



**TRANSFORMASI TANAMAN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
DENGAN GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN *A.tumefaciens***

SKRIPSI

Oleh

Amir Muayyad

NIM 121510501101

PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI

FAKULTAS PERTANIAN

UNIVERSITAS JEMBER

2016



**TRANSFORMASI TANAMAN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
DENGAN GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN *A.tumefaciens***

SKRIPSI

Oleh

Amir Muayyad

NIM. 121510501101

PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI

FAKULTAS PERTANIAN

UNIVERSITAS JEMBER

2016



**TRANSFORMASI TANAMAN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
DENGAN GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN *A.tumefaciens***

SKRIPSI

Diajukan guna melengkapi dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Sarjana (S1) pada Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh

Amir Muayyad

NIM. 121510501101

PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI

FAKULTAS PERTANIAN

UNIVERSITAS JEMBER

2016

PERSEMBAHAN

Karya ini kupersembahkan untuk:

1. Allah SWT atas segala karunia dan limpahan rahmat dalam penyelesaian karya ilmiah ini sehingga dapat terselesaikan dengan lancar.
2. Ibunda Hj. Aida Marwah dan Ayahanda H. Mustafa Madzani, kedua Adik saya Qudsiyatul Umniyah dan Qorirotus Siyanah, curahan semangat serta pikiran ini akan terasa hampa tanpa adanya Do'a dan kerja keras mereka
3. Guru-guru saya mulai dari taman kanak-kanak sampai dengan di perguruan tinggi
4. Almamater Fakultas Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

‘‘Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan sesuatu kaum sehingga mereka merubah keadaan pada diri mereka sendiri. Dan apabila Allah menghendaki keburukan terhadap sesuatu kaum, maka tak ada yang dapat menolaknya; dan sekali-kali tak ada pelindung bagi mereka selain Dia’’.

(Terjemahan QS Ar-Ra’du:11)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Amir Muayyad

NIM : 121510501101

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul **“Transformasi Tanaman Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dengan Gen *SoSPSI* Menggunakan *A.tumefaciens*”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus saya junjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 11 Desember 2016

Yang menyatakan,

Amir Muayyad

NIM. 121510501101

SKRIPSI

**TRANSFORMASI TANAMAN SINGKONG (*Manihot esculenta* Crantz)
DENGAN GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN VEKTOR *A.tumefaciens***

Oleh

Amir Muayyad

NIM. 121510501101

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph.D

NIP : 196504261994031001

Dosen Pembimbing Anggota : Tri Handoyo, SP., M.Agr., Ph.D

NIP : 197112021998021001

PENGESAHAN

Skripsi yang Berjudul “**Transformasi Tanaman Singkong (*Manihot esculenta Crantz*) dengan Gen *SoSPS1* Menggunakan *A.tumefaciens*” telah diuji dan disahkan pada:**

Hari : Selasa

Tanggal : 27 Desember 2016

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph.D

19650426 199403 1 001

Dosen Penguji Utama,

Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP.

19650425 199002 2 002

Dosen Pembimbing Anggota,

Tri Handoyo, SP., M.Agr., Ph.D

19711202 1998 02 1 001

Dosen Penguji Anggota,

Dr. Ir. Denna Eriani Munandar, MP.

19600409 198802 2 001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Pertanian,

Ir. Sigit Soeparjono, M.S., Ph.D..

NIP. 19600506 198702 1 001

RINGKASAN

Transformasi Tanaman Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dengan Gen *SoSPSI* Menggunakan *A.tumefaciens* Amir Muayyad; Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Sukrosa merupakan produk akhir dari proses asimilasi karbon yang berperan penting dalam proses penyediaan energi, pengatur ekspresi gen, sebagai partisi karbon serta untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Pada tanaman singkong, sukrosa akan ditranslokasikan ke jaringan simpan (*sink tissues*) dalam bentuk pati. SPS merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman. *SoSPSI* merupakan gen yang menyandikan protein *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) yang dikloning dari tanaman tebu. Berdasarkan hal tersebut, gen *SoSPSI* berpotensi untuk disisipkan pada tanaman singkong varietas kaspro agar terjadi overekspresi SPS.

Overekspresi SPS akan menyebabkan translokasi sukrosa ke jaringan simpan menjadi lebih banyak, sehingga akan terjadi peningkatan akumulasi pati pada umbi singkong. Metode yang digunakan adalah Transformasi Genetik dengan menyisipkan Gen *SoSPSI* ke dalam genom tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menggunakan vektor transformasi berupa bakteri gram negatif *Agrobacterium tumefaciens*.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Bioteknologi dan Biologi Molekuler, *Center for Development of Advance Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember, dimulai pada bulan Januari 2016 hingga selesai. Tahapan transformasi yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi persiapan eksplan transformasi, isolasi DNA plasmid dan konfirmasi gen target, infeksi *A. tumefaciens*, ko-kultivasi, eliminasi *A. tumefaciens*, seleksi tanaman *putative* transforman, isolasi DNA genom tanaman *putative* transforman dan analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Berdasarkan hasil transformasi diperoleh 3 tanaman *putative* transforman, dengan nilai rata-rata efektivitas transformasi sebesar 3%. Pada analisis PCR

didapatkan 2 tanaman transforman dari seluruh rangkaian transformasi yang telah dilakukan.



SUMMARY

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Transformation with *SoSPS1* Gene by Using *A.tumefaciens* Amir Muayyad; Agrotechnology Study Program Faculty of Agriculture University of Jember.

Sucrose is the final product of carbon assimilation process which has an important role in energy provision process, gene expression controller, as carbon partition and also to induce growth and development of the plant. In Cassava, sucrose will be translocated to sink tissues as a starch. SPS is a key enzyme in sucrose biosynthesis in the plant. *SoSPS1* is the gene expression of *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) which has been cloned from sugarcane. Based on this, *SoSPS1* gene has a potential to be transformed to Kaspro Cassava variety to construct SPS overexpression.

SPS overexpression will induce a bigger sucrose translocation to the sink tissues, and will be an increasing of starch accumulation in the tuber of cassava. The method is Genetical Transformation that insert the *SoSPS1* to the Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome by using negative gram bacteria *Agrobacterium tumefaciens* as the transformation vector.

This research conducted in Biotechnology and Molecular Biology Division, Center for Development of Advance Sciences and Technology (CDAST) Laboratory University of Jember, which has been started on January 2016. The transformation step which has been done in this research was transformation explant preparation, plasmid DNA isolation and gene target confirmation, *A. tumefaciens* infection, co-cultivation, *A. tumefaciens* elimination, putative transformant plant selection, putative transformant plant DNA genome isolation and PCR (Polymerase Chain Reaction) analysis.

Based on the transformation result, obtained 3 putative transformant plant with 3% transformation effectivity average rate. On PCR analysis, obtained 2 transformant plant from all of the conducted transformation chain.

PRAKATA

Puji syukur atas kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **Transformasi Tanaman Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) dengan Gen *SoSPSI* Menggunakan *A.tumefaciens***. Penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Allah SWT atas segala berkah dan hidayah-Nya yang selalu tercurah dalam setiap perjalanan hidupku;
2. Ir. Didik Pudji Restanto, MS., Ph.D. selaku dosen pembimbing utama, Tri Handoyo, SP., M.Agr., Ph.D. selaku dosen pembimbing anggota, dan Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP. selaku dosen penguji utama dan Dr. Ir. Denna Eriani Munandar, MP. selaku dosen penguji anggota yang telah meluangkan waktu dan perhatiannya untuk memberikan ilmu serta bimbingannya;
3. Dr.Ir. Jani Januar, M.T. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember;
4. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.,Sc. selaku ketua *Center for Development of Advance Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember yang telah memberikan bimbingan selama mengerjakan penelitian di Laboratorium CDAST;
5. Ir. Setiyono, MP. Selaku dosen pembimbing akademik yang telah membimbing selama studi;

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

Penulis,

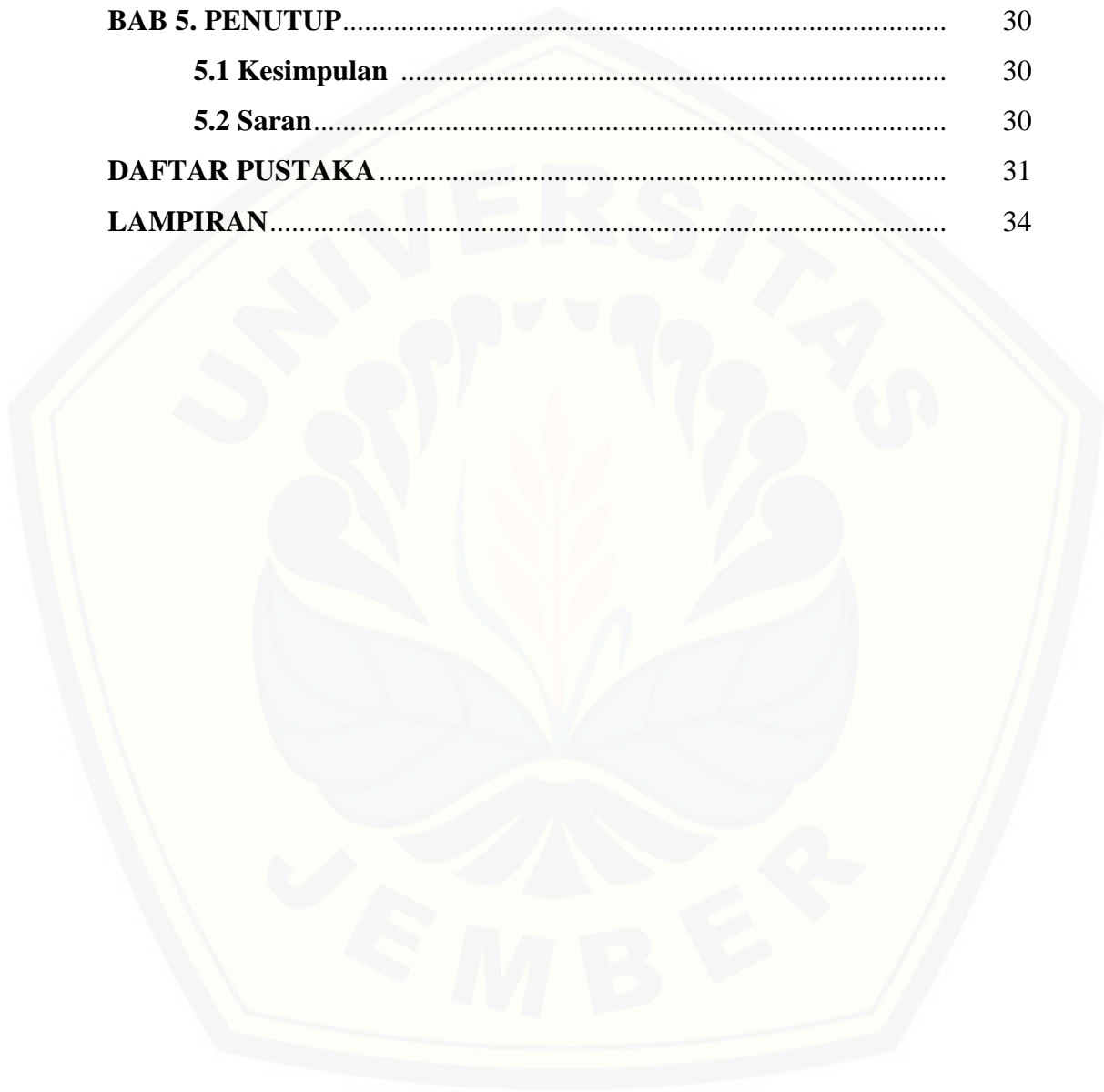
Jember, 11 Oktober 2016

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN SAMPUL.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tanaman Singkong Varietas Kaspro	4
2.2 Transformasi Gen melalui <i>A. tumifaciens</i>	5
2.3 <i>Sucrose Phosphate Synthase</i> (SPS), Biosintesis Sukrosa dan Akumulasi Pati	7
2.4 Hipotesis	10
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan	11

3.3 Metode Penelitian	11
3.3.1 Persiapan Eksplan dan Kondisi Umum Percobaan .	11
3.3.2 Persiapan <i>A. tumefaciens</i> GV 3101 Pembawa Plasmid <i>pKYS-SoSPS1</i>	11
3.3.2.1 Kultur <i>A.tumifaciens</i> GV 3101 Pembawa Konstruksi Plasmid <i>pKYS-SoSPS1</i>	12
3.3.2.2 Isolasi dan Konfirmasi DNA Plasmid <i>pKYS-SoSPS1</i>	13
3.3.2.3 Inokulasi <i>A.tumefaciens</i>	14
3.3.3 Transformasi Tanaman Singkong dengan Gen <i>SoSPS1</i>	14
3.3.3.1 Infeksi <i>A.tumefaciens</i> pada Eksplan	14
3.3.3.2 Ko-Kultivasi	14
3.3.3.3 Eliminasi <i>A.tumifaciens</i>	15
3.3.3.4 Seleksi Eksplan <i>Putative</i> Transforman	15
3.3.3.5 Efektifitas Transformasi	15
3.3.4 Pengujian dan Konfirmasi Hasil Transformasi	16
3.3.4.1 Isolasi DNA Genom Tanaman <i>Putative</i> Transforman	16
3.3.4.2 Analisis <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1 Hasil	18
4.1.1 Persiapan Eksplan sebagai Bahan Transformasi	18
4.1.2 Konfirmasi Konstruksi Plasmid <i>pKYS-SoSPS1</i> ..	20
4.1.3 Nilai Efektivitas Transformasi Tanaman Singkong dengan Gen <i>SoSPS1</i>	20
4.2. Pembahasan	20
4.2.1 Persiapan <i>A.tumifaciens</i> GV 3101 Pembawa Plasmid <i>pKYS-SoSPS1</i>	21

4.2.2 Transformasi Tanaman Singkong dengan Gen <i>SoSPS1</i>	22
4.2.3 Analisis PCR Tanaman Singkong <i>Putative</i> Transforman	27
BAB 5. PENUTUP	30
5.1 Kesimpulan	30
5.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	34



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Komposisi Media <i>Murashige and Skoog</i> (MS)	34
Lampiran 2 : Komposisi Media <i>Yeast Extract Peptone</i> (YEP).....	35



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Modifikasi Ti Plasmid <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
Gambar 2.2 Mekanisme interaksi <i>A. tumefaciens</i> dengan sel tanaman	7
Gambar 2.3 Tahapan Biosintesa Sukrosa Pada Daun Tanaman	8
Gambar 2.4 Proses Translokasi Sukrosa dan Biosintesis Pati pada Umbi Singkong.....	9
Gambar 3.1 Peta Konstruksi pKYS- <i>SoSPS1</i>	13
Gambar 4.1 Hasil Sterilisasi Tunas Aksilar yang digunakan sebagai Eksplan	18
Gambar 4.2 Single koloni <i>A. tumefaciens</i> strain GV 3101 yang telah terinsersi gen target <i>SoSPS1</i> dan Hasil elektroforesis gel agarose 1% DNA hasil PCR menggunakan primer F/R <i>nptII</i>	19
Gambar 4.3 Eksplan pada media seleksi ke-2 yang mengalami <i>overgrowth</i> ..	24
Gambar 4.4 Tanaman yang telah ditransformasi gen <i>SoSPS1</i> pada media seleksi 2 dan Tanaman kontrol (<i>wild type</i>) <i>SoSPS1</i> pada media seleksi 2	25
Gambar 4.5 Pertumbuhan tunas eksplan T3.1, T3.2 dan T4 pada media seleksi ke-5	26
Gambar 4.6 Pertumbuhan akar eksplan T3.1, T3.2 dan T4 pada media seleksi ke-5	27
Gambar 4.7 Visualisasi DNA genom tanaman pada gel agarose 1% dengan pasangan primer <i>CaMV</i> (F) dan <i>SPS</i> (R) serta sepasang primer <i>nptII</i> (F/R).....	26

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Nilai Efektivitas Transformasi (ET) pada tiap-tiap tahapan transformasi (transformasi ke-1 sampai dengan ke-4)	24



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Transformasi genetik pada tanaman merupakan suatu teknik rekayasa genetika dengan cara memasukkan gen asing yang diisolasi dari suatu organisme ke dalam genom tanaman. Terdapat dua metode yang dapat diterapkan untuk melakukan proses transformasi genetik pada tanaman, yakni metode langsung dan tidak langsung. Metode langsung merupakan teknik penyisipan gen dengan memanfaatkan alat yang dapat langsung memasukkan gen target ke dalam genom tanaman, misalnya *partikel bombardment*, elektroporasi dan mikroiinjeksi. Sedangkan metode tidak langsung merupakan teknik penyisipan gen target dengan memanfaatkan vektor *A. tumefaciens*. Metode transformasi tidak langsung lebih banyak digunakan karena memiliki efisiensi penyisipan gen yang lebih stabil, jumlah *copy* gen yang diintegrasikan ke genom tanaman berjumlah sedikit, serta lebih murah dan mudah apabila dibandingkan dengan metode transformasi secara langsung (Nishimura *et al.*, 2006).

SoSPS1 merupakan gen penyandi protein *Sucrose phosphate synthase* (SPS) yang diisolasi dari tanaman tebu (Sugiharto *et al.*, 1997). SPS merupakan enzim utama yang menentukan biosintesa sukrosa yang berlangsung di mesofil daun. Buchanan *et al.* (2000) menyatakan bahwa SPS mengkatalisis reaksi pembentukan *sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG). Suc-6-P dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) menghasilkan sukrosa. Sukrosa memiliki peranan penting dalam tubuh tanaman. Hal ini karena sukrosa berfungsi dalam penyediaan energi (Kim *et al.*, 2000), pengatur ekspresi gen, dan partisi karbon asimilat sehingga dapat memacu pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Fung *et al.*, 2003).

Hingga saat ini, proses penyisipan gen SPS pada genom tanaman telah banyak dilakukan. Proses penyisipan gen SPS ditujukan untuk memperoleh overekspresi SPS pada tanaman, sehingga tanaman memiliki kandungan sukrosa yang lebih tinggi atau sifat-sifat tertentu yang diinginkan akibat dari adanya

peningkatan sukrosa. Seperti halnya penelitian yang dilakukan oleh Ishimaru *et al.* (2008), bahwa tanaman kentang yang disisipi gen SPS jagung menunjukkan peningkatan sintesis sukrosa pada daun kentang, sehingga meningkatkan suplai fotoasimilat ke bagian umbi yang menyebabkan kandungan pati pada umbi kentang meningkat. Beberapa hal tersebut yang melatar belakangi penulis untuk menyisipkan gen *SoSPS1* pada tanaman singkong.

Proses penyisipan gen *SoSPS1* pada genom tanaman singkong diharapkan mampu meningkatkan ekspresi SPS, sehingga terjadi peningkatan biosintesis sukrosa. Terjadinya peningkatan biosintesis sukrosa diharapkan mampu memacu metabolisme sel tanaman sehingga pertumbuhan dan perkembangan tanaman menjadi lebih baik. Selain itu, melalui peningkatan biosintesis sukrosa diharapkan terjadi peningkatan translokasi sukrosa ke jaringan penyimpanan (umbi) sehingga memiliki kandungan pati yang lebih tinggi. Berdasarkan uraian tersebut, penulis bermaksud untuk melakukan penelitian mengenai transformasi tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz) varietas kaspro dengan menggunakan gen *SoSPS1*, untuk mengetahui pengaruhnya terhadap kandungan pati yang dihasilkan.

1.2 Rumusan Masalah

Transformasi tanaman singkong dengan gen *SoSPS1* diduga dapat meningkatkan ekspresi gen SPS sehingga terjadi peningkatan biosintesis sukrosa. Peningkatan biosintesis sukrosa diharapkan mampu memacu pertumbuhan dan perkembangan tanaman singkong serta meningkatkan akumulasi pati pada jaringan penyimpanan (umbi). Proses transformasi dilakukan dengan menggunakan vektor *A. tumefaciens*. Dengan demikian, apakah gen *SoSPS1* yang disisipkan mampu terintegrasi dalam genom tanaman singkong?

1.3 Tujuan

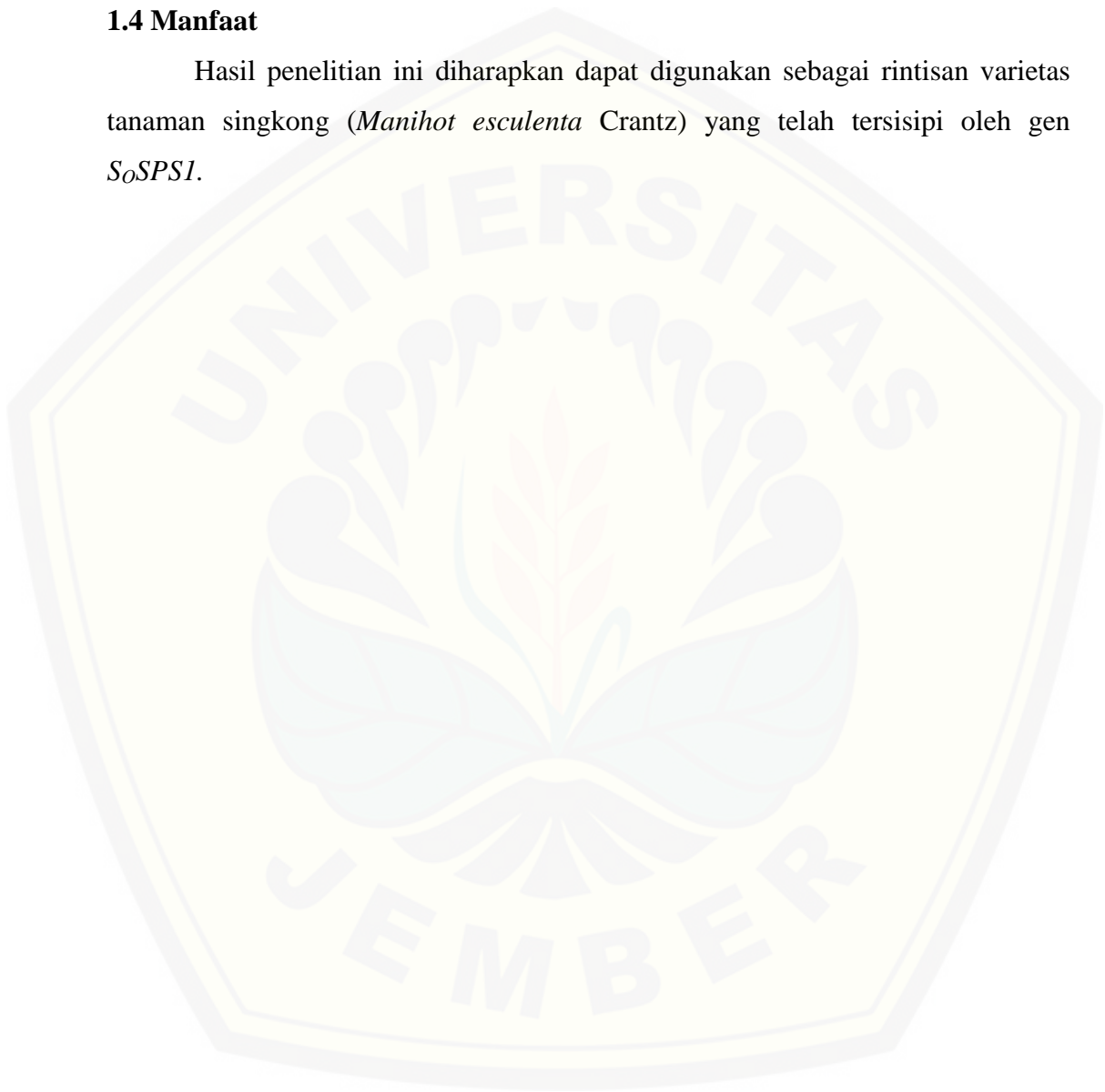
Tujuan penelitian transformasi tanaman singkong (*Manihot esculenta* crantz) dengan gen *SoSPS1* menggunakan *A.tumefaciens* adalah sebagai berikut.

1. Untuk mengetahui nilai efektivitas transformasi gen *SoSPS1* pada tanaman singkong.

2. Untuk melakukan konfirmasi keberadaan gen *SoSPS1* pada tanaman singkong hasil transformasi.
3. Untuk mendapatkan tanaman singkong yang telah tersisipi oleh gen *SoSPS1*.

1.4 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai rintisan varietas tanaman singkong (*Manihot esculenta* Crantz) yang telah tersisipi oleh gen *SoSPS1*.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Singkong Varietas Kaspro

Singkong (*Manihot esculenta* Crantz) merupakan tanaman yang berasal dari benua Amerika. Tanaman singkong telah mencapai menyebar hampir ke seluruh negara di dunia. Tanaman yang tergolong famili *Euphorbiaceae* ini masuk ke Indonesia pada tahun 1810 melalui bangsa Portugis dari Brazil yang datang ke Indonesia. Isidore *et al.* (2011) menyatakan bahwa negara-negara beriklim tropis merupakan negara penghasil singkong terbesar di dunia. Indonesia merupakan negara penghasil singkong terbesar ke-4 di dunia setelah Nigeria, Brazil dan Thailand. Berikut merupakan klasifikasi tanaman singkong menurut Le *et al.* (2007) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: Manihot
Spesies	: <i>Manihot esculenta</i> Crantz

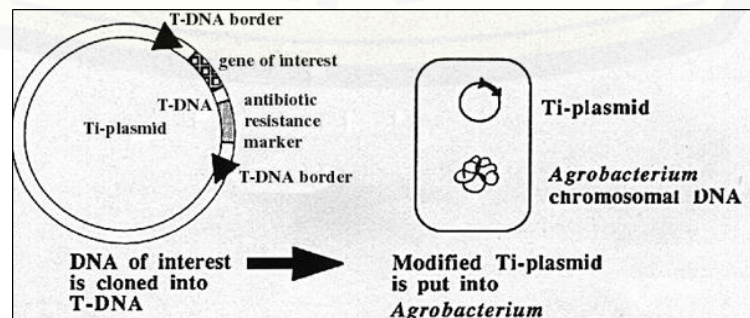
Singkong kaspro merupakan varietas singkong yang banyak dikembangkan di Jawa Timur sebagai bahan olahan pangan. Wattimena (2010) menyatakan bahwa singkong kaspro memiliki produktivitas yang cukup tinggi yakni hingga 35 ton per hektar. Selain itu, singkong kaspro juga memiliki umur panen yang lebih singkat (genjah) dibandingkan dengan varietas singkong lain yakni 8 bulan. Pohon tanaman singkong kaspro dapat tumbuh baik di dataran rendah maupun dataran tinggi hingga mencapai ketinggian 3 meter, dengan kondisi tanah yang gembur dan tidak selalu tergenang. Daun tanaman singkong kaspro berbentuk menjari, daun muda berwarna hijau muda, kemudian akan berubah menjadi hijau jika telah tua. Ukuran bunga jantan setengah dari ukuran bunga betina dengan pedicelus tipis, lurus dan pendek, sedangkan pada bunga

betina pedicelusnya tebal, melengkung dan panjang. Purwono dan Purnawati (2007) menyatakan bahwa tanaman singkong kaspro memiliki batang yang kokoh dan beruas-ruas dengan pola percabangan yang khas. Umbi tanaman singkong kaspro berkembang dari ujung proksimal, kemudian berkembang ke area distal (Rubatzky, 1998).

2.2 Transformasi Gen melalui *A. tumifaciens*

Transformasi genetik pada tanaman merupakan teknik rekayasa genetika dengan cara memasukkan gen target yang telah diisolasi pada tanaman, dengan tujuan agar tanaman tersebut memiliki sifat dan karakter yang diharapkan. Terdapat dua metode yang dapat diterapkan untuk melakukan transfer gen, yakni metode langsung dan tidak langsung. Metode langsung (*direct method*) dilakukan dengan menggunakan *Electroporation* dan *Particle bombardment*. Metode tidak langsung dapat dilakukan dengan memanfaatkan *A. tumifaciens* sebagai vektor (Nyaboga *et al.*, 2015).

Agrobacterium tumifaciens dapat dijadikan sebagai vektor untuk mentransfer gen ke dalam sel tanaman, karena memiliki kemampuan untuk mentransfer T-DNA (*transfer DNA*) ke dalam genom tanaman inang, sehingga menyebabkan terbentuknya tumor (*crown gall*). Kemampuan tersebut dapat dimanfaatkan untuk menyisipkan gen yang diinginkan ke dalam genom tanaman. Gen-gen yang berperan dalam sintesis hormon dan opine digantikan dengan gen target, sehingga tidak menyebabkan terbentuknya tumor dan dapat dihasilkan tanaman transgenik dengan ekspresi gen yang diharapkan (Gambar 2.1) (De la riva *et al.*, 1998).



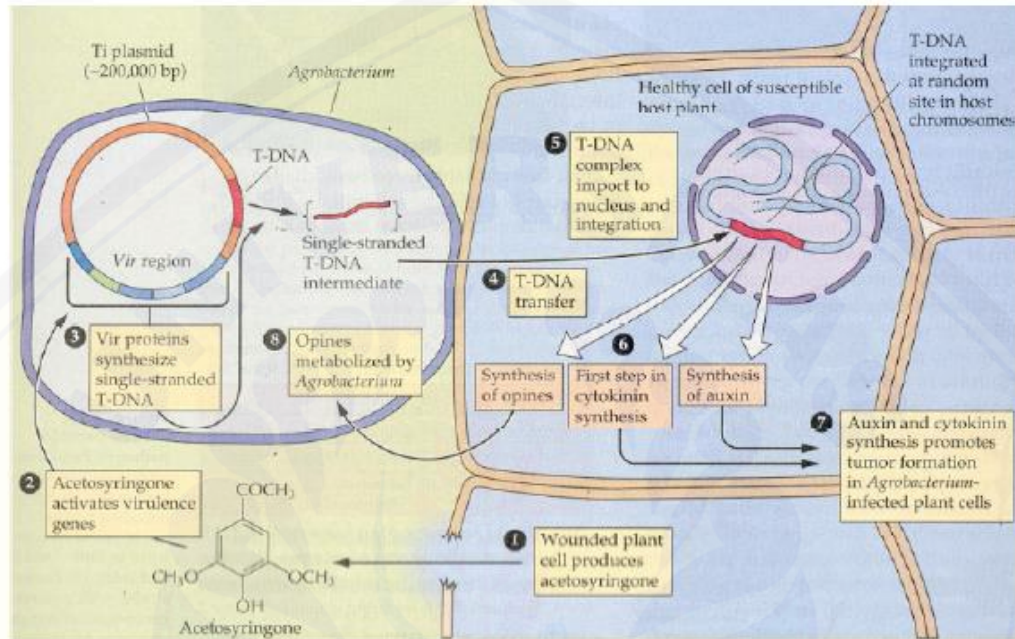
Gambar 2.1. Modifikasi Ti plasmid *Agrobacterium tumefaciens*.

De la riva *et al.* (1998) menyatakan bahwa proses pembentukan tumor (*crown gall*) oleh *Agrobacterium tumifaciens* melibatkan kinerja 3 komponen genetik penting, yakni T-DNA, gen virulen kromosom (*chromosomal virulence*), dan gen virulen dalam plasmid Ti (*tumor inducing*). T-DNA merupakan fragmen yang ditransfer ke dalam sel tanaman yang terluka dan disisipkan ke dalam genom tanaman. T-DNA terletak pada plasmid Ti, dimana daerah T-DNA tersebut dibatasi oleh LB (*Left Border*) dan RB (*Right Border*) mengandung gen penting bagi *A. tumifaciens*. Gen penting tersebut berperan dalam menyandikan enzim untuk biosintesis auksin dan sitokinin yang dapat menyebabkan pembelahan sel menjadi tidak terkontrol, sehingga menyebabkan tumor. Gen penting lain yang terdapat dalam T-DNA adalah gen yang berperan dalam sintesis dan sekresi opine untuk pertumbuhan *A. tumifaciens*.

Komponen genetik penting yang ke-2 adalah gen virulen kromosom (*chromosomal virulence*) yang terdapat dalam kromosom *A. tumifaciens* berfungsi dalam pelekatan bakteri pada sel tanaman. Komponen genetik yang ke-3 adalah gen-gen virulen (gen *vir*) yang terdapat dalam plasmid Ti (*tumor inducing*). Terdapat 7 macam gen *vir* yang terdapat dalam plasmid Ti, yakni gen *vir* A, B, C, D, E, G dan H. Gen-gen *vir* tersebut mensintesis protein virulensi yang berperan dalam menginduksi transfer dan integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman (De la riva *et al.*, 1998).

Tahapan transfer T-DNA dari *A. tumifaciens* ke dalam genom tanaman diawali dengan adanya jaringan yang terluka dari tanaman, sehingga mengeluarkan senyawa fenol monosiklik yakni *acetocyringone* dan beberapa monosakarida. Senyawa *acetocyringone* yang dihasilkan akan berinteraksi dengan *vir* A dan menghasilkan sinyal untuk mengaktifkan *vir* G dan memfosforilasinya menjadi *vir* G-P. Aktifnya *vir* G-P akan mengaktifkan gen-gen *vir* lainnya untuk mulai bersifat virulen dan melakukan transfer *vir* D untuk memotong secara spesifik Ti plasmid pada LB dan RB. Pemotongan tersebut menyebabkan terlepasnya T-DNA yang akan ditransfer ke dalam sel tanaman. T-DNA utas tunggal akan diikat oleh protein *vir* E yang merupakan *single strand binding* protein sehingga terlindung dari degradasi oleh enzim-enzim nuklease ketika T-

DNA masuk ke dalam sel tanaman. Bersamaan dengan itu, *vir B* membentuk saluran transmembran yang menghubungkan sel *A. tumefaciens* dan sel tanaman sehingga T-DNA dapat masuk ke dalam sel tanaman. Secara singkat mekanisme interaksi *A. tumefaciens* dengan sel tanaman dan proses transformasi genetik oleh *A. tumefaciens* dapat dilihat pada Gambar 2.2. (Zupan dan Zambryski, 1995).



Gambar 2.2 Mekanisme interaksi *A. tumefaciens* dengan sel tanaman (Kakkar and Verma, 2011).

2.3 *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS), Biosintesis Sukrosa dan Akumulasi Pati

Sukrosa merupakan produk akhir dari proses asimilasi karbon pada proses fotosintesis yang mudah ditransportasikan ke jaringan simpan (*sink tissues*). Sukrosa dalam tanaman berperan penting dalam proses penyediaan energi, pengatur ekspresi gen, sebagai partisi karbon serta untuk merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Fung *et al.*, 2003).

Chavez *et al.* (2000) menyatakan bahwa terdapat beberapa enzim yang berperan penting dalam proses sintesa sukrosa, yakni *sucrose transporter* (SUT), *sucrose synthase* (SuSy), *sucrose phosphate synthase* (SPS) dan *sucrose phosphate phosphatase* (SPP). Enzim *sucrose phosphate synthase* (SPS) dan *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) merupakan dua enzim yang lebih berperan penting dalam sintesa sukrosa jika dibandingkan dengan enzim SuSy. Hal ini

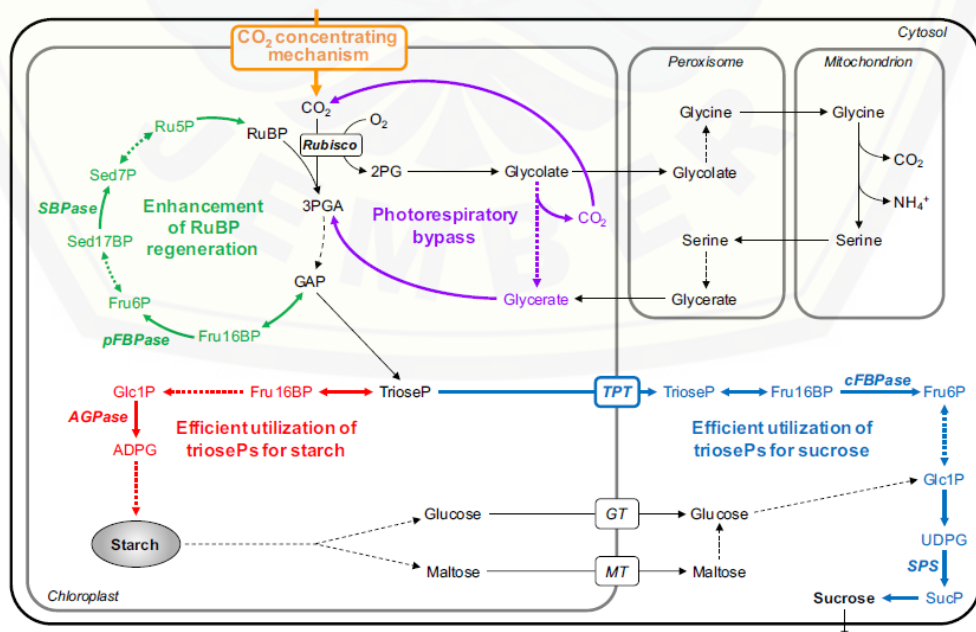
karena enzim SuSy tidak hanya mampu mensintesa sukrosa namun juga mampu mendegradasi sukrosa. SPS merupakan enzim utama dalam proses biosintesa sukrosa pada tanaman, karena memproduksi senyawa sucrose-6-phosphate yang merupakan substrat bagi enzim SPP untuk memproduksi sukrosa. Peningkatan aktivitas SPS dapat meningkatkan substrat bagi SPP, sehingga aktivitas SPP juga dapat ditingkatkan (Echeverria *et al.*, 1997).

Enzim SPS disintesis oleh gen SPS. Hingga saat ini, gen SPS telah berhasil diisolasi dari beberapa jenis tanaman, salah satunya dari tanaman tebu, *Saccharum officinarum* *Sucrose Phosphate Synthase (SoSPS)*. Terdapat dua jenis gen *SoSPS* yang menyandi enzim SPS. Kedua gen tersebut adalah gen *SoSPS1* yang mengkode *SPS* pada jaringan fotosintetik (daun), dan gen *SoSPS2* yang mengkode *SPS* yang diekspresikan secara konstitutif pada akar (Sugiharto *et al.*, 1997).

Enzim SPS mengkatalis pembentukan sucrose-6-phosphate (suc6P) dari fructose-6-phosphate (F6P) dan uridine-5-diphospho glucose (U-DPG) seperti reaksi dibawah ini (Buchanan *et al.*, 2000) :



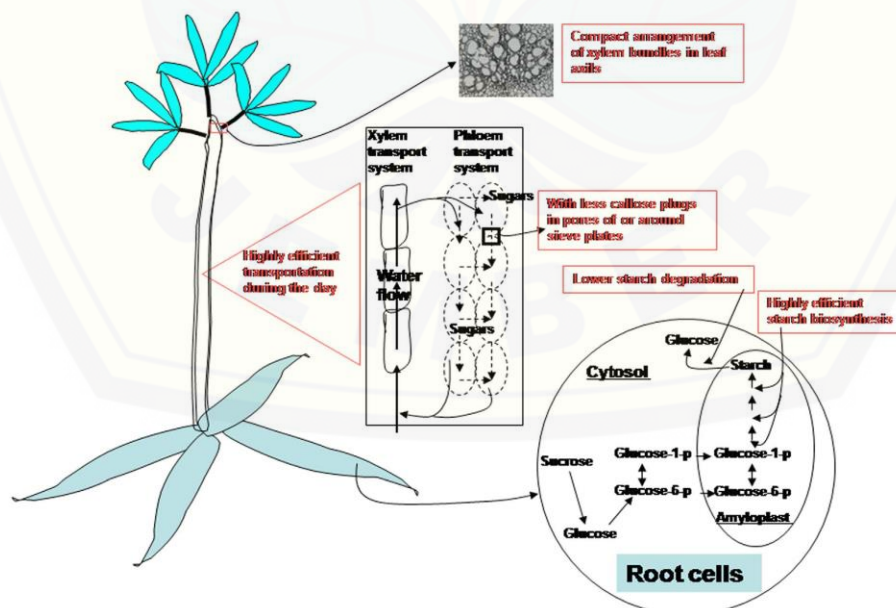
Phosphate pada sucrose-6-phosphate kemudian akan diputus oleh enzim SPP melalui proses defosforilasi sehingga terbentuk sukrosa (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Tahapan Biosintesa Sukrosa Pada Daun Tanaman (Cho *et al.*, 1992).

Walker dan Huber (1989) menyatakan bahwa sukrosa yang dihasilkan dari proses asimilasi karbon pada daun, akan ditranslokasikan ke bagian tanaman yang lain. Sukrosa merupakan sumber karbon utama yang digunakan untuk proses metabolisme tanaman. Selain digunakan secara langsung, sukrosa yang dihasilkan juga akan disimpan ke organ-organ penyimpanan (batang, biji, buah, akar serta umbi) baik dalam bentuk sukrosa maupun dikonversi menjadi pati.

Pati ditimbun pada amiloplas dalam organ penyimpanan (batang, biji, buah, akar serta umbi). Lakitan (1993) menyatakan bahwa sintesis pati pada amiloplas menggunakan bahan baku sukrosa ataupun bentuk gula sederhana lainnya yang dikirim dari daun. Pada daun, pati disintesis dan diakumulasi dalam kloroplas. Ketika siang hari, pati akan terakumulasi pada daun jika laju fotosintesis melampaui laju respirasi dan translokasi fotosintat keluar dari daun. Pada malam hari, pati yang terakumulasi dalam kloroplas akan diurai kembali melalui proses respirasi dan diangkut keluar dari daun dalam bentuk sukrosa. Sukrosa yang ditranslokasikan tersebut sebagian akan digunakan untuk proses pertumbuhan dan sebagian lagi akan disimpan dalam bentuk pati ataupun fruktan (bergantung pada jenis tanaman). Proses translokasi sukrosa dan biosintesis pati pada umbi tanaman singkong dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Proses translokasi sukrosa dan biosintesis pati pada umbi singkong (Li *et al.*, 2016).

Terdapat dua jenis pati yang disintesis dalam amiloplas, yakni amilosa dan amilopektin. Amilosa tidak memiliki percabangan dalam struktur molekulnya, sedangkan amilopektin memiliki percabangan. Komposisi amilopektin selalu lebih besar daripada amilosa. Lakitan (1993) menyatakan bahwa 60-100% pati yang terkandung dalam tumbuhan berbentuk amilopektin. Menurut Murtiningrum dkk., (2012), umbi segar tanaman singkong memiliki kadar amilosa 12,28%-27,38% sedangkan kadar amilopektin berkisar antara 72,61%-87,71% dengan kandungan pati total antara 13,12% sampai 46,09%. Tanaman singkong kaspro memiliki kadar pati 22,23% dengan hasil rata-rata pati pada umbi 13,10 ton ha⁻¹ (Radjit dan Nila, 2011).

2.4 Hipotesis

Transformasi tanaman singkong dengan gen *SoSPSI* menggunakan vektor *A. tumefaciens* dapat menghasilkan tanaman singkong transforman setelah dianalisis dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Bioteknologi dan Biologi Molekuler, *Center for Development of Advance Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember, dimulai pada bulan Januari hingga November 2016.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan standar dalam laboratorium kultur jaringan dan biologi molekuler seperti *Laminar Air Flow*, Spektrofotometer, *Shaker*, *PCR*, *Centrifuge*, *Nano drop* dan lain lain. Sedangkan bahan utama yang digunakan adalah tanaman singkong varietas kaspro, biakan bakteri *A. tumifaciens* strain GV 3101 sebagai pembawa konstruk plasmid *pKYS-SoSPSI*.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Persiapan Eksplan dan Kondisi Umum Percobaan

a. Induksi Tunas dari Bahan Stek

Bahan tanam berupa batang singkong kaspro dipotong sepanjang 8 cm atau memiliki 2 *axillary bud*. Potongan batang tersebut kemudian ditanam pada gundukan media pasir, kompos, tanah dengan perbandingan 1:1:1. Penanaman bahan tanam dilakukan selama 5 minggu yang bertujuan menginduksi pertumbuhan tunas.

b. Sterilisasi Alat

Peralatan meliputi, *beaker glass*, *petridish*, *scalpel*, botol kultur, dan pinset dicuci menggunakan sabun kemudian dibilas dan dikeringkan. Peralatan yang sudah kering (kecuali botol kultur) dibungkus dengan plastik dan ditutup rapat dengan alat pres plastik. Semua peralatan yang telah dibungkus plastik disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 17 psi selama 2 jam.

c. Pembuatan Media

Media dasar untuk perlakuan dalam penelitian ini menggunakan media dasar MS (*Murashige and skoog*). Untuk membuat 1 liter media dasar MS diperlukan 20 ml larutan stok A dan B; 10 ml larutan stok C dan D; 5 ml larutan stok E dan F; 10 ml larutan Mio Inositol; 1 ml Vitamin; 30 gram Sukrosa. Menambahkan air steril (aquades) sampai larutan media mencapai 1 liter. Larutan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. pH larutan diukur dengan pH meter hingga mencapai nilai 5,8 dengan menambahkan HCl untuk menurunkan pH dan NaOH untuk menaikkan pH pada larutan. Larutan yang telah jadi ditambahkan *phytagell* 2,5 gram dan dimasak sampai agar larut dan kemudian dituang ke dalam botol kultur steril sebanyak 20 ml. Selanjutnya media disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 17,5 psi selama 2 jam. Media yang telah steril disimpan di ruang kultur.

d. Sterilisasi Eksplan dan Penanaman Pada Media

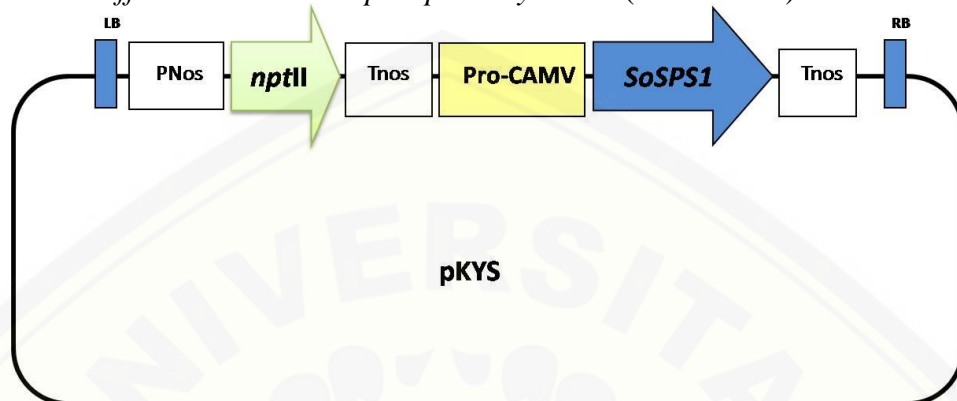
Eksplan batang muda singkong kaspro yang diambil dari lapang dibersihkan dari kotoran kemudian dicuci dengan menggunakan *detergent* dan dibilas dengan air mengalir. Eksplan tersebut kemudian disterilisasi dengan alkohol 70% dengan cara disemprot. Setelah itu, eksplan dipotong kecil untuk diambil bagian tunas aksilar (*axillary bud*). Eksplan dibawa ke dalam LAF (*Laminar airflow cabinet*) kemudian direndam pada alkohol 70% selama 1 menit kemudian dibilas dengan aquadest steril sebanyak 2 kali. Eksplan kemudian digojok dalam larutan *sodium hypochlorite* (NaClO) 1,05% selama 10 menit. Setelah itu eksplan dibilas dengan aquadest steril, diulang sebanyak 2 kali kemudian ditiriskan diatas kertas saring steril. Setelah kering, eksplan telah siap untuk dijadikan sebagai bahan transformasi.

3.3.2 Persiapan *A.tumifaciens* GV 3101 Pembawa Plasmid *pKYS-SoSPS1*

3.3.2.1 Kultur *A.tumifaciens* GV 3101 Pembawa Plasmid *pKYS-SoSPS1*

A.tumifaciens strain GV 3101 yang digunakan merupakan biakan murni yang telah diinsersi gen *SoSPS1* dalam plasmid *pKYS-SoSPS1*. Plasmid *pKYS-SoSPS1* mengandung bagian LB: *left border* RB: *right border* sebagai batas

bagian T-DNA, PNos: *promoter nopleveline synthase*, *nptII*: *neomycin phosphotransferase* gen penyandi sintesis protein ketahanan terhadap antibiotik *Kanamycin*, TNos: *terminator nopleveline synthase*, *promoter CaMV*, *SoSPS1*: *Saccharum officinarum sucrose phosphate synthase* (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Peta konstruk pKYS-*SoSPS1*, cDNA-SPS dibawah kendali promoter *CaMV* dan gen ketahanan terhadap kanamicyn *nptII* (Sugiharto *et al.*, 1997).

A.tumifaciens yang telah diinsersi gen *SoSPS1* dalam plasmid *pKYS-SoSPS1* diambil dari *gliserol stock* sebanyak 25 μ l. Kemudian diinokulasikan ke media YEP cair 2 ml dalam botol ulir yang mengandung antibiotik *kanamycin* 50 ppm dan *rifampicyn* 100 ppm. Hasil inokulasi diinkubasi shaker 150 rpm selama 18-24 jam pada suhu 28⁰C. Dari hasil inkubasi diambil 1 ose biakan yang telah tumbuh selanjutnya diinokulasi dengan metode *streak kuadran* pada media YEP padat selektif (*kanamycin* 50 ppm dan *rifampicyn* 100 ppm) untuk mendapatkan *single koloni*.

3.3.2.2 Isolasi dan Konfirmasi DNA Plasmid *pKYS-SoSPS1*

Isolasi DNA plasmid pada *single koloni A.tumifaciens* bertujuan untuk mendapatkan DNA plasmid *A.tumifaciens*. Teknik isolasi DNA plasmid menggunakan metode yang disebutkan dalam Sambrook *et al.* (1989).

Pellet DNA yang didapatkan dilarutkan dalam 20 μ l buffer TE dan diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. DNA plasmid hasil isolasi digunakan sebagai *template* untuk analisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan divisualisasi pada 1% gel elektroforesis untuk melakukan konfirmasi keberadaan gen target pada plasmid yang diinsersikan.

3.3.2.3 Inokulasi *A.tumefaciens*

Koloni tunggal bakteri yang telah terkonfirmasi kemudian diambil satu ose dan diinokulasikan ke dalam media YEP (*Yeast Extract and Peptone*) selektif (kanamycin 50 ppm dan rifampycin 100 ppm) cair 2 ml dan diinkubasi shaker 150 rpm, suhu 28°C selama 16 jam (Zainuddin *et al.*, 2012). Setelah 16 jam biakan *A.tumefaciens* tersebut kemudian disubkultur ke dalam YEP selektif cair 50 ml, diinkubasi shaker 150 rpm, pada suhu 28°C selama 4 hingga 6 jam (hingga kerapatan sel mencapai OD₆₀₀=0,5). Biakan bakteri tersebut kemudian di *sentrifuge* 5000 rpm selama 10 menit, buang sebagian supernatan yang dihasilkan dari proses *sentrifugasi*, sehingga hanya tersisa pelet dan sedikit supernatan. Tambahkan MS cair sebanyak 50 ml dan 25 ppm *acetosyringone* (Zainuddin *et al.*, 2012).

3.3.3 Transformasi Tanaman Singkong dengan Gen *SoSPS1*

3.3.3.1 Infeksi *A.tumefaciens* pada Eksplan

Sebanyak 50 eksplan tunas aksilar (*axillary bud*) yang telah disterilisasi ditusuk dengan jarum steril sebanyak 5 tusukan dibagian pangkal tunas. Eksplan kemudian diinfeksi dengan cara direndam pada MS cair yang telah diinokulasikan *A.tumefaciens* (OD₆₀₀=0,5) dan ditambah *acetosyringone* 25 ppm. Eksplan tunas aksilar tersebut kemudian digojok dengan *shaker* 50 rpm selama 25 menit pada suhu 28°C. Eksplan dibilas dengan MS cair, dikeringkan diatas cawan petri yang telah diletakkan kertas steril kering diatasnya. Eksplan selanjutnya ditumbuhkan pada media kokultivasi MS+ 25 ppm *acetosyringone*.

3.3.3.2 Ko-Kultivasi

Ko-kultivasi merupakan tahapan yang dilakukan setelah proses infeksi oleh *A.tumefaciens*. Tujuan dilakukannya Ko-kultivasi adalah untuk memberi kesempatan *A.tumefaciens* tumbuh bersama dengan eksplan. Selama proses ko-kultivasi, integrasi plasmid ke dalam genom tanaman dapat berlangsung. Proses ko-kultivasi menggunakan media (MS+25 ppm *acetosyringone*). Pada tahap ko-kultivasi, eksplan diinkubasi dalam kondisi gelap selama 2 hari pada suhu 28°C.

Suhu tersebut merupakan suhu optimal *A. tumefaciens* untuk tumbuh. Periode ko-kultivasi dilakukan selama 2 hari untuk mencegah terjadinya *overgrowth* (De la Riva *et al.*, 1998).

3.3.3.3 Eliminasi *A.tumifaciens*

Proses eliminasi terhadap *A.tumifaciens* perlu dilakukan agar tidak terjadi ledakan pertumbuhan (*overgrowth*) bakteri pada eksplan sesudah ko-kultivasi. Eksplan dari media ko-kultivasi dicuci dengan larutan cefotaxime 500 ppm kemudian dibilas dengan aquades steril, langkah tersebut dilakukan sebanyak 3 kali. Eksplan yang telah dicuci kemudian ditiriskan di atas kertas saring steril dan ditanam pada media eliminasi (MS+cefotaxime 500 ppm). Pada tahap tersebut, eksplan diinkubasi selama 7 hari dalam kondisi terang.

3.3.3.4 Seleksi Eksplan *Putative* Transforman

Tahapan seleksi eksplan dilakukan sebanyak 5 siklus. Pada setiap siklus, eksplan di inkubasi selama 14 hari pada kondisi terang. Media yang digunakan dalam tahapan seleksi adalah media MS+BAP 0,5 ppm+cefotaxime 500 ppm+kanamycin 50 ppm untuk seleksi ke-1 dan ke-2. Sedangkan untuk seleksi ke-3, ke-4 dan ke-5 media MS+BAP 0,5 ppm+GA₃ 0,1 ppm+cefotaxime 500 ppm+kanamycin 50 ppm. Tanaman singkong yang lolos sampai seleksi ke 5 disebut sebagai tanaman singkong *putative* transforman.

3.3.3.5 Efektifitas Transformasi

Tingkat efektifitas transformasi yang telah dilakukan dapat ditentukan berdasarkan jumlah planlet yang mampu tumbuh pada tiap tahapan transformasi, yakni selama ko-kultivasi, eliminasi, dan periode seleksi. Persentase keefektifan proses transformasi yang dilakukan dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$ET = \frac{\text{Jumlah planlet yang tumbuh pada tiap tahap transformasi}}{\text{Jumlah eksplan awal}} \times 100\%$$

3.3.4 Pengujian dan Konfirmasi Hasil Transformasi

3.3.4.1 Isolasi DNA Genom Tanaman *Putative* Transforman

Isolasi DNA genom dilakukan dengan menggerus 0,5 gram daun singkong menggunakan alat bor dalam sebuah *tube* 2 ml. Setelah halus, kemudian ditambahkan 500 μ l *buffer* ekstraksi (100 mM tris + 50 mM EDTA + 500 mM NaCl). Kemudian diswirling dan ditambahkan 500 μ l PCI (*Phenol chloroform isoamil*), lalu disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm 4⁰C selama 10 menit. Supernatan ditransfer ke endoprop baru dan ditambahkan isopropanol 0,8x volume supernatan, lalu diinkubasi pada suhu 4⁰C (*on ice*) selama 1 jam. Sesudah diinkubasi, pellet DNA dicuci dengan 70% etanol PA (*pro analysis*) dan dikeringkan dengan *vacum dry* kemudian diberi 50 μ l *buffer* TE. Konsentrasi sampel kemudian diukur dengan menggunakan *Nano drop*.

3.3.4.2 Analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Tahapan analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ditujukan untuk mengkonfirmasi keberadaan gen target pada genom tanaman *putative* yang telah lolos dari seleksi ke-5. Analisis PCR pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 2 pasang primer yang berbeda yakni sepasang primer *nptII* (*forward* dan *reverse*) dengan sekuen *nptII-F* (5'-GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGC-3'), *nptII-R* (5'-GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCG-3') yang berukuran 550 bp, serta pasangan primer *CaMV* (*forward*) dan SPS (*reverse*) dengan sekuen *CaMV -F* (5'-GGA CCT AAC AGA ACT CGC CG-3'), SPS-R(5' CAC CTC CTC GAC GAA GTA GTG3') yang berukuran 600 bp.

PCR dilakukan dengan menggunakan *Kappa Master Mix* yang komposisinya terdiri dari *i-Taq*, DNA *polymerase*, dNTPs, PCR *Reaction Buffer*, *Gel loading buffer*, *distilled water*. Pada penelitian ini, proses PCR dilakukan dengan metode setengah reaksi dengan total volume 10 μ l yang terdiri dari PCR Master Mix 5 μ l, masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) 1 μ l, DNA *template* 2 μ l dan ddH₂O 3 μ l. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus yang meliputi tahapan antara lain *predenaturation* 95⁰C selama 5 menit, *denaturation*

95⁰C selama 30 detik, *annealing* 55⁰C selama 30 detik, *elongation* 72⁰C selama 1 menit dan *final extension* 72⁰C selama 5 menit.

DNA yang telah teramplifikasi oleh PCR dipisahkan dengan 1% *agarose* gel elektroforesis yang mengandung 1,3 µl *ethidium bromide* dengan tegangan 100 V selama 25 menit. Hasil elektroforesis dilihat dan didokumentasikan menggunakan alat *Geldock* (*UV Illuminator*).



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil transformasi tunas aksilar (*axillary bud*) tanaman singkong kaspro menggunakan *A.tumefaciens* sebagai vektor pembawa plasmid *pKYS-SoSPS1* diperoleh 3 tanaman *putative* transforman, dengan nilai rata-rata efektivitas transformasi sebesar 3%. Pada analisis PCR didapatkan 2 tanaman singkong yang telah tersisipi oleh gen *SoSPS1* dari seluruh rangkaian transformasi yang telah dilakukan.

5.2 Saran

Penggunaan kerapatan bakteri yang tidak melebihi $OD_{600} = 0,5$ bertujuan untuk mengantisipasi terjadinya *overgrowth* pada penelitian serupa selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Anggraini, I. 2014. Pengaruh Bap dan GA₃ terhadap Multiplikasi Tunas Tanaman Singkong Gajah (*Manihot esculenta Crantz*) Melalui Kultur Meristem. *Skripsi*. Program Studi Agroteknologi. Universitas Jember.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem and R.L. Jones. 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologists*. Rockville, Maryland. America.
- Chavez, B.A.T., J.J. Valdez-Alaco'n, M. Marti'nez-Trujillo, L. Chen, B. Xoconostle-Ca'rez, W.J. Lucas and L. Herera-Estrella. 2000. Tissue Specific and Developmental Patern of Expression of The Rice SPS1 Gene. *Plant Physiology*, 124: 641-653.
- Cho, M.H., H.L. Park and T.R. Hahn. 2015. Engineering Leaf Carbon Metabolism to Improve Plant Productivity. *Plant Biotechnol Rep*, 9: 1-10.
- De la Riva, G.A., J. Gonzales-Cabrera, R. Vazques-Padron and C. Arya-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: A Natural Tool for Plant Transformation. *EJB Biotechnology*. 1(3): 118-133.
- Echeverria, E.D., Salvucci, M.E., P. Gonzales, C. Paris and C. Salerno. 1997. Physical and Kinetic Evidence for an Associaton between Sucrose-Phosphate Syntase and Sucrose-Phosphate Phosphatase. *Plant Physiol*, 115: 223-227.
- Fan, M., Liu, Z., Zhou, L., Lin, T., Liu, Y. and Luo, L. 2011. Effects of Plant Growth Regulators and Saccharide on In Vitro Plant and Tuberos Root Regeneration of Cassava (*Manihot esculenta Crantz*). *Plant Growth Regul*, 30: 11-19.
- Fung, R.W.M., G. L. Kamper, R.C. Gardner and E. MacRae. 2003. Differential Expression Within An SPS Gene Family. *Plant Sci*. 164 : 450-470.
- Ishimaru, K., N. Hirotsu, T. Kashiwagi, Y. Madoka, K. Nagasuga, K. Ono, and R. Ohsugi. 2008. Overexpression of a Maize SPS Gene Improves Yield Characters of Potato Under Field Conditions. *Plant Production Science*, 11(1): 104-107.
- Isidore, M., Emmanuel, H., Gervais, G., Peter, Y., K., S., Safia, K., Felix, G., Theodore, A., Jane and Daphrose, G. Micro Propagation of Disease Resistant Cassava Variety in Rwanda. *Rwanda*, 24(1): 49 – 58.

- Kakkar, A and V. K. Verma. 2011. Agrobacterium Mediated Biotransformation. *Applied Pharmaceutical Science*, 1(7): 29-35.
- Kim, J.Y., A. Mahe', J. Brangeon and J.L. Prioul. 2000. A Maize Vacuolar Invertase, IVR2, Is Induced by Water Stress. Organ/Tissue Specificity and Diurnal Modulation of Expression. *Plant Physiology*, 124: 71–84.
- Lakitan, B. 1993. *Dasar-dasar Fisiologi Tumbuhan*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Le, B. V., B. L. Anh, K. Soyong, N. D. Danh and L. T. Anh Hong. 2007. Plant regeneration of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants. *Agriculture technology*, 2(1): 121 – 128.
- Lee-Espinosa H.E., J.G. Cruz-Castillo and B. Garcia-Rosas. 2003. Multiple shoot proliferation and acclimation of “Midori” and “Kalapana” Anthurium (*Anthurium andreanum* L.) cultured *in vitro*. *Revista fitotecnia mexicana*. 26(4): 301-307.
- Li, Y.Z., Jian, Y.Z., San, M.W., Xian, W.F., Xing, L.L., and Bao, S.C. 2016. Characters Related to Higher Starch Accumulation in Cassava Storage Roots. *Nature Sci. Rep.*, 6: 1-17.
- Mannan, A., T. Noor Sted., and B. Mirza. 2009. Factors Affecting *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation of *Artemisia absinthium* L. *Pakistan Journal Bot*, 41(6): 3239-3246.
- Mapayi, E.F., Ojo, D.K., Oduwaye, O.A., and Porbeni, J.B.O. 2013. Optimization of In-Vitro Propagation of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Genotypes. *Agricultural Science*, 5(3): 261-269.
- Murtiningrum, E.F. Bosawer, P. Istalaksana dan A. Jading. 2012. Karakterisasi Umbi dan Pati Lima Kultivar Ubi Kayu (*Manihot esculenta*). *Agrotek*, 3(1): 81
- Nap, P. J., J. Bijvoet and W. J. Stiekema. 1992. Biosafety of Kanamycin-Resistant Transgenic Plants. *Transgenic Research*. Vol. 1: 239-249.
- Nishimura, A., Aichi, I., and Matsuoka, M. 2006. A Protocol for Agrobacterium – mediated Transformation in Rice. *Nature Protocols*. Vol. 1.
- Nyaboga, E.N., J.M. Njiru and L. Tripathi. 2015. Factors Influencing Somatic Embryogenesis, Regeneration and Agrobacterium-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivar TME14. *Frontiers in Plant Science*: 6(1): 1-13.

- Purwono dan H. Purnawati. 2007. *Budidaya 8 Jenis Tanaman Pangan*. Jakarta : Penebar Swadaya.
- Radjit, B.S. dan Nila, P. 2011. Hasil Umbi dan Kadar Pati Beberapa Varietas Ubi Kayu dengan Sistem Sambung (Mukibat). *Agrivigor*, 10(2): 185-195.
- Rubatzky, V. E., dan Mas Yamaguchi. 1998. *Sayuran Dunia: Prinsip, Produksi, dan Gizi*. Bandung: ITB.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Silva, T and Fukai. 2001. The Impact of Carbenecillin, Cefotaxime and Vancomycin on Chrysanthemum and Tobacco TCL Morphogenesis and Agrobacterium Growth. *Appl.Hort*, 3(1): 3-12.
- Sinatrya, A.N. 2015. Transformasi Gen *SoSUT1* pada Tanaman Tebu (*Saccharum officinarum* L var. BL) Transgenik Overekspresi Gen *SoSPSI* menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Skripsi (Tidak dipublikasikan). Program Studi Agroteknologi. Universitas Jember.
- Sugiharto B., Sakakibara H., Sumadi and Sugiyama T. 1997. Differential Expression of Two Genes for Sucrose Phosphate Synthase in Sugar Cane: Molecular Cloning of The Cdnas and Comparative Analysis Of Gene Expression. *Plant Cell Physiol*. 38: 961-965.
- Sugiharto, B., T. Handoyo dan Sumadi. 1997. Variabilitas Genetik dalam Enzim Fotosintetik dan Enzim Metabolisme Sukrosa pada Beberapa Varietas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) *Zuriat* 7(2):76-84
- Walker, J.L. and S.C. Huber. 1989. Purification and Preliminary Characterization of Sucrose Phosphate Synthase Using Monoclonal Antibodies. *Plant Physiol*. 89: 518-524.
- Wattimena, G.A. 2010. Tepung Singkong Aromatik. Artikel UP2M (Unit Pembinaan, Pemberdayaan, Masyarakat) – GPIB. IPB.
- Zainuddin, I.M., K. Schlegel, W. Gruissem and H. Vanderschuren. 2012. Robust Transformation Procedure for The Production of Transgenic Farmer-Preferred Cassava Landcrease. *Plant Methods*, 8(24): 1-8.
- Zupan, J.R. and P. Zambryski. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to The Plant Cell. *Plant Physiol*. 107: 1041-1047.

LAMPIRAN 1. Komposisi Media *Murashige and Skoog* (MS)

Larutan Stok	Bahan	Jumlah (mg/L)	Pengambilan (ml)
A	NH ₄ NO ₃	1650	20
B	KNO ₃	1900	20
C	CaCl 2H ₂ O	440	10
D	MgSO ₄ .7H ₂ O	370	10
	KH ₂ PO ₄	170	
E	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	5
	NaEDTA	37,3	
F	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	
	H ₃ BO ₃	6,2	
	KI	0,83	5
	Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,25	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	
	Myo-inositol	100	10
Vitamin	Pyridoxin HCl	0,5	
	Thiamine HCl	0,1	1
	Niacin	0,5	
	Glycine	2,0	
	Sukrosa	30 g	
	Phytigel	2,5 g	

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

Bahan	Jumlah (g/L)
<i>Yeast Extract</i>	10
Pepton	10
<i>Sodium Chloride</i> (NaCl)	5
Agar Bakteriologi	14

