gen dapat menjadi alternatif untuk mempercepat pengembangan berbagai varietas unggul baru di Indonesia. Gen *cwinv9* merupakan gen penyandi protein *cell wall invertase* yang berperan dalam hidrolisis sukrosa menjadi heksosa, serta salah satu gen *invertase gene family* yang meregulasi akumulasi sukrosa pada batang tebu. Pemecahan sukrosa menjadi heksosa akan menghambat laju akumulasi sukrosa pada batang tebu sehingga menurunkan produktivitas tebu. Upaya pengendalian reaksi hidrolisis sukrosa melalui penghambatan gen *cwinv9* dilakukan dengan asumsi penurunan laju hidrolisis sukrosa pada batang. Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan bibit klonal tanaman tebu yang memiliki peningkatan akumulasi sukrosa pada batang, mendapatkan metode perakitannya dengan teknologi hpRNAi, dan mendapatkan metode optimum regenerasinya. Adapun tujuan khusus yang ingin dicapai dan dianggap penting dalam penelitian ini antara lain: untuk mendapatkan formulasi media optimum untuk tahap induksi embriogenesis somatik untuk metode perbiakan bibit klonal tebu, untuk mengkonstruksi vektor RNAi untuk penghambatan gen *cwinv9* dan melakukan transformasinya ke dalam tebu, untuk mempelajari pengaruh penghambatan (*knockdown*) dari ekspresi gen *cwinv9* pada tebu secara *in vitro* pada berbagai kondisi lingkungan, untuk mempelajari pengaruh penghambatan produksi *cell wall invertase* (CWINV9) terhadap performa pertumbuhan tanaman tebu dalam kondisi cekaman kekeringan, dan untuk mempelajari pengaruh penghambatan produksi enzim *cell wall invertase* (CWINV9) tanaman tebu terhadap kondisi lingkungan perakaran (*rhizosfer*).

Penghambatan gen *cwinv9* dilakukan dengan teknologi *hpRNAi* yang didesain berbasis informasi gen *cwinv9* dari tebu PSJT941 dan PS881, dan disisipkan ke dalam kedua varietas tersebut sehingga menghasilkan tebu cisgenik. Adapun tahapan yang dilaksanakan pada penelitian ini meliputi: 1) embriogenesis somatik tanaman tebu (*S. officinarum* L.) menggunakan kombinasi perlakuan hormon 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) dan kinetin untuk tujuh varietas tebu meliputi PSJT941, PSJT9460, PS881, PS882, PS864, Kidang Kencana (KK), dan Bululawang (BL), 2) pendewasaan embrio somatik tanaman tebu (*S. officinarum* L.) dengan kombinasi hormon kinetin dan 1-Naphtalenaacetic acid (NAA), 3) konstruksi vektor RNAi untuk penghambatan ekspresi gen *cwinv9* dan

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

transformasinya pada tanaman tebu, 4) uji efisiensi RNAi dalam penghambatan ekspresi gen *cwinv9* pada klon tebu secara *in vitro* dalam berbagai kondisi lingkungan, 5) uji pengaruh penghambatan produksi enzim *cell wall invertase* (CWINV9) terhadap performa pertumbuhan dan akumulasi sukrosa, dan 6) pengaruh penghambatan produksi enzim *cell wall invertase* (CWINV9) terhadap kondisi lingkungan dan komunitas bakteri pada daerah perakaran.

Pengembangan metode regenerasi PS881, BL, KK, PS882, PSJT941, PSJT9640 dan PS 864 menunjukkan adanya 3 klusterisasi medium optimum pada tahap induksi kalus embriogenik, dimana PSJT941 dan PS881 memiliki media optimum induksi kalus embriogenik medium MS ditambah 1 mg/L 2,4 D, 3 mg/l kinetin, 100 mg/L glutamin, dan 500 mg/L kasein hidrolisat; varietas Bululawang (BL), Kidang Kencana (KK), dan PS862 memiliki media optimum induksi kalus embriogenik medium MS ditambah 3 mg/L 2,4 D, 3 mg/l kinetin, 100 mg/L glutamin, dan 500 mg/L kasein hidrolisat; varietas PSJT9460 memiliki media optimum induksi kalus embriogenik medium MS ditambah 3 mg/L 2,4 D, 3 mg/L kinetin; dan varietas PS 882 memiliki media optimum induksi kalus embriogenik medium MS ditambah 3 mg/L 2,4 D, 1 mg/L kinetin. Sementara medium optimum tahap pendewasaan embrio somatik dapat diklusterisasi menjadi 2 dosis meliputi media MS ditambahkan 1 mg/L NAA dan 0.1 mg/L kinetin untuk varietas PS862, PSJT941, PS881, PS882, dan BL; dan media MS ditambahkan 1 mg/L NAA dan 1 mg/L kinetin untuk varietas KK, PSJT9460, PS881, PS882, dan BL. Tahap perkecambahan dari ketujuh varietas tebu dapat menggunakan medium optimum dengan komposisi medium MS ditambah 0.1 mg/L NAA, 1 mg/L IBA, dan 100 mg/L kasein. Kontruk *hpRNAi-cwinv9-PS881* dan *hpRNAi-cwinv9-PSJT941* berhasil dikonstruksi melalui mekanisme *gateway cloning* dan menghasilkan klon tebu cisgenik PSJT941 dan PS881. Karakter planlet tebu cisgenik menunjukkan memiliki perbedaan karakter dengan tebu isogeniknya dengan penurunan tingkat ketahanan planlet tebu cisgenik pada kondisi cekaman kekeringan, suhu rendah, dan kondisi masam. Planlet tebu cisgenik memiliki efisiensi penggunaan glukosa secara lebih baik dibandingkan isogeniknya secara *in vitro*. Selain itu, planlet tebu cisgenik memiliki efisiensi penggunaan sukrosa secara lebih rendah dibandingkan isogeniknya. Berdasarkan pengujian tebu cisgenik di rumah kaca, *cell wall invertase* terkonfirmasi memiliki peran penting dalam regulasi akumulasi sukrosa dan respon fisiologis tebu dalam menghadapi cekaman kekeringan. Klon tebu cisgenik memiliki potensi peningkatan efisiensi akumulasi sukrosa hingga 30% pada kondisi lingkungan optimum. Akan tetapi klon tebu cisgenik mengalami penurunan ketahanan terhadap cekaman kekeringan dibandingkan dengan isogeniknya. Berdasarkan data metagenom, *cell wall invertase* memiliki peran dalam mekanisme interaksi tebu dengan komunitas bakteri pada sekitar perakaran sebagai *holobiont*-nya. Penurunan aktivitas invertase pada jaringan akar tebu berpengaruh terhadap kenaikan aktivitas invertase pada tanah sekitar perakaran tebu yang dihasilkan oleh bakteri tanah. Perubahan komunitas bakteri pada area perakaran tebu cisgenik dengan adanya kenaikan proporsi proteobacteria dan penurunan terrabacteria group mengkonfirmasi perubahan tersebut berhubungan dengan perubahan komunitas bakteri, serta interaksi bakteri dengan akar yang berjalan melalui berbagai reaksi biokimia.

Kata kunci: akumulasi sukrosa, embriogenesis somatik, metagenomik, pembungkaman gen, rhizosfer.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## SUMMARY

WILHELMUS TERANG ARGA SANJAYA. *Construction of High Yield Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Through Cell Wall Invertase Gene Silencing (*cwinv9*)*. Supervised by DWI ANDREAS SANTOSA, DIDY SOPANDIE, and GIYANTO.

Indonesia has been the largest sugar-importing country in the world in the last 5 years. Demands for meeting national sugar needs are increasing along with population and national economic growth. Although efforts to increase national sugar production have been made through a sugarcane field extensification program and revitalization of sugar factories, the lack of availability of superior sugar cane seeds is still an obstacle that needs to be overcome. The development of superior seeds through a plant breeding program has been carried out. Still, more is needed to meet the demand for high-yield superior sugarcane seeds suitable for various land conditions in Indonesia. Efforts to develop superior sugarcane varieties through a gene modification approach can be an alternative to accelerating the development of various new superior varieties in Indonesia. The *cwinv9* gene encodes the cell wall invertase protein that plays a role in the hydrolysis of sucrose to hexose, as well as one of the invertase gene families that regulates the accumulation of sucrose in sugarcane stalks. The breakdown of sucrose into hexoses will inhibit the rate of accumulation of sucrose in sugarcane stems, thereby reducing sugarcane productivity. Efforts to control the hydrolysis of sucrose by inhibiting the *cwinv9* gene were carried out with the assumption that the rate of sucrose hydrolysis in stems would decrease.

This research aimed to obtain clonal seeds of sugarcane which have increased accumulation of sucrose in the stems, obtain the assembly method using *hpRNAi* technology, and obtain the optimum regeneration method. The specific objectives to be achieved and considered necessary in this study include: getting the optimum media formulation for the stages of embryogenic callus induction, nodular callus induction, and the formation of coleoptilar somatic embryos for isogenic and cisgenic sugarcane clonal seedling cultivation methods, constructing *RNAi* vectors for inhibition of the cell wall invertase (*cwinv9*) gene in sugarcane and transforming it into sugarcane, studying the knockdown effect of *cwinv9* gene expression in sugarcane *in vitro* under various environmental conditions, investigating the impact of inhibition of cell wall invertase enzyme production (*CWINV9*) on the growth performance of sugarcane under drought stress conditions, and inspecting the impact of inhibition of cell wall invertase enzyme (*CWINV9*) production of sugarcane on the root environment (rhizosphere) under drought stress conditions.

Inhibition of the *cwinv9* gene was carried out using *hpRNAi* technology, which was designed based on information on the *cwinv9* gene from PSJT941 and PS881 sugarcane and was inserted into both varieties to produce cisgenic sugarcane. The stages carried out in this study included: 1) somatic embryogenesis of sugarcane (*S. officinarum* L.) using a combination of 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) and kinetin hormone treatment for seven varieties of sugarcane including PSJT941, PSJT9460, PS881, PS882, PS864, Kidang Kencana (KK), dan Bululawang (BL), 2) embryo maturation somatic sugarcane (*S. officinarum* L.) with a combination of the hormones kinetin and *1-Naphthaleneacetic acid* (NAA), 3)

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

construction of an RNAi vector to inhibit *cwinv9* gene expression and its transformation in sugarcane, 4) Test the efficiency of RNAi in inhibiting *cwinv9* gene expression in sugarcane clones in vitro under various environmental conditions, 5) Test the effect of inhibition of cell wall invertase (CWINV9) enzyme production on growth performance and accumulation of sucrose, and 6) Effect of inhibition of cell wall invertase (CWINV9) enzyme production on environmental conditions and bacterial communities in the root area.

The development of the PS881, BL, KK, PS882, PSJT941, PSJT9640, and PS 864 regeneration methods showed that there were 3 optimum medium clustering at the embryogenic callus induction stage, where PSJT941 and PS881 had the optimum medium MS medium embryogenic callus induction plus 1 mg/L 2.4 D, 3 mg/l kinetin, 100 mg/l glutamine, and 500 mg/l casein hydrolyzate; Bululawang (BL), Kidang Kencana (KK), and PS862 varieties had the optimum embryogenic callus induction medium MS medium plus 3 mg/L 2.4 D, 3 mg/l kinetin, 100 mg/L glutamine, and 500 mg/L casein hydrolyzate; variety PSJT9460 had the optimum medium for induction of embryogenic callus medium MS plus 3 mg/L 2.4 D, 3 mg/l kinetin; and variety PS 882 had the optimum embryogenic callus induction medium MS medium plus 3 mg/L 2.4 D, 1 mg/l kinetin. While the optimum medium for somatic embryo maturation stages can be clustered into 2 doses, including MS medium added 1 mg/L NAA and 0.1 mg/L kinetin for varieties PS862, PSJT941, PS881, PS882, and BL; and MS medium added 1 mg/L NAA and 1 mg/L kinetin for KK, PSJT9460, PS881, PS882, and BL varieties. The germination stage of the seven sugarcane varieties can use the optimum medium with the composition of MS medium plus 0.1 mg/L NAA, 1 mg/L IBA, and 100 mg/L casein. The hpRNAi-*cwinv9*-PS881 and hpRNAi-*cwinv9*-PSJT941 constructs were successfully constructed via a gateway cloning mechanism and produced PSJT941 and PS881 cisgenic sugarcane clones. The character of cisgenic sugarcane plantlets showed that they had different characteristics from isogenic sugarcane, with a decrease in the level of resistance of cisgenic sugarcane plantlets under drought stress, low temperature, and acid conditions. Cisgenic sugarcane plantlets have better glucose utilization efficiency than their isogenic ones in vitro. In addition, cisgenic sugarcane plantlets have a lower efficiency in using sucrose than isogenic ones. Based on testing of cisgenic sugarcane in the greenhouse confirmed that cell wall invertase has an important role in regulating sucrose accumulation and sugarcane's physiological response in drought stress. Cisgenic sugarcane clones can increase the efficiency of accumulating sucrose by up to 30% under optimum environmental conditions. However, the cisgenic sugarcane clones experienced less resistance to drought stress compared to the isogenic ones. Based on metagenome data, cell wall invertase has a role in the interaction mechanism of sugarcane with the bacterial community around the roots as its holobiont. The decrease in invertase activity in the sugarcane root tissue affected the increase in invertase activity in the soil around the sugarcane roots produced by soil bacteria. Changes in the bacterial community in the root area of cisgenic sugarcane with an increase in the proportion of proteobacteria and a decrease in the terrabacteria group confirm that these changes are related to changes in the bacterial community, as well as the interaction of bacteria with roots that goes through various biochemical reactions.

**Keywords:** gene silencing, metagenomics, sucrose accumulation, somatic embryogenesis, rhizosphere.

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



### *@Hak cipta milik IPB University*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.





- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2023  
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

*Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.*

*Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.*



### *@Hak cipta milik IPB University*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



**KONSTRUKSI TEBU (*Saccharum officinarum* L.) RENDEMEN  
TINGGI MELALUI PEMBUNGKAMAN GEN *Cell Wall  
Invertase (cwinv9)***

**WILHELMUS TERANG ARGASANJAYA**

Disertasi  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Doktor pada  
Program Studi Ilmu Tanah

**PROGRAM STUDI ILMU TANAH  
FAKULTAS PERTANIAN  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2023**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
    - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
    - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
  2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

IPB University



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Penguji Luar Komisi Pembimbing pada Ujian Tertutup Disertasi:

- 1 Prof. Dr. Ir. Agus Purwito, MSc. Agr.
- 2 Dr. Ir. Heru Bagus Pulunggono, M. Agr.

Promotor Luar Komisi Pembimbing pada Sidang Promosi Terbuka Disertasi:

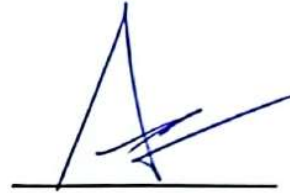
- 1 Prof. Dr. Ir. Dedi Nursyamsi, M. Agr.
- 2 Prof. Dr. Ir. Agus Purwito, MSc. Agr.

Judul Disertasi: **Konstruksi Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Rendemen Tinggi Melalui Pembungkaman Gen *Cell Wall Invertase (cwimv9)***

Nama : **Wilhelmus Terang Arga Sanjaya**  
NIM : **A161180048**

Disetujui oleh

Pembimbing 1:  
Prof. Dr. Ir. Dwi Andreas Santosa, MS



Pembimbing 2:  
Prof. Dr. Ir. Didy Sopandie, M. Agr.



Pembimbing 3:  
Dr. Ir. Giyanto, M. Si.

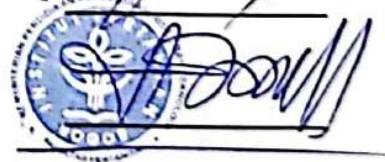


Diketahui oleh

Ketua Program Studi :  
Dr. Ir. Syaiful Anwar, MSc.  
NIP 1962113 198703 1003



Dekan Fakultas Pertanian :  
Prof. Dr. Ir. Suryo Wiyono, M.Sc. Agr.  
NIP 19690212 199203 1003



Tanggal Ujian:  
7 Maret 2023

Tanggal Lulus:

11 MAY 2023

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah yang Maha Esa atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan September 2020 sampai bulan Oktober 2023 ini ialah disertasi, dengan judul “Konstruksi Tebu (*Saccharum Officinarum L.*) Rendemen Tinggi Melalui Pembungkaman Gen *Cell Wall Invertase (cwinv9)*”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Ir. Dwi Andreas Santosa, MS; Prof. Dr. Ir. Didy Sopandie, M. Agr.; dan Dr. Ir. Giyanto M. Si. yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada moderator seminar, dan penguji luar komisi pembimbing. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada segenap karyawan dan laboran di *Indonesian Center for Biotechnology and Biodiversity*, segenap laboran Laboratorium Biologi Tanah IPB, dan PT PG Rajawali II yang telah membantu dan mendukung pelaksanaan penelitian ini sehingga dapat berjalan dengan baik. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada ayah, ibu, serta seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan, doa, kasih sayangnya dan dukungannya dalam penyelesaian penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada segenap teman-teman mahasiswa Program Studi Bioteknologi Tanah dan Lingkungan, dan Program Studi Ilmu Tanah atas dukungan dan bantuan dalam pelaksanaan penelitian ini, serta telah memberikan lingkungan pembelajaran yang produktif dan konstruktif sehingga mendukung penulis dalam melaksanakan penelitian ini.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Maret 2023

*Wilhelmus Terang Arga Sanjaya*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

## DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	ii
DAFTAR GAMBAR	iii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah Penelitian	2
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Strategi Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
1.6 Kebaruan Penelitian ( <i>novelty</i> )	6
1.7 Ruang Lingkup Penelitian	7
II TINJAUAN PUSTAKA	10
2.1 Karakter Morfologi dan Fisiologi Tanaman Tebu	10
2.2 Karakter Genomik Tanaman Tebu	12
2.3 Tata Kelola Pengembangan Industri Gula Indonesia	14
2.4 Toleransi Tebu Terhadap Cekaman Kekeringan	16
2.5 Perkembangan Pemuliaan Tanaman Tebu dan Urgensi Pendekatan Bioteknologi Molekuler	18
2.6 Metabolisme Sukrosa	20
2.7 Perkembangan Penelitian <i>Invertase Gene Family</i>	22
2.8 Konsep Dasar dan Aplikasi RNAi <i>gene silencing</i> pada Tebu	29
2.9 Regenerasi Tanaman Tebu Melalui Mikropropagasi	33
III METODE PENELITIAN	36
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	36
3.2 Bahan Penelitian	36
3.3 Tahapan Penelitian	37
3.4 Tahap 1: Embriogenesis Somatik Berbagai Varietas Tebu ( <i>Saccharum officinarum</i> L.) Menggunakan 2,4-D Dan Kinetin	37
3.5 Tahap 2: Pendewasaan Embrio Somatik Berbagai Varietas Tebu ( <i>Saccharum officinarum</i> L.) dengan Kinetin dan NAA	38
3.6 Tahap 3: Konstruksi Vektor RNAi Untuk Inaktivasi Gen <i>cwinv9</i> Pada Tanaman Tebu	39
3.7 Tahap 4: Efisiensi RNAi Dalam Menghambat Ekspresi Gen Invertase pada Tanaman Tebu	45
3.8 Tahap 5: Pengaruh penghambatan produksi enzim <i>cell wall invertase</i> (CWINV9) terhadap pertumbuhan tanaman dan efisiensi akumulasi sukrosa pada kondisi cekaman kekeringan	46

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

3.9	Tahap 6: Pengaruh penghambatan produksi enzim <i>cell wall invertase</i> (CWINV9) terhadap kondisi lingkungan dan komunitas bakteri pada daerah perakaran	50
IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	53
4.1	Embriogenesis Somatik Tanaman Tebu ( <i>Saccharum officinarum</i> L.) Menggunakan Kombinasi Perlakuan Hormon 2,4-D dan Kinetin	53
4.2	Pendewasaan Embrio Somatik Tanaman Tebu ( <i>Saccharum officinarum</i> L.) dengan Kombinasi Hormon Kinetin dan NAA	65
4.3	Konstruksi Vektor RNAi untuk Penghambatan Ekspresi Gen <i>cwinv9</i> dan Transformasinya pada Klon Tebu	73
4.4	Efisiensi <i>hpRNAi</i> dalam Penghambatan Ekspresi Gen <i>cwinv9</i> pada Klon Tebu Secara <i>In Vitro</i> dalam Berbagai Kondisi Lingkungan	78
4.5	Pengaruh Penghambatan Produksi <i>Cell Wall Invertase</i> (CWINV9) Terhadap Performa Pertumbuhan dan Akumulasi Sukrosa	82
4.6	Pengaruh Penghambatan Produksi <i>Cell Wall Invertase</i> (CWINV9) Terhadap Kondisi Lingkungan dan Komunitas Bakteri pada Daerah Perakaran	101
V	PEMBAHASAN UMUM	116
VI	SIMPULAN DAN SARAN	121
5.1	Simpulan	121
5.2	Saran	121
	DAFTAR PUSTAKA	123
	RIWAYAT HIDUP	141

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## DAFTAR TABEL

1	Varietas unggul tebu yang paling banyak ditanam di Indonesia	20
2	Primer dan penggunaannya	36
3	Kombinasi primer yang digunakan untuk melihat susunan orientasi gen target pada vektor <i>pANIC8A-hpRNAi-cwinvc9</i>	42
4	Pengaruh komposisi media perkecambahan terhadap persentase perkecambahan embrio pada berbagai varietas (5 MST)	71
5	Data hasil transformasi PSJT941 dan PS881	77
6	Analisis sifat kimia tanah pada berbagai perlakuan kadar air	112
7	Hasil interpretasi variabel	113

## DAFTAR GAMBAR

1	Skema lingkup penelitian	8
2	Diagram alur penelitian	9
3	Jalur C4 pada tanaman tebu	10
4	Bentuk morfologi tanaman tebu	11
5	Sejarah evolusi rumput dan tebu	13
6	Kerangka upaya peningkatan produksi gula di Indonesia	15
7	Jalur sintesis sukrosa tanaman tebu	21
8	Mekanisme transport sukrosa	22
9	Siklus sukrosa, heksosa dan akumulasi sukrosa	22
10	Hubungan filogenetik antara sekuens enzim invertase	25
11	Hubungan filogenetik gen <i>cell wall invertase (cwinv9)</i> dari delapan tanaman	27
12	Gen invertase	28
13	Mekanisme antisense	30
14	Diagram skematis dari berbagai jenis konstruksi pembungkaman	31
15	Peta vektor plasmid <i>pENTR<sup>TM</sup>/D-TOPO®</i>	40
16	Vektor <i>pANIC8B</i> digunakan untuk konstruksi RNAi berukuran 19,1 kb	41
17	Penampilan kalus dari eksplan tebu berbagai berbagai varietas pada medium optimum	54
18	Persentase pembentukan kalus embriogenik dari eksplan tebu pada perlakuan 2,4-D dan kinetin umur 12 MST	56
19	Bobot kalus embriogenik dari eksplan tebu pada perlakuan 2,4-D dan kinetin umur 12 MST	57
20	Persentase pembentukan kalus pada media optimum	58
21	Tipe kalus berbagai varietas tebu yang terbentuk pada media optimum	59
22	Penampakan morfologi kalus (A-G), histologis kalus tebu preparat basah (A1-G1) dan preparat awetan (A2,3-G2,3).	61
23	Analisis RT-PCR ( <i>Reverse Transcriptase PCR</i> ) untuk gen-gen yang berperan dalam pembentukan kalus	62
24	Eksresi gen-gen embriogenesis somatik sel kalus embriogenik tebu pada umur 4 MST untuk 7 varietas tebu Indonesia.	63

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
 a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
 b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

25	Persentase hidup kalus nodular pada media pendewasaan embrio somatik umur 4 MST	68
26	Tahap pendewasaan, perkecambahan embrio, dan pendewasaan planlet	69
27	Jumlah embrio globular, skutelar, dan koleoptilar yang terbentuk dari kalus nodular pada media pendewasaan embrio somatik optimal untuk setiap varietas.	70
28	Pengaruh komposisi media terhadap tinggi planlet dan panjang akar tebu umur 8 MST.	72
29	Fragmen hpRNAi-cwinv9 yang diamplifikasi dari pTA2CWINV9 dengan menggunakan primer <i>hpRNAi-cwinv9-F</i> dan <i>hpRNAi-cwinv9-R</i>	73
30	Hasil PCR menggunakan <i>pANIC8B-hpRNAicwinv9-PSJT941</i> dan <i>pANIC8B-hpRNAicwinv9-PS881</i> sebagai cetakan dengan primer pasangan <i>ZmUbi-F</i> dan <i>Gus-R</i> serta <i>Gus_F</i> dan <i>Nost-R</i> .	74
31	Hasil PCR terhadap koloni <i>A. tumefaciens</i> terintroduksi pANIC8B-hpRNAicwinv9	75
32	Hasil PCR menggunakan cDNA dari tebu cisgenik (cis)	76
33	Seleksi tebu cisgenik dan analisis ekspresi gen	80
34	Karakter planlet cisgenik PSJT941 dan PS881 secara <i>in vitro</i> (A), dan rataan tinggi planlet cisgenik dan isogenik pada berbagai kondisi media (B)	81
35	Pola ekspresi tebu cisgenik (Cis) dan isogenik (Iso) gen <i>cwinv9</i> ( <i>cell wall invertase</i> ), <i>ninv7</i> ( <i>neutral invertase</i> ), dan <i>invh2</i> ( <i>invertase inhibitor</i> ) pada berbagai kondisi kadar air	82
36	Penampakan daun, batang dan akar tebu cisgenik dan isogenik	85
37	Penampakan tanaman tebu cisgenik (Cis) dan isogenik (Iso) pada berbagai perlakuan kadar air	88
38	Perbandingan sifat agronomi tebu cisgenik (Cis-PSJT941 dan Cis-PS881) dan tebu isogenik (PSJT941 dan PS881)	89
39	Laju fotosintesis tebu cisgenik (Cis) dan isogenik (Iso) pada tanah dengan variasi kadar air	90
40	Kandungan pigmen daun tebu cisgenik (Cis) dan isogenik (Iso) varietas PSJT941 (kiri) dan PS881 (kanan)	91
41	Aktivitas enzim invertase pada tiga organ tebu: a) daun (2 & 24 MST), b) batang (24 MST), dan c) akar (24 MST)	93
42	Kandungan prolin tebu cisgenik dan isogenik pada umur 7 & 120 HSP	95
43	Kandungan (a) aktivitas enzim katalase (CAT) dan (b) tingkat peroksidasi lipid daun (MDA) tebu cisgenik (Cis) dan isogenik (Iso)	96
44	Pengaruh kadar air terhadap konsentrasi gula terlarut pada tebu cisgenik (Cis) dan isogenik (Iso)	98
45	Pengaruh kadar air terhadap konsentrasi sukrosa, fruktosa, dan glukosa pada tebu cisgenik (Cis) dan isogenik (Iso). a) konsentrasi gula daun, b) konsentrasi gula batang tebu	100
46	Metagenom bakteri dari area perakaran rhizofe tebu cisgenik (a), dan tebu isogenik (b) yang ditampilkan menggunakan krona berbasis data <i>16s rRNA targeted metagenomic analysis</i>	102
47	Diagram <i>sankey</i> dari taksa paling melimpah yang terdeteksi oleh metagenomik DNA pada area perakaran tebu cisgenik (a), dan isogenik (b).	105

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.

2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

48	Keberadaan populasi bakteri tertinggi pada komunitas area perakaran tebu cisgenik (Cis) dan isogenik (Iso) (a), dan diagram <i>venn</i> dari komunitas bakteri pada area perakaran cisgenik dan isogenik (b)	106
49	Aktivitas enzim tanah pada daerah perakaran tebu cisgenik (Cis) dan isogenik (Iso). a) invertase, b) urease, c) selulase, d) xilanase, e) beta-glukoidase	109
50	Analisis PCA menggunakan matriks korelasi (PC1 vs PC2) kimia tanah dan aktivitas enzim tanah (a) koordinat <i>biplot</i> dengan pengelompokan varietas, dan (b) koordinat <i>biplot</i> dengan pengelompokan klon dari area perakaran tebu	114
51	Desain penelitian berbasis piramida pembuktian, kelemahan, proyeksi riset lanjutan dan peluang riset kedepan	120

@Hak cipta milik IPB University

IPB University

