



**TRANSFORMASI MUTAN GEN *SoSPS1-S162A* PADA TANAMAN
TOMAT (*Lycopersicum esculentum*) MENGGUNAKAN
VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens***

TESIS

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S2)
dan mencapai gelar Magister Sains

Oleh

Mahbubatur Rohmah

NIM 141820401004

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

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

1. Ibunda Rosyidatul Bariroh, Bapak Nur Hasyim, dan Bapak Dandung Subianto yang telah memberikan kasih sayang, pengorbanan, dan doa yang selalu mengiringi perjalanan hidup saya;
2. Adik-adikku tersayang Auliya' Mujahidul Fatwa (Aam) dan Yusa' Syaikhul 'Ibad atas motivasi, dan semangat untuk penyelesaian tesis ini;
3. 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

“Setelah kesulitan pasti ada kemudahan,
jangan bersedih, terus berusaha memberikan yang terbaik dari apa yang kamu bisa”



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mahbubatur Rohmah

NIM : 141820401004

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Transformasi mutan gen *SoSPSI-SI62A* pada tanaman tomat (*Lycopersicum esculentum*) menggunakan Vektor *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, 6 Juni 2017

Mahbubatur Rohmah
NIM 141820401004

TESIS

**TRANSFORMASI MUTAN GEN *SoSPS1-S162A* PADA TANAMAN
TOMAT (*Lycopersicon esculentum*) MENGGUNAKAN
VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens***

Oleh

Mahbubatur Rohmah

NIM 141820401004

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Tesis berjudul “Transformasi Mutan Gen *SoSPS1-S162A* pada Tanaman Tomat (*Lycopersicum esculentum*) menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 6 Juni 2017

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji :

Ketua

Sekretaris

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

Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P.
NIP 196504251990022002

Anggota :

Penguji I

Penguji II

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si, M.Si
NIP 197509132000032001

Dr. Kahar Muzakhar, S.Si.
NIP 196805031994011001

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP 19610204198711101

RINGKASAN

Transformasi Mutan Gen *SoSPS1-SI62A* pada Tanaman Tomat (*Lycopersicum esculentum*) menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*; Mahbubatur Rohmah, 141820401004; 2017: 38 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Sukrosa merupakan produk akhir dari asimilasi karbon pada proses fotosintesis yang selanjutnya ditranslokasikan ke seluruh bagian tanaman untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Beberapa enzim yang mempengaruhi metabolisme sukrosa pada tanaman diantaranya *invertase*, *sucrose synthase*, dan *sucrose-phosphate synthase*. *Sucrose-Phosphate Synthase* (SPS) merupakan enzim pada tumbuhan tingkat tinggi yang berperan utama dalam biosintesa sukrosa. Namun demikian, aktivitas enzim SPS ternyata diregulasi oleh efektor alosterik dan sisi fosforilasi yaitu serin yang terkait dengan ada tidaknya sinar

Fosforilasi pada SPS tersebut perlu dikaji lebih lanjut yaitu salah satunya dengan melakukan mutasi pada sisi serin yang disubstitusi dengan alanin untuk melihat perubahan regulasi yang terjadi. SPS dimiliki oleh semua tanaman, diantaranya yaitu tanaman tebu yang dikode oleh gen *SoSPS1* (*Saccharum officinarum* *Sucrose Phosphate Synthase*). Mutasi pada gen *SoSPS1* dilakukan pada urutan asam amino ke-162 yang dianggap bertanggung jawab atas proses fosforilasi pada malam hari. Mutan gen *SoSPS1-SI62A* telah dikonstruksi dalam plasmid *pRI 101-AN-SoSPS1-SI62A*, yang selanjutnya ditransformasikan pada tanaman tomat rampai sebagai tanaman model. Adapun tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan tanaman tomat transgenic yang mengandung mutan gen *SoSPS1-SI62A*, beserta data tambahan agronomi berupa jumlah buah, berat total buah, dan kandungan sukrosa buah.

Penelitian dilakukan dalam dua tahap awal yaitu terdiri dari persiapan eksplan transformasi dan persiapan vektor transformasi. Tahapan transformasi meliputi

infeksi, ko-kultivasi, eliminasi, seleksi, dan aklimatisasi. Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tunas apikal tanaman tomat varietas rampai secara *in vitro* umur 14 hari. Transformasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali ulangan yang masing-masing merupakan penelitian yang terpisah (*Independent Experiment*). Seleksi dilakukan sebanyak 5 kali dengan masing-masing tahapan seleksi membutuhkan waktu 2 minggu. Agen penyeleksi yang digunakan mulai seleksi 1-5 yaitu menggunakan antibiotik *kanamycin* sebesar 50 mg/L^{-1} . Eksplan yang lolos seleksi 5 dan aklimatisasi kemudian dikonfirmasi keberadaan gen target dengan menggunakan primer *nptII* F/R, serta dilakukan pengamatan tambahan agronomi berupa jumlah buah, berat buah, dan kandungan sukrosa buah.

Hasil transformasi mutan gen *SoSPS1-S162A* pada tunas apikal tomat varietas rampai yang lolos seleksi ada 31 tanaman, namun yang lolos dari aklimatisasi hanya 15 tanaman. Dari 15 tanaman tersebut, didapatkan 10 tanaman yang positif mengandung mutan gen *SoSPS1-S162A* yaitu event V1, V2, V5, V7, V9, V10, V11, V13, V14, dan V15 yang ditandai dengan munculnya pita DNA sebesar 550bp dengan menggunakan pasangan primer *nptII* F/R. Berdasarkan data tambahan agronomi yang dilakukan, diketahui bahwasanya jumlah buah maupun berat total buah tanaman tomat yang positif mengandung mutan gen *SoSPS1-S162A* relatif lebih tinggi bila dibandingkan dengan tanaman kontrol (*wild type*) maupun tanaman yang overekspresi *SoSPS1*, namun kandungan sukrosanya masih bervariasi (heterogen).

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, karunia serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul “Transformasi Mutan Gen *SoSPS1-S162A* pada Tanaman Tomat (*Lycopersicum esculentum*) menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*”. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata dua (S2) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan tesis 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 tesis ini;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si. dan Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. selaku Dosen Penguji atas masukan dan saran guna kesempurnaan penulisan tesis ini;
3. Dr. Kahar Muzakhar, S.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan saran selama penulis menjadi mahasiswa di Universitas Jember;
4. Orang tua Rosyidatul Bariroh, Nur Hasyim, dan Dandung Subianto, serta nenek kakek Mukayah dan Moh. Ali yang selalu memberikan kasih sayang, pengorbanan dan doa sepanjang hidup;
5. Adik-adikku tersayang Auliya’ Mujahidul Fatwa dan Yusa’ Syaikhul ‘Ibad yang selalu memberikan motivasi, dan semangat;
6. Purnama Okviandari, S.P., M.P., Arsetyo Rahardhianto, S.Si., Nurul Hidayati, S.Si., Putu Frida Oktaningtias Widiartha, S.Si, dan Ken Melati, S.Si. yang telah

memberikan masukan dan mengajari kedisiplinan selama melaksanakan tugas akhir di CDAST;

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 tim Laboran FKIP Biologi Universitas Jember; Mas Tamyis, Mas Andik, Pak Maryono, Enki Dani Nugroho, Sigit Pratama, dan Moh. Efendi
9. Seluruh kawan seperjuangan di Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman CDAST Universitas Jember (Ncus, Intan, Weny, Retno, Novita, Kiki, Suvia, Aping, Pika, Lutfi, Gerda, Ifa, Guruh, Amir, Febri, Rosyadi, dan Afid), *tomato group* (Bu Inyana, Mas Obama, Reza, dan adek Ayu), Dosen Pendamping Penelitian (Pak Fafan dan Mbak Widhi), terima kasih atas seluruh kebersamaan, suka duka dan bantuan dalam menyelesaikan penelitian ini;
10. Seluruh mahasiswa Magister Biologi angkatan 2014 (*Top six* : Bu Inyana, Mbak Qusnul, Mbak Esti, Mbak Sheila, dan Djoni) yang telah memberikan banyak kenangan yang tidak terlupakan selama menjalani kuliah di Magister Biologi;
11. Tim asisten praktikum Mikrobiologi dan Mikologi FKIP Biologi Universitas Jember (Enki, Fahmi, Eni, Eli, Fiqih, Anik, Deki) terimakasih atas kebersamaanya dan semangatnya untuk penyelesaian tesis ini;
12. Teman kost (Aal, Yana, Mely, Tety) terima kasih atas segala kebersamaan, dukungan, dan bantuannya.
13. 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 tesis ini. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi perkembangan ilmu biologi.

Jember, 6 Juni 2017

Penulis

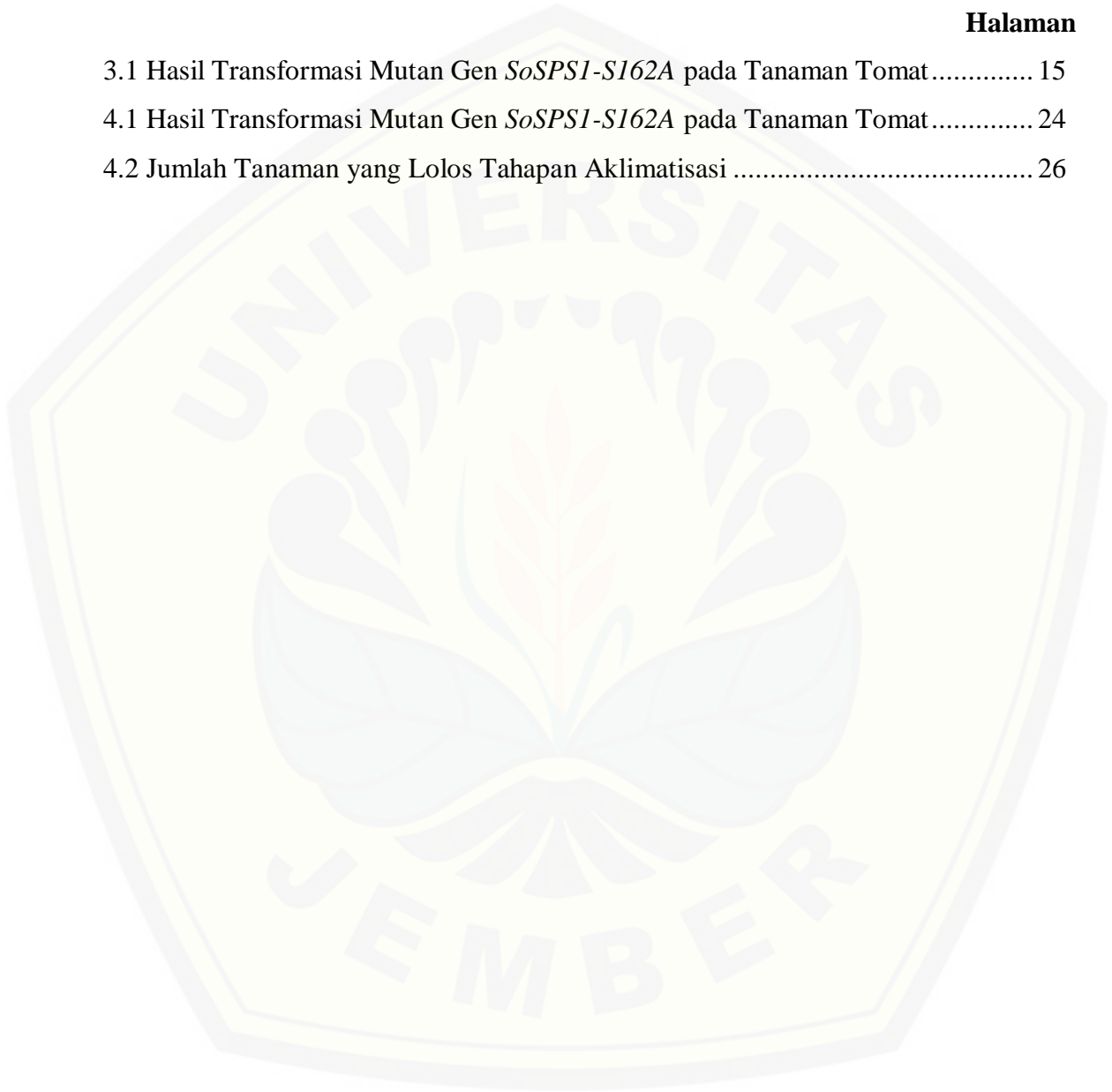
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN.....	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
BAB 1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Sucrose Phospat Synthase</i> (SPS)	4
2.2 Sisi Regulasi SPS.....	5
2.3 Kultur <i>invitro</i> Tanaman Tomat (<i>Lycopersum esculentum</i>)	6
2.4 Transformasi Mutan Gen SoSPS1-S162A pada tanaman tomat menggunakan vektor <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	7
2.5 Hipotesis.....	8

BAB 3. METODE PENELITIAN	9
3.1 Tempat dan Waktu	9
3.2 Alat dan Bahan	9
3.3 Metode Penelitian	9
3.3.1 Tanaman Tomat.....	9
3.3.2 Peta Konstruksi Plasmid pRI-101-AN <i>SoSPSI-SI62A</i>	9
3.3.3 Rancangan Penelitian.....	10
3.4 Pelaksanaan Percobaan	11
3.4.1 Perkecambahan Biji Tomat secara <i>Invitro</i>	11
3.4.2 Persiapan Koloni Tunggal <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
3.4.3 Infeksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pada eksplan.....	12
3.4.4 Ko- Kultivasi.....	12
3.4.5 Eliminasi.....	13
3.4.6 Seleksi Tanaman Putatif Transforman.....	14
3.4.7 Aklimatisasi.....	14
3.4.8 Isolasi dan Analisis PCR Genom Tanaman Putatif Transforman.....	15
3.4.9 Parameter Pengamatan Penelitian.....	16
3.4.10 Perhitungan Jumlah dan Berat Total Buah.....	17
3.4.11 Analisis Sukrosa Buah.....	17
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1 Konfirmasi Plasmid pRI-101-AN <i>SoSPSI-SI62A</i>	18
4.2 Transformasi Mutan Gen <i>SoSPSI-SI62A</i>	20
4.3 Isolasi dan Analisis PCR Genom Tanaman Putatif Transforman	27
4.4 Jumlah, Berat Total, dan Kandungan Sukrosa Buah Tanaman Putatif Transforman	28
BAB 5. KESIMPULAN	33
DAFTAR PUSTAKA	34

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Hasil Transformasi Mutan Gen <i>SoSPSI-S162A</i> pada Tanaman Tomat.....	15
4.1 Hasil Transformasi Mutan Gen <i>SoSPSI-S162A</i> pada Tanaman Tomat.....	24
4.2 Jumlah Tanaman yang Lolos Tahapan Aklimatisasi	26



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Biosintesis Sukrosa pada Tanaman yang Melibatkan Berbagai Enzim	4
3.1 Peta Konstruksi Plasmid pRI-101-AN <i>SoSPSI-S162A</i>	10
3.2 Skema Alur Penelitian.....	10
4.1 Hasil Data Sequencing Mutan S162A pada <i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	19
4.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
4.3 Eksplan Tomat Varietas Rampai secara <i>in vitro</i>	20
4.4 Tahapan Transformasi.....	21
4.5 Tahapan Seleksi Eksplan Hingga diperoleh Tanaman Putatif Transforman.....	23
4.6 Tahapan Aklimatisasi.....	25
4.7 Kendala saat Aklimatisasi	26
4.8 Hasil Elektroforesis PCR Tanaman Putatif Transforman dengan <i>nptII</i> F/R.....	27
4.9 Perbedaan Morfologi Tanaman WT, <i>SoSPSI</i> , dan Mutan <i>SoSPSI-S162A</i>	28
4.10 Buah Tomat Transgenik Over Ekspresi <i>SoSPSI-S162A</i>	29
4.11 Data Agronomi Tanaman	29
4.12 Hasil Uji Sukrosa Buah	31

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi media MS (<i>Murashige and Skoog</i>).....	38
B. Komposisi media YEP (<i>Yeast Extract Pepton</i>)	38
C. Kurva Standart Sukrosa.....	38

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sukrosa merupakan produk akhir asimilasi karbon pada proses fotosintesis yang selanjutnya ditranslokasikan pada seluruh bagian tanaman untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Huber dan Huber, 1996). Kadar sukrosa salah satunya dipengaruhi oleh adanya enzim *Sucrosa Phosphate Syntase* (SPS). Enzim tersebut berfungsi untuk mengkatalis *fruktosa-6-phosphate* dan *UDP-Glucose* menjadi *sucrose-6-phosphate*, serta berperan dalam biosintesis sukrosa yang berlangsung di mesofil daun (Dickinson *et al.*, 1991). Dengan meningkatnya aktivitas SPS pada tanaman dapat pula meningkatkan akumulasi sukrosa pada daun dan pertumbuhan tebu (Sugiharto *et al.*, 2008).

Gen penyandi SPS pada tebu ada 2 macam, yaitu *SoSPS1* dan *SoSPS2*. *SoSPS1* sendiri lebih dominan diekspresikan pada jaringan fotosintetik (daun) (Sugiharto *et al.*, 1997). Transformasi gen *SoSPS1* pada tanaman tomat Zamrud telah berhasil dilakukan dengan menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Overekspresi tersebut menunjukkan hasil bahwasanya terjadi peningkatan aktivitas enzim SPS, kandungan sukrosa daun sebesar 1.29 mg/g bb dengan kontrol (*wild type*) sebesar 0.74 mg/g bb, dan kandungan sukrosa buah sebesar 0.97 mg/g bb dengan *wt* sebesar 0.59 mg/g bb (Dewanti, 2011).

Aktivitas SPS pada tanaman ternyata dipengaruhi oleh regulasi enzim SPS, yaitu adanya regulasi efektor alosterik (*glucose-6-phosphate*, dan *Pi*) dan sisi spesifik (*fosforilasi seryl reversible*) seperti keberadaan ser/thr kinase yang berkaitan dengan proses fosforilasi terkait dengan kondisi gelap terang. Ketika kondisi gelap serin akan mengalami fosforilasi, sehingga aktivitas SPS lebih sedikit (Huber dan Huber, 1996). Serin yang terkait dengan adanya fosforilasi tersebut berada pada urutan 158, dan 162 (Toroser *et al.*, 1999).

Sisi fosforilasi pada tanaman membuat aktivitas SPS menjadi sedikit terhambat. Oleh karena itu dilakukan beberapa teknik rekayasa genetik untuk mengetahui peranan dari sisi fosforilasi, salah satunya yaitu dengan mutasi genetik berupa penggantian serin dengan asam amino yang lain. Beberapa penelitian yang telah dilakukan yaitu penggantian S158F, dan S158E (Toroser *et al.*, 1997), dan S162A (Takahashi *et al.*, 2010). Alanin merupakan asam amino yang sering digunakan sebagai agen mutasi, dikarenakan alanin tidak mempengaruhi atau mengubah konformasi rantai utama suatu protein, serta tidak menimbulkan efek elektrostatis dan sterik yang ekstrim. Selain itu alanin juga efektif dalam melakukan mutasi *single* amino untuk menganalisis protein (Lafavre *et al.*, 1997). Serin 162 (S162) tidak hanya ditemukan pada daun tebu, namun juga ditemukan pada tanaman yang lain seperti bayam (Toroser *et al.*, 1997), dan jagung (Foyer *et al.*, 1998).

Penelitian mengenai S162A pada tanaman baru sedikit dilakukan, diantaranya S162A yang diisolasi dari tanaman jagung dan diekspresikan pada padi transgenik. Penelitian tersebut menunjukkan hasil bahwa penggantian alanin pada urutan asam amino tersebut menyebabkan aktivitas SPS tidak sensitif terhadap inaktivasi pada kondisi gelap (Takahashi *et al.*, 2010). Penelitian lainnya menunjukkan jika SPS jagung yang diekspresikan pada tomat transgenik tidak berpengaruh terhadap regulasi gelap terang (Worrel *et al.*, 1991).

Berdasarkan beberapa hal tersebut, maka akan dilakukan transformasi tanaman tomat menggunakan mutan gen *SoSPS1-S162A* dengan menggunakan vektor *A. tumefaciens*. Tanaman tomat dijadikan tanaman model dalam penelitian ini karena tomat merupakan tanaman diploid yang merupakan inang dari vektor *A. tumefaciens*, tidak membutuhkan waktu lama untuk melihat hasilnya, hasil transformasi umumnya cukup berhasil terinsersi pada tanaman, dan gennya bersifat stabil (Okviandari, 2008).

1.2 Rumusan Masalah

Tanaman tomat Zamrud overekspresi *SoSPSI* diketahui mengalami peningkatan aktivitas SPS, kandungan sukrosa daun sebesar 1.76%, dan kandungan sukrosa buah sebesar 1.64% dibandingkan dengan tomat Zamrud *Wild Type* (WT). Namun demikian, dengan adanya sisi fosforilasi serin pada *SoSPSI* tersebut maka dilakukan mutasi serin menjadi alanin pada urutan ke 162. Mutan gen *SoSPSI-S162A* kemudian ditransformasikan pada tanaman tomat untuk didapatkan tomat PRG mutan gen *SoSPSI-S162A* dan diketahui jumlah buah, berat total buah, serta kandungan sukrosa buahnya.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini meliputi; tomat yang digunakan yaitu tomat varietas rampai dengan eksplan yang digunakan yaitu tunas apikal. Plasmid yang digunakan yaitu pRI-101-AN dengan mutan gen *SoSPSI-S162A* yang disisipkan pada *A. tumefaciens* strain GV 3101. Transformasi dilakukan sebanyak 3 kali dan merupakan penelitian yang terpisah. Tanaman putatif transforman kemudian dicek dengan PCR dengan menggunakan primer *nptII* F/R.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tomat PRG hasil transformasi genetik dengan mutan gen *SoSPSI-S162A*, dan mendapatkan data tambahan agronomi tanaman tomat *SoSPSI-S162A* meliputi jumlah buah, berat total buah, dan kandungan sukrosa buah.

1.5 Manfaat Penelitian

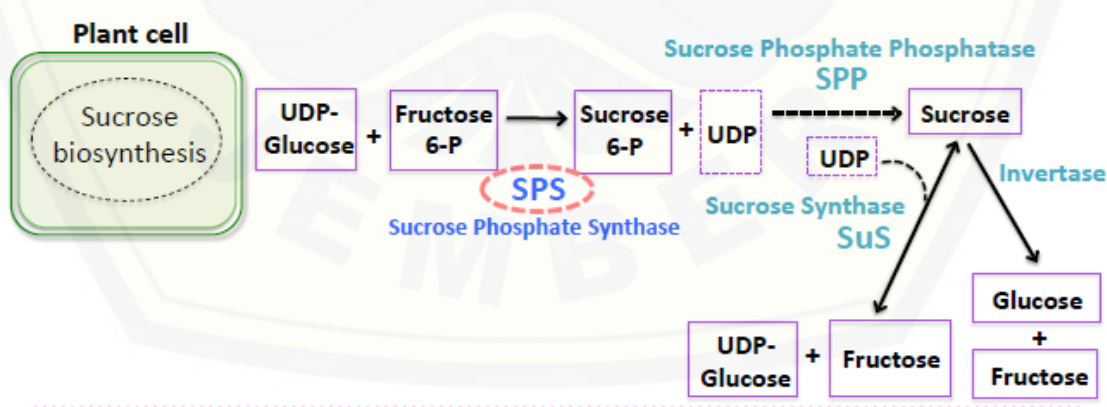
Hasil penelitian ini diharapkan mendapatkan tanaman tomat PRG mutan gen *SoSPSI-S162A* sehingga pada penelitian berikutnya dapat diketahui peran sisi fosforilasi S162A terkait dengan regulasi SPS.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Sucrosa Phospat Syntase (SPS)*

Sukrosa merupakan hasil utama proses fotosintesis pada tanaman yang dihasilkan dari asimilasi karbon. Pada tanaman, sukrosa berperan sebagai regulator ekspresi gen fotosintetik, maupun non-fotosintetik seperti gen yang terlibat dalam pembelahan, diferensiasi sel, serta pemasakan buah (Koch, 1996). Selain itu, sukrosa juga turut berperan dalam menyediakan energi, merangsang pertumbuhan, serta perkembangan tanaman (Fung *et al.*, 2002).

Ada 3 macam enzim yang mempengaruhi metabolisme sukrosa pada tanaman yaitu *Invertase* yang mendegradasi sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, *Sucrose Synthase (SuSy)* yang mendegradasi sukrosa dalam sitosol, dan *Sucrose-Phosphate Synthase (SPS)* yang berfungsi untuk mengkatalisis *fruktose 6 phospat* dan *UDP-Glucose* menjadi *sucrose-6-phospat* (Buchanan *et al.*, 2000). Selanjutnya, fosfat pada *sucrose-6-phospat* diputuskan oleh enzim SPP sehingga dihasilkan sukrosa. Berikut merupakan gambaran biosintesis sukrosa pada tanaman.



(Sawitri, 2016)

Gambar 1. Biosintesis sukrosa pada tanaman yang melibatkan berbagai macam enzim

Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa SPS merupakan enzim utama yang menentukan kemampuan tanaman dalam biosintesa sukrosa (Sugiharto *et al.*, 1997), yang selanjutnya ditranslokasikan ke bagian tanaman lain seperti biji, buah, akar, serta umbi untuk kelangsungan proses pertumbuhannya. Enzim SPS sudah berhasil diinsersikan pada beberapa tanaman produk rekayasa genetika (PRG) dengan tujuan untuk meningkatkan aktivitas SPS pada kandungan sukrosanya, diantaranya pada tanaman tomat transgenik yang diinsersi gen penyandi SPS jagung mengalami peningkatan akumulasi sukrosa (Worrel *et al.*, 1991). SPS pada tanaman tebu sendiri ditemukan ada dua jenis yaitu *SoSPS1* (pada organ fotosintetik) dan *SoSPS2* (pada organ non-fotosintetik) (Sugiharto *et al.*, 1997).

2.2 Sisi Regulasi SPS

Regulasi aktivitas SPS terbilang cukup kompleks karena melibatkan efektor alosterik (glukosa-6-fosfat dan Pi), dan sisi spesifik yaitu *fosforilasi seryl reversible*. Fosforilasi SPS atau inaktivasi dalam kondisi gelap dipicu oleh beberapa Ser/Thr kinase, dan akan mengalami defosforilasi atau diaktifkan dalam kondisi terang oleh protein profosfatase jenis 2A (Huber dan Huber, 1996). Terdapat beberapa sisi pada genom tanaman yang dianggap bertanggung jawab terhadap regulasi SPS diantaranya Ser158, Ser162, dan Ser424.

Lokasi ditemukannya beberapa serin tersebut diantaranya yaitu pada Ser158 pada daun bayam (Toroser *et al.*, 1999), Ser162 pada daun jagung dan pada daun tebu (Takahashi *et al.*, 2010; Sugiharto *et al.*, 2014). Semua sisi aktif tersebut berdasarkan penelitian yang dilakukan dianggap bertanggung jawab atas sedikitnya aktivitas SPS pada kondisi gelap (Huber dan Huber, 1996). Sisi pengaturan yang utama yaitu pada sisi Ser158 dan Ser162 yang terkait dengan ada tidaknya cahaya, sedangkan sisi Ser424 terkait dengan stress osmotik atau cekaman osmotik (Toroser *et al.*, 1999).

Serin 162 maupun 158 akan mengalami defosforilasi ketika ada sinar matahari sehingga SPS menjadi aktif, dan akan mengalami fosforilasi ketika kondisi gelap/ tidak ada sinar matahari menjadi tidak aktif atau aktivitasnya sedikit. Dengan adanya

sisi aktif yang mengatur regulasi SPS tersebut, kemudian dilakukan beberapa rekayasa genetik untuk mencoba menghilangkan efek fosforilasi SPS pada saat gelap. Beberapa cara yang dilakukan diantaranya mutasi berupa penggantian sisi serin dengan alanin S162A (Takahashi *et al.*, 2010), S158F, dan S158E (Toroser *et al.*, 1997).

2.3 Kultur Invitro Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill)

Tanaman tomat merupakan sayuran yang tergolong tanaman semusim, berbentuk perdu, dan termasuk dalam family solanacea. Penggunaan tomat sebagai agen transformasi sering dilakukan karena tomat mempunyai masa tanam yang cukup singkat yaitu ± 9 minggu buah tanaman tomat sudah bisa dipanen. Selain itu, dengan penggunaan vektor *A. tumefaciens* yang merupakan bakteri inang pada tanaman dikotil menjadi alasan lainnya dipilih tomat sebagai tanaman untuk transformasi.

Teknologi transformasi gen untuk perbaikan genetik pada tanaman tomat sudah sering dilakukan, diantaranya peningkatan kandungan sukrosa (Worrel *et al.*, 1991), ketahanan terhadap Lepidoptera (Santosa *et al.*, 2009), dan peningkatan translokasi sukrosa (Hackel *et al.*, 2006). Adapun beberapa bagian tomat yang digunakan untuk transformasi diantaranya kotiledon, hipokotil, tunas apikal, serta biji. Pertumbuhan dan morfogenesis tanaman tomat secara *invitro* dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya komposisi media, macam eksplan, varietas, dan zat pengatur tumbuh (Chaudry *et al.*, 2007).

Transformasi tomat dengan menggunakan bakteri *A. tumefaciens* harus melalui beberapa tahapan sehingga didapatkan tanaman tomat transgenik yang lebih stabil. Tahapan tersebut diantaranya penanaman biji tomat (14 hari), infeksi tanaman dengan *A. tumefaciens* yang telah diinduksi dengan gen target, ko-kultivasi (2 hari kondisi gelap), eliminasi (5 hari), 5 kali tahap seleksi (masing-masing seleksi 14 hari). Tahapan berikutnya yaitu aklimatisasi hingga diperoleh tanaman yang benar-benar *survive* dengan kondisi lingkungan sehingga kemudian bisa dilakukan uji

lanjutan seperti analisis PCR, pengamatan tinggi tanaman, jumlah buah, berat buah, aktivitas enzim, serta kandungan sukrosa.

Transformasi biasanya dilakukan dengan menggunakan beberapa antibiotik yang berperan sebagai selektor tanaman yang telah terinfeksi/ disisipi gen baru. Tanaman yang mempunyai ketahanan (resisten) terhadap gen yang telah ditambahkan akan tetap hidup, berbeda dengan tanaman yang tidak tersisipi gen, lama kelamaan akan mati pada medium seleksi. Antibiotik yang digunakan bergantung dengan *selectable marker* yang disisipkan, pada tanaman yang disisipi dengan gen resisten *nptII* maka memiliki ketahanan terhadap antibiotik *kanamycin*. Adapun penggunaan antibiotik *cefotaxime* digunakan untuk mengeliminasi bakteri *A. tumefaciens* agar tidak terjadi *overgrowth* pada medium seleksi, sedangkan antibiotik *asetosiringon* digunakan untuk membantu masuknya gen yang disisipkan/ meningkatkan infeksi bakteri kedalam tanaman yang akan transformasi pada medium ko-kultivasi.

2.4 Transformasi Mutan Gen *SoSPS1-S162A* pada Tanaman Tomat menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*

Transformasi genetik pada tanaman merupakan suatu upaya untuk memasukkan suatu gen target yang telah diisolasi dari suatu organisme ke dalam sel tanaman tertentu (Ningtyas, 2013). Metode transformasi biasanya dilakukan dengan dua macam, yaitu secara langsung dan secara tidak langsung. Transformasi secara langsung dapat dilakukan dengan *electrophoration*, *microinjection*, penembakan DNA (*Particle Bombardment*), dan menggunakan *polyethelene glycol* (Schroder *et al.*, 1989). Sedangkan metode transformasi secara tidak langsung dapat dilakukan dengan menggunakan bantuan bakteri atau virus sebagai vektor (Hiei *et al.*, 1997). Bakteri yang umum digunakan untuk membantu proses transformasi pada tanaman yang biasanya digunakan yaitu *Agrobacterium tumefaciens*.

Lessard *et al.*, (2002) menyatakan penggunaan *A. tumefaciens* sebagai vektor transformasi mempunyai kelebihan dan kekurangan. Kelebihannya antara lain; sangat efektif dan relatif murah, stabil, serta efisien, dan sangat kecil kemungkinan

terjadinya *transgene silencing*. Adapun kelemahannya yaitu pada beberapa jenis tanaman inang tertentu memiliki respons *hypersensitif* yang sangat terbatas.

A. tumefaciens merupakan bakteri tanah gram negatif yang dapat menimbulkan penyakit bagi tanaman, tetapi bermanfaat dalam rekayasa genetik karena dapat digunakan sebagai mediator untuk transfer gen ke tanaman (Salisbury dan Ross, 1995). Penggunaan *Agrobacterium* sebagai vektor transformasi karena mempunyai 3 komponen genetik yang sangat diperlukan dalam transfer gen, komponen tersebut yaitu T-DNA yang merupakan DNA aktif yang ditransfer ke tanaman. Kedua, gen virulensi (*vir*) yang merupakan gen penyandi protein yang mengatur transfer T-DNA dari bakteri ke tanaman. Ketiga, gen penyandi protein yang terdapat pada kromosom *Agrobacterium* (Lessard *et al.*, 2002).

Penggunaan *Agrobacterium* telah banyak dilakukan sebagai vektor untuk transformasi gen tertentu pada tanaman. Penelitian tersebut diantaranya transformasi gen *SoSUT1* pada tanaman tomat (Dwijayanti, 2014), dan penyisipan gen *SoSPSI* tebu pada tanaman tomat (Okviandari, 2008). Selain *SoSPSI*, mutan gen S162A yang dimiliki oleh jagung juga berhasil disisipkan pada tanaman padi transgenik menggunakan *A. tumefaciens*, tanaman padi transgenik mutan gen S162A tersebut kemudian dapat ditanam pada *green house* dan dapat diuji kandungan sukrosanya (Takahashi *et al.*, 2010).

2.5 Hipotesis

Mutan gen *SoSPSI-S162A* dapat terinsersi pada genom tanaman tomat sehingga tampak teramplifikasi dengan menunjukkan pita DNA ukuran 550 bp, serta terdapat perbedaan jumlah buah, berat total buah, dan kandungan sukrosa buah antara tanaman tomat tomat transgenik *SoSPSI-S162A*, *SoSPSI*, dan WT (*Wild Type*),

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember, mulai bulan Mei 2016 sampai Maret 2017.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Laminar Air Flow* (LAF), *Autoclave*, *Spectrofotometer*, *sentrifuge*, *gel documentation system*, peralatan standar kultur jaringan, dan peralatan standar PCR.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain biji tanaman tomat varietas rampai, *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, dengan plasmid pRI101-AN yang mengandung mutan gen *SoSPS1-S162A*, media *Murashige and Skoog* (MS), media *Yeast Extract Pepton* (YEP), alkohol 70%, NaClO 1,57%, aquadest steril, berbagai macam antibiotik (*rifampysin*, *kanamycin*, *cefotaxime*, *asetosiringon*), serta bahan lain yang digunakan untuk PCR.

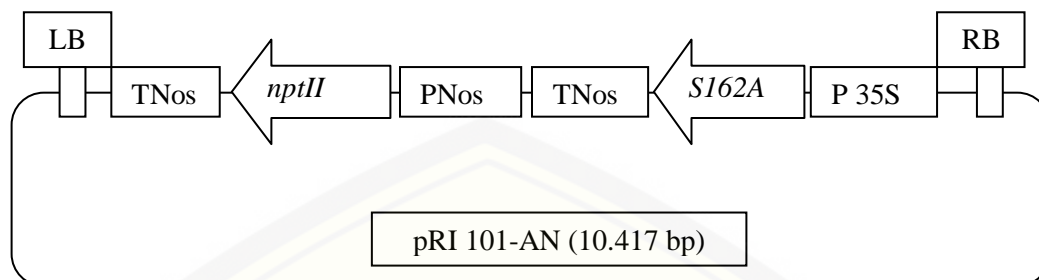
3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Tanaman Tomat

Tomat yang digunakan dalam penelitian ini adalah varietas rampai, dengan eksplan yang digunakan yaitu tunas apikal.

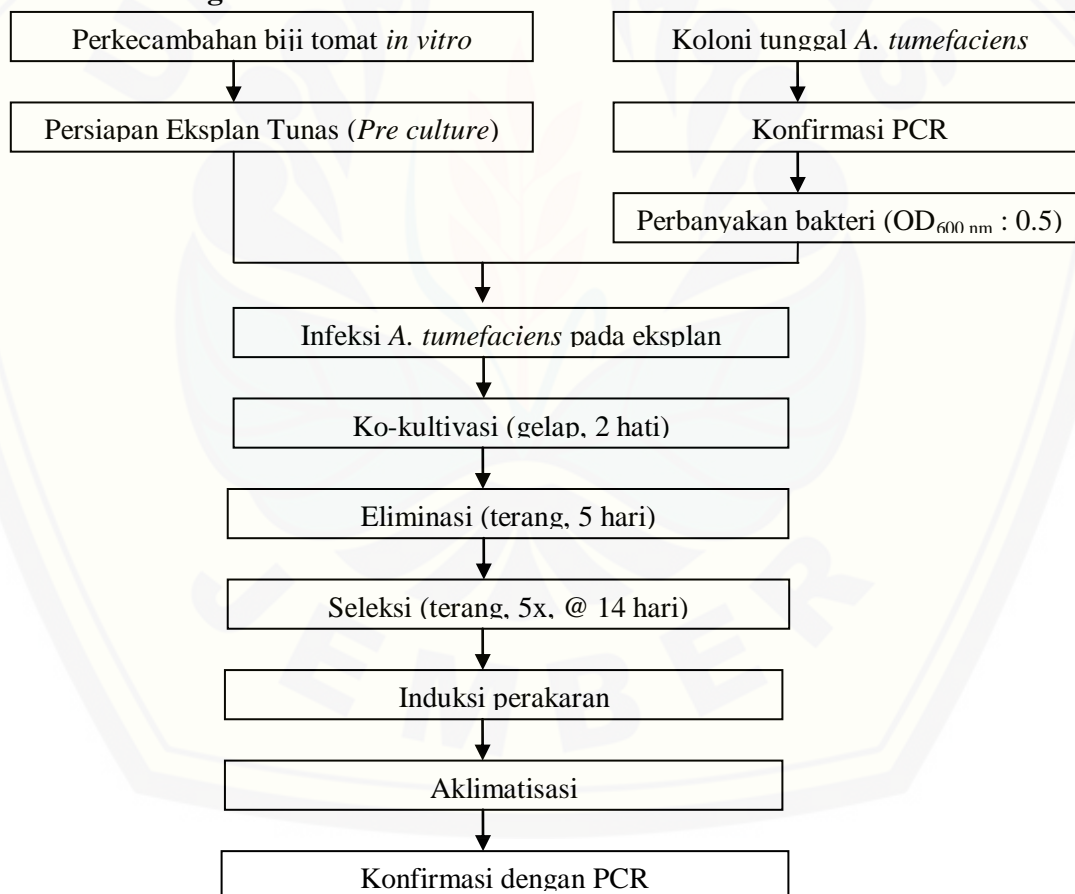
3.3.2 Peta Konstruksi plasmid pRI 101-AN SoSPS1-S162A

Agrobacterium tumefaciens yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari *glycerol stock* yang telah selesai di konfirmasi dengan sequencing (Sawitri, 2013) dan PCR, adapun peta konstruksi plasmidnya sebagai berikut:



Gambar 3.1 Peta konstruk plasmid pRI 101AN SoSPS1-S162A. LB: *left border*, RB: *right border* sebagai batas T-DNA, P35S: Promoter 35 synthetase, *nptII*: *neomycin phospho transferase* gene, T-Nos: *terminator nopaline synthetase*, P-Nos: *Promoter nopaline synthase*, S162A: *SoSPS1-S162A*.

3.3.3 Rancangan Penelitian



Gambar 3.2 Skema alur penelitian

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Perkecambahan Biji Tomat secara *In vitro*

Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biji tomat varietas rampai, dengan eksplan yang digunakan yaitu eksplan tunas apikal, dengan umur eksplan 14 hari. Persiapan eksplan dilakukan dengan merendam biji tomat dengan aquadest selama 15 menit sehingga didapatkan biji yang bernas. Biji disterilisasi menggunakan NaClO 1,57% (3 ml NaClO : 7 ml aquadest steril) selama 1,5 menit, kemudian dibilas aquadest steril sebanyak 6 kali. Biji kemudian dikering anginkan diatas kertas saring, kemudian ditanam pada media MS0 selama 10-14 hari di ruang kultur jaringan.

3.4.2 Persiapan Koloni Tunggal *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens yang digunakan dalam penelitian ini adalah *A. tumefaciens* yang mengandung mutan gen *SoSPS1-S162A* yang telah disimpan dalam *gliserol stock*. Bakteri dari *gliserol stock* selanjutnya diambil sebanyak 25 µl, kemudian dinokulasikan ke media YEP cair 2 ml dalam tabung reaksi yang mengandung antibiotik *rifampisin*, *gentamisin*, dan *kanamycin* 50 mgL⁻¹. Hasil inokulasi kemudian di-shaker selama 24 jam pada suhu 28°C dengan 150 rpm.

Hasil inokulasi diambil 1 ose biakan yang telah tumbuh, selanjutnya diinokulasi dengan metode *streak quadrant* pada media YEP padat yang mengandung antibiotik *rifampisin*, *gentamisin*, *kanamycin* 100 mgL⁻¹ dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C. Koloni tunggal yang diperoleh selanjutnya dikonfirmasi keberadaan mutan gen *SoSPS1-S162A* sebelum digunakan untuk transformasi.

Isolasi plasmid dilakukan untuk konfirmasi keberadaan mutan gen *SoSPS1-S162A* dalam *A. 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 memanen biakan *A. tumefaciens* pada media YEP yang telah diinkubasi *overnight* ke dalam eppendorf dan *disentrifuge* 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet yang dihasilkan ditambahkan 100 µl solution I dan *divortex*, kemudian ditambahkan 200 µl solution II dan *diswirling*. Selanjutnya, sampel diinkubasi dalam es selama 5 menit. Pelet yang dihasilkan ditambahkan 150 µl 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 µl. Selanjutnya, sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Supernatan ditambahkan PCI sebanyak volume supernatan yang diambil. Setelah itu, sampel *diswirling* dan *disentrifuge* 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, lalu dilakukan presipitasi dengan menambahkan etanol PA (2,5 volume supernatan) dan NaAc (0,1 volume supernatan) serta *diswirling* dan diinkubasi selama ± 1 jam pada suhu -20°C. Selanjutnya, sampel *disentrifuge* 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet yang dihasilkan kemudian dibilas dengan etanol 70% dan *disentrifuge* 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan ditambahkan 20 µl buffer TE. Setelah itu sampel DNA diukur konsentrasinya dengan menggunakan nanodrop *nano value plus* dan dilanjutkan dengan analisis PCR.

3.4.3 Infeksi *Agrobacterium tumefaciens* pada Eksplan

Koloni tunggal *A. tumefaciens* yang mengandung mutan gen *SoSPSI-S162A* diinokulasikan pada media YEP cair 2 ml yang mengandung antibiotik *rifampysin*, *gentamysin*, dan *kanamycin* 50 mgL⁻¹, dan diinkubasi *shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C selama semalam. Starter sebanyak 2 ml disubkultur dalam media

YEP cair 50 ml yang mengandung antibiotik yang sama, diinkubasi *shaker* 150 rpm pada suhu 28°C hingga kerapatan sel $OD_{600nm} = 0.5$.

Infeksi *A. tumefaciens* pada tanaman melalui pemotongan/pelukaan pada eksplan bertujuan untuk memungkinkan *A. tumefaciens* yang terdapat gen mutan *SoSPS1-S162A* masuk dan ter-*insersi* pada tanaman. Eksplan hasil pemotongan kemudian ditampung dalam media MS cair 10 ml. Selanjutnya eksplan tersebut dimasukkan ke dalam media YEP yang terdapat *A. tumefaciens* dan 20 mgL⁻¹ *acetosyringone* yang berfungsi untuk meningkatkan proses infeksi. Selanjutnya eksplan dishaker dengan kecepatan 60-70 rpm selama 25 menit. Eksplan tersebut kemudian ditiriskan di atas kertas saring steril sampai kering, lalu selanjutnya ditanam pada media ko-kultivasi.

3.4.4 Ko-kultivasi

Eksplan hasil transformasi ditumbuhkan pada media ko-kultivasi untuk menumbuhkan *A. tumefaciens* bersama dengan eksplan. Media ko-kultivasi terdiri dari media MS dengan penambahan 2 mgL⁻¹ BAP dan 20 mgL⁻¹ *acetosyringone*. Eksplan selanjutnya diinkubasi pada tempat gelap dengan suhu 28°C selama 2 hari. *Asetosiringon* pada media ko-kultivasi ini berfungsi untuk meningkatkan infeksi *A. tumefaciens* pada eksplan yang digunakan sehingga diharapkan gen target masuk dalam tanaman.

3.4.5 Eliminasi

Eksplan hasil inkubasi pada media ko-kultivasi dipindahkan ke tabung falcon dan ditambahkan aquadest steril 30 ml dan *cefotaxime* 500 mgL⁻¹, digojog, lalu aquadest sisa *washing* dibuang (dilakukan sebanyak 3 kali), selanjutnya dibilas dengan aquadest steril 2x. Eksplan kemudian ditiriskan di atas kertas saring steril sampai kering. Penanaman eksplan kemudian dilakukan pada media eliminasi yang terdiri dari MS dengan penambahan 500 mgL⁻¹ *ceffotaxime*, dan diinkubasi pada ruang kultur jaringan selama 5 hari. Adanya *ceffotaxime* pada media ini dikarenakan

ceftotaxime dapat digunakan untuk mengurangi *A. tumefaciens*, sehingga tidak terjadi *overgrowth* pada tanaman.

3.4.6 Seleksi Tanaman Putatif Transforman

Tahapan infeksi, ko-kultivasi, dan eliminasi yang telah dilalui, selanjutnya tanaman masuk pada tahapan seleksi. Proses seleksi tanaman transforman dilakukan dengan cara memindahkan eksplan hasil dari eliminasi pada media seleksi. Sebelum dipindah pada media MS dengan penambahan *kanamycin* 50 mgL⁻¹, dan 500 mgL⁻¹ *ceftotaxime* untuk seleksi, dilakukan pemotongan terlebih dahulu pada bagian eksplan yang berwarna kecoklatan. Satu kali transformasi dilakukan 5 kali tahapan seleksi, dengan tiap tahapan seleksi membutuhkan waktu 14 hari. Penggunaan *kanamycin* 50 mgL⁻¹ pada media seleksi ini berfungsi sebagai *selectble marker* sesuai dengan penanda pada plasmid yang telah disisipkan, sehingga bila eksplan tersebut tidak mengandung gen target maka dengan sendirinya tanaman tidak akan bisa *survive* sehingga akan berwarna coklat dan kelamaan akan mati.

3.4.7 Aklimatisasi

Aklimatisasi dapat dilakukan pada tanaman putatif transforman yang telah lolos (*survive*) dari seleksi 5 dengan syarat tanaman hasil transformasi tersebut telah memiliki akar yang kokoh, tinggi planlet ± 2 cm, dan berwarna hijau. Aklimatisasi dilakukan dengan 2 tahap, yaitu aklimatisasi pada *growth chamber* selama 2-3 minggu, dan selanjutnya aklimatisasi di *green house* sampai tumbuh dengan baik. Aklimatisasi dilakukan dengan cara menanam planlet pada media pasir dalam botol kaca yang telah dicampur dengan larutan nutrisi (*hougland*), yang selanjutnya disungkup dengan plastik dengan tutup berlubang untuk menghindari evapotranspirasi yang berlebihan. Penyiraman dilakukan hampir 2 hari sekali untuk menjaga kelembaban media. Proses aklimatisasi dilakukan ± 14 hari hingga diperoleh planlet yang siap untuk dipindah ke *green house* dan bisa diambil daunnya untuk isolasi genom.

3.4.8 Isolasi dan Analisis PCR Genom Tanaman Putatif Transforman

Isolasi DNA genom tanaman dilakukan dengan menggerus 0,3 gr daun tomat sampai halus. Serbuk daun dimasukkan dalam eppendorf, kemudian ditambahkan 500 µl buffer ekstraksi (0,2 Tris-Cl; 0,25 M NaCl; 0,25 ml SDS 10 %; dan 13,75 ml H₂O) lalu divortex. Setelah itu 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, lalu ditambahkan isopropanol sebanyak 0,8 x volume supernatan dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu -20°C. Setelah disentrifuge, pelet dicuci dengan ethanol 70 % sebanyak 1 ml, lalu disentrifuge kembali. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan selama 15 menit, lalu ditambahkan 30 µl buffer TE. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya menggunakan nano drop *nano vue plus* dan kemudian dianalisis PCR.

Analisis PCR dilakukan untuk deteksi keberadaan gen target yang telah terinsersi ke dalam genom tanaman. PCR dilakukan dengan menggunakan primer *nptII* (*neomycin phosphotransferase*) yang akan menghasilkan fragmen DNA sebesar 550 bp. Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan 1 pasang primer, yaitu primer Forward *nptII* (5'- GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGC C-3) dan primer Reverse *npt II* (5'- GTC GCT TGG TCG GTC ATT TC-3) untuk mendeteksi tanaman dengan menggunakan *selectable marker* berupa *kanamycin*. Digunakan *nptII* karena pada konstruk plasmid yang digunakan, *selectable markernya* berupa Kan^R atau resisten terhadap *kanamycin*.

PCR dilakukan dengan membuat *cocktail* setengah kali reaksi dengan total volume yang digunakan adalah 10µl, dengan komponen master mix kappa sebanyak 5 µl, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 0,5 µl, template DNA sebanyak 1 µl, dan ddH₂O sebanyak 3 µl. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 kali siklus yang terdiri dari tahap *pre-denaturation*: 95°C selama 3 menit, *denaturation*: 95°C selama 30 detik, *annealing*: 58°C selama 30 detik, *extention*: 72°C selama 1 menit, dan *final-extention*: 72°C selama 5 menit.

DNA yang sudah diamplifikasi kemudian dipisahkan dengan *agarose gel* 1 % elektroforesis 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 dilihat dan didokumentasikan menggunakan *Gel Documentation System*.

3.4.9 Parameter Pengamatan Penelitian

Dalam penelitian ini yang diamati yaitu:

- a. Jumlah tanaman yang lolos (*survive*) pada setiap seleksi, mulai seleksi 1 sampai seleksi ke-5 (tanaman putatif transforman)

Tabel 3.1 Tabel Hasil Transformasi mutan gen *SoSPS1-S162A* tanaman tomat

Transformasi	Efisiensi tahapan transformasi						
	K	E	S1	S2	S3	S4	S5
1							
2							
3							

Keterangan:

- K = Ko-kultivasi
- E = Eliminasi
- S = Seleksi, dari seleksi 1 sampai seleksi 5

Jumlah tanaman yang *survive* juga dapat dipresentasikan dengan %, yaitu dengan cara:

$$\frac{\text{jumlah eksplan yang lolos tiap seleksi}}{\text{jumlah eksplan awal}} \times 100\%$$

- b. Konfirmasi keberadaan mutan gen *SoSPS1-S162A* dengan PCR menggunakan primer *npt II* F/R, kemudian di elektroforesis dan selanjutnya divisualisasi dengan menggunakan *gel imaging system* hingga diperoleh pita DNA sebesar 550 bp untuk primer *npt II*.

3.4.10 Perhitungan Jumlah buah dan Berat Total Buah

Tanaman tomat putatif transforman yang berhasil melalui tahapan aklimatisasi dan telah berbuah kemudian dipanen buahnya yang seragam, yaitu ketika buah sudah berwarna merah. Tiap tanaman dihitung jumlah buah yang dihasilkan serta ditimbang berat buah hingga diperoleh berat buah total dalam tiap panen sampai tanaman tomat putatif transforman mati. Jumlah buah dan berat buah total pada penelitian ini merupakan hasil buah yang diproduksi oleh tiap tanaman tomat hingga tanaman dinyatakan mati.

Tomat yang telah dipanen kemudian diambil bijinya dengan cara memisahkan biji dari daging buah, kemudian membersihkan biji dari salut biji lalu membilasnya dengan air dan kemudian dikeringanginkan sampai biji kering. Biji yang telah kering kemudian disimpan dalam kulkas 4°C. Biji tersebut nantinya akan dijadikan sebagai stock biji F1 untuk ditanam dan dianalisis oleh peneliti berikutnya.

3.4.11 Analisis Sukrosa Buah

Buah yang telah dipanen dan berwarna merah matang adalah buah yang digunakan untuk uji sukrosa. Adapun uji kandungan sukrosa dilakukan dengan metode sellivanof sebagai berikut: Buah ditimbang per tanaman untuk mengetahui berat buah, kemudian digerus dan diambil sarinya lalu dimasukkan pada eppendorf dan disentrifuge 12.000 rpm selama 10 menit, supernatan sebanyak 50µl kemudian ditambah dengan NaOH 1 M 70µl, selanjutnya diletakkan pada *dryblock* 100°C selama 10 menit, ditambahkan 250 µl resorcinol 0.1% dan 750µl HCl 30%, kemudian di *dryblock* lagi 80°C selama 8 menit, dan dilakukan pengamatan dengan spektrofotometer 520 nm (per sampel 200µl, dengan pengulangan sebanyak 3 kali).

BAB 5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Hasil 3 kali transformasi diperoleh 31 tanaman putatif transforman dengan hanya 15 tanaman yang berhasil diaklimatisasi dan berbuah. 10 tanaman dinyatakan positif mengandung gen *SoSPS1-S162A*, yaitu V1, V2, V5, V7, V9, V10, V11, V13, V14, dan V15. Jumlah buah dan berat total buah pada tanaman tomat transgenik *SoSPS1-S162A* relatif lebih tinggi bila dibandingkan dengan tanaman tomat WT (*Wild Type*) maupun yang *SoSPS1*, namun kandungan sukrosa pada buah tomat transgenik *SoSPS1-S162A* masih bervariasi (belum homogen).

5.2 Saran

Penelitian yang dilakukan, tanaman kontrol yaitu WT dan *SoSPS1* hanya tersisa 1 tanaman saat aklimatisasi dan berbuah, sehingga data yang diperoleh kurang lengkap. Diharapkan pada penelitian berikutnya, menanam tanaman kontrol dengan jumlah yang lebih banyak serta melengkapi uji biokimia, maupun uji molekuler yang lengkap sehingga diperoleh data yang lebih baik dan valid.

DAFTAR PUSTAKA

- Buchanan, B.B, W. Jones. 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plant Physiologies*. USA. 630-674.
- Chaudry, Z., A. Afroz., Rachel. 2007. Effect the Variety and Plan Growth Regulator on Callus Proliferation and Regeneration of Three Tomato Cultivar. *J. Bol.* 39:857-869.
- De La Riva, G.A. Gonzalez, J. 1998. Agrobacterium tumefaciens : a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1 (3), 24-25.
- Dewanti, P. 2009. Transformasi Gen SoSPS1 pada Tomat melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Naskah Seminar Nasional Fakultas Pertanian Uniiiversitas Jember.
- Dewanti, P. 2011. *Peningkatan Kandungan Sukrosa dan Hasil Tomat Melalui Overekspresi Gen SoSPS1 dan Gen SoSUT1*. Tidak dipublikasikan. Disertasi. Program Pascasarjana Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya: Malang.
- Dickinson, CD., Altabella, T, and Chrispeels M.J. 1991. Slow Growth Phenotyph of transgenic tomato expressing apoplastic invertase. *Plant physiol* 95, 420-425.
- Dong, Mchughen Alan. 1993. Glyphosate tolerant flax plants from Agrobacterium mediated gene transfer. *Plant Cell Report* 7 (4): 281-4.
- Dwijayanti, D. 2014. *Transformasi Gen SoSUT menggunakan Vektor Agrobacterium tumefaciens pada Tanaman Tomat PRG Event 4.1*. Skripsi. Jember : Universitas Jember.
- Erickson, Ziegler, Guevera, Abel, Klosgen, Mathur, Rothstein and Schattat. 2004. Agrobacterium-derived Cytokinin Influence plastid morphology and Starch Accumulation in Nicotiana bethamiana during transient assay. *J. Plant Biology*. Vol. 14: 127.
- Foyer, Valadier. 1998. Drought-Induced Effect on Nitrate reductase activity and Mrna and on the coordinate 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.

- Hackel, A., N. Schaure, F. Cerrari, Kubs. 2006. Sucrose Transporter Lesut 1 and Lesut2 Inhibition Affect Tomato Fruit Development In Different Ways. *Plant Journal*. 45:180-192.
- Hartmann and Kester,s. 1990. *Plant Propagation : Principles and Practice*. ISBN 978-0-13-501449-3.
- 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.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate Modulated Gene Expression in Plants. *Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:509-540.
- Lefevre, F., M. H Remy and J. M. Manson. 1997. Alanine-Stretch Scanning Mutagenesis: A simple and Efficient Methode to Probe Protein Structure and Function. *Nucleid Acids Research*. 25 (2):447-448.
- Lessard, Kulaveerasingam, York, Strong, and Sinskey. 2002. Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants. *J. Metabolic Engineering*. Vol. 4: 67-79.
- McCormick S., J. Niedermeyer., J. Fry, A. Barnasen. 1986. Leaf Dise Transformation of Cultivated Tomato using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Report* 5:81-84.
- 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.
- Okviandari, P. Islahudin, M., Dewanti, P. 2008. *Transformasi Gen SPS Tebu untuk Meningkatkan Kandungan Sukrosa pada Tomat*. Universitas Muhammadiyah Jember. Tidak dipublikasikan.
- Raineri, D.M., Botino, P. 1990. *Agrobacterium* mediated transformation of Rice (*Oryza sativa* L). *Nature Biotechnology* 8. 33-38
- Salisbury, F.B., dan C.W Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Institut Teknologi Bandung. Bandung.

- Sambrook, J. E.F. Fritsch and Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santosa, T.J., A Sisharmini, Herman M. 2009. *Respon Regenerasi beberapa Genotip dan Studi Transformasi Genetik Tomat melalui Vektor Agrobacterium tumefaciens*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Bogor. 1-6.
- Sawitri, W. D. 2013. *Biochemical Study of Sucrose Phospat Syntase at Ser162 in Recombinant E. coli*. Unpublished data.
- Sawitri, W.D. 2016. *Study on Structure and Function of Sucrose Phosphate Syntase (SPS) From Sugarcance*. Osaka University.
- 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. Fukai,S. 2001. The Impact of carbenecillin, cefotaxime, and vancomycin on Chrysanthemum and Tobacco TCL morphogenesis and Agrobacterium Growth. Kagawa University. *Journal of Apllied Horticulture*, volume 3 (1).
- Sugiharto, B., 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 Cell Physiol.* Vol. 38: 961-965.
- Sugiharto, B., Slameto dan Dewanti, P. 2008. Peningkatan Produksi Gula melalui Overekspresi Gen SPS dan SUT pada Tanaman Tebu. *Laporan Penelitian Hibah Kompetensi*. Unpublished.
- Takahashi, Ono, Ugaki, Ishimura, Aoki, and Ohsugi. 2010. 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 heaves. *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

A. Komposisi Media MS (*Murashige and Skoog*)

Bahan	Jumlah/ L
MS Makro	50 ml
MS Mikro	0.5 ml
Fe2EDTA	5 ml
B5Vitamin	0.5 ml
Sukrose	30 gr
Phytageal	2.5 gr

B. Komposisi Media YEP (*Yeast Extract Pepton*)

Bahan	Massa (gr/L)
Yeast	10
Pepton	10
NaCl	5
Agar bakteriologi	14

C. Kurva Standart Sukrosa

