



**TRANSFORMASI GEN *SoSUTI* MENGGUNAKAN  
*Agrobacterium tumefaciens* DAN EKSPLAN TUNAS LATERAL  
PADA TANAMAN TEBU  
(*Saccharum spp. hybrid*)**

**SKRIPSI**

Oleh:

**Anandang Ganni Wiyono  
061510101069**

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



**TRANSFORMASI GEN *SoSUTI* MENGGUNAKAN  
*Agrobacterium tumefaciens* DAN EKSPLAN TUNAS LATERAL  
PADA TANAMAN TEBU  
(*Saccharum spp. hybrid*)**

**SKRIPSI**

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

**Oleh:**

**Anandang Ganni Wiyono  
061510101069**

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

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anandang Ganni Wiyono

NIM : 061510101069

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Transformasi Gen *SoSUT1* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Lateral Pada Tanaman Tebu (*Saccharum spp. hybrid*)”** 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, 05 Juni 2012

Yang menyatakan,

Anandang Ganni Wiyono

NIM. 061510101069

**SKRIPSI**

**TRANSFORMASI GEN *SoSUTI* MENGGUNAKAN  
*Agrobacterium tumefaciens* DAN EKSPAN TUNAS LATERAL  
PADA TANAMAN TEBU  
(*Saccharum spp. hybrid*)**

**Oleh:**

**Anandang Ganni Wiyono  
061510101069**

**Pembimbing:**

**Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS.**

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

## PENGESAHAN

Karya ilmiah skripsi berjudul “Transformasi Gen *SoSUTI* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Lateral Pada Tanaman Tebu (*Saccharum spp. hybrid*)” telah diuji dan disahkan pada :

Hari : Selasa

Tanggal : 05 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

Tri Handoyo, SP., Ph.D.  
NIP.19711202 199802 1 001

Mengesahkan

Dekan,

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

## RINGKASAN

**Transformasi Gen *SoSUT1* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Lateral Pada Tanaman Tebu (*Saccharum spp. hybrid*)**  
Anandang Ganni W. 061510101069. 2012. Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Sukrosa merupakan hasil fotosintesis di daun yang ditranslokasikan keseluruhan jaringan tanaman (dari *source* ke *sink*). Proses translokasi keseluruhan jaringan tanaman ini difasilitasi oleh suatu *carrier protein* yang disebut *sucrose transporter* (SUT). SUT merupakan suatu protein membran yang keberadaannya pada tanaman dibedakan menjadi tiga subfamily besar yaitu SUT1, SUT2, dan SUT4. SUT1 memiliki afinitas yang tinggi dibandingkan dengan SUT4, sedangkan SUT2 afinitasnya hampir tidak dapat terdeteksi.

Transformasi gen *SoSUT1* dilakukan pada eksplan tebu dikarenakan tanaman tebu merupakan tanaman industri utama yang sangat produktif. Proses transformasi yang digunakan pada umumnya menggunakan *vector Agrobacterium tumefaciens*, yang merupakan bakteri tular tanah yang mampu menstansfer bagian T-DNA plasmid ke dalam genom tanaman sehingga menyebabkan penyakit *crown gall*. Kemampuan T-DNA menyisip ke dalam genom tanaman inilah yang menyebabkan beberapa peneliti melakukan rekayasa untuk menyisipkan *gen of interest (SoSUT1)* pada sequence T-DNA dengan menghilangkan gen pengkode penyakit *crown gall*. Pada penelitian ini gen *SoSUT1* dikonstruksi dalam plasmid *pAct* bakteri *A. tumefaciens* strain GV 3101. *SoSUT1* yang diinsersikan ke dalam genom tebu diharapkan akan mampu meningkatkan akumulasi sukrosa yang lebih tinggi pada batangnya (*sink*).

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium BIOSAIN Politeknik Negeri Jember dan Laboratorium Biologi Dasar, Fakultas MIPA, Universitas Jember pada bulan Agustus 2010 sampai Januari 2012. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain; tunas lateral tanaman tebu (*Saccharum spp. hybrid*) cv BL, *A. tumefaciens* strain GV 3101, gen *SoSUT1* dalam plasmid, media YEP (*yeast-extract peptone*), media MS (Murashige Skoog), *primer F/R hptII*, dan PCR Master mix (Roche). Tahapan penelitian yang dilakukan, 1). konfirmasi binary plasmid *pAct:SoSUT1* di dalam *A. tumefaciens* menggunakan metode PCR dengan

menggunakan *primer F/R hptII*, 2). perbanyakkan eksplan tunas lateral tebu, 3). transformasi gen *SoSUT1* pada eksplan tebu *in vitro*, 4). konfirmasi konstruk gen *SoSUT1* di dalam genom tanaman tebu dengan menggunakan *primer F/R hptII*.

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, 2). transformasi gen *SoSUT1* pada eksplan tebu menghasilkan persentase tanaman putatif transforman sebesar 7 %, 3). konstruk gen *SoSUT1* telah terintegrasi ke dalam genom tanaman tebu. Berdasarkan hasil analisis menggunakan metode PCR dengan dua pasang primer menunjukkan pita DNA pada panjang 470 bp.

## SUMMARY

**Transformasi Gen *SoSUT1* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Lateral Pada Tanaman Tebu (*Saccharum spp. hybrid*)**  
Anandang Ganni W. 061510101069. 2012. Department of Agronomy, Agriculture Faculty, University of Jember.

Sucrose is the primary product of photosynthesis processed in leaves which is translocated to the entire of plant tissues (from source to sink). The translocation process is facilitated by a carrier protein which is called Sucrose Transporter (SUT). SUT is defined as a membrane protein which its existence in a plant is divided into three big subfamilies, they are: SUT1, SUT2, and SUT4. SUT1 has a higher affinity than SUT4, whereas the affinity of SUT2 is hardly to be detected.

The transformation of *SoSUT1* gen is applied on sugar cane explants since sugar cane plant becomes a major industrial plant which is very productive. Generally, the transformation process uses *Agrobacterium tumefaciens* vector, a soil infect bacteria that is able to transfer the T-DNA plasmid into plant genome that causes crown gall disease. The capability of T-DNA to insert into plant genome is the reason why some researchers do engineer to insert gen of interest (*SoSUT1*) into T-DNA sequence by removing encoded gen crown gall disease. In this study, the (*SoSUT1*) gen is constructed in pAct plasmid of *A. tumefaciens* strain GV 3101 bacteria. The (*SoSUT1*) gen which is inserted into sugar cane genome is expected to be able to increase the accumulation of sucrose which is higher in stalk (sink).

This study was conducted in the BIOSAIN laboratory, State Polytechnics of Jember and the Basic Biology Laboratory, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Jember University from August 2010 until January 2012. The materials used in this study are: axillary buds of sugar cane plant (*Saccharum spp. hybrid.*) cv BL, *A. tumefaciens* GV 3101, *SoSUT1* gen in plasmid, YEP (Yeast-extract peptone) media, MS (Murashige Skoog) media, Primer F/R *hptII*, and PCR Master Mix (Roche). The stages of experiment conducted in this study are: 1). The confirmation of pAct: *SoSUT1* binary plasmid in *A. tumefaciens* uses PCR method by using Primer F/R *hptII*, 2). The multiplication of axillary bud explants of sugar cane, 3). The transformation of *SoSUT1* gen on sugar cane explants in vitro, 4). The construct confirmation of *SoSUT1* gen in sugar cane plant genome by using Primer F/R *hptII*.

The result of this study shows that 1). The pAct: *SoSUT1* binary plasmid was integrated into *A. tumefaciens*. The result of the analysis by using PCR method with two pairs of primers shows DNA band 470 bp in length, 2). The *SoSUT1* gen transformation on sugar cane explants produces percentage of transformer putative plant by 7%, 3). The construct of *SoSUT1* gen was integrated into sugar cane plant genome. The result of the analysis by using PCR method with two pairs of primer shows DNA band 470 bp in length..



## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Transformasi Gen *SoSUTI* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Lateral Pada Tanaman Tebu (*Saccharum spp. hybrid*)”. Penelitian ini dibiayai oleh “PT. Perkebunan XI (Persero) Surabaya untuk Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr, Sc tahun 2011-2012”.

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

1. Ayahanda Agus Wiyono, Ibunda Andriyani, Adikku Aina Sukma Wiyani serta Nenekku Bushina tercinta, yang selalu memberikan doa, kasih sayang, semangat, dan motivasi sepanjang perjalanan hidupku sampai sekarang.
2. Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc., Tri Handoyo, SP. Ph.D., dan Netty Ermawati, Ph.D., selaku dosen pembimbing yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, saran, dan bimbingan dalam penelitian maupun penulisan skripsi ini.
3. Laboratorium Terpadu BIOSAIN Politeknik Negeri Jember dan Laboratorium Biologi Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember sebagai tempat penelitian.
4. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

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

Penulis

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	v
<b>RINGKASAN</b> .....	vi
<b>SUMMARY</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	ix
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xiii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xiv
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan dan Manfaat .....	4
1.3.1. Tujuan .....	4
1.3.2. Manfaat .....	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
2.1 Tebu ( <i>Saccharum spp. hybrid</i> ) varietas BL .....	5
2.2 Sucrose Transporter (SUT) .....	6
2.3 Transformasi dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	8
2.4 Hipotesis .....	11
<b>BAB III. METODE PENELITIAN</b> .....	12
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	12
3.2 Bahan dan Alat .....	12
3.3 Prosedur Penelitian .....	12
3.4 Pelaksanaan .....	12
3.4.1 Penyediaan Tunas Lateral Sebagai Eksplan .....	12
3.4.2 Persiapan Bakteri <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dan Pembuatan Starter .....	13
3.4.3 Transformasi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dan Ko-kultivasi .....	14

3.4.4	Eliminasi .....	14
3.4.5	Pengamatan Terhadap Tanaman Transforman .....	14
3.4.6	Aklimatisasi .....	15
3.4.7	Isolasi DNA Genom Tanaman Transforman .....	15
3.4.8	Desain Primer dan Analisis PCR .....	16
<b>BAB IV.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>18</b>
4.1	Konfirmasi Keberadaan Plasmid pAct dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Transforman .....	18
4.2	Transformasi Tunas Lateral Tebu dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> yang membawa gen <i>pAct-SoSUT1</i> .....	20
4.3	Aklimatisasi Planlet Putatif Transforman .....	26
4.4	Analisis PCR Tebu Putatif Transforman <i>Overekspresi</i> Gen <i>SoSUT1</i> .....	27
<b>BAB V.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>30</b>
5.1	Kesimpulan .....	30
5.2	Saran .....	30
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>31</b>
	<b>LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR TABEL

	<b>Halaman</b>
4.1. Hasil Transformasi ke-1 .....	23
4.2. Hasil Transformasi ke-2 .....	24
4.3 Hasil Transformasi ke-3 .....	25

## DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
1. Transformasi T-DNA dari sel <i>A. tumefaciens</i> ke sel tanaman.....	11
2. Peta konstruk plasmid pAct yang mengandung cDNA <i>SoSUT1</i> pada strain bakteri GV 3101 dan plasmid pAct .....	13
4.1. Hasil elektroforesis PCR produk DNA plasmid GV 3101 - <i>pAct SoSUT1</i> menggunakan (a) primer 2F/2R SUT dan (b) primer F/R <i>nptII</i> .....	19
4.2 Hasil elektroforesis PCR produk DNA plasmid <i>pAct SoSUT1</i> menggunakan (a) primer 2F/2R SUT dan (b) primer F/R <i>hptII</i> .....	19
4.3 Hasil elektroforesis PCR produk DNA plasmid GV 3101- <i>pAct SoSUT1</i> menggunakan primer F/R <i>hptII</i> .....	20
4.4 Hasil perbanyakan eksplan tunas lateral tebu.....	21
4.5 Perbedaan tahap perkembangan eksplan pada media seleksi antara yang ditransformasi dan tidak ditransformasi .....	22
4.6 Planlet hasil seleksi .....	23
4.7 Pengaruh <i>overgrowth</i> bagi eksplan.....	24
4.8 Aklimatisasi.....	26
4.9 Hasil PCR meggunakan Primer (F/R) <i>hptII</i> pada tanaman putative transforman setelah diaklimatisasi.....	28

## DAFTAR LAMPIRAN

	<b>Halaman</b>
Lampiran 1 Komposisi Media Stock .....	36
Lampiran 2 Komposisi Media Transformasi .....	37

## DAFTAR SINGKATAN

bp	: <i>basepair</i>
cDNA	: <i>Complementary deoxyribose nucleic acid</i>
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<i>goi</i>	: <i>gene of interest</i>
<i>hptII</i>	: <i>hygromycin phosphotransferaseII</i>
LB	: <i>Left Border</i>
MS	: <i>Murashige Skoog</i>
<i>pAct</i>	: <i>Plasmid actin</i>
PCI	: <i>Phenol Chloroform Isoamylalcohol</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RB	: <i>Right Border</i>
SPP	: <i>Sucrose phosphate phosphatase</i>
<i>SoSUT1</i>	: <i>Saccharum officinarum Sucrose transporter 1</i>
SUCs	: <i>sucrose carriers</i>
<i>SuSy</i>	: <i>sucrose 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>
vir	: <i>virulence</i>
YEP	: <i>Yeast extract Pepton</i>