



**TRANSFORMASI GEN *SoSUT1* PADA TANAMAN TOMAT
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) MENGGUNAKAN VEKTOR
*Agrobacterium tumefaciens***

SKRIPSI

Oleh:

**Sheptyan Cristanto
061510101032**

**JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2012**



**TRANSFORMASI GEN *SoSUT1* PADA TANAMAN TOMAT
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) MENGGUNAKAN VEKTOR
*Agrobacterium tumefaciens***

SKRIPSI

Diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan
untuk menyelesaikan Progam Sarjana pada
Program Studi Agronomi Jurusan Budidaya Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh:

**Sheptyan Cristanto
061510101032**

**JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2012**

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sheptyan Cristanto

NIM : 061510101032

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Transformasi Gen *SoSUT1* Pada Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Menggunakan Vektor *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. 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, 27 Januari 2012

Yang Menyatakan,

Sheptyan Cristanto

NIM. 061510101032

SKRIPSI

**TRANSFORMASI GEN *SoSUTI* PADA TANAMAN TOMAT
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) MENGGUNAKAN VEKTOR
*Agrobacterium tumefaciens***

Oleh:

**Sheptyan Cristanto
061510101032**

Pembimbing:

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

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

PENGESAHAN

Karya ilmiah skripsi berjudul “Transformasi Gen *SoSUTI* Pada Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*” telah diuji dan disahkan pada :

Hari : Jumat

Tanggal : 27 Januari 2012

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua,

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

Anggota I,

Anggota II,

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

Ir. Raden Soedradjad, M.T.
NIP. 19570718 198403 1 001

Mengesahkan

Dekan,

Dr. Ir. Bambang Hermiyanto, MP.
NIP. 19611110 198802 1 001

RINGKASAN

Transformasi Gen *SoSUT1* Pada Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Sheptyan Cristanto. 061510101032. 2012. Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Gen *SoSUT1* adalah gen pengkode protein *sucrose transporter* yang diisolasi dari jaringan daun tanaman tebu (*Sacharum officinarum*). Protein *sucrose transporter* pada tanaman tingkat tinggi berfungsi dalam translokasi sukrosa dari organ *source* menuju ke *sink*. Dalam usaha meningkatkan kualitas tanaman tomat, perakitan kultivar tanaman tomat baru perlu dilakukan, salah satunya dengan cara transformasi gen secara tidak langsung dengan memanfaatkan vector *A.tumefaciens* sebagai alat transport gen. Penyisipan gen *SoSUT1* ke dalam tanaman tomat transgenik *SoSPS1* diharapkan terjadi overekspresi ganda gen *SoSPS1-SoSUT1* pada tanaman tomat, yang berpengaruh terhadap peningkatan sintesis dan translokasi sukrosa pada tanaman tomat, sehingga dihasilkan tanaman tomat transgenik dengan kandungan sukrosa dan hasil meningkat.

Dalam penelitian ini, gen *SoSUT1* dikonstruksi dalam plasmid pActin dan disisipkan ke dalam Ti-plasmid *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah untuk memperoleh tanaman tomat transgenik overekspresi ganda gen *SoSPS1-SoSUT1*, yang memiliki potensi sintesis dan transport sukrosa dari *source* ke *sink* yang tinggi, sehingga terjadi peningkatan kandungan sukrosa pada organ penyimpanan. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai model pengembangan tanaman tomat dalam perakitan kultivar tanaman tomat baru yang memiliki produktifitas dan kualitas buah yang tinggi dengan adanya over-ekspresi ganda gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar, Fakultas MIPA, Universitas Jember pada bulan September 2010 sampai Oktober 2011. Bahan yang digunakan, biji tomat transgenik *SoSPS1*; *A.tumefaciens* strain LBA4404, gen *SoSUT1* dalam plasmid pActin (LBA4404-pAct-*SoSUT1*), media YEP (*yeast-extract peptone*), media MS (*Murashige Skoog*), primer F/R *nptII*, F/R *hptII* dan 2F/2R SUT; dan PCR Master mix (iNtRON). Tahapan penelitian yang dilakukan, 1) konfirmasi *binary plasmid* pAct:*SoSUT1* di dalam *A.tumefaciens* menggunakan metode PCR dengan menggunakan primer F/R *hptII* dan 2F/2R SUT, 2) transformasi gen *SoSUT1* pada eksplan tomat, 3) konfirmasi konstruk gen *SoSUT1* di dalam genom tanaman tomat dengan menggunakan primer F/R *hptII* dan F/R *nptII*, 4) pengaruh transformasi ganda gen *SoSPS1-SoSUT* terhadap kandungan sukrosa buah tomat.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 1) *binary plasmid* pAct:*SoSUT1* telah terintegrasi ke dalam *A.tumefaciens*. Berdasarkan hasil analisis menggunakan metode PCR dengan dua pasang primer menunjukkan pita DNA pada panjang 470 bp dan 1000 bp. 2) Transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tomat transgenik *SoSPS1* menghasilkan persentase tanaman putatif transforman sebesar 60,97% dengan keberhasilan aklimatisasi sebesar 60 %. 3) Konstruk gen *SoSUT1* telah terintegrasi ke dalam genom tanaman tomat. Berdasarkan hasil analisis menggunakan metode PCR dengan dua pasang primer menunjukkan pita DNA pada

panjang 470 bp dan 600 bp. 4) Overekspresi ganda gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* dapat meningkatkan kadar sukrosa buah tomat lebih tinggi (0,08 mg/gram berat basah) dibanding peningkatan akibat overekspresi tunggal gen *SoSPS1* (0,07 mg/gram berat basah) maupun *SoSUT1* (0,05 mg/gram berat basah) maupun tanaman kontrol (0,04 mg/gram berat basah).

Kata Kunci: transformasi, gen *SoSUT1*, gen *SoSPS1*, plasmid pAct, *A. tumefaciens*



SUMMARY

Transformation *SoSUTI* Genes Into Tomato Plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Using *Agrobacterium tumefaciens* vector.
Sheptyan Cristanto. 061510101032. 2010. Department of Agronomy, Agriculture Faculty, University of Jember.

SoSUTI gene is encode *sucrose transporter* protein, isolated from sugarcane (*Sacharum officinarum*) leaf. Sucrose transporter proteins in higher plants functioning in the translocation of sucrose from source to the sink organs. In an effort to improve the quality of tomato plants, the assembly of a new tomato cultivar needs to be done, one of them by way of transformation genes indirectly by utilizing vector *A.tumefaciens* as a means of transport genes. *SoSUTI* gene insertion into transgenic tomato plants are expected to occur *SoSPS1* overexpression of the gene double *SoSUTI*- *SoSPS1* on tomato plants, which affect the increased synthesis and translocation of sucrose in tomato plants, so that the resulting transgenic tomato plants with sucrose content and yield increase.

In this study, *SoSUTI* gene has cloned on *pActin* DNA binary vector and been inserted into Ti –plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. The research purpose has to obtain tomato plants transgenic overexpression of the double gene *SoSPS1* and *SoSUTI*, which has the potential transport of sucrose from source to sink is high, resulting in increased content of sucrose in storage organs. The results of this study is expected to be used as a model for the development of tomato plants in the assembly of a new tomato cultivar having productivity and high fruit quality with the over-expression of multiple genes *SoSPS1* and *SoSUTI*.

The research was conducted at the Laboratory of Botany and Tissue Culture, Faculty of Mathematics and Natural Science, University of Jember in September 2010 to October 2011. Materials used, transgenic tomato seeds *SoSPS1*; *A.tumefaciens* strain LBA4404 gene in the plasmid *pActin SoSUTI* (*LBA4404-pACT-SoSUTI*), YEP medium (yeast-extract Peptone), MS medium (Murashige Skoog), and PCR Master mix (iNtRON) were used as main materials for this experiment. The experiment was divided into several stages, 1) confirmation of *pAct:SoSUTI* binary plasmid on *A.tumefaciens* using PCR method with F/R *hptII* and 2F/2R SUT primers, 2) transformation *SoSUTI* gene into tomato explants, 3) confirmation *SoSUTI* gene constructs in the genome of tomato plants by using primer F/R *hptII* and F/R *nptII*, 4) the effect of multiple gene transformation *SoSPS1-SoSUT* of sucrose content of tomato fruit.

The results showed that 1) the binary plasmid *pAct:SoSUTI* has been integrated into *A.tumefaciens*. Based on PCR analysis to confirm *pAct:SoSUTI* has been shown single band of DNA plamid at 470 bp and 1000 bp.2) Transformation *SoSUTI* gene in plants transgenic tomato *SoSPS1* generate putative transformants percentage of 60.97% with the successful acclimatization of 60%. 3) *SoSUTI* gene constructs have been integrated into the genome of tomato plants. Based on

PCR analysis to confirm *SoSUT1* gene construct has been shown single band of DNA plamid at 470 bp and 600 bp. 4) Overexpression of multiple genes *SoSPS1* and *SoSUT1* can increase the sucrose content of tomatoes is higher (0.08 mg/g wet weight) than the increase caused by single overexpression *SoSPS1* gene (0,07 mg/g wet weight) and *SoSUT1* (0,05 mg/g wet weight) and control plants (0,04 mg/g wet weight).

Keywords: transformation, *SoSUT1* gene, *SoSPS1* gene, binary *plasmid* pAct, *A.tumefaciens*



PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Transformasi Gen *SoSUTI* Pada Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*”. Penelitian ini dibiayai oleh “Proyek Penelitian Hibah Kompetensi Dirjen Dikti Tahun 2008-2010 dan PT.Perkebunan XI (Persero) untuk Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr, Sc.”

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

1. Ayahanda Purdianto dan Ibunda Sri Utami tercinta, yang selalu memberikan doa, kasih sayang, semangat, dan motivasi sepanjang perjalanan hidupku sampai sekarang. Kakakku Happy Enggar Setyawan, S.E. dan Rachardy Andrianto, kakak ipar Indra Yuni dan keponakan tercinta Deniswara Aulia Kristanti, atas motivasi, semangat, dan dukungan untuk menjadi orang yang lebih baik, serta adikku Nora Indra Puspitasari yang telah mendukung dan sabar menemaniku hingga sekarang.
2. Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS, selaku dosen pembimbing utama dan Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, saran, dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
3. Ir.Raden Soedradjad,M.T,_ selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP dan Purnama Okviandari, MP. yang telah memberikan masukan, dorongan dan semangat selama menjalankan tugas akhir;
5. Dr. Ir. Bambang Hermiyanto, MP., selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember beserta stafnya.

6. Dr. Ir. Sigit Suparjono, MS., selaku Ketua Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember beserta stafnya.
7. Rekan-rekan kerja; Hilda Safitri, S.Si, Anisa Indah P.S.Si., Bernet Agung Saputra. S.P., Ryza Aditya Priatama, S.Si., Seagames Waluyo, S.P., Anandang Ghani, Ajie Baskoro, Ahmad Fudhaili, Nina “Menut”, Triliani Farlisa, Aditya “unyil”, Mutik Mahtuhfatul, Anzi Ndut, terima kasih atas seluruh perhatian, dukungan dan bantuannya dalam menyelesaikan penelitian ini;
8. Keluarga Besar Agro ‘06 Fakultas Pertanian Universitas Jember yang telah menambah warna hidup selama ini;
9. Keluarga besar BIOMOL, HIMAGRO dan pihak-pihak lain yang tidak bisa disebutkan satu persatu yang telah membantu dan memberi semangat dalam perjalanan di kampus hijau ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan karya ilmiah tertulis ini masih terdapat banyak kekurangan, untuk itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi penyempurnaan karya ilmiah tertulis ini. Semoga Karya Ilmiah Tertulis ini bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi perkembangan ilmu pertanian.

Penulis

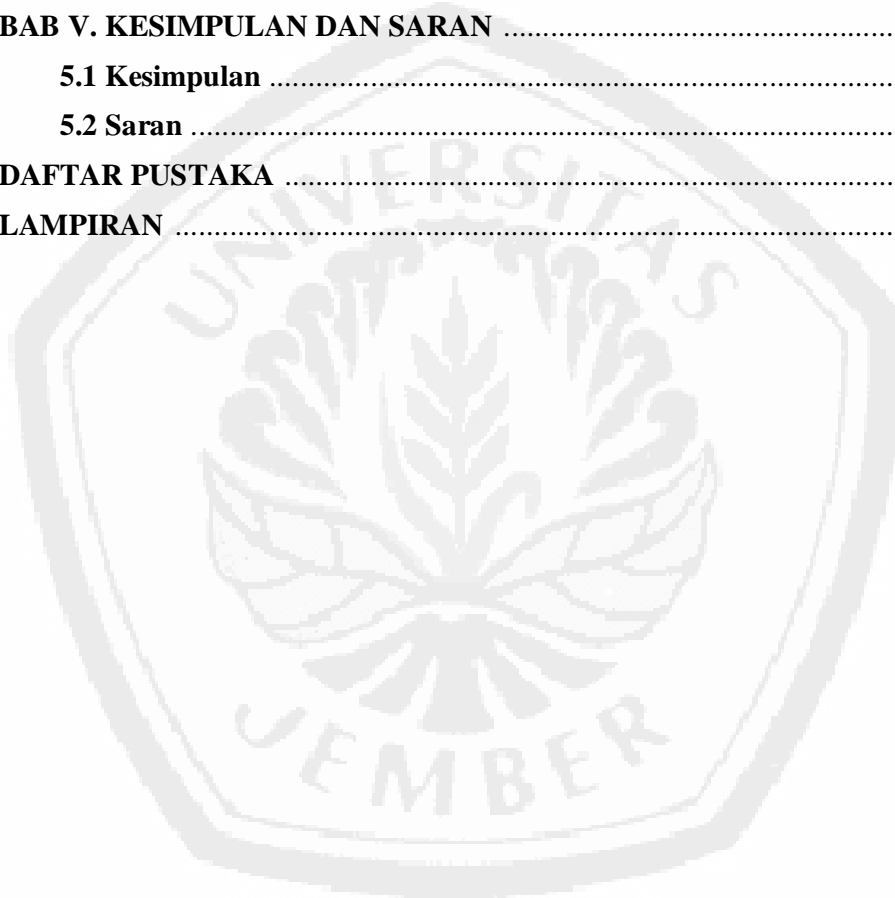
Jember, 27 Januari 2011

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN PEMBIMBINGAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
RINGKASAN	vi
SUMMARY	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xix
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 II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Kultur In Vitro Tanaman Tomat	4
2.2 Fotosintesis dan Biointesis Sukrosa pada Tanaman	6
2.3 <i>Sucrose Phosphate Synthase</i> (SPS) pada Tanaman	7
2.4 <i>Sucrose Transporter</i> (SUT) pada Tanaman	8
2.5 Bakteri <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
2.6 Transformasi Gen Menggunakan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ...	10
2.7 Hipotesis	12

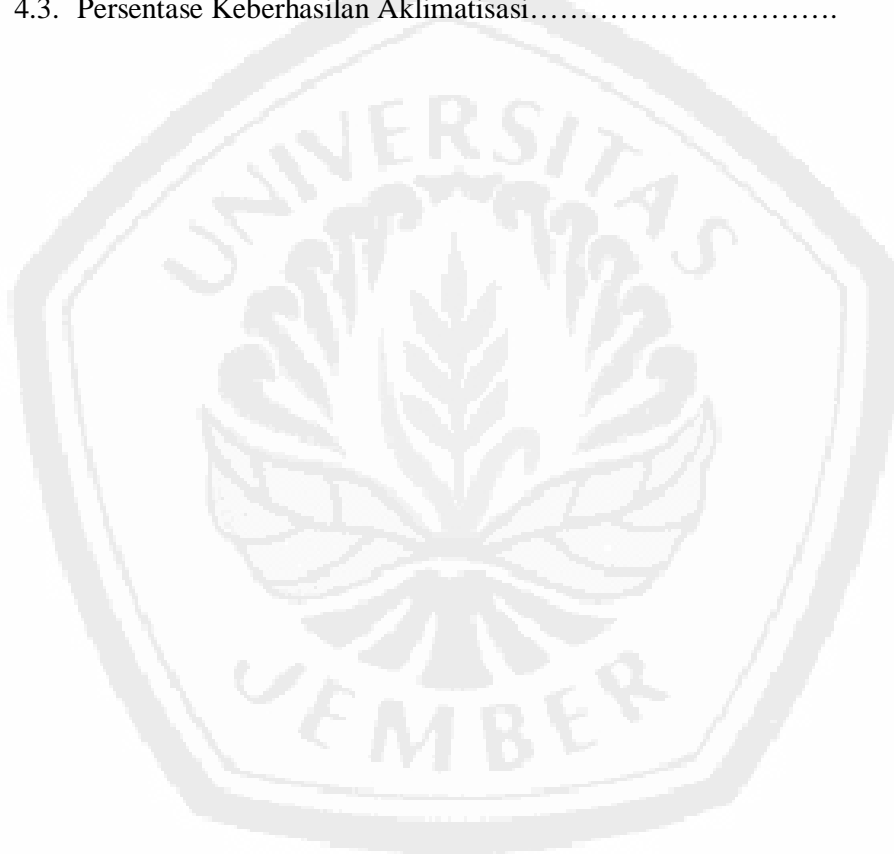
BAB III. METODOLOGI	13
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2 Bahan dan Alat	13
3.3 Metode Percobaan.....	13
3.4 Pelaksanaan	14
3.4.1 Pembuatan Media.....	14
3.4.1.1. Media MS (Murashige Skoog)	14
3.4.1.2. Media YEP (<i>Yeast-extract Pepton</i>)	14
3.4.2 Persiapan Eksplan.....	14
3.4.3 Inokulasi <i>A. tumefaciens</i>	14
3.4.4 Isolasi DNA Plasmid.....	15
3.4.5 Infeksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ke Dalam Tanaman.....	15
3.4.6 Kokultivasi.....	16
3.4.7 Eliminasi.....	16
3.4.8 Seleksi Eksplan Putative Transforman.....	16
3.4.9 Pre-Aklimatisasi Eksplan Putative Transforman	17
3.4.10 Aklimatisasi Tanaman Putative Transforman	17
3.4.11 Isolasi DNA Genom Tanaman Transforman	17
3.4.12 Analisis <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR)	18
3.4.13 Ekstraksi Enzim	19
3.4.14 Pengukuran Aktivitas Enzim dan Total Protein Terlarut (TPT)	20
3.4.15 Analisis <i>Western Blot</i>	20
3.4.16 Analisis Kandungan Sukrosa Buah.....	21
3.5. Parameter Pengamatan	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Konfirmasi Keberadaan Plasmid pAct dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Transforman	23
4.2 Transformasi Tomat PRG <i>SoSPSI</i> dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> yang membawa gen pAct-<i>SoSUT1</i>	24
4.3 Pre-Aklimatisasi dan Aklimatisasi Planlet Putatif	24

Transforman	29
4.4 Hasil PCR Tanaman Tomat Putatif Transforman Overekspresi Ganda Gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i>	32
4.5 Aktivitas <i>Sucrose Phosphate Synthase</i> (SPS)	34
4.6 Analisis <i>Western Blot Sucrose Phosphate Synthase</i> (SPS).....	35
4.7 Kandungan Sukrosa Buah.....	36
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	38
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	39
LAMPIRAN	45



DAFTAR TABEL

No	Teks	Halaman
4.2.	Persentase eksplan tahan yang mampu beregenerasi menjadi planlet putatif transforman.....	27
4.3.	Persentase Keberhasilan Aklimatisasi.....	31



DAFTAR GAMBAR

No	Teks	Halaman
2.2.	Sintesis Sukrosa.....	7
2.3.	Peta konstruk cDNA SoSPS1 pada strain bakteri LBA4404 dan plasmid pKYS	8
2.4.	peta konstruk cDNA <i>SoSUT1</i> pada strain bakteri LBA4404 dan plasmid pAct	9
2.5.	Skema plasmid Ti dari <i>Agrobacterium. Tumefaciens</i>	9
2.6.	Transformasi T-DNA dari sel <i>A. tumefaciens</i> ke sel tanaman...	11
4.1.	Hasil elektroforesis DNA plasmid pAct di dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
4.2.1	Eksplan ditanam pada media kokultivasi.....	26
4.2.2	Eksplan ditanam pada media eliminasi.....	26
4.2.3	Perbandingan Pertumbuhan Eksplan Antara Perlakuan LBA-pAct, Kontrol Negatif, dan Kontrol Positif pada 28 Hari Setelah Tanam (HST).....	28
4.2.4	Pencoklatan (<i>browning</i>) pada eksplan.....	29
4.2.5	Pertumbuhan eksplan pada media seleksi.....	29
4.3.1.	Planlet siap aklimatisasi.....	30
4.3.2.	Tanaman putatif transforman, umur 1 bulan setelah aklimatisasi.....	32
4.4.1	Elektroforesis DNA hasil PCR dengan pasangan <i>primer hpt-F/R</i> pada tanaman putatif transforman hasil tranformasi ganda gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT</i>	33
4.4.2	Elektroforesis DNA hasil PCR dengan pasangan <i>primer nptII-F/R</i> tanaman putatif transforman hasil tranformasi gen <i>SoSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i>	33

4.5. Aktivitas Spesifik SPS Tanaman Tomat Transgenik Terhadap Tanaman Kontrol.....	34
4.6. Hasil Analisis <i>Western Blot</i> Pada Tanaman Transgenik dan Kontrol.....	35
4.7. Kandungan Sukrosa Buah Tomat Transgenik terhadap Tanaman Kontrol.....	37




DAFTAR LAMPIRAN

No	Teks	Halaman
Lampiran 1	Data Jumlah Ekplan Pada Tahap Transformasi.....	45
Lampiran 2	Komposisi Media Stock.....	46
Lampiran 3	Komposisi Media Transformasi.....	47
Lampiran 4	Komposisi Larutan Hoagland.....	48
Lampiran 5	Kurva Standart yang Digunakan Untuk Pengukuran.....	49
Lampiran 6	Hasil Pengukuran Aktivitas SPS dan Kandungan Sukrosa Buah.....	50



DAFTAR SINGKATAN



bp	: basepair
BSA	: <i>Bovine Serume Albumin</i>
cDNA	: <i>Complementary deoxyribose nucleic acid</i>
DTT	: Dithiothreitol
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
F-6-P	: fructose-6-phosphate
G-6-P	: Glucose 6 Phosphate
<i>goi</i>	: <i>gene of interest</i>
<i>hptII</i>	: <i>hygromycin phosphotransferaseII</i>
LB	: Left Border
MS	: Murashige Skoog
<i>nptII</i>	: <i>neomycin phosphotransferaseII</i>
pAct	: <i>Plasmid actin</i>
PCI	: <i>Phenol Chloroform Isoamylalcohol</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pKYS	: <i>Plasmid Keyko Sakakibara</i>
PMSF	: <i>Phenilmethilsulvinil fluoride</i>
PVP	: <i>Polyvinylpyrrolidone</i>
RB	: Right Border
S-6-P	: <i>Sucrose-6-phosphate</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dedocyl Sulfat - Poliacrylamide Gel Electroforesis</i>
SPP	: <i>Sucrose phosphate phosphatase</i>
SPS	: <i>Sucrose phosphate synthase</i>
<i>SoSPS1</i>	: <i>Saccharum officinarum Sucrose phosphate synthase</i>
<i>SoSUT1</i>	: <i>Saccharum officinarum Sucrose transporter</i>

SUCs	: <i>sucrose carriers</i>
SuSy	: <i>sucrose synthase</i>
SUT	: <i>Sucrose transporter</i>
T-DNA	: Transfer DNA
TBS	: Tris Buffer Saline
TE	: <i>tris-EDTA</i>
Ti-plasmid	: <i>Tumor inducing plasmid</i>
TPT	: Total Protein Terlarut
UDPG	: <i>uridine diphosphate glucose</i>
vir	: <i>virulence</i>
YEP	<i>Yeast extract Pepton</i>

