



**EFEKTIFITAS TRANSFORMASI GEN *SoSPS1* PADA TOMAT
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) MENGGUNAKAN KONSTRUK
PLASMID pCL4-*SoSPS1***

SKRIPSI

Oleh

**Mutik Mahtuhfatul Bariroh
NIM 071810401068**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2012**



**EFEKTIFITAS TRANSFORMASI GEN *SoSPS1* PADA TOMAT
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) MENGGUNAKAN KONSTRUK
PLASMID pCL4-*SoSPS1***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**Mutik Mahtuhfatul Bariroh
NIM 071810401068**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2012**

PERSEMBAHAN

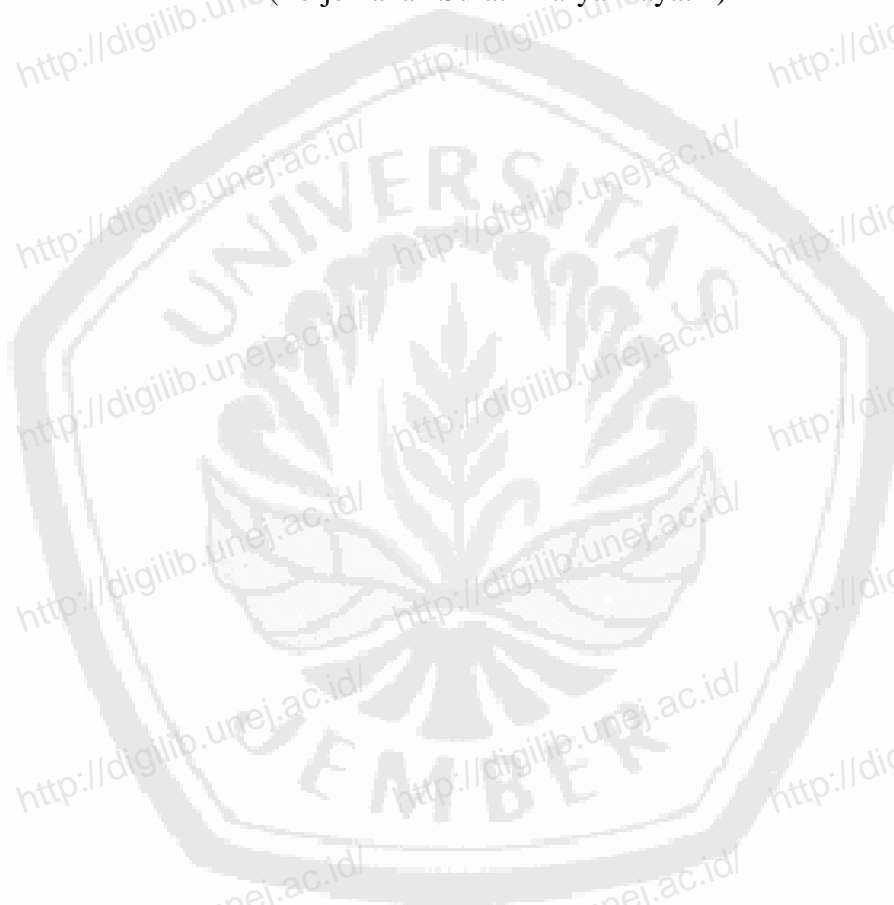
Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang serta Nabi Muhammad SAW junjungan seluruh umat manusia, kupersembahkan skripsi ini kepada:

1. Ibunda Muslihah dan Ayahanda Ali Mukhiyar, terima kasih yang tak terhingga atas segala pengorbanan, kasih sayang dan doa yang tiada henti;
2. kakak tersayang Masrurroh, Masita dan adik tercinta Zidnil Hasan Fadli atas motivasinya dan sebagai sumber semangat yang mengiringi setiap langkah;
3. keluarga besar yang telah begitu banyak memberikan dukungan dan dorongan serta semangat dalam menuntut ilmu;
4. para guru sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu, mendidik, membimbing dengan penuh ikhlas dan kesabaran, terima kasih yang tak terhingga atas ilmu yang engkau berikan;
5. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

Sesungguhnya tulangku telah lemah dan kepalaku telah ditumbuhi uban, dan aku belum pernah kecewa dalam berdoa kepada Engkau, ya Tuhanku.

(Terjemahan Surat Maryam ayat 4)



*)Departemen Agama Republik Indonesia.2009. Al-Quran dan Terjemahan. Jakarta Timur: CV. Pustaka Alkaustsar.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mutik Mahtuhfatul Bariroh

NIM : 071810401068

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “*Efektifitas Transformasi Gen SoSPSI Pada Tomat (Lycopersicon esculentum Mill.) Menggunakan Konstruksi Plasmid pCLA-SoSPSI*” 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 dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juli 2012

Yang Menyatakan,

Mutik Mahtuhfatul B
NIM. 071810401068

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “*Efektifitas Transformasi Gen SoSPS1 Pada Tomat (Lycopersicon Esculentum Mill.) Menggunakan Konstruksi Plasmid pCL4-SoSPS1*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penelitian ini dibiayai oleh MP3EI dan Dikti tahun 2011/2012 atas nama Bambang Sugiharto.

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

1. Prof.Dr.Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc selaku dosen pembimbing utama, Drs.Dwi Setyati M.Si. selaku dosen pembimbing anggota, yang telah meluangkan waktu, dan dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, saran, dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr.rer.nat.Kartika Senjarini S.Si., M.Si. dan Sattya Arimurti SP.M.Si. selaku dosen penguji atas masukan dan saran guna kesempurnaan penulisan skripsi ini;
3. Drs. Sutoyo M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikn saran dan bimbingan selama menjadi mahasiswa di Universits Jember;
4. kedua orang tua saya Ayahanda Ali Mukhiyar dan Ibunda Muslihah yang selalu memberikan doa, kasih sayang dan pengorbanan sepanjang perjalanan hidupnya sampai sekarang. Kakaku mas Kurniadi dan mbak Masita yang memberikan semangat, motivasi, dan dukungan moral maupun materil yang tiada henti-hentinya untuk menjadi orang yang lebih baik;
5. Purnama Okviandari, MP. yang telah memberikan masukan, dorongan dan semangat selama menjalankan tugas akhir.
6. para sahabat di LAB. Biologi Molekuler; Yahya Agung, Ahmad Fudhaili, Sheptyan Cristanto Sp, Ajie Baskoro, Anandang Ghani, Nina Oktaria, Triliani Farlisa, Aditya

Nurmalita P, Yunianzi Tiara P., Nurul Holifah, terima kasih atas seluruh perhatian, dukungan dan bantuannya dalam menyelesaikan penelitian ini;

7. seluruh sahabat seperjuangan Biologi angkatan 2007 yang telah menambah warna hidup selama ini;
8. keluarga kecilku dikosan Mayizah I. dan Inayatul A. terima kasih telah memberi semangat, perhatian dan bantuannya;
9. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu dan memberi semangat selama berjuang di kampus.

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 biologi.

Jember, Juli 2012

Penulis

SKRIPSI

**EFEKTIFITAS TRANSFORMASI GEN *SoSPS1* PADA TOMAT
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) MENGGUNAKAN KONSTRUK
PLASMID pCL4-*SoSPS1***

Oleh:

**MUTIK MAHTUHFATUL BARIROH
NIM. 071810401068**

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota: Dra.Dwi Setyati, M.Si

PENGESAHAN

Karya ilmiah skripsi berjudul “Transformasi Gen *SoSPSI* pada Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Menggunakan Konstruksi Plasmid pCLA-*SoSPSI*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Jember pada:

Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji

Ketua

Sekretaris

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

Dra. Dwi Setyati, M.Si.
NIP 196404171991032001

Anggota

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

Dr. rer.nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si.
NIP 19750913200002001

Sattya Arimurti, S.P., M.Si.
NIP 197403311999032001

Mengesahkan
Dekan,

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

RINGKASAN

Efektifitas Transformasi Gen *SoSPS1* pada Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Menggunakan Konstruk Plasmid pCL4-*SoSPS1* : Mutik Mahtuhfatul Bariroh, 071810401068; 2012, 37 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Transformasi genetik dengan *Agrobacterium tumefaciens* merupakan salah satu teknik pemuliaan tanaman yang umum banyak dikembangkan. Kelebihan transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* dibandingkan dengan *particle bombardment* dan *electroporation* yaitu lebih efektif, murah, mudah digunakan dan jumlah salinan DNA yang dapat di masukkan sedikit (Lessard *et al.*, 2002). Transformasi genetik pada tanaman tomat telah dilakukan untuk meningkatkan kandungan sukrosa pada tanaman tomat (Worrell *et al.*, 1991). Ketersediaan gen *sucrose phosphate synthase* (SPS) tebu yang berhasil dikloning (Sugiharto, 1997) dapat digunakan untuk transformasi gen *SoSPS1* pada tanaman tomat. Efisiensi transformasi genetik dengan *Agrobacterium tumefaciens* ditentukan oleh promotor dan spesifikasi plasmid vektor yang digunakan. Pada saat ini telah tersedia konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* yang dikendalikan oleh promotor RUBQ2 yang mengendalikan gen *SoSPS1*. Tetapi transformasi gen *SoSPS1* dengan konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* yang dikendalikan dengan promotor RUBQ2 masih belum diketahui efektifitasnya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas transformasi gen *SoSPS1* yang dikonstrak pada plasmid pCL4-*SoSPS1* yang dikendalikan oleh promotor RUBQ2 dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*.

Plasmid yang akan digunakan untuk transformasi sebelumnya dilakukan pengecekan atau konfirmasi keberadaan konstruk plasmid untuk mengetahui *Agrobacterium tumefaciens* yang digunakan sebagai vektor telah positif membawa gen *SoSPS1*. Konfirmasi diawali dengan mengisolasi DNA plasmid menggunakan

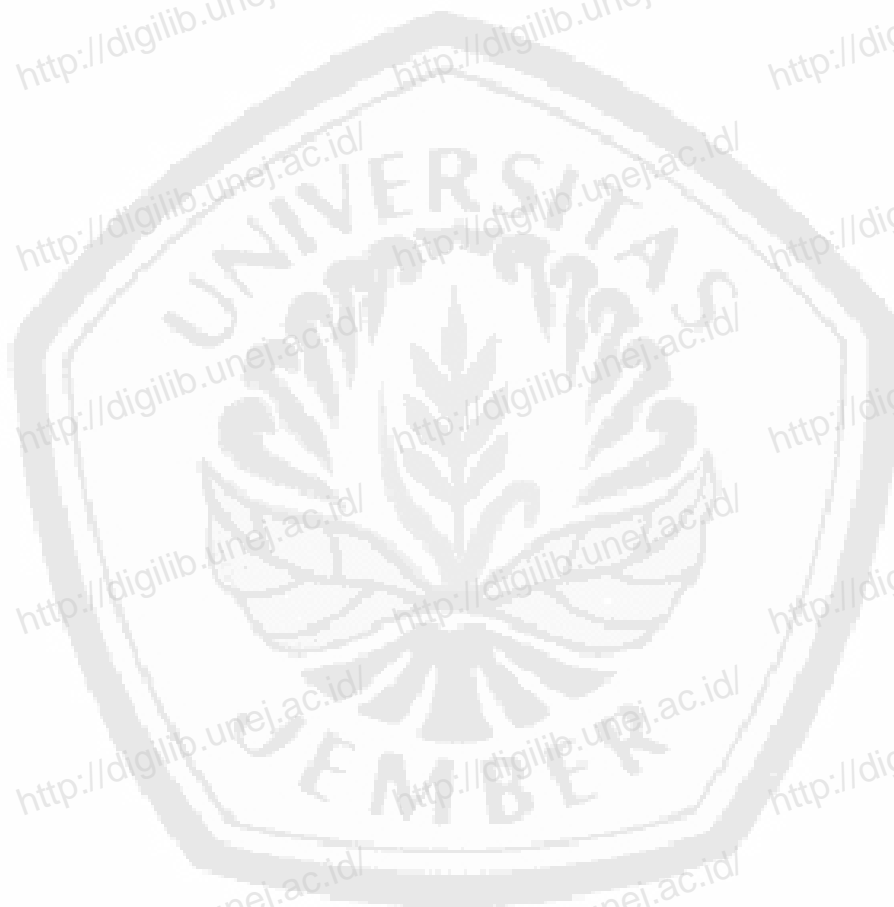
metode *alkaline lysis* (Sambrook, 1989), yang selanjutnya hasil isolasi plasmid yang mengandung konstruk pCL4-*SoSPSI* digunakan sebagai DNA *template* pada analisis PCR (*polymerase chain reaction*). Tahapan awal dari proses transformasi yaitu persiapan eksplan, kokultivasi, eliminasi, dan seleksi, selanjutnya aklimatisasi. Tanaman putativ transforman yang dihasilkan selanjutnya dianalisis PCR untuk mengetahui keberhasilan transformasi dan dilanjutkan dengan analisis *western blot* untuk mengetahui protein SPS yang terbentuk.

Berdasarkan hasil analisis dengan metode PCR dan amplifikasi menggunakan sinar UV konfirmasi DNA plasmid diperoleh fragmen DNA dengan panjang ± 600 bp yang sesuai dengan primer yang digunakan. Berdasarkan hasil ini maka *A. tumefaciens* strain GV3101 dapat digunakan sebagai vektor transformasi karena terbukti telah mengandung plasmid pCL4-*SoSPSI* sebagai gen interest untuk transformasi pada eksplan epikotil. Presentase jumlah planlet yang mampu bertahan pada media seleksi sampai seleksi ke-5 dari transformasi pertama yaitu dihasilkan 9.67%, transformasi kedua 9.09% dan transformasi ketiga dihasilkan 56.7%. Planlet putative transforman tomat varietas zamrud hasil transformasi dengan *A. tumefaciens* GV3101 pCL4-*SoSPSI* berhasil diaklimatisasi yaitu total sebanyak 22 planlet dari tiga kali transformasi. Berdasarkan hasil analisis PCR diperoleh 10 tanaman tomat transforman yang positif mengandung gen *SoSPSI* yaitu tanaman nomor 7, 9, 10 dan 12, 22, 25, 26 dan 27. Hasil ini menunjukkan bahwa efektifitas dari plasmid pCL4-*SoSPSI* dalam menghasilkan tanaman transforman sebesar 15,87%. Hasil analisis *western blot* menunjukkan bahwa didapatkan pita protein dengan intensitas ketebalan protein SPS yang terbentuk lebih tebal jika dibandingkan dengan tanaman tomat kontrol. Hal ini menunjukkan terjadi over ekspresi gen *SoSPSI* pada tanaman tomat transforman yang dihasilkan.

DAFTAR ISI

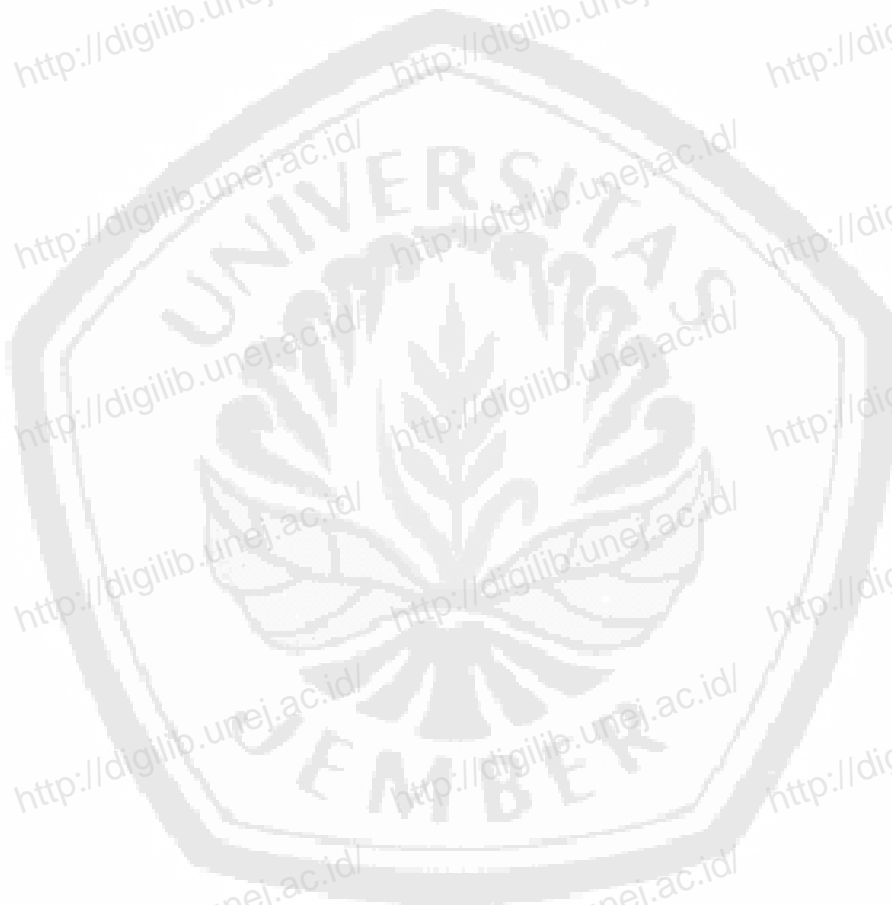
	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	ii
HALAMAN MOTTO.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN.....	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
DAFTAR ISTILAH.....	xvi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Trasformasi Genetik dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Pada Tomat (<i>Lycopersycon esculentum</i> Mill.).....	4
2.2 Kultur <i>In vitro</i> Tanaman Tomat.....	7
2.3 Promoter dan Gen Penyeleksi.....	8
2.4 Sucrose Phosphate Synthase (SPS) pada Tanaman.....	9
2.5 Hipotesis.....	11

BAB III. METODE PENELITIAN.....	12
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	12
3.2 Bahan dan Alat.....	12
3.3 Prosedur Kerja.....	12
3.3.1 Pembuatan Media.....	12
3.3.2 Persiapan Eksplan.....	13
3.3.3 Persiapan <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
3.3.4 Isolasi DNA Plasmid.....	14
3.3.5 Tahapan Transformasi	16
3.3.6 Aklimatisasi.....	17
3.3.7 Isolasi DNA Genom Tanaman Putative Transforman	17
3.3.8 Analisis <i>Polimerase Chain Rection</i> (PCR).....	18
3.3.9 Analisis Protein SPS dengan Western Blot.....	18
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	20
4.1 Persiapan Eksplan Tanaman Tomat.....	20
4.2 Konfirmasi Gen <i>SoSPS1</i> dalm <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
4.3 Transformasi <i>Gen SoSPS1</i> Pada Tanaman Tomat	21
4.3.1 Infeksi dan kokultivasi.....	21
4.3.2 Eliminasi dan Seleksi.....	22
4.4 Aklimatisasi Tanaman Tomat in vitro.....	25
4.5 Hasil Analisis PCR Tanaman Tomat Putatif Transforman Gen	25
<i>SoSPS1</i>.....	26
4.6 Analisis Western Blot.....	27
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	29
5.1 Kesimpulan.....	29
5.2 Saran.....	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30
LAMPIRAN.....	36



DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1. Presentase Jumlah Eksplan yang Tahan Terhadap Kanamisin pada Media Seleksi.....	24

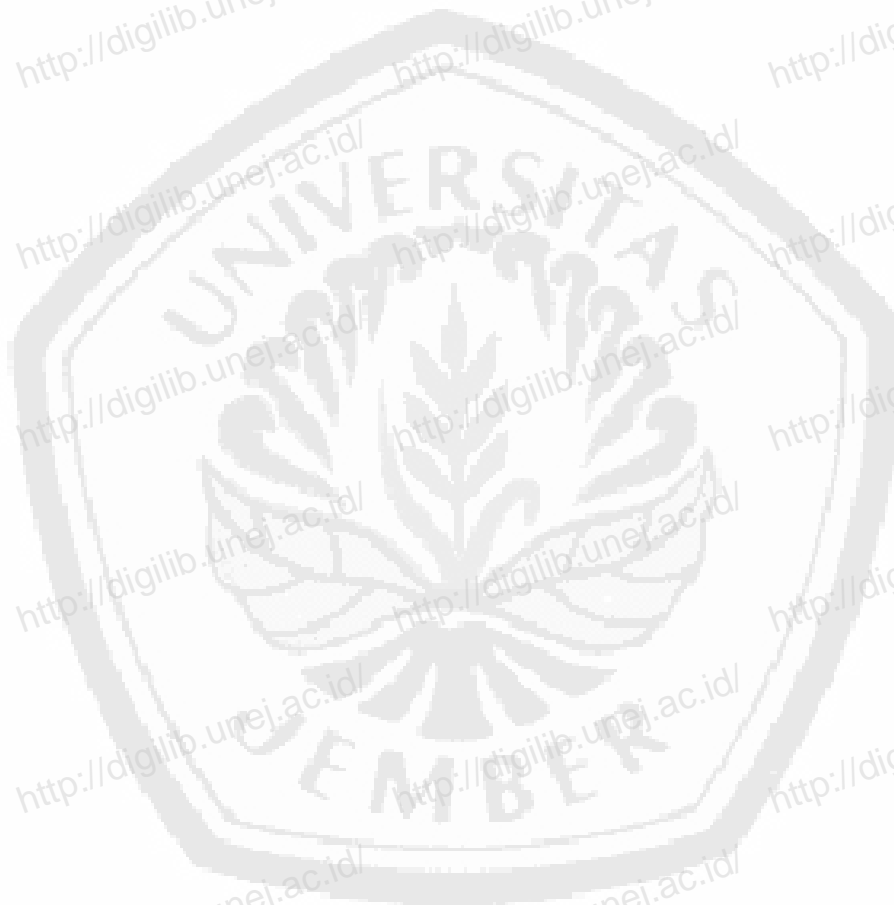


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Plasmid Ti dari <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
Gambar 2.2 Mekanisme transfer T-DNA dari <i>A.tumefaciens</i> ke dalam sel tanaman.....	6
Gambar 2.3 Jalur sintesis sukrosa yang dikatalisis oleh SPS.....	10
Gambar 3.1 Peta konstruksi plasmid pCL4- <i>SoSPS1</i> . LB: left border, RB: right border, nos: <i>nopaline synthetase gene</i> (0.3 kb), npt II: <i>neomycin phosphotransferase gene</i> (0.9 kb), Ubi-1: maize ubiquitin promoter (2.0 kb), <i>SoSPS</i> : <i>Saccharum officinarum</i> sucrose phosphate synthase gene, RUBQ2: rice ubiquitin promoter (2.7 kb). Site restriction enzim X: XhoI, Bg: Bgl II, P: Pst I, H: HindIII, S: SmaI, B:BamHI, E: EcoRI, K: KpnI, N: NcoI.	14
Gambar 4.1 Persiapan eksplan yang digunakan untuk transformasi. A. biji dikeringkan di atas kertas saring steril, B.biji di tanam pada media MSo, C, D. kecambah biji tomat umur 7 hari dan 14 hari, E. epikotil dari kecambah umur 14 hari yang digunakan sebagai eksplan transformasi.....	20
Gambar 4.2 1. DNA marker (intron biotechnology). 2. Hasil PCR plasmid pCL4- <i>SoSPS1</i> dengan menggunakan pasangan primer SPS diperoleh fragmen DNA sebesar ± 600 bp.....	21
Gambar 4.3 Eksplan pada media kokultivasi yang mengandung asetosiringon 25 ppm.....	22
Gambar 4.4 Eksplan pada media eliminasi yang mengandung antibiotik cefotaxime 500 ppm.....	22
Gambar 4.5 A. Eksplan pada media seleksi 1, B. Seleksi 2, C. Seleksi 3, D. Seleksi 4 E. Seleksi 5, F. Eksplan pada media MSo (media pengakaran).....	23
Gambar 4.6 A.Eksplan pada media seleksi yang mengalami <i>overgrowht</i> <i>A. tumefaciens</i> , B. Eksplan menguning akibat nekrosis pada jaringan.....	25
Gambar 4.7 Pertumbuhan tanaman putative transforman setelah aklimatisasi. A.Tanaman umur 1 minggu, B.Tanaman umur 2 minggu, C.Tanaman umur 3 minggu, D.Tanaman umur 40 hari.....	26
Gambar 4.8 Elektroforesis DNA hasil PCR dengan menggunakan pasangan primer nptII-F/R dan template DNA genomik tomat putatif transforman. M: Marker DNA 1 kb (Intron Biotechnology); K+: plasmid pCL4- <i>SoSPS1</i> ; K- : tanaman kontrol (non transforman); angka 2-27: sampel tanaman.....	27
Gambar 4.9 Hasil analisis <i>Western blot</i> protein SPS1 tanaman transforman pCL4- <i>SoSPS1</i> menggunakan antibodi spesifik SPS1.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Komposisi Media <i>Murashige and Skoog</i>	36
2. Komposisi Media Transformasi.....	37



DAFTAR ISTILAH

BCIP	: <i>5 bromo 4 chloro 3 indolyl phosphate disodium salt</i>
CaMV	: <i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	: <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
NOS	: <i>Nopaline synthase gene</i>
MS	: <i>Murashige skoog</i>
NBT	: <i>Nitro blue tetrazolium chloride</i>
Npt II	: <i>The neomycin phosphotransferase gene</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RUBQ2	: <i>Rice ubiquitin</i>
T-DNA	: <i>Transfer deoxyribonucleic acid</i>
Ti plasmid	: <i>Tumor inducing plasmid</i>
SDS-PAGE	: <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis</i>
SoSPS	: <i>Saccharum officinarum Sucrose Phosphate Synthase</i>
Ubi-1	: <i>Maize Ubiquitin</i>
YEP	: <i>Yeast extract pepton</i>