

ANALISIS MOLEKULER GEN Cry1Ab/Ac PADA TEBU (*Saccharum officinarum*) TRANSGENIK TAHAN HAMA PENGGEREK BATANG

DEA ARMITA



**BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**

- 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 TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Analisis Molekuler Gen Cry1Ab/Ac pada Tebu (*Saccharum officinarum*) Transgenik Tahan Hama Penggerek Batang” 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 tesis ini.

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

Bogor, Mei 2024

Dea Armita
P0501201003



RINGKASAN

DEA ARMITA. Analisis Molekuler Gen Cry1Ab/Ac pada Tebu (*Saccharum officinarum*) Transgenik Tahan Hama Penggerek Batang. Dibimbing oleh ANJA MERYANDINI dan SRI KOERNIATI.

Tebu nasional memiliki produktivitas sebesar 5512 kg/ha yang tergolong rendah jika dibandingkan dengan produktivitas tebu di Thailand yang telah mencapai 7610 kg/ha pada tahun 2017. Salah satu penyebab produktivitas gula nasional yang rendah adalah serangan hama dan penyakit. Hama penggerek merupakan hama utama yang menyerang tebu dan menyebabkan kerugian secara ekonomi. Salah satu jenis hama penggerek pada tebu adalah penggerek batang (*Chilo sacchariphagus*). Pengembangan sifat tahan hama yang dinilai efektif dan ekonomis adalah dengan menginsersikan gen Bt yang bersifat racun terhadap beberapa ordo invertebrata pada tahap larva. Penggunaan gen Cry1Ab pada tebu dilakukan di tahun 1997 untuk membentuk tebu transgenik yang tahan terhadap hama penggerek tetapi ekspresi yang dihasilkan sangatlah rendah. Penelitian selanjutnya dengan gen Cry1Ac yang dimodifikasi pada tebu transgenik menunjukkan nilai ketahanan yang cukup tinggi, yaitu sebanyak 62% tanaman transgenik yang tahan terhadap hama setelah dilakukan uji lapang. Penggunaan gen fusi Cry1Ab/Ac telah dilakukan sebelumnya pada padi, buncis, dan tanaman rami untuk mengatasi serangan hama penggerek.

Tebu transgenik melalui tahap awal ekstraksi DNA untuk konfirmasi gen Cry1Ab/Ac. Ekstraksi DNA dilakukan sesuai dengan metode CTAB yang dimodifikasi. Gen Cry1Ab/Ac pada tebu transgenik dikonfirmasi dengan menggunakan metode PCR untuk uji secara kualitatif dan metode spektrofotometri dengan nanodrop untuk uji secara kuantitatif. Setelah dikonfirmasi, tebu transgenik juga melalui tahap ekstraksi RNA untuk menghitung nilai ekspresi gen Cry1Ab/Ac. RNA yang telah didapatkan kemudian digunakan untuk mensintesis cDNA dengan kit iScript. DNA komplemen atau cDNA kemudian digunakan sebagai sampel dalam metode RT-PCR dengan menggunakan primer GAPDH dan Cry1Ab/Ac untuk mendapatkan nilai ekspresi dalam satuan Cq (*quantification cycle*). Nilai Cq yang telah diperoleh kemudian dihitung dengan menggunakan perhitungan sesuai dengan metode Livak untuk mendapatkan nilai ekspresi dalam satuan *normalized expression*. Nilai ekspresi tebu transgenik kemudian dibandingkan hubungannya dengan persentase tingkat serangan hama penggerek batang pada tebu transgenik dan kontrol nontransgenik.

Gen Cry1Ab/Ac telah berhasil terkonfirmasi pada seluruh sampel ditunjukkan dengan hasil positif pada elektroforegram hasil analisis PCR dengan perbandingan plasmid pC5300 sebagai kontrol positif dan tanaman nontransgenik sebagai kontrol negatif. Nilai ekspresi gen Cry1Ab/Ac dengan RT-PCR memiliki nilai yang bervariasi. Perbandingan nilai ekspresi gen Cry1Ab/Ac dengan tingkat serangan hama penggerek batang menunjukkan bahwa 212 GV, 335 GV, dan 222 EH tahan sedangkan 311 GV tidak tahan terhadap hama penggerek batang.

Kata kunci: analisis ekspresi, Cry1Ab/Ac, penggerek batang, tebu transgenik



SUMMARY

DEA ARMITA. Molecular Analysis of Cry1Ab/Ac Gene in Transgenic Sugarcane (*Saccharum officinarum*) Resistant to Stem Borer. Supervised by ANJA MERYANDINI and SRI KOERNIATI.

Productivity of national sugarcane is 5512 kg/ha which is relatively low compared to sugarcane productivity in Thailand which reached 7610 kg/ha in 2017. One of the causes of low national sugar productivity is pest and disease attack. Borers are the main pest that attack sugarcane and cause economic losses. One of them is the stem borer (*Chilo sacchariphagus*). The development of pest-resistant traits that are considered effective and economical is by inserting the Bt gene which is toxic to several orders of invertebrates at the larval stage. Cry1Ab gene usage in sugarcane was carried out in 1997 to create transgenic sugarcane that was resistant to borer but the expression result was low. Subsequent research with the modified Cry1Ac gene in transgenic sugar cane showed quite high resistance values, namely 62% of transgenic plants were resistant to pests after field tests. Cry1Ab/Ac fusion gene has been previously carried out in rice, chickpeas and flax plants to overcome borer attacks.

Transgenic sugarcane went through an initial stage of DNA extraction to confirm the Cry1Ab/Ac gene. DNA extraction was carried out according to the modified CTAB method. The Cry1Ab/Ac gene in transgenic sugarcane was confirmed using the PCR method for qualitative testing and the nanodrop method for quantitative testing. Once confirmed, the transgenic sugarcane also goes through an RNA extraction stage to calculate the expression value of the borer resistance gene. The RNA that was obtained was then used to synthesize cDNA with the iScript kit. Complementary DNA or cDNA is then used as a sample in the RT-PCR method using GAPDH and Cry1Ab/Ac primers to obtain expression values in Cq (quantification cycle) units. The Cq value that has been obtained is then calculated using calculations according to the Livak method to obtain the expression value in normalized expression units. The expression values of transgenic sugar cane were then compared in relation to the percentage of stem borer attack levels on transgenic sugar cane and non-transgenic controls.

Successful integration of the Cry1Ab/Ac gene into transgenic sugarcane has been demonstrated in all samples, as evidenced by positive electrophorogram results from PCR analysis using the pC5300 plasmid as a positive reference. By utilizing RT-PCR, the Cry1Ab/Ac gene's expression value varies. When the degree of stem borer attack was compared to the Cry1Ab/Ac gene expression values, it was found that 212 GV, 335 GV, and 222 EH were resistant to the pests, but 311 GV was not.

Keywords: Cry1Ab/Ac, expression analysis, stem borer, transgenic sugarcane



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 2024¹
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.



**ANALISIS MOLEKULER GEN Cry1Ab/Ac PADA TEBU
(*Saccharum officinarum*) TRANSGENIK TAHAN
HAMA PENGGEREK BATANG**

DEA ARMITA

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Bioteknologi

**BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@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.

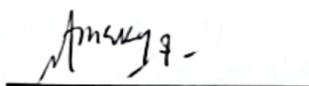
Judul Tesis : Analisis Molekuler Gen Cry1Ab/Ac pada Tebu (*Saccharum officinarum*) Transgenik Tahan Hama Penggerek Batang
Nama : Dea Armita
NIM : P0501201003

@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.

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, M.S



Pembimbing 2:
Dr. Ir. Sri Koerniati, M. Sc



Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si
NIP. 1962041919890310



Dekan Sekolah Pascasarjana:
Prof. Dr. Ir. Dodik Ridho Nurrochmat, M.Sc.F.Trop, IPU
NIP. 197003291996081001




Tanggal Ujian:
30 Mei 2024

Tanggal Lulus:



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanaahu wa ta'ala* atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan November 2022 sampai bulan November 2023 ini ialah Ilmu Tanaman/Tumbuhan, dengan judul “Analisis Molekuler Gen Cry1Ab/Ac pada Tebu (*Saccharum officinarum*) Transgenik Tahan Hama Penggerek Batang”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Dra. Anja Meryandini, M.S dan Dr. Ir. Sri Koerniati, M. Sc yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Dr. Ir. Ulfah Juniarti M. Agr. sebagai moderator seminar dan Dr. Ir. Aris Tjahjoleksono D.E.A sebagai penguji luar komisi pembimbing. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada BB Biogen dan Pusat Genomik Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) yang telah memberikan fasilitas dalam penelitian selama pengumpulan data. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada keluarga, rekan-rekan serta seluruh staf Laboratorium Biomolekuler BB-Biogen dan Laboratorium Genomik BRIN yang telah memberikan dukungan.

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

Bogor, Mei 2024

Dea Armita



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xv
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Tebu Varietas Bululawang	3
2.2 Hama Penggerek Batang	3
2.3 Gen Fusi Cry1Ab/Ac	4
2.2 RT-PCR	6
III METODE	9
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	9
3.2 Alat dan Bahan	9
3.3 Prosedur Kerja	9
3.3.1 Isolasi DNA Tebu	9
3.3.2 Isolasi RNA Tebu	10
3.3.3 Sintesis cDNA	11
3.4 Analisis data	11
3.4.1 <i>Real Time</i> PCR	11
3.4.2 Uji Ketahanan Tebu terhadap Hama Penggerek Batang	12
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	13
4.1 Konfirmasi Gen Cry1Ab/Ac pada Batang Tebu	13
4.2 Preparasi cDNA Tebu untuk RT-PCR	14
4.3 Analisis Ekspresi Gen Cry1Ab/Ac dengan RT-PCR	16
4.4 Tingkat serangan hama penggerek batang	18
V SIMPULAN DAN SARAN	19
5.1 Simpulan	19
5.2 Saran	19
DAFTAR PUSTAKA	21
RIWAYAT HIDUP	25



DAFTAR TABEL

1	Konsentrasi dan kemurnian DNA batang tebu transgenik	13
2	Konsentrasi dan kemurnian RNA batang tebu transgenik	14
3	Konsentrasi dan kemurnian cDNA batang tebu transgenik	15
4	Nilai ekspresi gen Cry1Ab/Ac pada batang tebu	17

DAFTAR GAMBAR

1	Kerusakan pada batang tebu yang disebabkan oleh hama penggerek batang bergaris (<i>Chilo sacchariphagus</i>)	4
2	Mekanisme toksin Cry dalam tubuh serangga	5
3	Deteksi SYBR® Green, deteksi probe TaqMan, dan grafik <i>melt curve</i> (kurva leleh) untuk primer tertentu	7
4	Elektroforegram DNA batang tebu transgenik, kontrol positif plasmid pC5300 dengan gen Cry1Ab/Ac (C+), dan kontrol negatif (C-)	14
5	Elektroforegram cDNA batang tebu transgenik dengan gen Cry1Ab/Ac berukuran 139 <i>base pair</i> dengan ladder 100 <i>base pair</i>	16
6	Peta plasmid pC5300 dengan T-DNA yang membawa gen Cry1Ab/Ac serta promoter Rubisco (<i>rbcS</i>)	17
7	Tingkat serangan hama penggerek batang selama tiga minggu	18