



TRANSFORMASI GEN *SoSPS1* PADA TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L. var. BL) OVEREKSPRESI GEN *SoSUT1* EVENT 2 MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens*

SKRIPSI

Oleh

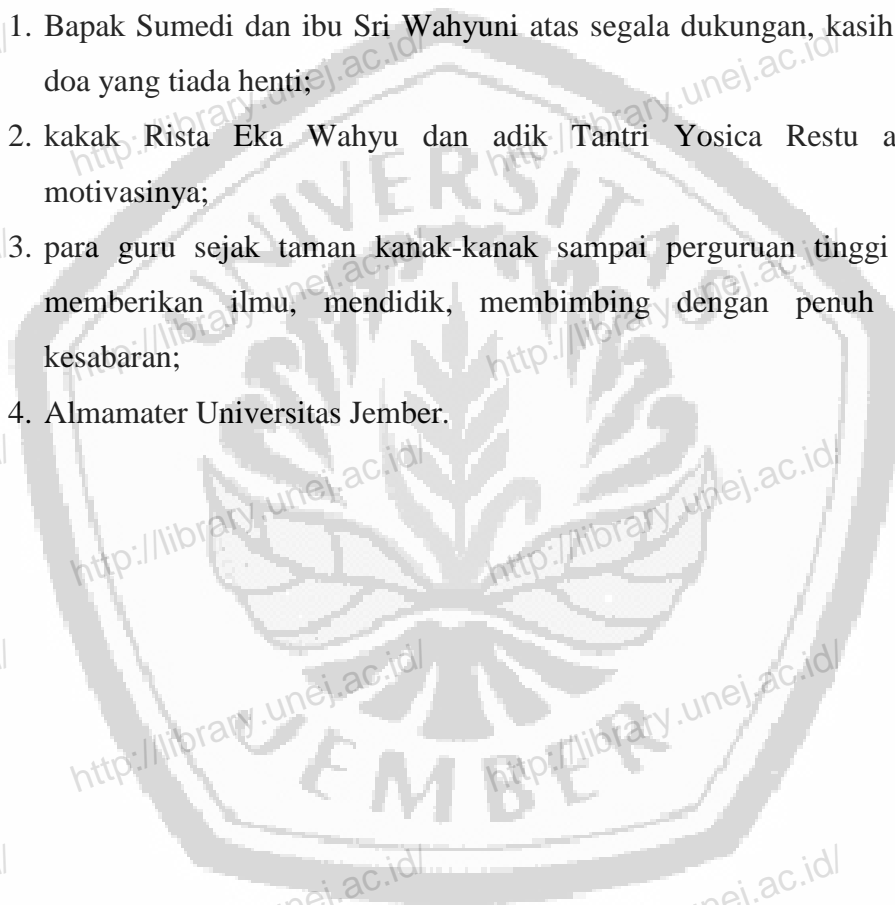
**Rinda Media Ningtyas
NIM 081810401021**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2013**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Bapak Sumedi dan ibu Sri Wahyuni atas segala dukungan, kasih sayang dan doa yang tiada henti;
2. kakak Rista Eka Wahyu dan adik Tantri Yosica Restu atas sumber motivasinya;
3. para guru sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu, mendidik, membimbing dengan penuh ikhlas dan kesabaran;
4. Almamater Universitas Jember.



MOTTO

“Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan.

Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain.”

(Surat Alam nasyrah, ayat 6 dan 7)ⁱ



i. Yayasan Penyelenggara Penterjemah/Pentafsir Alqur'an. 1971. Al Quran dan Terjemahan. Saudi Arabia

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Rinda Media Ningtyas

NIM : 081810401021

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Transformasi Gen *SoSPS1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Overekspresi Gen *SoSUT1 Event 2* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh MP3EI dan PT. Perkebunan Nusantara XI tahun 2012/2013 atas nama Prof. Dr. Bambang Sugiharto M. Agr. Sc. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 26 Mei 2013

Yang menyatakan,

Rinda Media Ningtyas

NIM 081810401021

SKRIPSI

TRANSFORMASI GEN *SoSPS1* PADA TANAMAN TEBU (*Saccharum officinarum* L. var. BL) OVEREKSPRESI GEN *SoSUT1* EVENT 2 MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens*

Oleh :

Rinda Media Ningtyas

NIM 081810401021

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Bambang Sugiharto M. Agr. Sc

Dosen Pembimbing Anggota : Esti Utarti S.P., M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Transformasi Gen *SoSPSI* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Overekspresi Gen *SoSUT1 Event 2* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember

Tim Penguji :

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Prof. Dr. Bambang Sugiharto M. Agr. Sc
NIP 195510221982121001

Esti Utarti S. P., M.Si
NIP 197003031999032001

Penguji I,

Penguji II,

Dra. Dwi Setyati M.Si
NIP 196404171991032001

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini
NIP 19750913200002001

Mengesahkan
Dekan,

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

RINGKASAN

Transformasi Gen *SoSPSI* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Overekspresi Gen *SoSUT1* Event 2 Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*; Rinda Media Ningtyas; 081810401021; 2013; 28 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Transformasi genetik pada tanaman adalah suatu upaya memasukkan gen target yang diisolasi dari suatu organisme ke dalam sel tanaman. Metode transformasi secara tidak langsung menggunakan *A. tumefaciens* lebih sering digunakan karena dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium yang sederhana serta jumlah *copy* gen yang diintegrasikan ke genomik tanaman berjumlah sedikit. *SoSPSI* adalah cDNA/gen yang menyandikan protein SPS (*Sucrose phosphate synthase*), yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman. Enzim SPS mengkatalisis reaksi pembentukan *sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG). *Sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) menghasilkan sukrosa. Sukrosa disintesis pada jaringan daun selama proses fotosintesis dan kemudian ditranslokasikan ke jaringan penyimpanan oleh protein SUT. Protein SUT adalah protein yang berfungsi sebagai translokator sukrosa dari jaringan fotosintetik ke jaringan penyimpan.

Pada penelitian sebelumnya, telah diperoleh tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) overekspresi gen *SoSUT1*. Namun demikian, pada tebu transgenik tersebut tidak terjadi peningkatan biosintesis sukrosa. Oleh karena itu diperlukan overekspresi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* agar terjadi peningkatan baik biosintesis maupun translokasi sukrosa sehingga dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada batang tanaman tebu. Dalam penelitian ini dilakukan transformasi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1*

menggunakan *A. tumefaciens*. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan tanaman tebu transforman overekspresi ganda yaitu gen *SoSPS1* dan gen *SoSUT1*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi persiapan eksplan untuk transformasi, kultur *A. tumefaciens*, isolasi DNA plasmid dan PCR, infeksi *A. tumefaciens* pada eksplan, ko-kultivasi, eliminasi *A. tumefaciens*, seleksi eksplan *putative* transforman, aklimatisasi, isolasi DNA genom tanaman *putative* transforman, dan analisis *Polymerase Chain Reaction (PCR)*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa berdasarkan hasil analisis PCR diperoleh tanaman tebu yang positif overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1* sebanyak 4 tanaman (yang berasal dari 1 tanaman) pada transformasi ke-1 (1,81%), 3 tanaman pada transformasi ke-2 (4,84%) dan 4 tanaman pada transformasi ke-3 (7,14%). Efektivitas rata-rata transformasi gen *SoSPS1* menggunakan *A. tumefaciens* yang mengandung konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* dan dikendalikan oleh promotor *RUBQ2* pada tanaman tebu overekspresi gen *SoSUT1* sebesar 4,59%. Keberadaan fragment DNA *hptII* sebesar 470 bp dan DNA *nptII* sebesar 550 bp hasil PCR menunjukkan integrasi konstruk pCL4-*SoSPS1* pada genom tebu transforman sehingga dapat dikatakan sebagai tanaman tebu transgenik overekspresi ganda gen *SoSUT1* dan gen *SoSPS1*.

PRAKATA

Puji Syukur kehadiran Allah S.W.T yang telah memberikan limpahan rahmat, nikmat serta hidayahNya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Transformasi Gen *SoSPS1* Pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L. var. BL) Overekspresi Gen *SoSUT1 Event 2* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu prasyarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

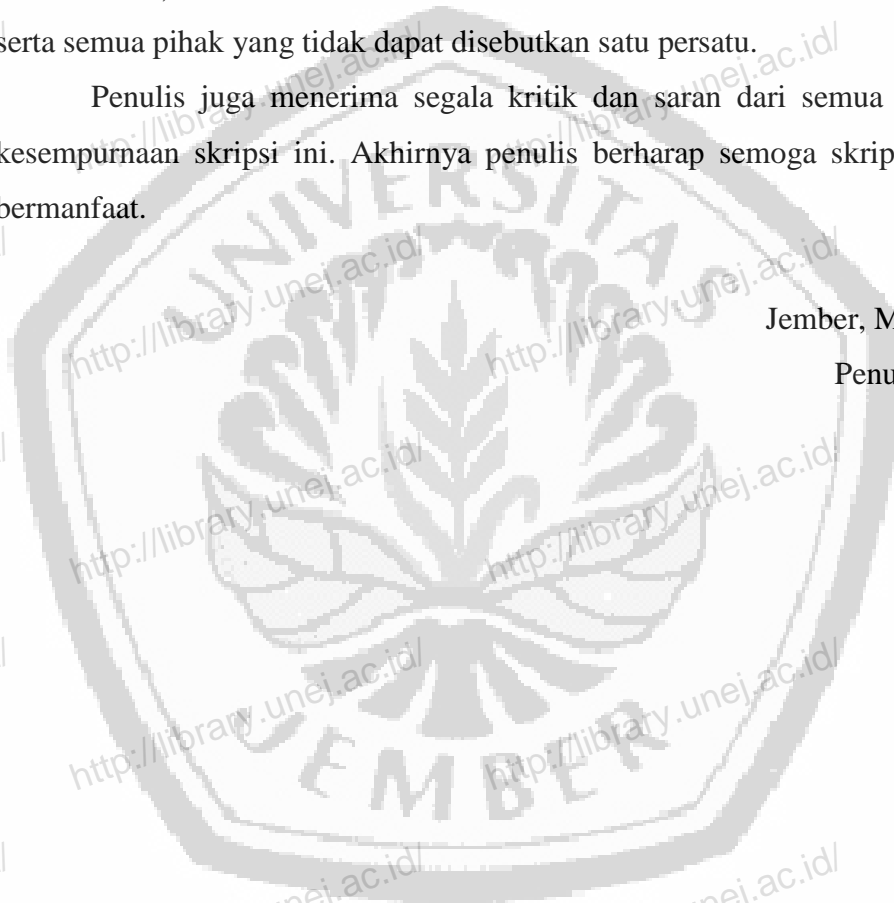
1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto M. Agr. Sc selaku dosen pembimbing utama dan Esti Utarti S.P., M.Si selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran telah meluangkan waktu, pikiran, saran serta motivasi dalam penulisan skripsi ini;
2. Dra. Dwi Setyati M.Si dan Dr. rer. nat. Kartika Senjarini selaku dosen penguji yang telah memberi banyak kritik dan saran yang sangat membangun dalam penyusunan skripsi ini;
3. Drs. Moh. Imron Rosyidi M.Sc selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan saran dan bimbingan selama menjadi mahasiswa di Universitas Jember;
4. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan FMIPA Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu penulis selama masa perkuliahan;
5. kedua orang tua, kakak, adik dan keluarga besar yang selalu memberikan semangat dan doa serta segala dukungan kepada penulis demi terselesaikannya skripsi ini;

6. Purnama Okviandari M.P yang telah memberikan masukan, dorongan dan semangat selama menjalankan tugas akhir;
7. para sahabat di Laboratorium Biologi Molekuler, terima kasih atas seluruh perhatian, dukungan dan bantuannya dalam menyelesaikan penelitian ini;
8. teman-teman seperjuangan Biologi angkatan 2008 yang telah memberi dukungan dan motivasi;
9. serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Mei 2013

Penulis



DAFTAR ISI

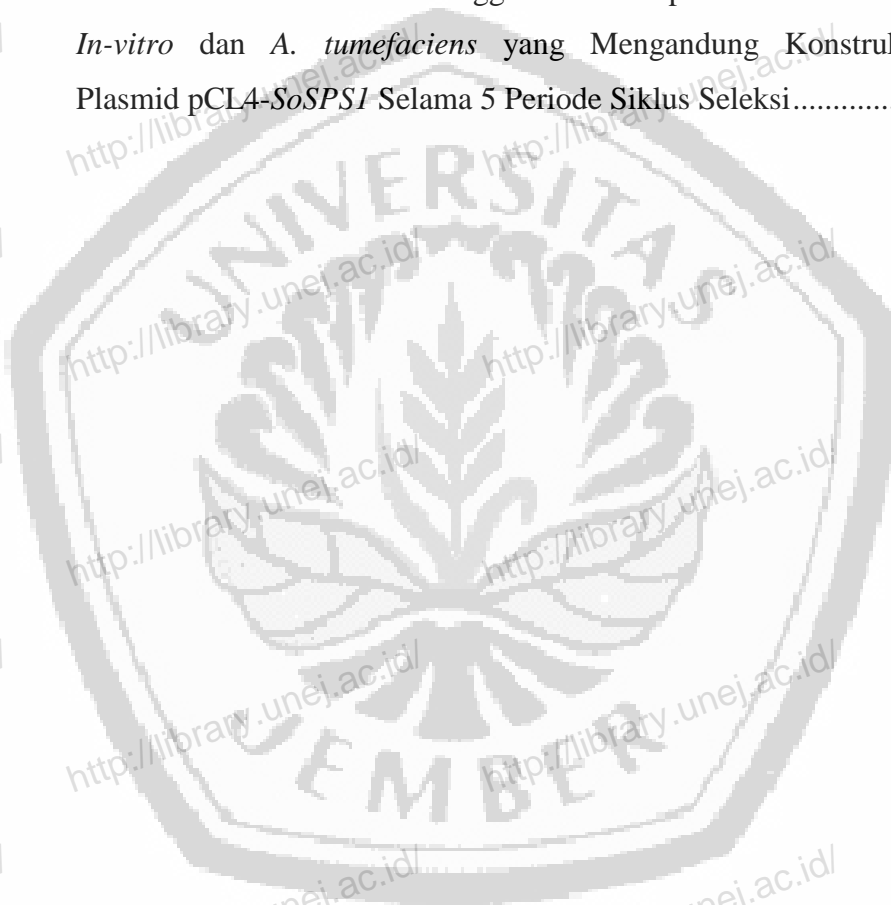
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan dan Manfaat	3
1.3.1 Tujuan	3
1.3.2 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Transformasi Gen Melalui <i>A. tumefaciens</i>	4
2.2 Biosintesis Sukrosa dan <i>Sucrose Phosphat Synthase (SPS)</i>	6
2.3 <i>Sucrose Transporter (SUT)</i> pada Tanaman	8

BAB 3. METODE PENELITIAN	9
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	9
3.2 Alat dan Bahan	9
3.3 Cara Kerja	9
3.3.1 Persiapan Eksplan.....	9
3.3.2 Kultur <i>A. tumefaciens</i>	9
3.3.3 Isolasi DNA Plasmid dan PCR	10
3.3.4 Infeksi <i>A. tumefaciens</i> pada Eksplan.....	11
3.3.5 Ko-kultivasi	11
3.3.6 Eliminasi <i>A. tumefaciens</i>	12
3.3.7 Seleksi Eksplan <i>Putative</i> Transforman.....	12
3.3.8 Aklimatisasi Tanaman <i>Putative</i> Transforman.....	12
3.3.9 Isolasi DNA Genom Tanaman <i>Putative</i> Transforman.....	13
3.3.10 Analisis <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	14
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Konfirmasi Gen Target pada <i>A.tumefaciens</i>	15
4.2 Transformasi Gen <i>SoSPS1</i> pada Tanaman Tebu	15
4.3 Aklimatisasi Tanaman Tebu <i>In-vitro</i>	20
4.4 Hasil Analisis PCR Tanaman Tebu <i>Putative</i> Transforman Gen <i>SoSPS1</i> dan Gen <i>SoSUT1</i>	21
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	24
5.1 Kesimpulan	24
5.2 Saran	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN-LAMPIRAN	
A. Komposisi Larutan Hoagland	29
B. Komposisi Media <i>Murashige and Skoog</i> (MS)	30
C. Komposisi Media <i>Yeast Extract Peptone</i> (YEP)	31

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1 Efektivitas Transformasi Menggunakan Eksplan Tunas Tebu <i>In-vitro</i> dan <i>A. tumefaciens</i> yang Mengandung Konstruk Plasmid pCL4- <i>SoSPS1</i> Selama 5 Periode Siklus Seleksi.....	19
---	----

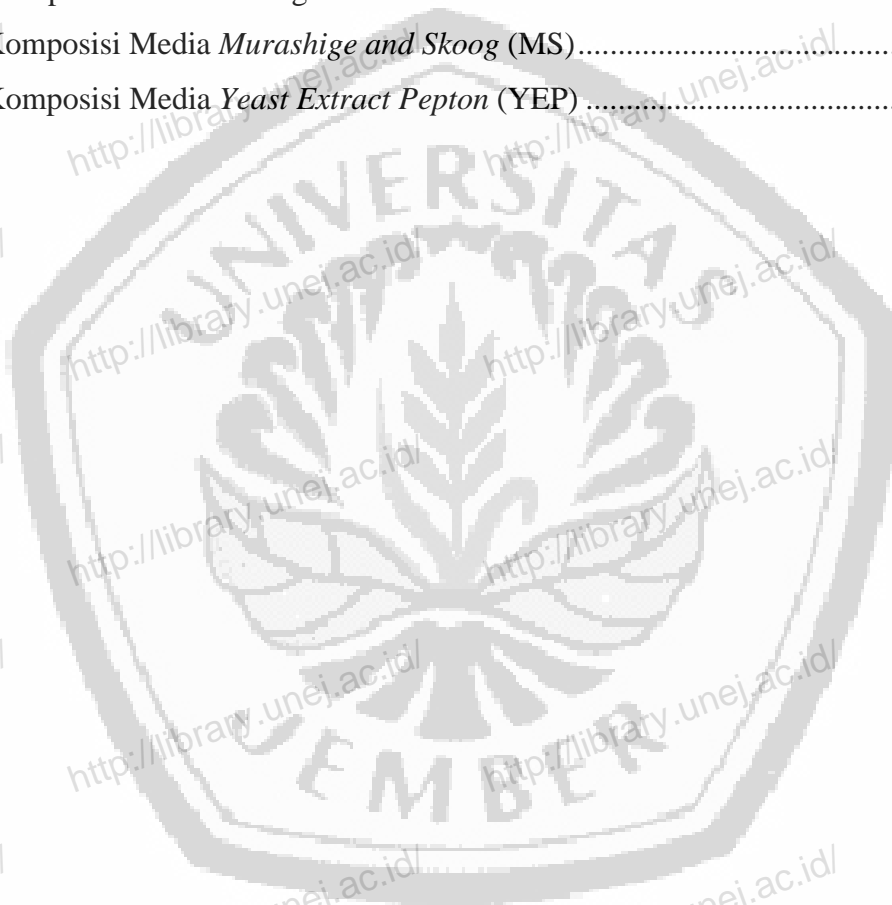


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Tumor Inducing</i> Plasmid pada <i>A. tumefaciens</i>	5
Gambar 2.2 Mekanisme Interaksi <i>A. tumefaciens</i> dengan Sel Tanaman.	6
Gambar 3.1 Peta Konstruk Plasmid pCL4- <i>SoSPSI</i>	10
Gambar 4.1 Hasil Elektroforesis Gel Agarose 1% DNA Hasil PCR dengan Pasangan Primer F/R <i>npII</i> dan <i>Template</i> DNA Plasmid Bakteri yang Diisolasi dari Bakteri <i>A. tumefaciens</i> Strain GV 3101.....	15
Gambar 4.2 Eksplan Tanaman Tebu pada Media Ko-kultivasi dan Media Eliminasi.....	17
Gambar 4.3 Planlet Tebu pada Media Seleksi dan Media MS0.....	18
Gambar 4.4 Kontaminasi Jamur pada Eksplan Tanaman Tebu yang Ditanam pada Media Seleksi ke-5 pada Transformasi 1.....	20
Gambar 4.5 Tanaman Tebu yang Berhasil di Aklimatisasi Umur 1 Bulan.....	21
Gambar 4.6 Hasil Elektroforesis Gel Agarose 1% DNA Hasil PCR dengan Menggunakan Pasangan Primer <i>hptII</i> F/R dan <i>Template</i> DNA Genom Tebu.....	22
Gambar 4.7 Hasil Elektroforesis Gel Agarose 1% DNA Hasil PCR dengan Menggunakan Pasangan Primer <i>npII</i> F/R dan <i>Template</i> DNA Genom Tebu.....	23

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi Larutan Hoagland	29
B. Komposisi Media <i>Murashige and Skoog</i> (MS)	30
C. Komposisi Media <i>Yeast Extract Pepton</i> (YEP)	31



DAFTAR SINGKATAN

ABS	: Absorbansi
bp	: <i>basepair</i>
BL	: Bulu lawang
CaMV	: <i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	: <i>Complementary deoxyribose nucleic acid</i>
cyt-FBPase	: <i>Cytosol- fructose-1,6-biphosphatase</i>
DNA	: <i>Deoxyribose nucleic acid</i>
EDTA	: <i>Ethylene diamine tetra acetic acid</i>
F	: <i>Forward</i>
F-6-P	: <i>Fructose-6-phosphate</i>
G-6-P	: <i>Glucose-6-Phosphate</i>
GUS	: - Glucoronidase
<i>hptII</i>	: <i>Higromycin phosphotransferaseII</i>
kb	: kilo <i>basepair</i>
LB	: <i>Left border</i>
mRNA	: <i>Messenger ribose nucleic acid</i>
MS	: <i>Murashige and Skoog</i>
NaCl	: <i>Natrium Chlorida</i>
nm	: nano meter
<i>nos</i>	: <i>Nopaline synthase</i>
<i>nptII</i>	: <i>Neomycin phosphotransferaseII</i>
OD	: <i>Optical density</i>
PCI	: <i>Phenol chloroform isoamylalcohol</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>

Pi	: <i>Phosphate anorganik</i>
R	: <i>Reverse</i>
RB	: <i>Right border</i>
RUBQ2	: <i>Rice ubiquitin 2</i>
S-6-P	: <i>Sucrose-6-phosphate</i>
SDS	: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SE/CC	: <i>Sieve element/companion cell</i>
SoSPS1	: <i>Saccharum officinarum Sucrose phosphate synthase 1</i>
SoSUT1	: <i>Saccharum officinarum Sucrose transporter 1</i>
SPP	: <i>Sucrose phosphate phosphatase</i>
SPS	: <i>Sucrose phosphate synthase</i>
SUT	: <i>Sucrose transporter</i>
T-DNA	: <i>Transfer DNA</i>
TE	: <i>Tris-EDTA</i>
Ti-plasmid	: <i>Tumor inducing plasmid</i>
Ubi-1	: <i>Maize ubiquitin 1</i>
UDPG	: <i>Uridine-5- diphospho glucose</i>
UV	: <i>Ultra violet</i>
Vir	: <i>Virulence</i>
YEP	: <i>Yeast extract pepton</i>