



**EFEKTIFITAS TRANSFORMASI GEN *SoSPS1*
MENGUNAKAN VEKTOR PLASMID pCL4 dan EKSPLAN
TUNAS LATERAL TEBU (*Saccharum officinarum* L.)**

SKRIPSI

Oleh:

**Aji Baskoro
071510101073**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2012**



**EFEKTIFITAS TRANSFORMASI GEN *SoSPS1*
MENGUNAKAN VEKTOR PLASMID pCL4 dan EKSPLAN
TUNAS LATERAL TEBU (*Saccharum officinarum* L.)**

SKRIPSI

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

Oleh:

**Aji Baskoro
071510101073**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2012**

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT yang maha pengasih dan maha penyayang serta Nabi Muhammad SAW junjungan seluruh umat manusia, kupersembahkan skripsi ini kepada:

1. Ayahanda Harwanto Dwi Nugroho dan Ibunda Kusumawati tercinta, kuhaturkan terimakasih yang tak terhingga atas segala pengorbanan, kasih sayang, dan do'a yang terus mengalir;
2. Seluruh keluarga besar yang telah begitu banyak memberikan dorongan dan dukungan dalam setiap kegiatan;
3. Semua guru-guru yang telah mendidik dan memberikan ilmunya, terimakasih yang tak terhingga atas ilmu yang diberikan;
4. Almamater Universitas Jember.

MOTTO

“Bermimpilah, karena Tuhan akan memeluk mimpi-mimpi itu”

“Bermimpilah dalam hidup, jangan hidup dalam mimpi”

“Beri aku sesuatu yang paling sulit, aku akan belajar”

..... *Andrea Hirata (Penulis Tetralogi Laskar Pelangi)*

“Man Jadda Wajada”

(...siapa yang bersungguh-sungguh pasti akan berhasil...)

“Man Shabara Zhafira”

(...siapa yang bersabar pasti akan beruntung...)

..... *Ahmad Fuadi (Penulis Trilogi Negeri 5 Menara)*

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aji Baskoro

NIM : 071510101073

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Efektifitas Transformasi Gen *SoSPS1* Menggunakan Vektor Plasmid pCL4 dan Eksplan Tunas Lateral Tebu (*Saccharum officinarum* L.)**” 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, 13 Juni 2012

Yang Menyatakan,

Aji Baskoro

NIM. 071510101073

SKRIPSI

**EFEKTIFITAS TRANSFORMASI GEN *SoSPS1*
MENGUNAKAN VEKTOR PLASMID pCL4 dan EKSPAN
TUNAS LATERAL TEBU (*Saccharum officinarum* L.)**

Oleh:

**Aji Baskoro
071510101073**

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 “Efektifitas Transformasi Gen *SoSPS1* Menggunakan Vektor Plasmid pCL4 dan Eksplan Tunas Lateral Tebu (*Saccharum officinarum* L.)” telah diuji dan disahkan pada :

Hari : Rabu

Tanggal : 13 Juni 2012

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji I,

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

Penguji II,

Penguji III,

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

Ir. Bambang Sukowardojo, MP.
NIP. 195212291981031001

Mengesahkan

Dekan,

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

RINGKASAN

Efektifitas Transformasi Gen *SoSPSI* Menggunakan Vektor Plasmid pCL4 dan Eksplan Tunas Lateral Tebu (*Saccharum officinarum* L.). Aji Baskoro. 071510101073. 2012. Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Pengembangan tanaman tebu dengan menggunakan teknologi rekayasa genetik hingga saat ini masih terus dilakukan. Rekayasa genetik dapat dilakukan melalui proses transformasi gen dengan memanfaatkan peran bakteri *Agrobacterium tumefaciens* sebagai vektor. Melalui rekayasa genetik dengan teknik penyisipan materi genetik seperti gen *SPS* (*sucrose phosphate synthase*) dapat menyebabkan overekspresi *SPS* pada tanaman target. Gen *SPS* merupakan gen pengkode sintesa enzim *SPS* yang mengkatalisis reaksi pembentukan sukrosa di sitosol. Berdasarkan sejumlah penelitian, diketahui bahwa enzim *SPS* merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa (Huber and Huber, 1996; Laporte *et al.*, 2001). Melalui overekspresi *SPS* diharapkan dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada tanaman tebu.

Pada penelitian ini, gen *SoSPSI* dikonstruksi dalam plasmid pCL4 dan disisipkan ke dalam Ti-plasmid *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101. Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah untuk melihat efektifitas transformasi gen *SoSPSI* dengan menggunakan promoter RUBQ2 dalam vektor ekspresi pCL4 pada tanaman tebu.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Dasar, Fakultas MIPA, Universitas Jember pada bulan Agustus 2010 sampai Mei 2012. Bahan dan alat yang digunakan meliputi, tunas lateral tanaman tebu yang diregenerasikan menjadi tanaman tebu *in vitro*; *A.tumefaciens* strain GV3101, gen *SoSPSI* dalam plasmid pCL4 (GV3101-pCL4-*SoSPSI*), media YEP (*yeast-extract peptone*), media MS (*Murashige Skoog*), DNA elektroforesis (*BioCraft;Biomed*); spectrophotometer (Hitachi U-2000 Type dual beam); LAF (*Laminair Air Flow*); Sentrifuge (Sorvall Type RC 5B Plus SS-34), *microsentrifuge* (Tommy MRX 150); alat diseksi. Pengamatan meliputi; konfirmasi keberadaan pCL4-*SoSPSI* di dalam *Agrobacterium tumefaciens* dengan menggunakan analisa PCR (*Polymerase Chain Reaction*), pengamatan persentase keberhasilan aklimatisasi, dan deteksi keberadaan gen *SoSPSI* pada genom tanaman putatif transforman.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa transformasi gen *SoSPSI* pada tanaman tebu menghasilkan 6 klon tanaman putatif transforman dari 50 tanaman yang ditransformasi. Hasil Analisa PCR keenam tanaman putatif transforman yang telah diaklimatisasi (klon 1.1, klon 1.2, klon 2, klon 3, klon 6.1 dan klon 6.2) menunjukkan bahwa gen *SoSPSI* telah terintegrasi ke dalam genom tanaman,

sehingga keenam tanaman tersebut dapat dikatakan sebagai tanaman transforman gen *SoSPSI*. Persentase efektifitas transformasi gen *SoSPSI* dengan menggunakan pCL4 sebesar 12 %, hasil ini lebih besar dibandingkan penelitian sebelumnya dengan menggunakan konstruk pKYS sebesar 4%.

SUMMARY

Effectivity of Transformation *SoSPSI* Gene Using pCL4 Plasmid Vector and Axillary Bud Explant from Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Aji Baskoro. 071510101073. 2012. Department of Agronomy, Agriculture Faculty, University of Jember.

Development of sugarcane crop using genetic engineering technology is still being conducted. Genetic engineering can be done through a process of transformation genes by using bacteria *Agrobacterium tumefaciens* as a vector. Through genetic engineering techniques such as *SPS* gene (sucrose phosphate synthase) insertion of genetic material can lead to overexpression of *SPS* on the target plant. *SPS* Gene is a gene encoding *SPS* enzyme that catalyzes the synthesis reaction of the formation of sucrose in the cytosol. Based on numerous studies, it is known that the enzyme *SPS* is a key enzyme in the biosynthesis of sucrose (Huber and Huber, 1996; Laporte et al., 2001). Through overexpression of *SPS* is expected to increase the sucrose content in sugarcane.

In this study, *SoSPSI* gene has cloned on pCL4 DNA binary vector and inserted into the Ti-plasmid *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101. The purpose of this research, to see the effectiveness of transformation *SoSPSI* genes using promoter RUBQ2 the expression vector pCL4 on sugarcane.

The research was conducted at the Laboratory of Botany and Tissue Culture, Faculty of Mathematics, University of Jember in August 2010 to May 2012. Materials and tools used, the lateral buds of sugarcane regenerated into plants *in vitro*; *A.tumefaciens* strain GV3101, *SoSPSI* gene in the plasmid pCL4 (GV3101-pCL4-*SoSPSI*), YEP medium (yeast-extract peptone), MS medium (Murashige Skoog), DNA electrophoresis (BioCraft; Biomed); spectrophotometer (Hitachi U-2000 Type dual beam); LAF (Laminair Air Flow); centrifuged (Sorvall RC 5B Plus Type SS-34), microsentrifuge (Tommy MRX 150); dissection tools. Observations include: confirmation of pCL4-*SoSPSI* on *Agrobacterium tumefaciens* using PCR analysis (Polymerase Chain Reaction), observation of the percentage of successful acclimatization, and the detection of the presence of *SoSPSI* genes in plant genomes putative transformants.

The results showed that the transformation of sugarcane *SoSPSI* gene produced 6 clones putative transformants from 50 plants transformed. The results of PCR analysis of the 6 plants putative transformant which have acclimatized (clone 1.1, clone 1.2, clone 2, clone 3, clone 6.1 and clone 6.2) showed that the *SoSPSI* gene has been integrated into the genome plants, so that the 6 plants can be regarded as transformant plants of *SoSPSI* gene. Percentage effectiveness of transformation *SoSPSI* gene using pCL4 by 12%, the result is greater than previously research using constructs pKYS 4%.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektifitas Transformasi Gen *SoSPSI* Menggunakan Vektor Plasmid pCL4 dan Eksplan Tunas Lateral Tebu (*Saccharum officinarum* L.)”. Penelitian ini dibiayai oleh “PT. Perkebunan XI (Persero) untuk Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc.”

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

1. Ayahanda Harwanto Dwi Nugroho dan Ibunda Kusumawati tercinta, yang selalu memberikan doa, kasih sayang, semangat, dan motivasi sepanjang perjalanan hidupku 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 telah memberikan pengarahan, saran, dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini.
3. Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP., Purnama Okviandari, MP., dan Dr. Evi Hanizar, M. Kes., yang telah memberikan masukan, dorongan dan semangat selama menjalankan tugas akhir.
4. Ir. Bambang Sukowardojo, MP., selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa.
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-rekanku; Dwi Esti Febriyantingih, S.Si., Deny Ariyanto, SP., Hilda Safitri, S.Si., Bernet Agung, SP., Anandang Ghanni, SP., Sheptyan Cristanto, SP., Anzi Tiara, Ahmad Fudhaili, S.Si., Nina Oktaria, S.Si., Triliani Farlisa, S.Si., Nurul Holifah, Aditya Nurmalita, Mutik Mahtuhfatul, atas bantuan dan dukungannya dalam menyelesaikan penelitian ini.

8. 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.

Jember, 13 Juni 2012

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY.....	x
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN	xviii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Peranan <i>sucrose phosphate synthase</i> (SPS) dalam Biosintesis Sukrosa	5
2.2 Bakteri <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
2.3 DNA Promoter	9
2.4 Eksplan Tanaman Tebu	10
2.5 Transformasi <i>Gen SPS</i> pada tanaman	11
2.6 Hipotesis	12

BAB III. METODE PENELITIAN	13
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	13
3.2 Bahan dan Alat	13
3.3 Cara Kerja	14
3.3.1 Pembuatan Media	14
3.3.2 Persiapan Eksplan Tebu	14
3.3.3 Persiapan <i>A. Tumefaciens</i>	14
3.3.3.1 Inokulasi <i>A. tumefaciens</i>	14
3.3.3.2 Konfirmasi DNA Plasmid	15
3.3.4 Transformasi	16
3.3.5 Kokultivasi	17
3.3.6 Eliminasi	17
3.3.7 Seleksi	17
3.3.8 Pre-Aklimatisasi dan Aklimatisasi	18
3.3.9 Analisis Tebu Hasil Transformasi dengan PCR	18
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1 Persiapan Eksplan Tanaman Tebu	20
4.2 Konfirmasi Bakteri <i>A. tumefaciens</i>	23
4.3 Transformasi <i>Gen SPS</i> Pada Tanaman Tebu	25
4.4 Hasil Transformasi	27
4.5 Aklimatisasi Tanaman Tebu <i>In vitro</i>	29
4.6 Hasil Analisis PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	31
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

No	Teks	Halaman
4.1.	Persentase eksplan pada media kokultivasi, eliminasi, dan seleksi	27

DAFTAR GAMBAR

No	Teks	Halaman
2.1.	Jalur biosintesa sukrosa pada daun tanaman	5
2.2.	Modifikasi Ti plasmid <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
2.3.	Mekanisme transformasi T-DNA kedalam jaringan tanaman dengan menggunakan vektor <i>A.tumefaciens</i>	7
2.4.	T-DNA <i>binary vector systems</i>	8
3.1.	Peta konstruksi plasmid pCL4- <i>SoSPSI</i>	12
4.1.	Tunas lateral mati akibat <i>browning</i>	20
4.2.	Tahapan regenerasi tunas lateral menjadi tanaman tebu <i>in vitro</i>	21
4.3.	Peta T-DNA vektor pCL4- <i>SoSPSI</i> , dengan site primer SPS	23
4.4.	Hasil elektroforesis PCR produk DNA plasmid pCL4	23
4.5.	Eksplan tanaman tebu yang ditanam pada media kokultivasi dalam kondisi gelap	25
4.6.	Tanaman putatif transforman	27
4.7.	Tanaman tebu albino akibat paparan <i>kanamycin</i> 50 ppm	28
4.8.	Tanaman putatif transforman yang berhasil diaklimatisasi	30
4.9.	Peta T-DNA vektor pCL4- <i>SoSPSI</i> , dengan site primer <i>nptII</i>	31
4.10.	Elektroforesis DNA hasil PCR klon 1.1, klon 1.2, dan klon 2 dengan pasangan primer <i>nptII-F/R</i> tanaman putatif transforman hasil tranformasi gen <i>SoSPSI</i>	31
4.11	Elektroforesis DNA hasil PCR klon 3, klon 6.1, dan klon 6.2 dengan pasangan primer <i>nptII-F/R</i> tanaman putatif transforman hasil tranformasi gen <i>SoSPSI</i>	31

DAFTAR LAMPIRAN

No	Teks	Halaman
Lampiran 1	Komposisi Media Stock.....	41
Lampiran 2	Komposisi Larutan Hoagland.....	42
Lampiran 3	Dokumentasi Saat Penelitian	43
Lampiran 4	Biodata Penulis	44

DAFTAR SINGKATAN

BAP	: <i>Benzyl amino purine</i>
bp	: basepair
CaMV	: <i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	: <i>Complementary deoxyribose nucleic acid</i>
chv	: <i>Chromosomal Virulance</i>
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i>
F-6-P	: fructose-6-phosphate
G-6-P	: Glucose-6-Phosphate
GA3	: <i>Gibberellic Acid</i>
<i>goi</i>	: <i>gene of interest</i>
GUS	: β - Glucoronidase
LB	: <i>Left Border</i>
LAF	: <i>Laminair Air Flow</i>
MS	: Murashige Skoog
nos	: <i>Nopaline synthase gene</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>
pKYS	: <i>Plasmid Keyko Sakakibara</i>
RB	: <i>Right Border</i>
RUBQ2	: <i>Rice polyubiquitin gene</i>
S-6-P	: <i>Sucrose-6-phosphate</i>
SDS	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SPP	: <i>Sucrose phosphate phosphatase</i>
SPS	: <i>Sucrose phosphate synthase</i>
SuSy	: <i>Sucrose Synthase</i>

<i>SoSPS1</i>	:	<i>Saccharum officinarum Sucrose phosphate synthase 1</i>
<i>SoSPS2</i>	:	<i>Saccharum officinarum Sucrose phosphate synthase 2</i>
T-DNA	:	<i>Transfer DNA</i>
TE	:	<i>tris-EDTA</i>
Ti-plasmid	:	<i>Tumor inducing plasmid</i>
Ubi-1	:	<i>Maize Ubiquitin</i>
U-DPG	:	<i>uridine diphosphate glucose</i>
UV	:	<i>Ultra Violet</i>
vir	:	<i>virulence</i>
YEP	:	<i>Yeast extract Pepton</i>