

# EFISIENSI TRANSFORMASI TOMAT (*Lycopersicon esculentum*) DENGAN GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Parawita Dewanti<sup>1</sup>, Muhammad Islahuddin<sup>2</sup>, Purnama Okviandari<sup>3</sup>  
Seagames Waluyo<sup>4</sup>, Bernet Agung Saputra<sup>5</sup>, Tatik Wardiyati<sup>6</sup>, dan Bambang Sugiharto<sup>7</sup>  
<sup>1,4,5</sup> Fakultas Pertanian Universitas Jember, <sup>2</sup> Fakultas Pertanian Universitas Islam Jember,  
<sup>6</sup> Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Malang, <sup>3,7</sup> Fakultas MIPA Universitas Jember  
Jl. Kalimantan III/23 Jember - Jawa Timur  
E-mail: parawita@yahoo.co.id

## ABSTRACT

*Agrobacterium-mediated transformation has known provide the increase of sucrose production on tomato (*Lycopersicon esculentum*). Transformation technique, medium composition, age of explant, antibiotic concentration as selection agent were optimized to improve transformation efficiency. Cotyledon and axillary bud from *L. esculentum* cv. *zamrud* and *liontin* were co-cultivated with *Agrobacterium* strain LBA4404 that harboured a *pKYS* binary vectors carrying genes for both neomycin phosphotransferase (*NPTII*) and *S. officinarum* *SPS* (*SoSPS1*). Kind of explants, explant age (14, 15, and 16 days-old in vitro seedlings) and kanamycin selection medium (0, 25, 50, 75, and 100 mgL<sup>-1</sup>) were used as treatment. This study aimed to determine transformation efficiency and obtain transgenic tomato plants transformed with the *SoSPS1* gene using *Agrobacterium tumefaciens*. Transformation efficiency was obtained at 14 days old cotyledon explants, with the percentage of explants forming shoots 19.8%. PCR results showed that the plasmid-*SoSPS1 pKYS* already integrated in the explant and has obtained eight clones of transgenic tomato plants.*

**Key words:** tomato (*Lycopersicon esculentum*), *SoSPS1* gene, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*

## PENGANTAR

Hasil akhir dari proses fotosintesis pada tanaman tomat adalah sukrosa dan pati. Sukrosa di dalam sel tanaman mempunyai peran penting dalam proses metabolisme (Castleden *et al.*, 2004) sebagai sumber energi dan kerangka karbon serta merupakan bentuk karbohidrat yang lebih mudah untuk ditranslokasi antar jaringan tanaman (Cheng *et al.*, 1996). Biosintesis sukrosa di dalam sel tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum*) dikatalisis oleh beberapa enzim. Sucrose phosphat synthase (*SPS*) merupakan enzim yang berfungsi dalam mengkatalis fruktosa-6-phosphate dan UDP-glucose menjadi sucrose-6-phosphate (Dickinson *et al.*, 1991). Pada beberapa tanaman diketahui *SPS* sebagai enzim utama dalam menentukan kandungan sukrosa, seperti pada buah tomat, melon, batang tebu, dan umbi bit dan merupakan salah satu enzim kunci dalam asimilasi karbon (Sugiharto *et al.*, 2003).

Tomat (*Lycopersicon esculentum*) merupakan tanaman sayuran penting di Indonesia. Salah satu upaya perakitan galur tomat adalah dengan rekayasa genetik melalui metode DNA rekombinan. Penyisipan materi genetik pada tanaman tomat menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* telah dilakukan sejak tahun 1986 (McCormick *et al.*, 1986), namun hasilnya masih bervariasi. Beberapa faktor mempengaruhi keberhasilan penyisipan materi genetik,

diantaranya adalah binary vector (An, 1986), varietas (Ling *et al.*, 1998; Ellul *et al.*, 2003; Santoso *et al.*, 2009), tipe eksplan (Fillati *et al.*, 1987), zat pengatur tumbuh (Pfitzner *et al.*, 1998; Cortina *et al.*, 2004), konsentrasi bakteri (Shanin *et al.*, 1986), strain *Agrobacterium* (Roekel *et al.*, 1993), dan konsentrasi antibiotik (Hu dan Phillips, 2001; Qiu *et al.*, 2007).

Transformasi gen *SPS* (*Sucrose Phosphat Synthase*) telah dilakukan pada beberapa tanaman seperti tembakau (Miswar *et al.*, 2005), tomat (Laporte *et al.*, 2001, Worrel *et al.*, 1991), bayam dan *Arabidopsis thaliana* (Signora *et al.*, 1998), dan tebu (Miswar *et al.*, 2007). Hasil dari beberapa transformasi gen *SPS* tersebut menunjukkan adanya peningkatan aktivitas *SPS* dan kandungan sukrosa. Hasil penelitian Dali *et al.* (1992) menyatakan bahwa sukrosa yang dibentuk di daun tomat akan dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh invertase setelah sampai di buah. Sukrosa kemudian dibentuk kembali (*resintesis*) dari glukosa dan fruktosa yang dikatalisis oleh *SPS* buah (Miron dan Schaffer, 1991). Disini terlihat bahwa *SPS* merupakan enzim penting dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efisiensi transformasi dan mendapatkan tanaman tomat transgenik yang ditransformasi dengan gen *SoSPS1* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*.

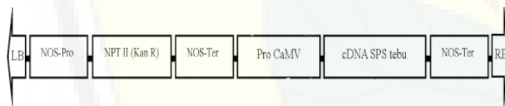
## BAHAN DAN CARA KERJA

### Bahan Tanam

Benih tomat varietas Zamrud dan Liontin berasal dari Balitsa (Balai Penelitian Sayuran) Lembang. Benih direndam air hangat selama 5 menit, kemudian disterilisasi dengan larutan Hipoklorit 5% selama 30 detik dan dibilas 3 kali dengan aquadest steril. Benih ditanam pada media perkecambahan (MS + 30 g/l sukrosa + 3 g/l phytigel, pH 5,8). Inkubasi dilakukan selama 4 hari diruang gelap dan 10 hari diruang terang dengan penyinaran 1600 lux dan pada suhu 25° C.

### Pengkulturan Agrobacterium

Koloni tunggal dari *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, yang mengandung konstruk gen SPS (Gambar 1), ditumbuhkan pada media YEP (*yeast extract pepton*) 2 ml ditambah antibiotik *kanamycin* 50 mgL<sup>-1</sup>, *Streptomycin* 30 mgL<sup>-1</sup>, dan *refamicyn* 50 mgL<sup>-1</sup>, kemudian diinkubasi pada shaker (150 rpm) pada suhu 28° C selama 2 hari. Kultur Agrobacterium di subkultur ke 50 ml YEP (*yeast extract pepton*) cair ditambah antibiotik (*kanamycin* 50 mgL<sup>-1</sup>, *Streptomycin* 30 mgL<sup>-1</sup> dan *refamicyn* 50 mgL<sup>-1</sup>), kemudian diinkubasi pada shaker (150 rpm) pada suhu 28° C hingga OD ± 0,5 – 0,8. Pengukuran OD diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm (A<sub>600</sub>).



**Gambar 1.** Peta konstruk *pKYS-SoSPS1*. cDNA-*SoSPS1* dibawah kendali promotor CaMV35S dan gen ketahanan terhadap kanamisin NPT II

### Infeksi dan Kokultivasi

Eksplan kotiledon dipotong bagian pangkal dan ujung sehingga membentuk persegi panjang, sedangkan tunas aksilar dipotong ± 0,5 cm. Potongan kotiledon dan tunas aksilar di tanam pada media prekulturan (MS + 30 g/l sukrosa + 0,2 mgL<sup>-1</sup> IAA + 2 mgL<sup>-1</sup> BAP + 3 g/l phytigel, pH 5,8). Eksplan diprekulturan selama 24 jam pada suhu 25° C.

Bakteri Agrobacterium pada media 50 ml YEP (*yeast extract pepton*) cair di sentrifuge dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit dan peletnya disuspensikan pada media MS cair sebanyak 50 ml.

Eksplant tomat hasil prekulturan dimasukkan ke dalam suspensi Agrobacterium, kemudian digojok dengan shaker selama 30 menit pada suhu 28° C dan kecepatan 50 rpm.

Eksplan ditanam pada media kokultivasi (MS + 30 g/l sukrosa + 0,2 mgL<sup>-1</sup> IAA + 2 mgL<sup>-1</sup> BAP + 3 g/l phytigel + 50 mgL<sup>-1</sup> acetosyringone, pH 5,8.) dan diinkubasi di tempat gelap selama 2 hari.

### Eliminasi Agrobacterium

Eksplant dari media kokultivasi dicuci dengan menggunakan MS cair 50 ml yang mengandung cefotaxime 500 mgL<sup>-1</sup> dan ditiriskan diatas kertas saring. Eksplant ditanam pada media eliminasi (MS + 30 g/l sukrosa + 0,2 mgL<sup>-1</sup> IAA + 2 mgL<sup>-1</sup> BAP + 3 g/l phytigel + 500 mgL<sup>-1</sup> cefotaxim, pH 5,8) pada kondisi terang selama 5 hari.

### Seleksi Tomat Putative Transforman

Eksplan ditanam pada media kanamisin 0, 25, 50, 75 dan 100 mgL<sup>-1</sup> untuk mengetahui efektivitas kanamisin sebagai agen seleksi.

Optimasi eksplan umur 14, 15 dan 16 hari setelah perkecambahan juga dilakukan untuk mengetahui efektivitas umur eksplant dalam membentuk tunas. Hasil uji kanamisin dan umur eksplant digunakan sebagai dasar untuk transformasi.

Eksplant dari media eliminasi disubkultur pada media seleksi (MS + 30 g/l sukrosa + 0,2 mgL<sup>-1</sup> IAA + 2 mgL<sup>-1</sup> BAP + 3 g/l phytigel + 500 mgL<sup>-1</sup> cefotaxim + 50 mgL<sup>-1</sup> kanamisin, pH 5,8). Planlet yang mampu tumbuh disubkultur pada media seleksi baru dengan 5 kali media seleksi. Dengan masa seleksi masing-masing 14 hari. Apabila eksplan sudah bertunas disubkultur ke media perpanjangan MS + 30 g/l sukrosa + 0,25 mgL<sup>-1</sup> BAP + 0,25 mgL<sup>-1</sup> GA3 + 3 g/l phytigel + 500 mgL<sup>-1</sup> cefotaxim + 50 mgL<sup>-1</sup> kanamisin, pH 5,8), kemudian media perakaran (MS + 30 g/l sukrosa + 0,15 mgL<sup>-1</sup> NAA + 3 g/l phytigel + 500 mgL<sup>-1</sup> cefotaxim + 50 mgL<sup>-1</sup> kanamisin, pH 5,8).

### Parameter Pengamatan

Pengamatan dilakukan pada persentase eksplant berkalus, persentase eksplant bertunas dan jumlah tunas per eksplant.

### Analisis PCR (Polymerase Chain Reactions)

Isolasi DNA genomik berasal dari daun tomat. Untuk mengetahui keberadaan gen *SoSPS1* pada plasmid *pKYS* yang diisolasi dari *Agrobacterium tumefaciens* transforman dilakukan PCR menggunakan *forward primer nptII* (5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3), dan *reverse primer nptII* (5'-GTCGCTTGGTCGGTCATTTC-3) dengan ukuran ± 650 bp.

**HASIL**

**Efektifitas Kanamisin Sebagai Agen Seleksi**

Kanamisin merupakan antibiotik yang digunakan sebagai agen seleksi pada eksplan yang sudah diinfeksi dengan *Agrobacterium*. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa eksplant tunas aksilar dan kotiledon tomat yang dikulturkan selama 28 hari pada media MS + kanamisin (25, 75, 50, 100) mgL<sup>-1</sup> menunjukkan bahwa 100% eksplan berwarna hitam dan mati, sedangkan eksplan yang ditanam pada media tanpa kanamisin tidak menunjukkan kematian (Tabel 1).

**Tabel 1.** Persentase kematian eksplan tunas aksilar dan kotiledon tomat yang ditumbuhkan pada media MS yang mengandung kanamisin

Tipe Eksplan	Konsentrasi Kanamisin (mgL <sup>-1</sup> )	Persentase Tunas Mati pada Hari ke-			
		7	14	21	28
Tunas aksilar	0	0	0	0	0
	25	0	40	60	100
	50	0	50	70	100
	75	0	60	100	-
	100	0	100	-	-
Kotiledon	0	0	0	0	0
	25	40	60	100	-
	50	60	100	-	-
	75	70	100	-	-
	100	100	100	-	-

**Pengaruh Umur Eksplant pada Efektifitas Pembentukan Tunas Putative Transforman**

Perbedaan umur eksplan akan mempengaruhi efektivitas pembentukan tunas transforman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan eksplan untuk membentuk tunas putative transforman adalah 72% pada umur eksplant 14 hari, 10% pada umur eksplant 15 hari dan 0% pada umur eksplant 16 hari (Tabel 2).

**Tabel 2.** Persentase jumlah eksplant bertunas pada umur eksplan yang berbeda

Umur Eksplan	Jumlah Eksplan	Jumlah Eksplan Bertunas	Persentase Jumlah Eksplant Bertunas
14 hari	50	36	72
15 hari	50	5	10
16 hari	50	0	0

**Efisiensi Transformasi**

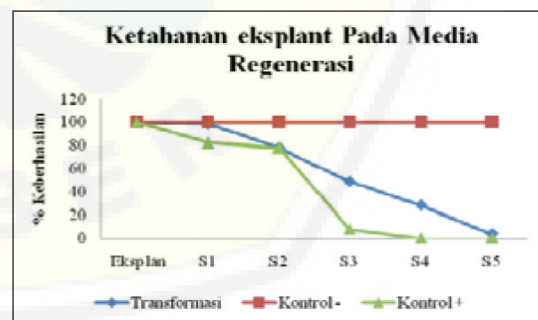
Penelitian dilaksanakan sampai tahap pembentukan tanaman putative transforman dengan cara seleksi eksplan

pada media antibiotik. Berdasarkan penelitian pendahuluan, hipokotil yang diinfeksi dengan *Agrobacterium*, selalu menunjukkan kematian. Oleh karena itu, eksplan yang digunakan adalah tunas aksilar dan kotiledon. Hasil transformasi menunjukkan bahwa eksplan kotiledon dan tunas aksilar mampu membentuk tunas 19,80% dan 8,28% (Tabel 3).

**Tabel 3.** Tabel jenis eksplant, jumlah eksplan, eksplan berkalus, eksplan bertunas dan tunas per eksplan

Jenis Eksplan	Jumlah Eksplant	Eksplant Berkalus (%)	Eksplant Bertunas (%)	Tunas per Eksplant (%)
Kotiledon	300	71,66	19,80	1,90
Tunas aksilar	300	66,00	8,28	0,51

Eksplant ditanam pada media MS tanpa kanamisin (kontrol-) dan media MS dengan kanamisin (kontrol+), sedangkan eksplan yang sudah diinfeksi dengan *Agrobacterium* ditanam pada media seleksi (transforman). Seleksi dilakukan 5 kali dengan lama seleksi masing-masing 2 minggu. Hasil pengamatan sampai seleksi 5 menunjukkan bahwa eksplan yang ditanam pada media kontrol negatif mampu berregenerasi hingga 100%, sedangkan eksplan yang di tanam pada media kontrol positif menunjukkan kematian secara bertahap, tampak bahwa pada seleksi 4, eksplan sudah menunjukkan kematian. Dari hasil pegamatan didapatkan bahwa transformasi gen *SoSPS1* ke tanaman tomat mempunyai persentase keberhasilan pada media seleksi 1-5 masing-masing 98,4%, 78,13%, 48,8%, 28,53% dan 4% (Gambar 2).

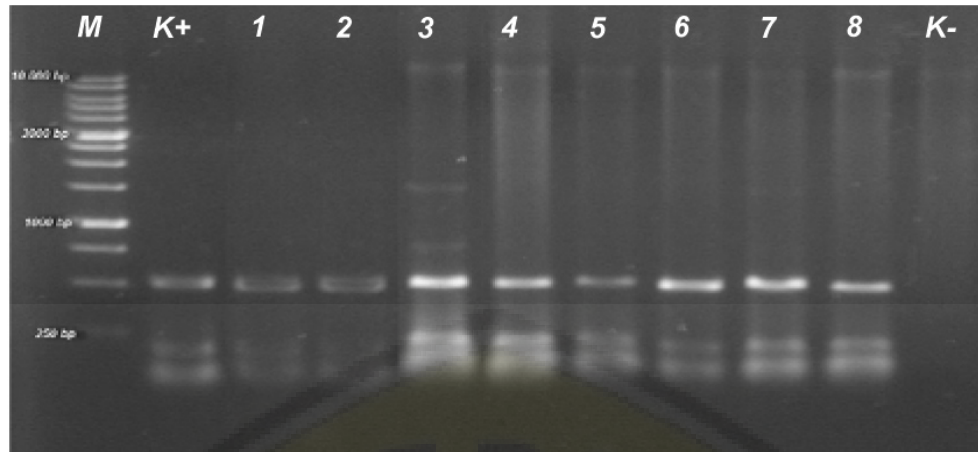


**Gambar 2.** Ketahanan eksplant pada media seleksi (S1: seleksi ke 1, S2: seleksi ke 2, S3: seleksi ke 3, S4: seleksi ke 4, S5: seleksi ke 5)

**Analisis PCR**

Isolasi genom dilakukan pada tanaman transforman (T0), kemudian dikonfirmasi dengan PCR untuk mengetahui keberhasilan transformasi. Hasil PCR dapat dilihat pada Gambar 3.





**Gambar 3.** Hasil PCR dengan primer F/R NPT II, (M) Marker, (K<sup>+</sup>) pKYS, (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) tanaman transforman, (K) tanaman *wild type*

## PEMBAHASAN

Kanamisin merupakan antibiotik yang digunakan sebagai agen seleksi, karena dalam konstruk gen target terdapat gen ketahanan terhadap kanamisin (*nptII*). Eksplan yang ditanam pada media kontrol (MS + 0 mg/l kanamisin) sampai hari ke 28 mampu beregenerasi, tetapi eksplan yang ditanam pada media perlakuan (MS + 25, 50, 75, 100 mgL<sup>-1</sup> kanamisin) mengalami kematian (Tabel 1). Hal ini membuktikan bahwa eksplan yang tidak mempunyai gen ketahanan pada kanamisin akan mengalami kematian. Hasil pengamatan yang dilakukan dengan interval 7 hari menunjukkan bahwa penambahan kanamisin 100 mgL<sup>-1</sup> pada tunas aksilar dan kanamisin 50 mgL<sup>-1</sup> pada kotiledon selama 14 hari, sudah dapat mematikan eksplan sebesar 100%. Santoso *et al.* (2001) melaporkan bahwa penambahan 50 mgL<sup>-1</sup> kanamisin pada media MS sudah dapat mematikan eksplan kotiledon tomat. Berbeda dengan yang dilaporkan Miswar *et al.* (2007), eksplan daun tembakau menunjukkan kematian pada penambahan kanamisin 100 mgL<sup>-1</sup>.

Kemampuan eksplan untuk membentuk tunas tergantung umur eksplan yang digunakan. Hasil pengamatan pada eksplan kotiledon menunjukkan bahwa eksplan yang mampu membentuk tunas adalah eksplan yang mampu membentuk kalus berwarna hijau pada kedua ujung potongan kotiledon, sedangkan kalus yang berwarna coklat tidak mampu beregenerasi. Kalus yang berwarna hijau (kalus embriogenik) akan terbentuk setelah 14–21 hari setelah ditanam pada media seleksi. Eksplan yang umurnya lebih dari 14 hari hanya mampu membentuk kalus yang berwarna coklat tetapi tidak mampu beregenerasi. Santoso *et al.* (2001), melaporkan bahwa kalus embriogenik akan membentuk primordia tunas setelah sekitar 10–14 hari.

Media seleksi mengandung kanamisin 50 mgL<sup>-1</sup> dan cefotaxim 500 mgL<sup>-1</sup>. Kanamisin digunakan sebagai agen seleksi dan cefotaxim untuk membunuh bakteri. Eksplan yang ditanam pada media seleksi bertujuan untuk mendapatkan tanaman putative transforman, karena di dalam gen target terdapat gen penyeleksi (*npt II*) dibawah kendali promoter NOS yang resisten terhadap kanamisin, sehingga kanamisin digunakan sebagai penyeleksi awal untuk eksplan yang tidak tertransformasi. Eksplan yang resisten terhadap kanamisin diasumsikan bahwa gen target telah tertransformasi. Nasir (2002) berpendapat bahwa, kanamisin yang bersifat meracun akan membunuh sel non transformasi secara perlahan-lahan. Namun, sel yang tertransformasi mampu hidup secara normal karena regenerasi tanaman tidak terganggu.

Hasil transformasi pada eksplan kotiledon dan tunas menunjukkan bahwa eksplan kotiledon menghasilkan persentase tanaman putatif transforman 19,80% lebih banyak dibandingkan eksplan tunas 8,28%. Eksplan yang tumbuh dan mampu bertahan pada media seleksi diduga bahwa T-DNA *A. tumefaciens* mampu terintegrasi pada genom tanaman. Frary *et al.*, 1996; Cortina *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2007, melaporkan bahwa metode transformasi pada eksplan kotiledon lebih responsive namun tidak menutup kemungkinan untuk dilakukan infeksi pada eksplan lain seperti tunas aksilar, daun dan hipokotil. Hasil penelitian Frary *et al.*, 1996, menunjukkan bahwa efisiensi transformasi sebesar 10,6% pada kultivar tomat Moneymaker. Cortina *et al.*, 2004, juga melaporkan bahwa efisiensi transformasi pada tomat mencapai 12,5%.

Hasil transformasi pada eksplan kotiledon menunjukkan bahwa kalus muncul pada bekas potongan, 21 hari setelah transformasi, tetapi hanya kalus embriogenik yang mampu

membentuk tunas. Pada eksplan tunas aksilar, tunas muncul dari pangkal bagian bawah, tunas baru yang muncul nampak lebih hijau dibandingkan tunas asalnya. Hal ini diduga bahwa tunas yang tumbuh adalah tunas yang putatif transforman. Setelah terbentuk tunas eksplant disubkultur pada media pemanjangan sampai tinggi palanlet  $\pm 2$  cm, kemudian eksplant disubkultur pada media perakaran, selanjutnya plantlet siap diaklimatisasi. Hasil aklimatisasi telah diperoleh 8 klon tanaman putatif transforman.

Hasil PCR dengan F/R *nptII* pada 8 klon menunjukkan bahwa terdapat pita pada 650bp pada kontrol positif dan sample tanaman, namun tidak nampak pada tanaman kontrol tidak (Gambar 3). Hal ini membuktikan bahwa tanaman tomat yang dihasilkan merupakan tanaman tomat transgenik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Efisiensi transformasi diperoleh pada eksplan kotiledon umur 14 hari, dengan persentase eksplan membentuk tunas sebesar 19,8%. Berdasarkan hasil PCR menunjukkan bahwa plasmid pKYS-*SoPSI* sudah terintegrasi pada eksplan dan telah diperoleh 8 klon tanaman tomat transgenik.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Sc., yang telah memberikan saran dalam penelitian, penulisan makalah dan pendanaan.

## KEPUSTAKAAN

- An G, 1986. High Efficiency Transformation of Cultured Tobacco Cells. *Plant Physiol.* 79: 568–570.
- Castleden CK, Aoki N, Gillespie VJ, MacRae EA, Quick WP, Buchner P, Foyer CH, Furbank RT, dan Lunn JE, 2004. Evolution and Function of The Sucrose-phosphate Synthase Gene Families in Wheat and Other Grasses. *Plant Physiol.* 135: 1753–1764.
- Cheng WH, Im KH, dan Chourey PS, 1996. Sucrose Phosphate Synthase Expression at The Cell and Tissue Level is Coordinated with Sucrose Sink-to-source Transitions in Maize Leaf. *Plant Physiol.* 111: 1021–1029.
- Cortina C dan Culi'añez-Maci' FA, 2004. Tomato Transformation and Transgenic Plant Production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 269–275.
- Dali N, Michaud D, dan Yelle S, 1992. Evidence for The Involvement of Sucrose Phosphate Synthase in The Pathway of Sugar Accumulation in Sucrose Accumulating Tomato Fruits. *Plant Physiol.* 99: 434–438.
- Dickinson S, Altabella T, dan Chrispeels M, 1991. Slow Growth Phenotype of Transgenic Tomato Expressing Apoplasmic Invertase. *Plant Physiol.* 95: 420–425.
- Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, Rios G, Roig LA, dan Moreno V, 2003. The Ploidy Level of Transgenic Plants in mediated Transformation of Tomato Cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill.) is Genotype and Procedure Dependent. *Theor. Appl. Gen.* 106(2): 231–238.
- Fillati JJ, Kiser J, Ronald R, dan Comai L, 1987. Efficient Transfer of Glyphosate Tolerance Gene Into Tomato Using a Binar *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Biotechnology* 5: 726–730.
- Frary A dan Earle ED, 1996. An Examination of Factors Affecting The Efficiency of mediated Transformation of Tomato. *Plant Cell Reports.* 16: 235–240.
- Hu W dan Phillips GC, 2001. A Combination of Overgrowth-control Antibiotics Improves *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation Efficiency for Cultivated Tomato (*L. esculentum*) In Vitro Cell. *Dev. Biol. Plant* 37: 12–18.
- Laporte MM, Galagan JJ, Prasch AL, Vanderveer PJ, Hanson DT, Shewmaker CK, dan Sharkey TD, 2001. Promoter Strength and Tissue Specificity Effect on Growth of Tomato Plants Transformed with Maize Sucrose Phosphate Synthase. *Planta* 212: 817–822.
- Ling HQ, Kriseleit D, dan Ganai MW, 1998. Effect of Ticarcillin/Potassium Clavulante on Callus Growth and Shoot Regeneration in - Mediated Transformation of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Cell Reports* 17: 843–847.
- McCormick S, Niedermeyer J, Fry J, Barnason A, Horsch R, dan Fraley R, 1986. Leaf Disc Transformation of Cultivated Tomato (*L. esculentum*) Using *A. grobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 5: 81–84.
- Miron D dan Schaffer AA, 1991. Sucrose-phosphate Synthase, Sucrose Synthase, and Invertase Activities in Developing Fruit of *Lycopersicon esculentum*, and the SA. *Plant Physiol* 95: 623–627.
- Miswar, Sugiharto B, Soedarsono J, dan Moeljolawiro S, 2005. Transformasi Gen Sucrose-phosphate Synthase (SoSPS1) Tebu (*Saccharum officinarum* L.) untuk Meningkatkan Sintesis Sukrosa Pada Daun Tembakau (*nicotiana tabacum* L.). *Berkala Ilmiah BIOLOGI* 4(5): 337–347.
- Miswar, Sugiharto B, Handoyo T, dan Made SA, 2007. Peranan Sucrose Phosphate Synthase (SPS) dan Acid Invertase (AI) Internoda Tebu (*Saccharum officinarum* L.) dalam Akumulasi Sukrosa. *Agritrop*, 26(4): 187–193.
- Nasir M, 2002. Bioteknologi Potensi dan Keberhasilannya Dalam Bidang Pertanian. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Pfützner AJP, 1998. Transformation of Tomato. *Meth. Mol. Biol.* 81: 359–363.
- Qiu D, Direccion G, Tavarza R, dan Giuliano G, 2007. Improved Protocol for *Agrobacterium* Mediated Transformation of Tomato and Production of Transgenic Plants Containing Carotenoid Biosynthetic Gene CsZCD. *Scientia Horticulturae* 112: 172–175.
- Roekel JSC van, Damm B, Mechters LS, dan Hoekema, 1993. Factors Influencing Transformation Frequency of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Reports* 12: 644–647.

- Santoso TJ, Sisharmini A, dan Herman M, 2001. Respon Regenerasi Beberapa Genotipe dan Studi Transformasi Genetik Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Melalui Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian.
- Shanin EA, Sukhapinda K, dan Simpson RB, 1986. Transformation of Cultivated Tomato by a Binary Vector in *Agrobacterium rhizogenes*: Transgenic Plants With Normal Phenotypes Harbour Binary Vector T-DNA, But No Ri -plasmid T-DNA. *Theor. Appl. Gen.* 72: 770–777.
- Signora L, Galtier N, Skøt L, Lucas H, and Foyer CH, 1998. Over-expression of Sucrose Phosphate Synthase in Arabidopsis Thaliana Results in Increased Foliar Sucrose/Starch Ratios and Favours Decreased Foliar Carbohydrate Accumulation in Plants After Prolonged Growth with CO<sub>2</sub> Enrichment. *Journal of Experimental Botany*, (49) 321: 669–680.
- Sugiharto B, Miswar, Murdiyatmo U, 2003. Overekspresi Gen Sucrose-phosphate Synthase Untuk Peningkatan Biosintesis Sukrosa Pada Tanaman Tebu. *Laporan Akhir RUT VIII*. Universitas Jember dan Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, 42.
- Worrel AC, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersiy M, dan Voelker TA, 1991. Expression of Maize Sucrose-phosphate Synthase in Tomato Leaf Carbohydrate Partitioning. *Plant Cell*. 3: 1121–113.

