



**TRANSFORMASI GEN *NPTII* VEKTOR pCL4 DENGAN
Agrobacterium tumefaciens PADA TANAMAN TEBU
(*Saccharum officinarum* L.)**

SKRIPSI

Oleh

**Moch. Ayub Afandi
NIM. 021510101075**

**JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2007**



**TRANSFORMASI GEN *NPTII* VEKTOR pCL4 DENGAN
Agrobacterium tumefaciens PADA TANAMAN TEBU
(*Saccharum officinarum* L.)**

SKRIPSI

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

Oleh

**Moch. Ayub Afandi
NIM. 021510101075**

**JURUSAN BUDIDAYA PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2007**

SKRIPSI

**TRANSFORMASI GEN *NPTII* VEKTOR pCL4 DENGAN
Agrobacterium tumefaciens PADA TANAMAN TEBU
(*Saccharum officinarum* L.)**

Oleh

Moch. Ayub Afandi

NIM. 021510101075

Pembimbing

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

Pembimbing Anggota : Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr.Sc., Ph.D.

PENGESAHAN

Karya ilmiah (Skripsi) berjudul **Transformasi Gen *nptII* Vektor pCL4 dengan *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.)** telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian pada:

Hari : Kamis
Tanggal : 21 Juni 2007
Tempat : Fakultas Pertanian

Tim Penguji
Ketua,

Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS.
NIP. 132 095 706

Anggota I,

Anggota II,

Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr.Sc., Ph.D.
NIP. 132 207 406

Ir. Boedi Santoso, MP.
NIP. 131 658 018

Mengesahkan
Dekan,

Prof. Dr. Ir. Endang Budi Trisusilowati, MS.
NIP. 130 531 982

RINGKASAN

Transformasi Gen *nptII* Vektor pCL4 dengan *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.); Moch. Ayub Afandi, 021510101075; 2007; 20 halaman; Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Transformasi gen pada tanaman merupakan upaya memanipulasi sifat genetik dengan cara mentransfer gen yang diisolasi dari organisme (tanaman, virus, bakteri) ke dalam inti sel tanaman untuk mendapatkan sifat-sifat unggul dan yang menguntungkan pada tanaman. *A. tumefaciens* merupakan salah satu media transfer gen ke dalam tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui metode transformasi gen *nptII* vektor pCL4 pada tanaman tebu dengan *A. tumefaciens* dan respon tanaman tebu putative transforman terhadap media seleksi antibiotik geneticin.

A. tumefaciens merupakan bakteri tanah (*soil borne pathogen*) yang dapat menginfeksi tanaman pada kondisi luka dan menyebabkan tumor (*crown gall*), yaitu suatu gumpalan atau kalus jaringan tumor yang tumbuh pada tempat terjadinya infeksi. Secara alami bakteri *A. tumefaciens* hanya menginfeksi tanaman dari kelompok dikotil. Tetapi, saat ini telah banyak tanaman monokotil yang berhasil ditransformasi dengan bakteri *Agrobacterium* dengan melakukan beberapa modifikasi.

Penelitian dimulai dengan pembuatan planlet tebu dari *axillary bud* tebu var. M442 yang ditumbuhkan pada media kultur MS dengan ZPT BA 0,1 mg/l dan kinetin 0,2 mg/l. Selanjutnya, adalah tahapan pengkulturan *Agrobacterium* pada media YEP (*yeast extract peptone*) dengan antibiotik kanamycin 50 mg/l dan rifampicin 100 mg/l selama 2 hari digojog dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28 °C. Kultur *Agrobacterium* kemudian disubkultur pada media yang sama dan digojog 150 rpm pada suhu 28 °C sampai didapatkan nilai OD₆₀₀ = 0,5–1,0. Infeksi *Agrobacterium* dilakukan pada planlet tebu yang dilukai pada pangkal batang dan ditanam pada media kokultivasi (MS padat dengan acetosyringone 100 mg/l pada kondisi gelap selama 3 hari). Eliminasi *Agrobacterium* dilakukan pada

media MS padat dengan cefotaxime 500 mg/l selama 10-14 hari. Seleksi dan regenerasi planlet tebu putative transforman dilakukan pada media MS padat dengan cefotaxime 500 mg/l dan geneticin 50 mg/l.

Hasil penelitian menunjukkan tanaman tebu putative transforman mampu tumbuh dan beregenerasi pada media seleksi selama empat siklus sebesar 3,3%, dengan 14 hari pada tiap-tiap siklusnya. Hal ini disebabkan bahwa gen *nptII* vektor pCL4 yang ditransfer oleh bakteri *Agrobacterium* diduga telah terintegrasi dengan genom DNA pada planlet tebu.

SUMMARY

Transformation of Gene *nptII* Vector pCL4 by *Agrobacterium tumefaciens* at Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.); Moch. Ayub Afandi, 021510101075; 2007; 20 pages; Agronomy Departement Agriculture Faculty Jember University.

Gene transformation in plant is an effort to manipulate genetic characteristic with gene transferring from organism (plant, virus, bacteria) into plant nucleus to get pre eminent and profitable characteristics to the plant. *A. tumefaciens* are one of gene transferring media to the plant. The objective of the research is to understand transformation method of gene *nptII* vector pCL4 at sugarcane with *A. tumefaciens* and the response of sugarcane putative transformer with geneticin selection.

A. tumefaciens is an soil borne pathogen that can infection plant in wounding condition and it was cause of tumor (*crown gall*). Naturally, *A. tumefaciens* can infection of dicotil plant only. Recently, there is much monocot that can be transformed by *Agrobacterium* with some modification.

The planlet of this research from *axillary bud* of M442 variety that it was grown in MS culture media with BA 0,1 mg/l and kinetin 0,2 mg/l. Next step, it was culturing *Agrobacterium* step at YEP media (*yeast extract peptone*) by kanamycin 50 mg/l and rifampicin 100 mg/l during 2 days shaking by 150 rpm at temperature 28 °C. *Agrobacterium* culture then subcultured at the same media and shaking by using 150 rpm at temperature 28 °C until OD₆₀₀ = 0,5–1,0. *Agrobacterium* infection was done at sugarcane planlet that was hurt at the jetty of branch and it was planted at cocultivasi media (solid MS with acetosyringone 100 mg/l at dark condition for about 3 days). *Agrobacterium* elimination was done at MS media with cefotaxime 500 mg/l for 10-14 days. Selection and regeneration of planlet sugarcane putative transforman was done at MS media with cefotaxime 500 mg/l and geneticin 50 mg/l.

The result of the research shows that sugarcane putative transformer can be grown and regenerate at *Agrobacterium* media selection during four cycle as much as 3,3%, by 14 days at each cycles it was caused by *nptII* gene pCL4 vector

transferred by *Agrobacterium* bacteria it is anticipated has already integrated with DNA genome at sugarcane planlet.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Transformasi Gen *nptII* Vektor pCL4 dengan *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L.)**”. Penelitian ini didanai oleh Proyek Penelitian Hibah Pasca XII DIKTI “Perakitan Varietas Tebu Produktivitas Gula Tinggi Melalui Rekayasa Genetika” tahun anggaran 2006.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Keluarga besar Mustahal Ponco (Alm.), Bapak Marsekan dan Ibu Kifayah, Mbak Lissa, Mas Aan, dan Angga “kentang” atas dukungan spiritual dan materialnya,
2. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc. sebagai Ketua Tim Hibah Pasca XII DIKTI,
3. Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, MS. sebagai Dosen Pembimbing Utama, Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr.Sc., Ph.D. sebagai Dosen Pembimbing Anggota I, dan Ir. Boedi Santoso, MP. sebagai Dosen Pembimbing Anggota II yang telah memberikan bimbingan dan arahan dalam menyelesaikan skripsi,
4. Prof. Dr. Ir. Endang Budi Trisusilowati, MS. sebagai Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember dan Ir. Bambang Kusmanadhi, M.Sc. sebagai Ketua Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Jember,
5. Keluarga besar Biologi Molekul Universitas Jember, Agro’02 *community*, dan semua pihak yang telah memberikan motivasi hingga penulisan skripsi ini selesai.

Segala kesempurnaan hanyalah milik Allah SWT, kritik dan saran dari pembaca akan menjadi masukan bagi penulis.

Jember, Juli 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PEMBIMBING	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
RINGKASAN	iv
SUMMARY	vi
PRAKATA	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Transformasi Gen pada Tanaman	3
2.2 Bakteri <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	4
2.3 Transformasi Gen pada Tanaman dengan <i>A. tumefaciens</i>	4
2.4 Gen Penyeleksi untuk Studi Ekspresi Gen Tanaman Transforman	6
BAB 3. METODE PENELITIAN	7
3.1 Waktu dan Tempat	7
3.2 Bahan dan Alat	7
3.3 Metode	7

3.3.1	Persiapan Planlet	7
3.3.2	Pengkulturan <i>Agrobacterium</i>	7
3.3.3	Infeksi dan Kokultivasi	8
3.3.4	Eliminasi <i>Agrobacterium</i>	8
3.3.5	Seleksi dan Regenerasi Planlet Tebu Putative Transforman	8
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	9
4.1	Tanaman Tebu <i>In Vitro</i> (Planlet) Var. M442	9
4.2	Transformasi Gen dengan <i>A. tumefaciens</i>	10
4.3	Eliminasi Bakteri <i>A. tumefaciens</i>	11
4.4	Seleksi dan Regenerasi Planlet Tebu Putative Transforman	12
BAB 5.	SIMPULAN	17
DAFTAR PUSTAKA	18

DAFTAR TABEL

Nomor	Judul	Halaman
4.1	Prosentase planlet hidup setelah diinfeksi dengan <i>A. tumefaciens</i> strain EHA105 vektor pCL4.	15

DAFTAR GAMBAR

Nomor	Judul	Halaman
2.1	Infeksi <i>A. tumefaciens</i> ke dalam sel tanaman	5
4.1	Planlet tebu <i>in vitro</i> var. M442	9
4.2	Planlet tebu pada media kokultivasi	11
4.3	Planlet tebu pada media eliminasi <i>A. tumefaciens</i>	12
4.4	Planlet tebu pada media seleksi geneticin 50 mg/l	14
4.5	Peta konstruksi vektor pCL4	14
4.6	Pengaruh geneticin 50 mg/l pada planlet tebu	16