



**TRANSFORMASI GENETIK TANAMAN TOMAT DENGAN  
MUTAN GEN *SoSPS1-S424A* MELALUI  
*Agrobacterium tumefaciens***

**SKRIPSI**

Oleh  
**Wilujeng Rahayu**  
**NIM 121810401057**

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

**2017**



**TRANSFORMASI GENETIK TANAMAN TOMAT DENGAN  
MUTAN GEN *SoSPS1-S424A* MELALUI  
*Agrobacterium tumefaciens***

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Wilujeng Rahayu**

**NIM 121810401057**

**JURUSAN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2017**

## PERSEMBAHAN

Dengan nama Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini penulis persembahkan kepada:

1. Ibunda Djumianah dan Ayahanda Paimin yang telah memberikan kasih sayang, pengorbanan, dan doa yang selalu mengiringi perjalanan hidup saya;
2. kakak tersayang Yudi Herianto dan Rini Sutiyowati serta keponakan tersayang Amir Yusuf Al Farisi atas motivasi, semangat dan pembelajaran hidup;
3. semua guru dan dosen dari sekolah dasar hingga perguruan tinggi yang telah mendidik, terima kasih yang tak terhingga atas bimbingan dan ilmu-ilmu yang sangat bermanfaat bagi kehidupan saya;
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

**MOTO**

“Kematian adalah nasehat terbaik dalam kehidupan, tinggallah di bumi layaknya seorang musafir yang akan kembali ke kampung halamannya (surga).”



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Wilujeng Rahayu

NIM : 121810401057

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Transformasi Genetik Tanaman Tomat dengan Mutan Gen *SoSPS1-S424A* Melalui *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 dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, April 2017

Wilujeng Rahayu

NIM 121810401057

**SKRIPSI**

**TRANSFORMASI GENETIK TANAMAN TOMAT DENGAN  
MUTAN GEN *SoSPS1-S424A* MELALUI *Agrobacterium tumefaciens***

Oleh

**Wilujeng Rahayu**

**NIM 121810401057**

**Pembimbing**

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

**Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P.**

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Transformasi Genetik Tanaman Tomat Dengan Mutan Gen *SoSPS1-S424A* Melalui *Agrobacterium tumefaciens*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji :

Ketua

Sekretaris

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

Dr.Ir. Parawita Dewanti, M.P

NIP 195510221982121002

NIP 196504251990022002

Anggota

Penguji I

Penguji II

Dra. Dwi Setyati, M.Si

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

NIP 196404171991032001

NIP 197509132000032001

Mengetahui

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D.

NIP 196102041987111001



## RINGKASAN

**Transformasi Genetik Tanaman Tomat dengan Mutan Gen *SoSPS1-S424A* Melalui *Agrobacterium tumefaciens***; Wilujeng Rahayu, 121810401057; 2017: 31 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Sukrosa merupakan produk akhir dari proses fotosintesis yang terjadi di daun. Sukrosa berperan penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Beberapa enzim yang mempengaruhi metabolisme sukrosa pada tanaman yaitu *invertase*, *sucrose synthase*, dan *sucrose-phosphate synthase*. *Sucrose-Phosphate Synthase* (SPS) adalah enzim pada tumbuhan tingkat tinggi yang berperan utama dalam biosintesa sukrosa. Aktivitas enzim SPS diregulasi oleh fosforilasi serin. Fosforilasi *Ser424* mengaktifkan enzim SPS dalam respon terhadap stress osmotik. Stress osmotik menyebabkan peningkatan fosforilasi *Ser424* pada SPS daun *Spinacia oleracea*.

Salah satu penyebab stress osmotik adalah cekaman kekeringan. Peningkatan aktivitas SPS selama cekaman kekeringan juga menyebabkan kandungan sukrosa meningkat pada tanaman. Tanaman tebu juga memiliki enzim SPS yang dikode oleh gen *SoSPS1* (*Saccharum officinarum* *Sucrose Phosphate Synthase*). Gen *SoSPS1* merupakan cDNA penyandi enzim SPS yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman tebu. Gen *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) tebu berhasil dikloning dan mutasi gen *SoSPS1* berhasil dilakukan yaitu mutasi gen *SoSPS1* pada *Ser424A*. Mutan gen *SoSPS1* pada *Ser424A* merupakan hasil mutasi gen *SoSPS1* pada serin urutan ke-424 yang disubstitusi dengan asam amino alanin. Mutan gen tersebut telah dikonstruksi dalam plasmid *pRI101-AN-S0SPS1-S424A*. Oleh karena itu diperlukan proses transformasi mutan gen tersebut ke dalam genom tanaman tomat sebagai tanaman model untuk studi regulasi sisi fosforilasi *Ser424A*. Adapun tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan tanaman tomat yang mengandung mutan gen *SoSPS1* pada *Ser424A* dalam genom tanaman tomat.



Penelitian dilakukan dalam dua tahap awal yaitu terdiri dari persiapan eksplan transformasi dan persiapan vektor transformasi. Tahapan selanjutnya meliputi infeksi, ko-kultivasi, eliminasi, seleksi, induksi perakaran, aklimatisasi, dan konfirmasi keberadaan gen target. Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tunas apikal tanaman tomat varietas rampai secara *in vitro* umur 14 hari. Transformasi pada penelitian ini dilakukam sebanyak 3 kali ulangan yang masing-masing merupakan penelitian yang terpisah (*Independent Experiment*) dengan jumlah eksplan masing-masing 100 eksplan. Seleksi dilakukan sebanyak 6 kali, terdiri dari seleksi pertama sampai dengan kelima menggunakan konsentrasi kanamycin  $50 \text{ mg/L}^{-1}$  dan seleksi keenam menggunakan konsentrasi kanamycin  $75 \text{ mg/L}^{-1}$ . Eksplan yang lolos seleksi selanjutnya dilakukan perhitungan efektivitas seleksi dan analisis PCR.

Hasil transformasi mutan gen *SoSPSI-S424A* pada tunas apikal tomat varietas rampai yang lolos seleksi dan aklimatisasi berdasarkan hasil analisis PCR diperoleh 15 tanaman positif mengandung mutan gen *SoSPSI-S424A* yaitu event A1.1, A2.1, A3.1, A4.1, A5.1, A6.1, A7.1, A1.2, A4.2, A7.2, A8.2, A9.2, A10.2, A11.2, dan A12.2.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, karunia serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Transformasi Genetik Tanaman Tomat dengan Mutan Gen *SoSPS1-S424A* Melalui *Agrobacterium tumefaciens*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini penulis menerima banyak bantuan dari berbagai pihak yang bersifat materiil, bimbingan maupun motivasi. Oleh karena itu, penulis mengucapkan rasa penghargaan dan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc selaku Dosen Pembimbing Utama, Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
2. Dra. Dwi Setyati, M.Si. dan Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si. selaku Dosen Penguji atas masukan dan saran guna kesempurnaan penulisan skripsi ini;
3. Esti Utarti S.P., M.Si. dan Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan saran selama penulis menjadi mahasiswa di Universitas Jember;
4. kedua orang tua Djumianah dan Paimin yang selalu memberikan kasih sayang, pengorbanan dan doa sepanjang hidup;
5. kakakku tersayang Yudi Herianto yang selalu memberikan motivasi, semangat dan nasehat untuk menjadi lebih baik;
6. Purnama Okviandari, S.P., M.P., Arsetyo Rahardhianto, S.Si., Nurul Hidayati, S.Si., Putu Frida Oktaningtias Widiarthi, S.Si, dan Ken Melati, S.Si. yang telah memberikan masukan dan mengajari kedisiplinan selama melaksanakan tugas akhir;

7. seluruh civitas akademika serta staf dan karyawan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah membantu selama masa perkuliahan;
8. seluruh kawan seperjuangan di Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman CDAST Universitas Jember (Suvia, Kiky, Novita, Weny, Anjas, Ika, Ridwan, Winda, Fira, Febri, Arie, Cici, Cahya, Tisa, Amir, Guruh, Tita, Eko, Rio, Anggi, Destu, Ila, Agnes), kakak senior (Retna, Wulan, Ryan, Intan, Retno, Firdha, Nurul, Fragaria, Wardah, Ratna, Frengky, Cesha, Khosim), adik junior (Rosyadi, Afid, Lutfi, Gerda, Ifa, Angga, Udin, Yusuf, Azzam, Erna, Desi, Isna) dan *tomato group* (Inyana, Mahbubatur, Riski dan Reza) terima kasih atas seluruh kebersamaan, suka duka dan bantuan dalam menyelesaikan penelitian ini;
9. seluruh mahasiswa Jurusan Biologi angkatan 2012 (Biozva) yang telah mengajarkan arti persahabatan dan memberikan banyak kenangan yang tidak terlupakan selama menjalani kuliah di Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember ini;
10. seluruh mahasiswa dari semua angkatan di Jurusan Biologi Universitas Jember yang telah memberikan banyak kenangan dan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini;
11. seluruh teman kost (Nida, Mida, Mey, Dena, Galih, Rosi dan Katrin) terima kasih atas segala kebersamaan, dukungan dan bantuannya.
12. seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu dan memberi semangat selama di Universitas Jember.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas segala bantuan dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi perkembangan ilmu biologi.

Jember, April 2017

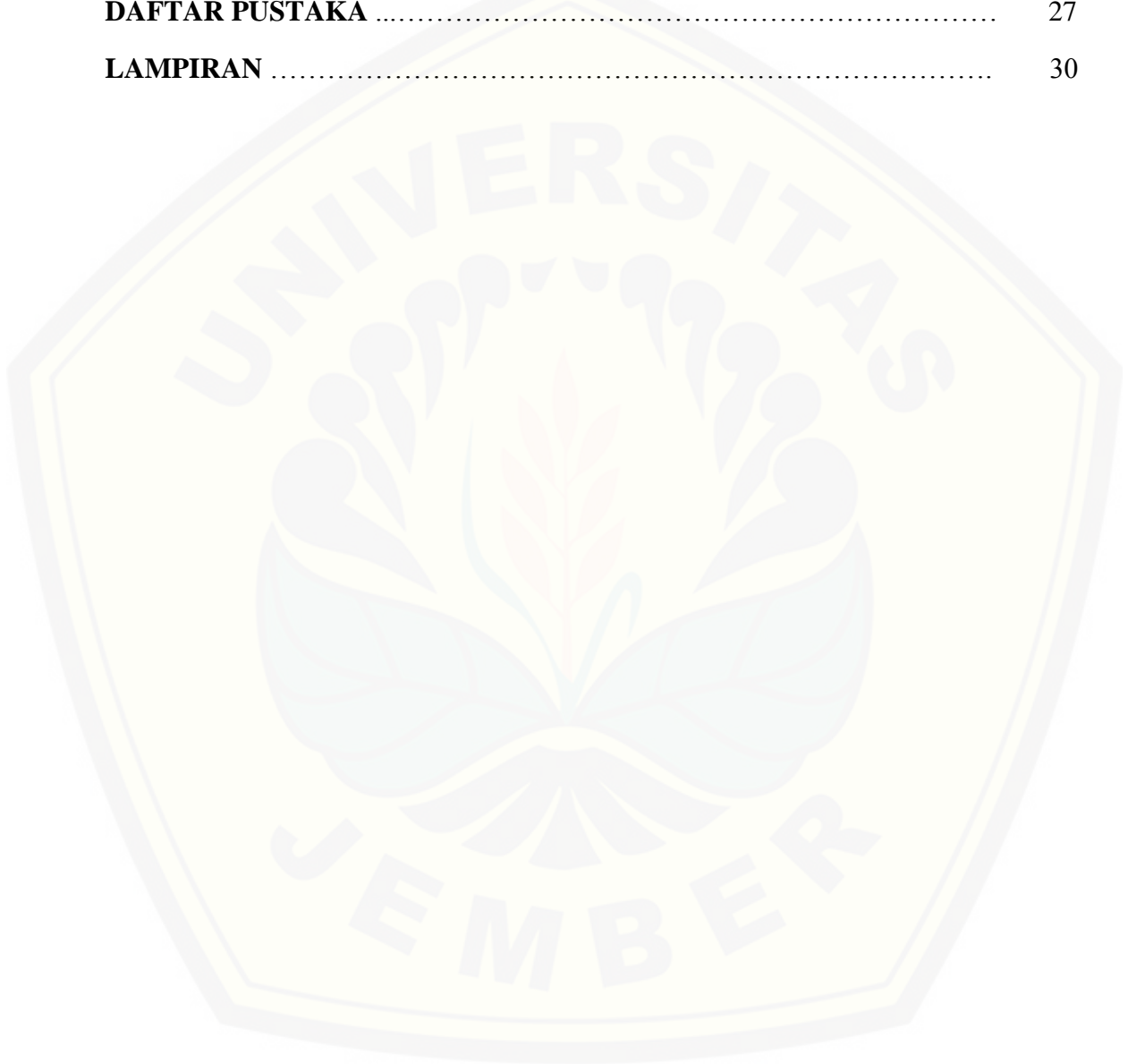
Penulis

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan</b> .....	2
<b>1.4 Manfaat</b> .....	2
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	3
<b>2.1 <i>Sucrose Phosphate Synthase (SPS)</i></b> .....	3
<b>2.2 Sisi Fosforilasi <i>Ser424</i></b> .....	4
<b>2.3 Transformasi Mutan Gen <i>SoSPS1-S424A</i> Melalui <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pada Tanaman Tomat</b> .....	5

<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	7
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	7
<b>3.2 Alat dan Bahan</b> .....	7
<b>3.3 Metode Percobaan</b> .....	7
3.3.1 Alur Penelitian .....	8
<b>3.4 Persiapan Benih Tomat Secara In Vitro</b> .....	9
3.4.1 Persiapan Eksplan .....	9
<b>3.5 Persiapan Koloni Tunggal <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b> .....	9
<b>3.6 Konfirmasi Plasmid <i>pRI 101-AN-SoSPS1-S424A</i></b> .....	10
3.6.1 Isolasi Plasmid .....	10
3.6.2 Analisis PCR .....	11
<b>3.7 Perbanyak <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b> .....	12
<b>3.8 Transformasi Eksplan</b> .....	12
3.8.1 Infeksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pada Esplan .....	12
3.8.2 Ko-Kultivasi .....	12
3.8.3 Eliminasi .....	13
3.8.4 Seleksi Eksplan Putatif Transforman .....	13
3.8.5 Induksi Perakaran Eksplan Putatif Transforman .....	13
3.8.6 Aklimatisasi Tanaman Putatif Transforman .....	14
<b>3.9 Konfirmasi Tanaman Putatif Transforman</b> .....	14
3.9.1 Isolasi DNA Genom .....	14
3.9.2 Analisis PCR .....	15
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	16
<b>4.1 Konfirmasi Plasmid <i>pRI 101-AN-SoSPS1-S424A</i></b> .....	16

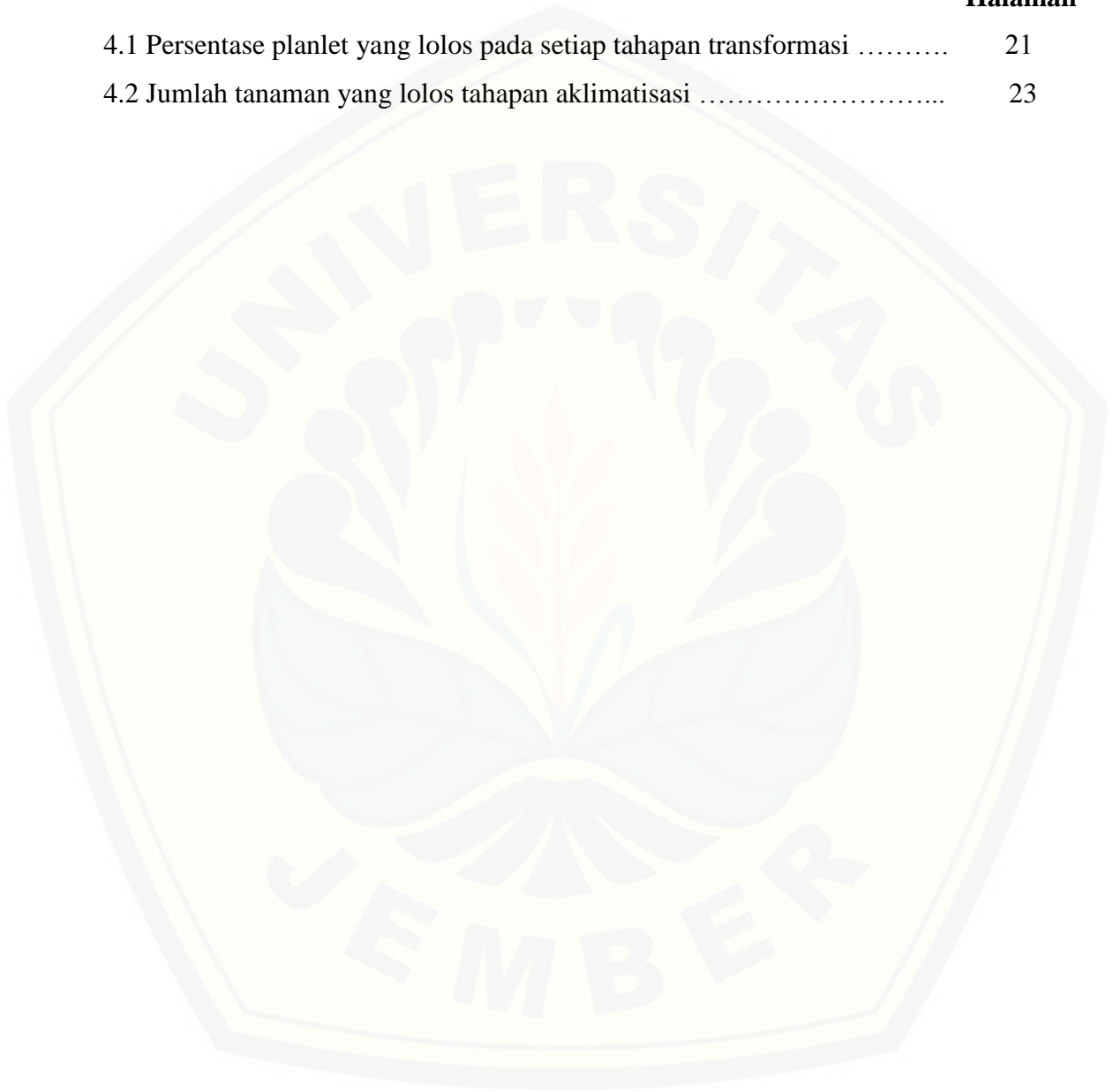
<b>4.2 Transformasi Mutan Gen <i>SoSPS1-S424A</i></b> .....	17
<b>4.3 Konfirmasi Tanaman Putatif Transforman Mutan Gen <i>SoSPS1-S424A</i></b> .....	23
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	26
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	27
<b>LAMPIRAN</b> .....	30





**DAFTAR TABEL**

	<b>Halaman</b>
4.1 Persentase planlet yang lolos pada setiap tahapan transformasi .....	21
4.2 Jumlah tanaman yang lolos tahapan aklimatisasi .....	23



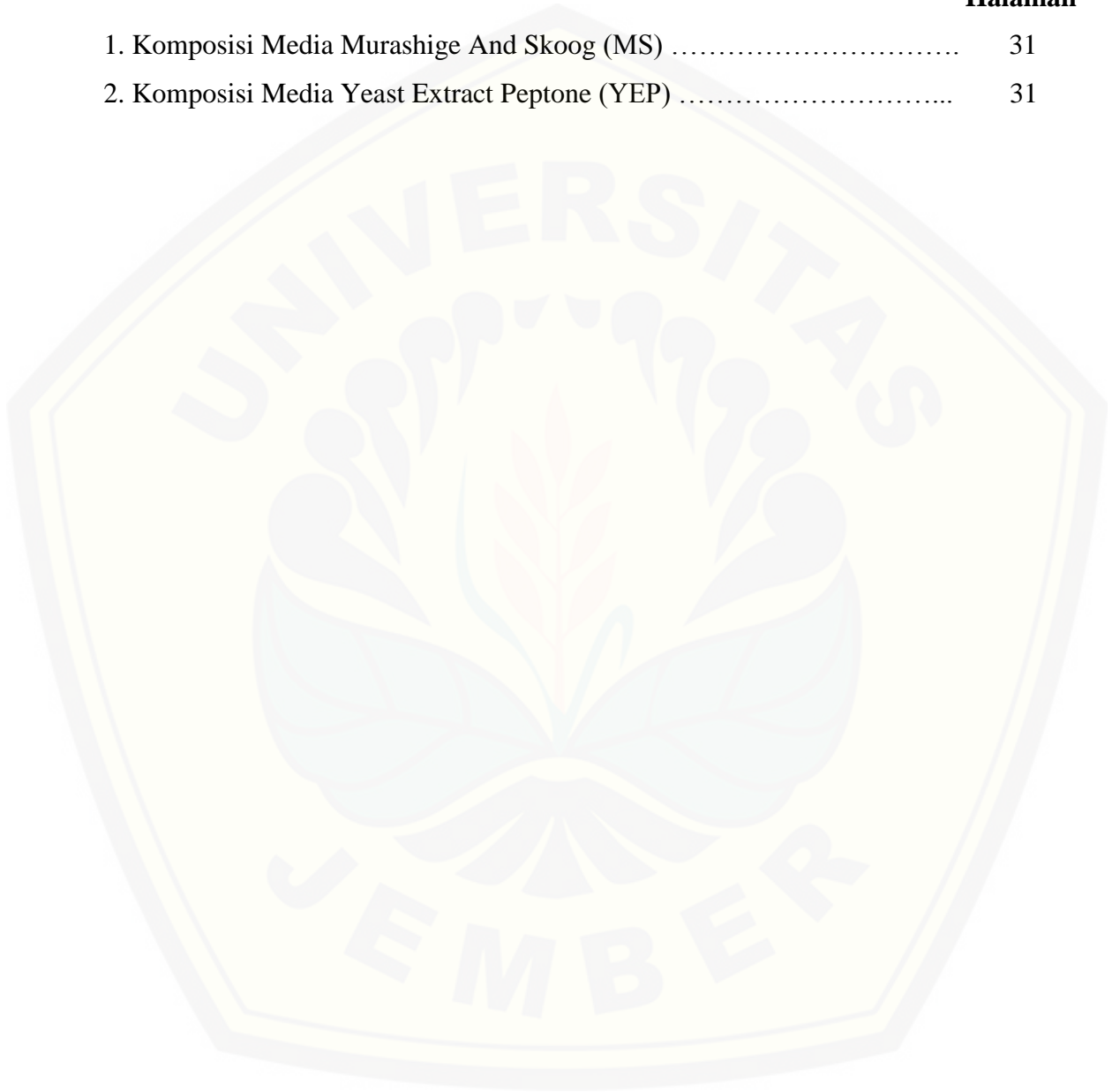


DAFTAR GAMBAR

	<b>Halaman</b>
2.1 Hasil sekuensing mutan gen <i>SoSPS1-S424A</i> .....	5
2.2 Mekanisme infeksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pada sel tanaman .....	6
3.1 Peta konstruk plasmid <i>pRI 101-AN-SoSPS1-S424A</i> .....	9
4.1 Koloni tunggal <i>A.tumefaciens</i> strain GV 3101 pada media YEP padat yang mengandung rifampycin, gentamycin dan kanamycin .....	16
4.2 Hasil PCR menggunakan primer F/R <i>nptII</i> DAN DNA template yang diisolasi dari bakteri <i>A.tumefaciens</i> strain GV 3101 .....	17
4.3 Persiapan eksplan transformasi .....	18
4.4 Eksplan tanaman tomat pada media .....	19
4.5 Eksplan tanaman tomat pada media seleksi .....	20
4.6 Persiapan aklimatisasi .....	22
4.7 Aklimatisasi Tanaman Putatif Transforman .....	23
4.8 Hasil Elektroforesis gel agarose 1% DNA hasil PCR dengan menggunakan primer <i>nptII</i> -F/R dan template DNA genom tanaman tomat putatif transforman.....	25

**DAFTAR LAMPIRAN**

	<b>Halaman</b>
1. Komposisi Media Murashige And Skoog (MS) .....	31
2. Komposisi Media Yeast Extract Peptone (YEP) .....	31



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sukrosa berperan penting untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Huber dan Huber, 1996). Sukrosa merupakan produk akhir dari proses fotosintesis yang terjadi di daun. Pada sebagian besar tanaman sukrosa dibentuk pada sitosol dan ditransportasikan dari jaringan pembentukan (*source tissue*) menuju jaringan penyimpanan (*sink tissue*) melalui floem dan dimanfaatkan sebagai sumber energi dalam proses pertumbuhan dan perkembangan (Campbell *et al.*, 2002). Beberapa enzim yang mempengaruhi metabolisme sukrosa pada tanaman yaitu *invertase*, *sucrose synthase*, dan *sucrose-phosphate synthase*.

*Sucrose-Phosphate Synthase* (SPS) adalah enzim pada tumbuhan tingkat tinggi yang berperan utama dalam biosintesa sukrosa. Aktivitas enzim SPS diregulasi oleh fosforilasi serin. Pada penelitian Toroser dan Huber (1997) menyatakan bahwa fosforilasi *S424* mengaktifkan enzim SPS dalam respon terhadap stress osmotik. Stress osmotik berupa cekaman kekeringan menyebabkan fosforilasi *S424* yang mengaktifkan enzim SPS. Cekaman kekeringan dapat meningkatkan aktivitas enzim SPS pada beberapa tanaman (Foyer *et al.*, 1998). Peningkatan aktivitas SPS selama cekaman kekeringan menyebabkan kandungan sukrosa meningkat pada tanaman tebu (Rinanto dan Sugiharto, 2011). Hal tersebut juga ditemukan pada tanaman jagung bahwa kandungan sukrosa berkorelasi positif dengan aktivitas enzim SPS (Foyer, 1998).

Penelitian Toroser dan Huber (1997) menunjukkan bahwa stres osmotik menyebabkan peningkatan fosforilasi *S424* pada SPS daun *Spinacia oleracea*. Pada penelitian ini dilakukan transformasi mutan gen *SoSPS1-S424A* ke dalam tanaman tomat melalui *Agrobacterium tumefaciens* sebagai vektor transformasi. Transformasi genetik dengan *Agrobacterium tumefaciens* merupakan salah satu teknik pemuliaan tanaman yang secara umum digunakan dan dikembangkan. Gen yang ditransfer oleh *Agrobacterium* menghasilkan tanaman transgenik yang lebih

stabil (Hiei *et al.*, 1997) dan metode ini pada umumnya digunakan untuk transformasi pada tanaman dikotil seperti tomat.

### 1.2 Rumusan Masalah

Stres osmotik menyebabkan peningkatan fosforilasi *S424* pada SPS daun *Spinacia oleracea*. Pada penelitian ini dilakukan transformasi mutan gen *SoSPSI-S424A* ke dalam tanaman tomat varietas rampai melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Berdasarkan hal tersebut rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- apakah mutan gen *SoSPSI-S424A* yang ditransformasikan mampu terintegrasi ke dalam genom tanaman tomat varietas rampai?

### 1.3 Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tomat yang genomnya mengandung mutan gen *SoSPSI-S424A*.

### 1.4 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan mendapatkan tanaman tomat terseleksi hasil transformasi genetik dengan mutan gen *SoSPSI-S424A* sehingga bisa digunakan untuk analisa lebih lanjut tentang peran sisi fosforilasi *S424* pada tanaman.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Sucrose Phosphate Synthase (SPS)*

Sukrosa merupakan produk akhir dari proses fotosintesis yang terjadi di daun. Sukrosa dalam tanaman berperan penting untuk menyediakan energi, merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Fung *et al.*, 2003). Selain itu sukrosa juga berperan sebagai pengatur ekspresi gen-gen fotosintetik (Jang dan Sheen, 1994) dan gen-gen nonfotosintetik seperti gen yang terlibat dalam pembelahan dan diferensiasi sel. Beberapa enzim yang mempengaruhi metabolisme sukrosa pada tanaman yaitu *invertase*, *sucrose synthase*, dan *sucrose-phosphate synthase*. Dalam sel, sukrosa disintesis di sitosol yang dikatalisis oleh *Sucrose-Phosphate Synthase (SPS)*. SPS merupakan enzim utama yang menentukan kemampuan tanaman dalam sintesis sukrosa (Komatsu *et al.*, 1999).

*Sucrose-Phosphate Synthase (SPS)* adalah enzim yang berperan utama dan menjadi enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman tingkat tinggi. Enzim SPS berperan sebagai pengkatalis proses perubahan *UDP-glucose* dan *Fructose-6-Phosphate* menjadi *Sucrose-6-Phosphate*, UDP dan  $H^+$ . Berikut persamaan reaksi sintesis sukrosa yang dikatalisis oleh SPS:



Enzim SPS diregulasi oleh metabolit dan fosforilasi protein reversible baik pada jaringan fotosintetik maupun pada jaringan nonfotosintetik. Tidak terbatas pada jaringan fotosintetik, tetapi enzim SPS juga bekerja pada jaringan nonfotosintetik yang aktif dalam biosintesis sukrosa, seperti dalam pemasakan buah. Selain itu, enzim SPS mengendalikan pada level enzim protein, seperti dalam perkembangan daun (Huber dan Huber, 1996).



## 2.2 Sisi Fosforilasi S424

SPS terfosforilasi pada residu multiple seryl secara *in vivo*. Beberapa peran dari sisi fosforilasi serin telah diketahui, seperti sisi pengaturan fosforilasi utama yang terlibat adalah S158 pada daun *Spinacia oleracea* dan S162 pada daun jagung (Huber dan Huber, 1996). S158 sebagai sisi utama yang bertanggung jawab untuk inaktivasi protein SPS pada daun *Spinacia oleracea* secara *in vivo* (Toroser *et al.*, 1999). Sedangkan S162 merupakan sisi utama yang bertanggung jawab untuk inaktivasi protein SPS pada daun jagung secara *in vivo* (Takahashi *et al.*, 2000).

Aktivitas SPS di bawah regulasi yang kompleks, melibatkan efektor alosterik (glukosa-6-fosfat; Glc6P dan Pi) dan sisi spesifik, yaitu fosforilasi seryl reversible. Fosforilasi SPS atau inaktivasi dalam kondisi gelap oleh beberapa Ser/Thr kinase, dan terjadi defosforilasi atau aktivasi dalam kondisi gelap oleh protein profosfatase jenis 2A (Huber dan Huber, 1996). Selain itu, stres osmotik menyebabkan peningkatan fosforilasi S424 pada SPS daun *Spinacia oleracea*. Fosforilasi S424 mengaktifkan enzim SPS dalam respon terhadap stres osmotik (Toroser dan Huber 1997).

Salah satu penyebab stress osmotik adalah cekaman kekeringan. Cekaman kekeringan menyebabkan fosforilasi S424 yang mengaktifkan enzim SPS. Cekaman kekeringan dapat meningkatkan aktivitas enzim SPS pada beberapa tanaman (Foyer *et al.*, 1998). Peningkatan aktivitas SPS selama cekaman kekeringan menyebabkan kandungan sukrosa meningkat pada tanaman tebu (Rinanto dan Sugiharto, 2011). Hal tersebut juga ditemukan pada tanaman jagung bahwa kandungan sukrosa berkorelasi positif dengan aktivitas enzim SPS (Foyer *et al.*, 1998).

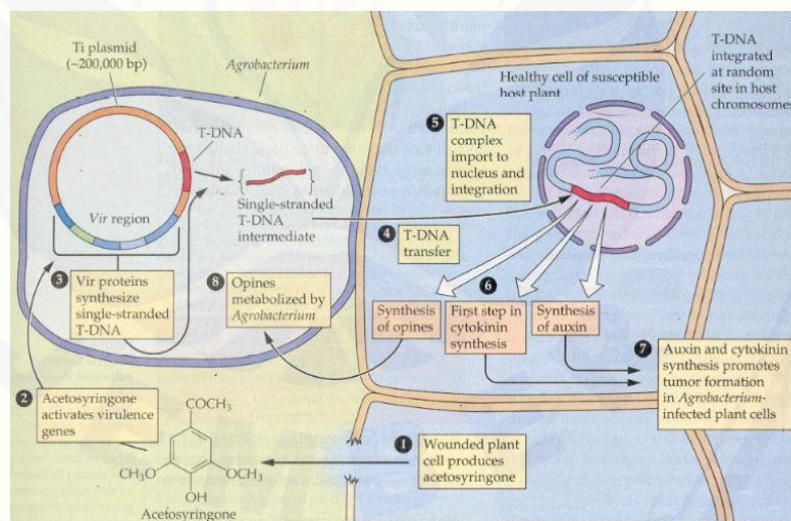
Tanaman tebu juga memiliki enzim SPS yang dikode oleh gen *SoSPS1* (*Saccharum officinarum* *Sucrose Phosphate Synthase*). Gen *SoSPS1* merupakan cDNA penyandi enzim SPS yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman tebu (Kusrini, 2014). Gen *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) tebu berhasil dikloning (Sugiharto *et al.*, 1997) dapat digunakan untuk bahan mutan gen. Mutasi gen *SoSPS1* berhasil dilakukan yaitu mutasi gen *SoSPS1* pada S424A. Mutan gen *SoSPS1-S424A* merupakan hasil mutasi gen *SoSPS1* pada serin urutan ke-424





*acetosyringone* mengaktifkan gen-gen virulensi pada *A. tumefaciens*. Gen-gen virulen mensintesis *single stranded* T-DNA dan terjadi transfer T-DNA. Kompleks T-DNA masuk kedalam nukleus dan berintegrasi sehingga terjadi sintesis sitokinin, auksin serta opine. Sintesis auksin dan sitokinin memacu pembentukan tumor pada sel tanaman yang terinfeksi *A. tumefaciens*. Senyawa opine yang terbentuk digunakan oleh *A. tumefaciens* untuk pertumbuhannya. Secara singkat mekanisme interaksi *A. tumefaciens* dengan sel tanaman dan proses transformasi genetik oleh *A. tumefaciens* disajikan pada Gambar 2.2.

Transformasi genetik pada tanaman tomat telah dilakukan untuk meningkatkan kandungan sukrosa pada tanaman tomat (Worrell *et al.*, 1991). Penyisipan mutan gen *SoSPS1* pada tanaman tomat dilakukan dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai vektor transformasi. Gen yang ditransfer oleh *Agrobacterium* menghasilkan tanaman transgenik yang lebih stabil (Hiei *et al.*, 1997) dan metode ini pada umumnya digunakan untuk transformasi pada tanaman dikotil.



Gambar 2.2 Mekanisme infeksi *Agrobacterium tumefaciens* pada sel tanaman (Kakkar dan Verma, 2011)

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman, *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember mulai bulan April 2016 - Februari 2017.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Laminar Air Flow (LAF), peralatan kultur jaringan, shaker inkubator, spektrofotometer, *growth chamber*, bor listrik, mata bor, nanodrop, peralatan PCR, mesin elektroforesis dan Gel Documentation System. Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain benih tanaman tomat varietas rampai, *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, media Murashige and Skoog (MS), media YEP, rifampycin, gentamycin, kanamycin, acetosyringone, cefotaxime, alkohol 70%, Sodium hypochlorite (NaClO) 5.25 %, aquadest steril, hogland, pasir, cocopit, bahan kimia untuk isolasi DNA dan bahan kimia untuk analisis PCR.

### 3.3 Metode Percobaan

Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tunas apikal tanaman tomat varietas rampai secara *in vitro* umur 14 hari. Pada penelitian ini dilakukan transformasi sebanyak 3 kali dengan jumlah eksplan masing-masing 100 eksplan. Seleksi dilakukan sebanyak 6 kali, terdiri dari seleksi pertama sampai dengan kelima menggunakan konsentrasi kanamycin  $50 \text{ mg/L}^{-1}$  dan seleksi keenam menggunakan konsentrasi kanamycin  $75 \text{ mg/L}^{-1}$ . Eksplan yang lolos seleksi selanjutnya dilakukan analisis yang meliputi efektivitas seleksi dan analisis PCR.

Transformasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali ulangan yang masing-masing merupakan penelitian yang terpisah (*Independent Experiment*). Efektivitas transformasi dihitung berdasarkan pada jumlah tanaman yang hidup pada setiap tahap transformasi (ko-kultivasi, eliminasi, seleksi, induksi perakaran dan aklimatisasi) dengan menggunakan rumus:

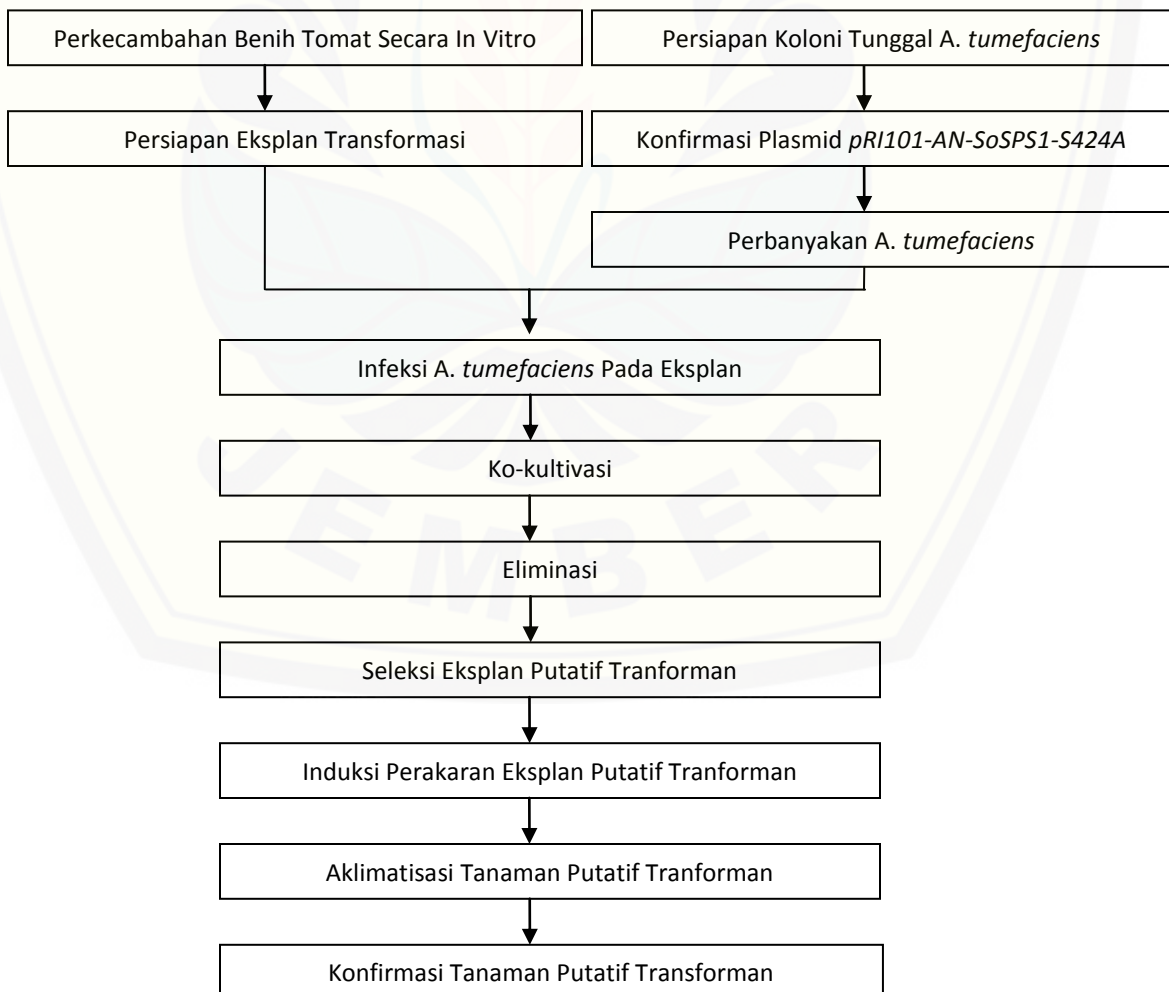
$$\text{Efektivitas transformasi} = \frac{\text{Jumlah tanaman yang lolos tiap tahapan transformasi}}{\text{Jumlah tanaman awal}} \times 100\%$$

Pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Jumlah tanaman tomat yang lolos dalam setiap tahap transformasi
2. Konfirmasi keberadaan gen target dengan analisis PCR

### 3.3.1 Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan alur penelitian sebagai berikut:



### 3.4. Perkecambahan Benih Tomat Secara In Vitro

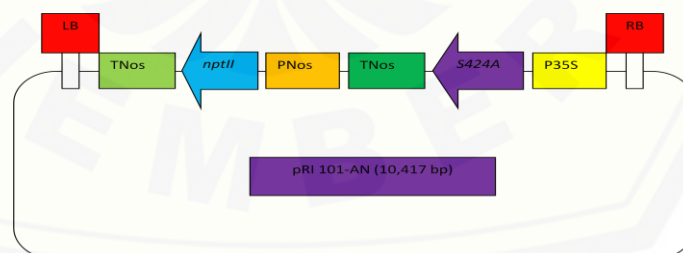
Persiapan eksplan dilakukan dengan merendam benih tomat dengan aquadest steril selama 1 menit. Setelah itu, aquadest dibuang. Benih disterilisasi secara kimiawi menggunakan Sodium hypochlorite (NaClO) 5.25 % selama 1,5 menit, kemudian dibilas aquadest steril sebanyak 7 kali. Benih kemudian dikering anginkan dengan kertas saring dan setelah benih kering ditanam pada media MS<sub>0</sub> selama 4 hari di tempat gelap dan selama 10 hari di tempat terang. Tunas apikal yang terbentuk digunakan sebagai eksplan untuk transformasi.

#### 3.4.1 Persiapan Eksplan

Eksplan yang digunakan adalah bagian tunas apikal tanaman tomat. Mula-mula tunas dipotong pada bagian pucuk tanaman. Pada bagian ujung daun tunas apikal dipotong untuk melukai tanaman.

### 3.5 Persiapan Koloni Tunggal *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 yang sudah disisipkan mutan gen *SoSPS1-S424A* dalam plasmid *pRI-101-AN*. Berikut peta konstruk plasmid *pRI-101-AN-SoSPS1-S424A* (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Peta konstruk plasmid *pRI 101-AN-SoSPS1-S424A* (LB: left border, RB: right border sebagai batas T-DNA, P35S: Promoter 35 synthetase, nptII: neomycin phospho transferase, T-Nos: terminator nopaline synthetase, S424A: *SoSPS1-S424A* gene)



Koloni *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 yang mengandung plasmid *pRII01-AN-SoSPS1-S424A* dari *gliserol stock* diambil sebanyak 25  $\mu$ l. dan dinokulasikan ke media YEP cair 2 ml dalam botol ulir yang mengandung rifampycin 100  $\text{mgL}^{-1}$ , gentamycin 12,5  $\text{mgL}^{-1}$ , dan kanamycin 50  $\text{mgL}^{-1}$ . Hasil inokulasi diinkubasi dalam shaker inkubator 150 rpm selama 18-24 jam pada suhu 28°C. Dari hasil inokulasi diambil 1 ose biakan yang telah tumbuh, selanjutnya diinokulasi dengan metode *streakquadrant* pada media YEP padat yang mengandung rifampycin 100  $\text{mgL}^{-1}$ , gentamycin 12,5  $\text{mgL}^{-1}$ , dan kanamycin 50  $\text{mgL}^{-1}$ , dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28°C. Dari tahapan tersebut, diambil 1 ose koloni tunggal yang ditumbuhkan pada media YEP 2 ml yang mengandung antibiotik yang sama kemudian diinkubasi shaker inkubator 150 rpm selama 18-24 jam pada suhu 28°C. Biakan yang tumbuh diambil 1 ose dan selanjutnya diinokulasi dengan metode *streakquadrant* pada media YEP padat yang mengandung antibiotik yang sama. Koloni tunggal yang diperoleh dikonfirmasi keberadaan plasmid *pRII01-AN-SoSPS1-S424A* sebelum digunakan untuk transformasi.

### **3.6. Konfirmasi Plasmid *pRII01-AN-SoSPS1-S424A***

#### **3.6.1 Isolasi Plasmid**

Isolasi plasmid dilakukan untuk konfirmasi keberadaan mutan gen *SoSPS1-S424A* dalam *Agrobacterium tumefaciens*. Teknik isolasi plasmid dari sel bakteri dilakukan berdasarkan metode yang disebutkan dalam Sambrook *et al.* (1989). Teknik isolasi plasmid meliputi tiga tahap yang terdiri dari pelisisan sel, purifikasi dan presipitasi. Berikut teknik isolasi plasmid secara terperinci.

Tahap pertama adalah pelisisan sel. Isolasi plasmid diawali dengan memindahkan biakan *Agrobacterium tumefaciens* ke dalam eppendorf dan disentrifuge 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet yang dihasilkan ditambahkan 100  $\mu$ l solution I dan divortex. Pada sampel ditambahkan 200  $\mu$ l

solution II dan *diswirling*. Selanjutnya, sampel diinkubasi dalam es selama 5 menit. Pelet yang dihasilkan ditambahkan 150  $\mu$ l solution III dan *diswirling*. Selanjutnya, sampel diinkubasi dalam es selama 5 menit. Setelah itu, sampel *disentrifuge* 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

Tahap kedua adalah purifikasi. Supernatan dipindahkan ke eppendorf baru dan ditambahkan *RNAse* 10  $\mu$ l. Selanjutnya, sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Pada supernatan ditambahkan PCI sebanyak supernatan yang diambil. Setelah itu, sampel *diswirling* dan *disentrifuse* 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C.

Tahap ketiga adalah presipitasi. Pada eppendorf diambil larutan bagian atas dan dipindahkan ke eppendorf baru dan dilakukan presipitasi dengan menambahkan etanol PA (2,5 volume supernatan) dan NaAc (0,1 volume supernatan) serta *diswirling* dan diinkubasi selama  $\pm$  1 jam pada suhu -20°C. Selanjutnya, sampel *disentrifuge* 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet yang dihasilkan dibilas dengan etanol 70% dan *disentrifuse* 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 20  $\mu$ l buffer TE. Setelah itu sampel diukur konsentrasinya dengan menggunakan nanodrop dan dilanjutkan dengan analisis PCR.

### 3.6.2 Analisis PCR

Analisis PCR menggunakan sepasang primer *nptII* (*Neomycin phosphotransferase II*) yaitu primer *nptII*-F (5'-GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGC-3') dan *nptII*-R (5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCG-3') yang akan menghasilkan fragmen DNA sebesar 550 bp. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus yang meliputi tahap pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, annealing pada suhu 55°C selama 30 detik, elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit dan final extention pada suhu 72°C selama 5 menit. DNA hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1% yang mengandung 1,5  $\mu$ L ethidium bromide. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder*

sebanyak 2  $\mu\text{L}$  untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis divisualisasi di Gel Documentation System.

### 3.7 Perbanyak *Agrobacterium tumefaciens*

Koloni tunggal *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 yang mengandung konstruk plasmid *pRI101-AN-SoSPSI-S424A* diinokulasikan pada media YEP cair 2 ml yang mengandung rifampycin 100  $\text{mgL}^{-1}$ , gentamycin 12,5  $\text{mgL}^{-1}$ , dan kanamycin 50  $\text{mgL}^{-1}$ , dan diinkubasi di atas shaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C selama 18-24 jam. Starter sebanyak 2 ml disubkultur dalam media YEP cair 50 ml yang mengandung antibiotik yang sama dan diinkubasi pada shaker incubator dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C hingga kerapatan sel ( $\text{OD}_{600}$ ) mencapai 0,5.

### 3.8 Transformasi Ekplan

#### 3.8.1 Infeksi *Agrobacterium tumefaciens* pada Ekplan

Infeksi diawali dengan memasukkan sebanyak 100 ekplan pada media  $\text{MS}_0$  cair yang telah diberi suspensi sel *Agrobacterium tumefaciens* dan acetosyringone 20  $\text{mgL}^{-1}$ . Senyawa *acetosyringone* digunakan untuk menginduksi proses infeksi. Infeksi dilakukan dengan cara dishaker dengan kecepatan 50 rpm selama 15 menit. Ekplan hasil inkubasi ditiriskan di atas kertas saring steril 15 menit. Selanjutnya ekplan yang telah kering ditanam pada media ko-kultivasi.

#### 3.8.2 Ko-kultivasi

Ekplan hasil infeksi ditumbuhkan pada media kokultivasi untuk menumbuhkan *Agrobacterium tumefaciens* secara bersama-sama dengan ekplan. Media kokultivasi terdiri dari media  $\text{MS}_0$  dengan penambahan acetosyringone 20  $\text{mgL}^{-1}$ . Ekplan selanjutnya diinkubasi pada kondisi gelap dengan suhu 28°C selama 2 hari.



### 3.8.3 Eliminasi

Eksplan hasil inkubasi pada media kokultivasi kemudian dipindahkan ke tabung falcon dan ditambahkan aquadest steril 30 ml. Eksplan *diswirling* dan aquadest dibuang (dilakukan sebanyak 2 kali). Selanjutnya, eksplan dibilas dengan 30 ml aquadest steril dan cefotaxime 500 mgL<sup>-1</sup>. Eksplan *diswirling* dan larutan dibuang (dilakukan sebanyak 3 kali). Setelah itu eksplan ditiriskan di atas kertas saring steril selama 15 menit. Penanaman eksplan dilakukan pada media eliminasi yang terdiri media MS<sub>0</sub> dengan cefotaxime 500 mgL<sup>-1</sup>. Eksplan selanjutnya diinkubasi pada ruang kultur jaringan selama 5 hari dalam kondisi terang.

### 3.8.4 Seleksi Eksplan Putatif Transforman

Proses seleksi eksplan putatif transforman dilakukan dengan cara memindahkan eksplan hasil inkubasi ke atas kertas saring steril. Bagian eksplan yang berwarna kecoklatan dipotong dan eksplan dipindah ke media MS<sub>0</sub> dengan penambahan cefotaxime 500 mgL<sup>-1</sup> dan kanamycin 50 mgL<sup>-1</sup>. Eksplan selanjutnya diinkubasi pada ruang kultur jaringan selama 14 hari. Pada tahap seleksi dibutuhkan 6 siklus yang terdiri dari siklus 1-5 dengan penambahan kanamycin 50 mgL<sup>-1</sup> dan siklus 6 dengan penambahan kanamycin 75 mgL<sup>-1</sup>, dengan inkubasi masing-masing siklus selama 14 hari dalam kondisi terang. Eksplan yang disubkultur pada tahap seleksi berikutnya adalah eksplan yang memiliki ketahanan terhadap kanamycin yang ditandai dengan mampu tumbuh pada media seleksi dengan baik dan warna batang dan daun hijau. Eksplan yang lolos sampai dengan tahap seleksi terakhir (seleksi 6) disebut dengan tanaman putatif transforman.

### 3.8.5 Induksi Perakaran Ekplan Putatif Transforman

Ekplan yang lolos dalam tahap seleksi 6 selanjutnya dilakukan induksi perakaran. Proses induksi perakaran ekplan putatif transforman dilakukan dengan cara memindahkan eksplan hasil inkubasi ke media MS<sub>0</sub> dan diinkubasi pada ruang kultur jaringan selama 14 hari dalam kondisi terang.

### 3.8.6 Aklimatisasi Tanaman Putatif Transforman

Tahap aklimatisasi dilakukan dengan tujuan untuk mengadaptasikan tanaman sebelum dikondisikan dalam greenhouse. Tanaman tomat yang telah lolos tahap seleksi 6 dan telah memiliki akar dan tinggi tanaman minimal 2 cm selanjutnya ditumbuhkan di pot yang sudah berisi media tanam berupa pasir. Tanaman yang sudah dipindahkan ke pot kemudian dimasukkan ke dalam *growth chamber* pada suhu 26°C selama 1 bulan. Pada tahapan ini, tanaman diberi nutrisi dengan larutan hogland 500 µL/1 liter air. Tanaman selanjutnya ditanam pada media cocopit dan ditempatkan di dalam *greenhouse*.

## 3.9 Konfirmasi Tanaman Putatif Transforman

### 3.9.1 Isolasi DNA Genom

Tahap ini dilakukan untuk mengawali proses konfirmasi keberadaan gen target dalam genom tanaman. Isolasi DNA genom tanaman dilakukan dengan menggerus daun tomat dengan mata bor sampai halus. Serbuk daun dimasukkan dalam eppendorf dan ditambahkan 500 µl buffer ekstraksi (0,2 Tris-Cl; 0,25 M NaCl; 0,25 M EDTA, 2,5 ml SDS 10 %; dan 13,75 ml H<sub>2</sub>O) dan divortex. Setelah itu pada sampel ditambahkan 500 µl PCI dan *swirling* sampai terbentuk dua lapisan, kemudian *disentrifuge* selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang terbentuk dipindahkan pada eppendorf baru, kemudian ditambahkan isopropanol sebanyak 0,8 x volume supernatant dan NaAc 0,2 x volume supernatan. Selanjutnya, sampel diinkubasi selama 1 jam pada suhu -20°C. Setelah itu sampel *disentrifuge*, kemudian pelet yang dihasilkan dicuci dengan etanol 70 % sebanyak 700 µl dan *disentrifuge* kembali. Supernatan yang terbentuk dibuang dan pelet dikeringkan selama 15 menit, kemudian ditambahkan 30 µl buffer TE dan 1 µl *RNAse*. Selanjutnya sampel diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya menggunakan nanodrop dan dianalisis PCR.

### 3.9.2 Analisis PCR

Analisis PCR dilakukan untuk deteksi keberadaan gen target yang telah terinsersi ke dalam genom tanaman. PCR dilakukan dengan menggunakan sepasang primer *nptII* (*Neomycin phosphotransferase II*) yaitu primer *nptII*-F (5'-GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGC-3') dan *nptII*-R (5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCG-3') yang akan menghasilkan fragmen DNA sebesar 550 bp.

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan Kapa Master Mix. Pada satu kali reaksi total volum yang digunakan adalah 10 µl yang terdiri dari primer forward dan reverse masing-masing 0,5 µl, DNA template 1 µl, dan ddH<sub>2</sub>O 3 µl. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 kali siklus yang terdiri dari tahap pre-denaturation: 95 °C selama 5 menit, denaturation: 95 °C selama 30 detik, annealing: 55 °C selama 30 detik, extension: 72 °C selama 1 menit, dan final-extension: 72 °C selama 5 menit.

DNA yang sudah diamplifikasi kemudian dipisahkan dengan elektroforesis gel agarose 1 % yang mengandung 1,5 µl EtBr (Ethidium bromide) dengan tegangan 100 Volt selama 25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 kb Ladder sebanyak 3 µl untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis divisualisasi dan didokumentasikan menggunakan Gel Documentation System.

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Hasil transformasi mutan gen *SoSPSI-S424A* pada tunas apikal tomat varietas rampai yang lolos seleksi dan aklimatisasi berdasarkan hasil analisis PCR diperoleh 15 tanaman positif mengandung mutan gen *SoSPSI-S424A* yaitu event A1.1, A2.1, A3.1, A4.1, A5.1, A6.1, A7.1, A1.2, A4.2, A7.2, A8.2, A9.2, A10.2, A11.2, dan A12.2.

### 5.2 Saran

Seleksi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 6 kali yang meliputi seleksi ke-1 sampai dengan ke-5 dengan penambahan kanamycin  $50 \text{ mg/L}^{-1}$  dan seleksi ke-6 dengan penambahan kanamycin  $75 \text{ mg/L}^{-1}$ . Namun, hasil tanaman terseleksi ketika dikonfirmasi menunjukkan bahwa terdapat tanaman yang tidak positif mengandung gen target, sehingga pada penelitian selanjutnya sebaiknya melakukan optimasi antibiotik kanamycin agar proses seleksi bisa lebih efektif.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Campbell, N.A., J.B. Reece dan L.G. Mitchell. 2002. *Biologi Jilid 1*. Terjemahan oleh Rahayu Lestari. Jakarta: Erlangga.
- Erickson, Ziegler, Guevera, Abel, Klosgen, Mathur, Rothstein and Schattat. 2004. Agrobacterium-derived Cytokinin Influences plastid morphology and starch accumulation in *Nicotiana benthamiana* during transient assays. *J. Plant Biology*. Vol. 14: 127.
- De la Riva, Gonzalez-Cabrera, Vazquez-Padron, and Ayra-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A Natural Tool for Plant Transformation. *J. Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 1 No.3.
- Dong, J., and McHughen, A. 1993. Transgenic Flax Plant from *Agrobacterium* Mediated Transformation: Incidence of Chimeric Regenerants and Inheritance of Transgenic Plants. *J. Plant Science*. Vol. 91: 139-148.
- Foyer, Valadier, Migge, and Becker. 1998. Drought-Induced Effects on Nitrate Reductase Activity and mRNA and on the Coordination of Nitrogen and Carbon Metabolism in Maize Leaves. *J. Plant Physiol*. Vol. 117: 283-292.
- Fung, Langenkamper, Gardner, and MacRae. 2002. Differential Expression within an SPS Gene Family. *J. Plant Science*. Vol. 164: 459-470.
- Hiei, Y., T. Komari, and T. Kubo. 1997. Transformation of Rice Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35: 205-218.
- Huber, S.C., and Huber, J.L. 1996. Role and Regulation of Sucrose Phosphate Synthase in Higher Plants. *J. Plant Physiol*. Vol. 47: 431-444.
- Jang, J.C., and Sheen, J. 1994. Sugar Sensing in Higher Plants. *J. Plant Cell*. Vol. 6: 1665-1679.
- Komatsu, Moriguchi, Koyama, Omura, and Akihama. 2002. Analysis of Sucrose Synthase Genes in Citrus Suggests Different Roles and Phylogenetic Relationships. *J. Experimental Botany*. Vol. 53: 61-71.



- Kusrini, E. 2014. *Seleksi dan Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) pCL4-SoSPS1 secara In Vitro. Tidak dipublikasikan*. Skripsi. Jember: Fakultas MIPA Universitas Jember.
- Lessard, Kulaveerasingam, York, Strong, and Sinskey. 2002. Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants. *J. Metabolic Engineering*. Vol. 4: 67-79.
- Manickavasagam, Ganapathi, Anbazhagan, Sudhakar, Selvaraj, Vasudevan and Kasthurirengan. 2004. *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation and Development of Herbicide-resistant Sugarcane (*Saccharum* Species Hybrids) Using Axillary Buds. *J. Plant Cell*. Vol. 23: 134-143.
- Mannan, Syed, Selvaraj, and Mirza, B. 2009. Factors Affecting *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation of *Artemisia absinthium* L.. *J. Botani*. Vol. 41(6): 3239-3246.
- Mathias, R.J., and Boyd, L.A. 1986. Cefotaxime Stimulates Callus Growth, Embryogenesis and Regeneration in Hexaploid Bread Wheat (*Triticum aestivum* L Em. Thell). *J. Botani*. Vol. 41(6): 3239-3246.
- Matthews, Saunders, Gebhardt, Lin, and Koehler. 1995. *Methods in Molecular Biology: Reporter Genes and Transient Assays for Plants*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Ningtyas, R.M. 2013. *Transformasi Gen SoSPS1 pada Tanaman Tebu (Saccharum officinarum L. var. BL) Overekspresi Gen SoSUT1 Event 2 Menggunakan Agrobacterium tumefaciens*. Tidak dipublikasikan. Skripsi. Jember: Fakultas MIPA Universitas Jember.
- Nishimura, Aichi, and Matsuoka. 2006. A Protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Nature Protocol*. Vol. 1: 6.
- Purnamaningsih, Ragapadmi. 1990. Regenerasi Tanaman melalui Embriogenesis Somatik dan Beberapa Gen yang Mengendalikannya. *Buletin AgroBio*. Vol.5 No.2.
- Rahmawati, S. 2006. Status Perkembangan Perbaikan Sifat Genetik Tanaman Padi Menggunakan Transformasi *Agrobacterium*. *Jurnal AgroBiogene*. Vol.2(1): 36-44.
- Raineri, Bottino, Gordon and Nester. 2002. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.). *Nature Biotechnology*. Vol.8.

- Rinanto, Y., dan Sugiharto, B. 2011. *Aktivitas Sucrose Phosphate Synthase Kultivar Tebu (Saccharum officinarum L.) Toleran dan Sensitif Selama Cekaman Kekeringan*. Seminar Nasional VIII Pendidikan Biologi.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawitri, W.D. 2013. *Biochemical Study of Sucrose Phosphate Synthase at Ser424 in Recombinant E.coli*. Unpublished data.
- Schroder, J., Alt-Morbe, J. and Kithmann, H. 1989. Differences in Induction of Ti-plasmid Virulence Genes *virG* and *virD* and Continued Control of *virD* Expression by Four External Factors. *J. Mol. Plant-Microbe Interact.* Vol. 2: 301-308.
- Silva, J.A, and Fukai, S. 2001. The Impact of Carbenicillin, Cefotaxime and Vancomycin on Chrysanthemum and Tobacco TCL Morphogenesis and *Agrobacterium* Growth. *J. Appl. Hort.* Vol. 3(1): 3-12.
- Sugiharto, Sakakibara, Sumadi, and Sugiyama. 1997. Differential Expression of Two Genes for Sucrose-Phosphate Synthase in Sugarcane: Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. *J. Plant Physiol.* Vol. 38: 961-965.
- Takahashi, Ono, Ugaki, Ishimura, Aoki, and Ohsugi. 2000. Ser162-Dependent Inactivation of Overproduced Sucrose-Phosphate Synthase Protein of Maize Leaf in Transgenic Rice Plants. *J. Plant Cell Physiol.* Vol. 4: 977-981.
- Toroser, D., and Huber, S.C. 1997. Protein Phosphorylation as a Mechanism for Osmotic-Stress Activation of Sucrose-Phosphate Synthase in Spinach leaves. *J. Plant Physiol.* Vol. 114: 947-955.
- Toroser, McMichael Jr, Krause, Kurreck, Sonnewald, Stitt, and Huber. 1999. Site-directed Mutagenesis of Serine 158 Demonstrates its Role in Spinach Leaf Sucrose-Phosphate Synthase Modulation. *J The Plant Journal.* Vol. 17(4): 407-413.
- Worrell, Bruneau, Summerfelt, Boersig, and Voelker. 1991. Expression of a Maize Sucrose Phosphate Synthase in Tomato Alters Leaf Carbohydrate Partitioning. *J. Plant Cell Physiol.* Vol. 3: 1121-1130.



**LAMPIRAN**

1. Komposisi Media *MURASHIGE AND SKOOG* (MS)

<b>Bahan</b>	<b>Jumlah /1L</b>
MS Makro	50 ml
MS Mikro	0,5 ml
Fe <sub>2</sub> EDTA	5 ml
B <sub>5</sub> Vitamin	0,5 ml
Sukrosa	30 gram
Phytagell	2,5 gram

2. Komposisi Media *Yeast Extract Peptone* (YEP)

<b>Bahan</b>	<b>Jumlah /1L</b>
Yeast Extract	10 gram
Peptone	10 gram
Sodium Chloride (NaCl)	5 gram