



**SKRINING TANAMAN PADI TRANSGENIK OVEREKSPRESI
GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN ANTIBIOTIK KANAMYCIN**

SKRIPSI

Oleh:

Lutfiana Riski

NIM 131810401016

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2018



**SKRINING TANAMAN PADI TRANSGENIK OVEREKSPRESI
GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN ANTIBIOTIK KANAMYCIN**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi Strata 1 (S1) Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Oleh:

Lutfiana Riski

NIM 131810401016

JURUSAN BIOLOGI

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS JEMBER

2018

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, karya tulis ilmiah ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Sugiartik, Ayahanda Slamet Darsono tercinta, dan Saudaraku Diki Dwi Aji saya ucapkan terima kasih atas segala dukungan dan do'a yang tiada henti;
2. Seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, dukungan dan semangat untuk menuntut ilmu;
3. Guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu yang berharga;
4. Almamaterku Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
5. Sahabat dan teman-temanku yang telah memberikan dukungan dan semangat.

MOTTO

“Hai orang-orang beriman, jadikanlah sabar dan sholat sebagai penolongmu,
sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar.”

(terjemahan Surat *Al-Baqarah* ayat 153)^{*)}

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-
orang yang berilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha mengetahui
apa yang kamu kerjakan”

(terjemahan Surat *Al-Mujaadilah* ayat 11)^{*)}

^{*)}Departemen Agama Republik Indonesia. 2008. Al-Qur'an dan Terjemahan.
Jakarta: CV. Pustaka Al-Kautsar.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Lutfiana Riski

NIM : 131810401016

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Skrining Tanaman Padi Transgenik Overekspresi Gen *SoSPSI* Menggunakan Antibiotik Kanamycin” 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 di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember,
Yang Menyatakan,

Lutfiana Riski
NIM. 131810401016

SKRIPSI

**SKRINING TANAMAN PADI TRANSGENIK OVEREKSPRESI
GEN *SoSPS1* MENGGUNAKAN ANTIBIOTIK KANAMYCIN**

Oleh:

Lutfiana Riski

NIM 131810401016

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dra. Dwi Setyati, M.Si

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

PENGESAHAN

Karya ilmiah skripsi berjudul “Skrining Tanaman Padi Transgenik Overekspresi Gen *SoSPSI* Menggunakan Antibiotik Kanamycin” telah diuji dan disahkan pada:

hari :

tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji

Ketua,

Sekretaris,

Dra. Dwi Setyati, M.Si

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

NIP. 196404171991032001

NIP. 195510221982121001

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

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

M. Su’udi, Ph.D

NIP. 197509132000032001

NRP. 76001678

Mengesahkan,

Dekan

Drs. Sujito, Ph.D

NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Skrining Tanaman Padi Transgenik Overekspresi Gen *SoSPS1* Menggunakan Antibiotik Kanamycin;

Lutfiana Riski, 131810401016; 2018; 46 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tanaman transgenik merupakan tanaman yang telah direkayasa genetiknya, salah satunya yaitu dengan melalui proses transformasi. Salah satu gen yang ditransformasikan ke dalam genom tanaman adalah gen SPS. Gen *SPS* merupakan gen yang menjadi kunci dalam sintesis sukrosa pada tanaman. Gen tersebut mengkatalis *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG) menjadi *sucrose-6-phosphate* (suc6P). Proses selanjutnya yaitu terjadi pemutusan *phosphate* pada suc6P oleh enzim *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) dan menghasilkan sukrosa. Transformasi gen SPS pada tanaman telah banyak dilakukan, diantaranya adalah pada tanaman tebu, tembakau, dan padi. Pewarisan gen *SoSPS1* pada tanaman transgenik hasil transformasi gen *SoSPS1* pada padi *Indica* cv. Inpari 14 generasi selanjutnya belum diketahui sehingga perlu dikonfirmasi adanya gen *SoSPS1* pada tanaman tersebut. Selain itu, untuk memperoleh tanaman transgenik homozigot perlu diketahui rasio segregasi pada keturunan berikutnya. Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian mengenai konfirmasi keberadaan gen *SoSPS1* dan rasio segregasi Mendel pada tanaman padi overekspresi gen *SoSPS1* generasi T4.

Penelitian ini dilakukan dengan melakukan skrining 7 event tanaman padi transgenik overekspresi gen *SoSPS1* dan menghitung rasio fenotip tanaman transforman dengan tanaman nontransforman. Data yang diperoleh dianalisis *chi square* dengan rasio yang diharapkan 3:1. Tahap selanjutnya yaitu mengkonfirmasi adanya gen *SoSPS1* melalui analisis PCR.

Berdasarkan skrining tanaman transgenik pada generasi T4, dan analisis *chi square* dengan derajat kebebasan 0,05 diperoleh 4 tanaman yang memiliki rasio segregasi 3:1. Hasil skrining juga menunjukkan tidak adanya tanaman

homozigot sehingga pada generasi ini pewarisan gen *SoSPS1* masih belum stabil. Berdasarkan konfirmasi PCR, dari 14 tanaman yang dianalisis diperoleh 12 tanaman positif transforman sedangkan 2 tanaman lainnya tidak terkonfirmasi mengandung gen *SoSPS1* karena diduga *chimera*.



PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Skrining Tanaman Padi Transgenik Overekspresi Gen *SoSPSI* Menggunakan Antibiotik Kanamycin**” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Dra. Dwi Setyati, M.Si selaku dosen pembimbing utama dan Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr.Sc selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, dan saran dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si, M.Si dan M. Su’udi, Ph.D selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Esti Utarti S.P, M.Si dan Purwatiningsih, S.Si, M.Si, Ph.D selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan S1;
4. Mohammad Ubaidillah S.Si.,M.Agr.,Ph.D, yang telah membimbing dan memberikan saran selama bekerja di laboratorium demi kesempurnaan skripsi ini;
5. Ibunda Sugiartik, Ayahanda Slamet Darsono serta Ananda Diki Dwi Aji atas dukungan, do’a, perhatian dan kasih sayang tiada henti sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S1;
6. Teknisi laboratorium CDAST Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman : Purnama Oktaviandari, S.P, M.P., Arsetyo Rahardianto, S. Si, Nurul Hidayati, S.Si, Ni Putu Frida Okta W., S.Si., yang telah membantu memberikan saran dalam penelitian ini;

7. Rekan-rekan kerja di laboratorium: Siti Nurul Afidah, Moch. Rosyadi Adnan, Nur Nafisatul. A, Arina Aulia, Chesa Ananda, Intan Neliana, Retnosari Apriasti, Nurul Mufitdah, Firdha Narulita, Risky Maulana, Fragaria Vesca, Suwinda Fibriani, Weny Nailul, Suvia Widyaningrum, Reza Anugrah, A Bagus Sudrajat, Arina Amalia, Femin Damayanti, Anisatul Mukarromah yang memberikan motivasi dan waktunya untuk membantu penelitian ini;
8. Teman-teman Biologi 2013 “Biogas” dan sahabat Kosan: Anafiyati, Avif Tri Asri Lestari, Siti Lutfia Lailatus Syurur, Siti Febriana Fatmala, dan Yenny Febriana R.A yang telah memberikan semangat dan bantuan dalam penyusunan skripsi ini;
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Jember, Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN_MOTTO	iii
HALAMAN_PERNYATAAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Morfologi Tanaman Padi.....	4
2.2 Peranan SPS dalam Asimilasi Karbon dan Biosintesis Sukrosa pada Tanaman	5
2.3 Tanaman Overekspresi gen <i>SoSPSI</i>	7
2.4 Pewarisan Genetik Tanaman Tranforman dimediasi <i>A. tumefaciens</i>	8
2.5 Pewarisan Sifat Tanaman Transforman Berdasarkan Hukum Mendel	9
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	11
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.2 Bahan dan Alat	11
3.2.1 Bahan	11
3.2.2 Alat.....	11

3.3 Alur Penelitian.....	12
3.4 Prosedur Penelitian.....	13
3.4.1 Skrining Tanaman Padi Overekspresi gen <i>SPS</i>	13
3.4.2 Konfirmasi Tanaman Padi Overekspresi Gen <i>SoSPSI</i>	14
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
4.1 Optimasi Konsentrasi Kanamycin.....	17
4.2 Skrining Tanaman Padi Transforman.....	18
4.3 Rasio Fenotip Tanaman Transforman dan Non-transforman.....	20
4.4 Analisis PCR	22
BAB 5. PENUTUP	23
5.1 Kesimpulan.....	23
5.2 Saran.....	23
DAFTAR PUSTAKA	24
LAMPIRAN.....	28
Lampiran 4.1 Komposisi Media A-B Mix	28
Lampiran 4.2 Perhitungan <i>Chi Square Test</i> pada Hasil Skrining.....	29
Lampiran 4.3 Tabel <i>Chi-Square Test</i>	31

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Jumlah tanaman transforman dan non-transforman serta analisis *chi square* 21



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi tanaman padi	4
Gambar 2.2 Proses sintesis sukrosa pada tanaman C3.....	6
Gambar 2.3 Peta konstruk plasmid pCL4- <i>SoSPSI</i> dalam T-DNA yang telah ditransformasi pada DNA tanaman padi	8
Gambar 3.1 Alur Penelitian.....	12
Gambar 4.1 Hasil optimasi tanaman padi <i>wild type</i> dengan berbagai konsentrasi kanamycin	17
Gambar 4.2 Tanaman padi pada tahap skrining.....	19
Gambar 4.3 Fenotip tanaman hasil <i>skrining</i> menggunakan antibiotik kanamycin 75 mg/L	19
Gambar 4.4 Hasil analisis PCR tanaman padi tanaman yang lolos seleksi antibiotik kanamycin 75 mg/L	22

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman transgenik merupakan tanaman yang telah direkayasa genetiknya, salah satunya yaitu dengan melalui proses transformasi. Transformasi genetik merupakan suatu pemindahan gen yang diisolasi dari tanaman, bakteri, virus, dan hewan ke dalam genom baru sehingga diperoleh tanaman yang memiliki sifat-sifat unggul. Sifat unggul tersebut diantaranya ketahanan terhadap hama dan penyakit, herbisida maupun peningkatan kandungan nutrisi atau daya simpan (Manuhara, 2006).

Transformasi genetik pada tanaman dapat dilakukan dengan beberapa cara, salah satunya menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (Hopkins, 2007). Penggunaan *A. tumefaciens* sebagai vektor untuk transfer gen memiliki keuntungan yaitu sedikitnya jumlah salinan transgen atau gen yang diintegrasikan ke dalam genom tanaman (Nishimura *et al.*, 2006). Jumlah salinan transgen yang terintegrasi akan mempengaruhi ekspresi dari transgen. Semakin banyak jumlah salinan transgen dapat menyebabkan hilangnya ekspresi dari salah satu atau bahkan seluruh transgen tersebut (Flavell, 1994). Transgen yang tidak terekspresi akan menyebabkan pewarisan gen yang tidak stabil pada keturunan berikutnya.

Transgen yang masuk ke dalam kromosom pada tanaman hasil transformasi dapat diwariskan ke keturunannya sesuai dengan hukum Mendel (Watson *et al.*, 1988). Transgen yang telah ditransformasi tersebut akan masuk ke dalam genom tanaman secara acak dan sulit diprediksi sisi integrasinya (Vaucheret *et al.*, 1998). Transgen yang terintegrasi ke dalam lokus kromosom akan mengalami segregasi dalam pembentukan gamet kemudian mengelompok secara bebas sehingga dihasilkan individu homozigot dan heterozigot (Crowder, 1997). Individu homozigot yang diperoleh pada tanaman transgenik sangat penting untuk kestabilan gen asing pada keturunan berikutnya. Hal ini karena individu homozigot akan menghasilkan keturunan homozigot sehingga diperoleh tanaman transgenik yang stabil.

Salah satu gen yang ditransformasikan ke dalam genom tanaman adalah gen *SPS*. Gen *SPS* merupakan gen pengkode enzim SPS. Enzim tersebut merupakan enzim yang menjadi kunci dalam sintesis sukrosa pada tanaman. Enzim tersebut mengkatalis *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG) menjadi *sucrose-6-phosphate* (suc6P). Proses selanjutnya yaitu terjadi pemutusan *phosphate* pada suc6P oleh enzim *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) dan menghasilkan sukrosa (Langenkamper *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2005). Aktivitas SPS berkorelasi positif terhadap akumulasi sukrosa pada tanaman. Selain itu, SPS juga terlibat dalam pertumbuhan dan hasil panen tanaman serta berperan dalam toleransi stress pada tanaman diantaranya stress kekeringan (Huang *et al.*, 2012).

Transformasi gen *SPS* pada tanaman telah banyak dilakukan, salah satunya adalah transformasi gen *SoSPS1* yang telah dilakukan oleh Miswar *et al.*,(2005) pada tanaman tembakau, Ningtyas *et al.*,(2015) pada tanaman tebu, dan Satria *et al.*,(2015) pada tanaman padi. Transformasi gen *SPS* pada padi oleh Satria *et al.*, (2015) dilakukan dengan menyisipkan gen *SoSPS1* pada padi Indica cv. Inpari 14. Kultivar tersebut dipilih karena memiliki produktivitas yang rendah sehingga diharapkan dengan menyisipkan gen tersebut dapat meningkatkan produktivitas. Berdasarkan hasil transformasi, telah berhasil diperoleh tanaman padi overekspresi gen *SoSPS1* serta telah dikonfirmasi adanya gen tersebut menggunakan analisis PCR. Namun belum diketahui pewarisan gen tersebut pada tanaman padi overekspresi gen *SoSPS1* pada generasi selanjutnya sehingga perlu dikonfirmasi adanya gen *SoSPS1* pada tanaman tersebut. Selain itu, untuk memperoleh tanaman transgenik homozigot perlu diketahui rasio segregasi pada keturunan berikutnya. Berdasarkan latar belakang tersebut perlu dilakukan penelitian mengenai konfirmasi keberadaan gen *SoSPS1* dan rasio segregasi Mendel pada tanaman padi overekspresi gen *SoSPS1* generasi T₄.

1.2 Rumusan Masalah

Gen *SPS* merupakan gen yang berperan penting dalam sintesis sukrosa pada tanaman tebu. Transformasi gen *SoSPS1* telah dilakukan pada tanaman padi

Indica cv. Inpari 14, namun masih belum diketahui rasio segregasi Mendel pada keturunan berikutnya yaitu pada generasi T_4 dan diperlukan adanya tanaman transgenik homozigot agar diperoleh tanaman transgenik yang stabil. Selain itu, diperlukan konfirmasi PCR untuk mengetahui adanya gen *SoSPSI* pada tanaman padi overekspresi gen *SoSPSI* generasi T_4 .

1.3 Batasan Masalah

Analisis yang dilakukan terdiri dari analisis *chi square test* dengan rasio yang diharapkan yaitu 3:1 dan analisis PCR untuk mengkonfirmasi adanya gen *SoSPSI*.

1.4 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui rasio segregasi gen *SoSPSI* pada generasi T_4 , memperoleh tanaman transgenik homozigot dan mengkonfirmasi adanya gen *SoSPSI* pada tanaman padi overekspresi gen *SoSPSI* generasi T_4 .

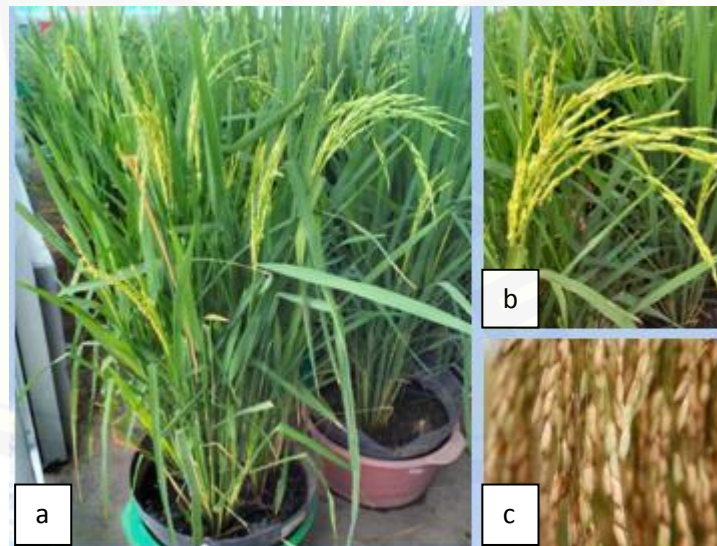
1.5 Manfaat

Hasil penelitian diharapkan dimanfaatkan sebagai dasar pengembangan dalam penelitian bioteknologi pada tanaman padi PRG. Adanya data mengenai rasio segregasi gen *SPS* pada tanaman generasi selanjutnya dan diperolehnya tanaman transgenik yang homozigot diharapkan dapat menjadi dasar pertimbangan bagi peneliti dalam bidang pemuliaan tanaman.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Morfologi Tanaman Padi

Tanaman padi (*Oryza sativa*) merupakan tanaman yang tergolong tanaman tahunan, dengan batang yang bulat berongga, agak pipih dan berumpun (Smith dan Dilday, 2003). *O. Sativa* memiliki batang tegak dengan tinggi 0,6-2 meter, serta terdiri dari 4-5 anakan (FAO, 2017). Struktur daun terdiri dari pelepah dan lamina, dilengkapi dengan aurikula dan ligula. Bunga berbentuk malai yang terdiri dari bagian basal, rachis (axis), cabang primer dan sekunder, *pedicel* dan bulir (Smith dan Dilday, 2003). Pada malai, terdapat cabang yang menunjang sejumlah bulir padi. Tiap bulir memiliki bunga yang dikelilingi oleh *lemma* dan *palea* di bagian basal. *Lemma* dan *palea* (kulit sekam) yang menutupi biji padi bervariasi dalam ukuran, tekstur, dan warna. Setiap malai dapat berisi 100-150 bulir padi (FAO, 2017). Secara umum, bagian-bagian tanaman padi dapat dilihat pada Gambar 2.1.



(a) Tanaman padi inpari 14; (b) malai; (c) biji
Gambar 2.1 Morfologi tanaman padi (dokumen pribadi, 2017)

Tanaman padi merupakan salah satu dari 23 spesies dari genus *Oryza* yang banyak dikenal dan dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi (Vaughan *et al.*,

2003). *Oryza sativa* terdiri dari dua subspecies, yaitu *Oryza sativa* ssp. *Indica* dan *Oryza sativa* ssp. *japonica*. Jenis padi *Indica* memiliki karakteristik biji lebih ramping, daun berwarna hijau terang, dan memiliki lebih banyak anakan, sedangkan jenis padi *Japonica* memiliki karakteristik biji yang lebih bulat, daun berwarna hijau tua, dan memiliki sedikit anakan (OECD,1999).

2.2 Peranan SPS dalam Asimilasi Karbon dan Biosintesis Sukrosa pada Tanaman

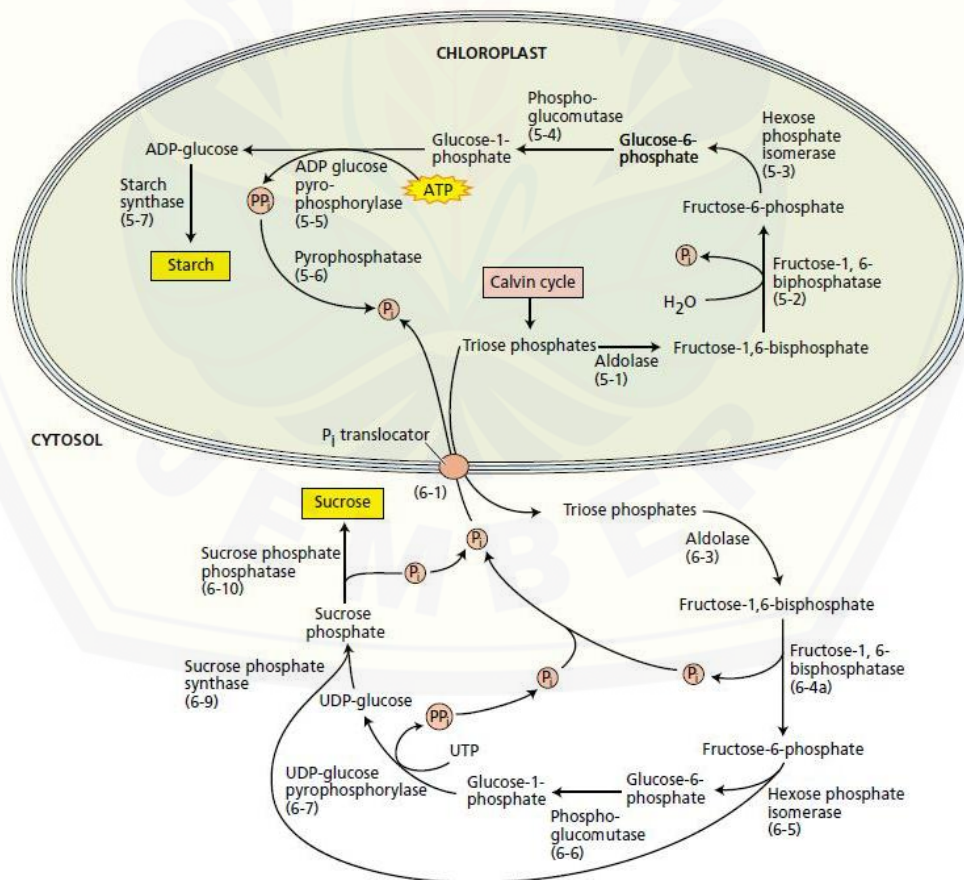
Berdasarkan jalur asimilasi karbon, tanaman dibagi menjadi 3, yaitu tanaman C3, C4, dan CAM. Penamaan jalur fotosintesis tersebut didasarkan pada jalur asam dikarboksilik karena hasil fiksasi karbon stabil yang pertama kali diperoleh adalah asam dikarboksilik (C4) seperti malat dan aspartat. Senyawa C4 tersebut kemudian dipecah menjadi piruvat (C3) dan CO₂. Pada tanaman C3 hasil fiksasi karbon berupa 3-fosfoglisarat (C3). Sekitar 90% tanaman terestrial yang merupakan tanaman pertanian merupakan tanaman C3 diantaranya padi, gandum, kedelai, dan kentang (Pessarakli, 2005).

Proses fotosintesis pada tanaman diawali dengan dipecahnya H₂O menjadi hidrogen dan oksigen. Reaksi ini membutuhkan cahaya matahari sehingga disebut dengan reaksi terang. Reaksi terang menghasilkan energi (NADPH dan ATP) yang dibutuhkan dalam reaksi gelap atau siklus Calvin yaitu proses terjadinya fiksasi karbon dan dihasilkannya glukosa (Campbell *et al.*, 2008). Pada tanaman C3, asimilasi CO₂ langsung melalui siklus Calvin (Pessarakli, 2005).

Padi merupakan tanaman C3 yang proses asimilasi karbonnya secara keseluruhan terjadi di dalam kloroplas (Pessarakli, 2005). Pada siklus Calvin, terdiri dari 3 tahap yaitu fiksasi karbon, reduksi, dan regenerasi RuBP. Dalam fiksasi karbon, CO₂ berikatan dengan gula yang memiliki 5 karbon yaitu *ribulose biphosphate* (RuBP) dan dikatalis oleh *RuBP carboxylase* (rubisco) sehingga terbentuk 2 molekul *3-phosphoglyserate*. Pada tahap selanjutnya tiap molekul *3-phosphoglyserate* mengikat fosfat dari ATP membentuk *1,3-biphosphoglyserate* yang selanjutnya tereduksi menjadi *glyseraldehide-3-phosphate* (G3P). G3P, melalui serangkaian reaksi yang kompleks 5 molekul G3P disusun kembali

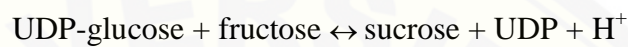
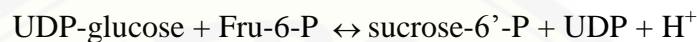
menjadi 3 molekul RuBP, sedangkan 1 molekul G3P lainnya akan dikeluarkan dan menjadi bahan awal untuk jalur metabolisme lain seperti sintesis glukosa dan karbohidrat lainnya (Campbell *et al.*, 2008).

Sukrosa merupakan senyawa penting yang berfungsi sebagai sumber energi pada sel fotosintetik dan dapat ditranslokasikan ke jaringan yang sedang tumbuh. Sintesis sukrosa terjadi di sitosol dan menggunakan glukosa dan fruktosa yang telah terfosforilasi sebagai bahan baku (Lakitan, 2012). Sukrosa disintesis dari *triose phosphat* dengan konversi *glucose-1-phosphate* menjadi *UDP-glucose* melalui enzim *UDP-glucose pyrophosphorylase*. Selanjutnya *UDP-glucose* diubah menjadi *sucrose-6-phosphate* oleh enzim *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS). Kemudian *sucrose-6-phosphate phosphatase* memecah fosfat dari *sucrose-6-phosphate* menjadi sukrosa (Taiz dan Zeiger, 2002). Adapun proses sintesis sukrosa secara keseluruhan dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.2 Proses sintesis sukrosa pada tanaman C3 (Taiz dan Zeiger, 2002)

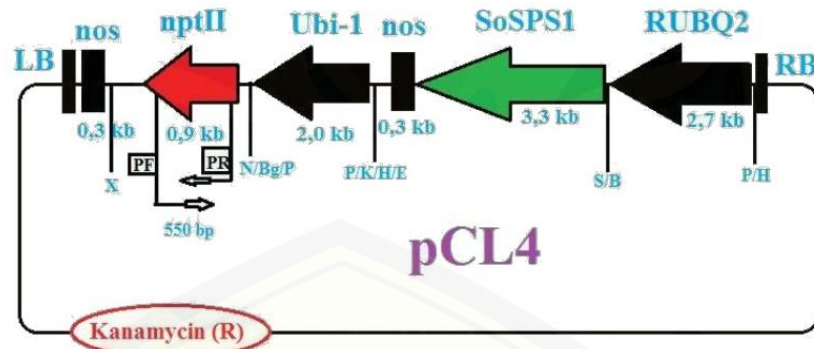
Enzim *Sucrose-phosphate synthase* (SPS) merupakan enzim kunci dalam proses asimilasi karbon pada tanaman. SPS juga memiliki peran penting dalam produksi sukrosa di dalam sel fotosintetik dan di dalam perkecambahan biji berperan dalam konversi dari pati atau asam lemak menjadi sukrosa (Chavez-Barcenas *et al.*, 2000). Sintesis sukrosa dapat dikatalisis oleh enzim yang berbeda yaitu *sucrose phosphate synthase* (SPS) dan *sucrose synthase* (SuSy) dengan persamaan reaksi yaitu:



SPS tidak hanya ditemukan pada jaringan fotosintetik, namun juga terdapat pada jaringan nonfotosintetik seperti pada buah yang masak. Aktivitas SPS diregulasi oleh efektor allosterik seperti glukosa-6-fosfat dan Pi dan fosforilasi seryl (Huber dan Huber, 1996). SPS berperan dalam metabolisme sukrosa diantaranya adalah berpengaruh dalam pertumbuhan tanaman dan perkembangan buah, serta regulasi dari distribusi hasil fotosintetik yaitu sukrosa dan pati (Wang *et al.*, 2013). Beberapa penelitian melaporkan bahwa overekspresi gen *SPS* dapat meningkatkan kandungan gula pada buah (Laporte *et al.*, 1997) dan hasil panen yang lebih tinggi (Ishimaru *et al.*, 2008).

2.3 Tanaman Overekspresi gen *SoSPS1*

Transformasi gen *SoSPS1* menggunakan eksplan tunas apikal padi telah dilakukan oleh Satria *et al.* (2015) dan berdasarkan analisis PCR dan aklimatisasi telah diperoleh 7 tanaman transforman yang dapat bertahan hidup. Transformasi gen *SoSPS1* dilakukan dengan menggunakan vektor *A. tumefaciens* strain GV 3101 yang mengandung binary vector plasmid pCL4. Plasmid tersebut telah disisipi gen *SoSPS1* dibawah kontrol promoter *Rice Ubiquitin 2* (RUBQ2) dan dilengkapi dengan gen penanda *Neomycin Phosphotransferase II* (*npt II*). Adapun peta konstruk plasmid yang telah diintegrasikan dalam DNA tanaman padi ditunjukkan pada Gambar 2.2.



LB: left border; RB: right border; nos: nopaline synthase gene; npt II: neomycin phosphotransferase gene; Ubi-1: maize ubiquitin promoter; SoSPS1: *Saccharum officinarum* sucrose phosphate synthase gene; RUBQ2: rice ubiquitin promoter
 Gambar 2.3 Peta konstruk plasmid pCL4-SoSPS1 dalam T-DNA yang telah ditransformasi pada DNA tanaman padi (Satria, *et al.* 2015)

Ishimaru *et al.*, (2008) telah membuktikan bahwa overekspresi gen *SPS* jagung pada kentang dapat meningkatkan persediaan fotoasimilatori dari daun (*source*) ke umbi (*sink*) dan dapat meningkatkan hasil panen seperti umbi yang lebih besar dan manis dibandingkan kontrol. Chavez-Barcenas *et al.* (2000) melaporkan bahwa gen *SPS1* pada padi terekspresi pada jaringan fotosintetik (sel mesofil daun), *scutellum* pada perkecambahan biji, dan pada polen (bunga imatur). Pada daun, gen hanya terekspresi pada sel mesofil di lamina dan pelepah daun. Ekspresi gen pada daun di bagian terluar lebih tinggi daripada di bagian dalam daun. Selain itu, pada daun yang telah membuka ekspresi gen menurun dari ujung daun sampai ke bagian pangkal daun. Hal ini menunjukkan bahwa translokasi sukrosa dari *source* ke *sink* terjadi pada dua arah yaitu secara basipetal dan transversal. Selama proses perkembangan daun, ekspresi gen *SPS* akan meningkat pada daun yang lebih tua (matur) jika dibandingkan pada daun muda yang hanya terekspresi di bagian apex daun.

2.4 Pewarisan Genetik Tanaman Tranforman dimediasi *A. tumefaciens*

Metode transformasi menggunakan *A. tumefaciens* merupakan metode yang banyak digunakan. Bakteri tersebut mengandung plasmid Ti (*Tumor Inducing*) yang mengkode sebagian besar sifat yang menyebabkan virulensi. *A. tumefaciens* menginduksi terbentuknya tumor pada tanaman melalui transfer

single-strand T-DNA ke dalam genom tanaman. Hal inilah yang menjadi dasar untuk mengintegrasikan gen interest ke dalam genom tanaman melalui *A. tumefaciens*. Integrasi gen tersebut terjadi secara acak dan dengan jumlah salinan gen yang sulit untuk diprediksi (Kumar dan Fladung, 2004).

Tanaman hasil transformasi akan mengalami segregasi transgen dalam pembentukan gamet. Hal ini akan menghasilkan tanaman yang bersifat heterozigot atau homozigot pada tanaman generasi selanjutnya (Weng *et al.* 2004). Tanaman hasil transformasi disebut tanaman T₀ dan bersifat heterozigot atau memiliki salinan transgen pada lokus genom tanaman. DNA akan terintegrasikan ke dalam satu kromosom namun tidak homolog pada lokus yang sama. Tanaman T₀ akan menghasilkan biji T₁ yang tumbuh menjadi tanaman T₁ yang dapat bersifat heterozigot, homozigot positif (transgenik) atau homozigot negatif (nontransgenik) dengan perbandingan 2:1:1 (rasio Mendel jika terdapat satu salinan transgen) (Stewart, 2008).

Tizaoui dan Kchouk (2012) melaporkan bahwa tanaman tembakau homozigot dapat diperoleh pada tanaman T₂ dan T₃. Carsono *et al.* (2010) juga melaporkan bahwa gen *Glu-1Dx5* pada padi transgenik dapat terdeteksi pada T₂ dan sudah tidak bersegregasi lagi sehingga diduga homozigot. Selain itu, Duan *et al.* (1994) yang telah mengintegrasikan gen *potato proteinase inhibitor II (pinII)* ke dalam beberapa varietas padi Japonica, menyatakan bahwa gen *pin II* dapat terekspresi sampai generasi ke empat.

2.5 Pewarisan Sifat Tanaman Transforman Berdasarkan Hukum Mendel

Sifat-sifat Mendel dikendalikan oleh suatu gen dan hasil ekspresi gen tersebut langsung mengarah ke karakteristik fenotip. Hal ini merupakan konsep penting dalam bioteknologi tanaman, karena sampai saat ini tanaman transgenik yang dihasilkan memiliki sifat yang dikendalikan oleh transgen tunggal. Sifat-sifat Mendel dapat memiliki variasi yang menghasilkan karakteristik protein yang berbeda, namun gen yang mengontrol sifat tersebut merupakan gen yang terletak pada satu lokasi yang sama dalam kromosom yaitu lokus (Stewart, 2008).

Setiap individu akan menghasilkan gamet-gamet yang kandungan gennya separuh dari kandungan gen pada individu. Hal ini karena pada saat pembentukan gamet, tiap pasang gen akan disegregasi ke dalam masing-masing gamet yang terbentuk (Hukum Mendel I). Pada saat terjadi persilangan, segregasi suatu pasangan gen tidak bergantung pada segregasi pasangan gen lainnya. Hal ini menyebabkan terjadi pemilihan kombinasi gen-gen secara bebas dalam pembentukan gamet (Hukum Mendel II) (Susanto, 2011).

Transgen diwariskan secara seksual sebagai karakter dominan dengan rasio Mendel 3:1. Pipatpanukul *et al.* (2004) melaporkan bahwa gen *hptII* telah diwariskan pada T₁ jenis padi Indica cv. RD6 dengan menghasilkan rasio segregasi 3:1. Hal ini menunjukkan bahwa gen *hptII* telah terintegrasi ke dalam satu lokus. Namun, beberapa tanaman menunjukkan rasio yang berbeda (1:1) dan diasumsikan bahwa yang terintegrasi adalah *multiple* T-DNA. Menurut Tizaoui dan Kchouk (2012) penyimpangan hukum Mendel tersebut dapat terjadi dengan frekuensi 10-50 % karena transmisi transgen yang tidak stabil atau ekspresi transgen yang rendah. Banyak faktor yang dapat mempengaruhi ekspresi dan pewarisan transgen tersebut, diantaranya yaitu transgen itu sendiri, genom tanaman (*host genom*), dan interaksi keduanya.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, serta di *Greenhouse Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST). Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni – Desember 2017.

3.2 Bahan dan Alat

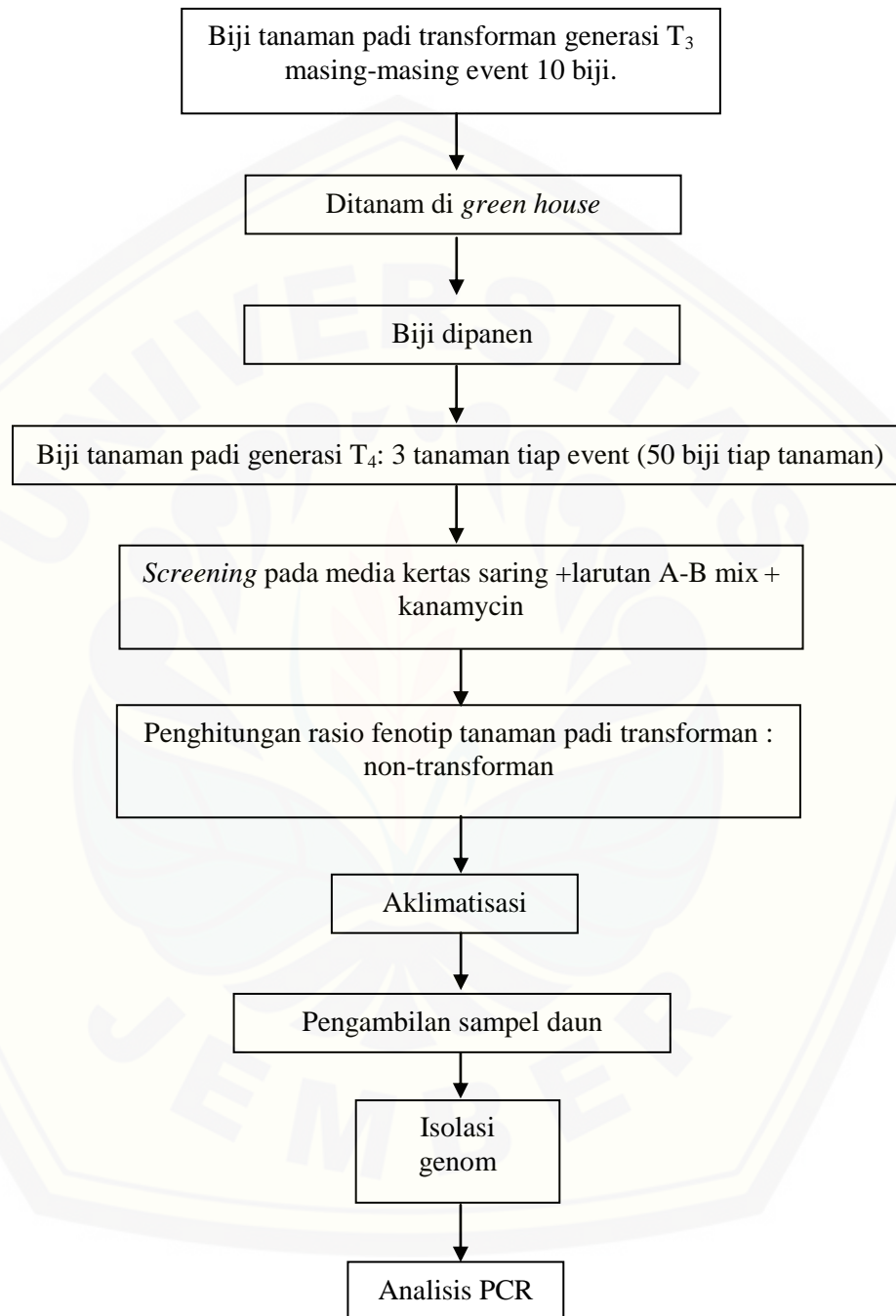
3.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji tanaman padi generasi T3 *Indica* cv. Inpari 14 SS hasil transformasi menggunakan *A. tumefaciens* strain GV 3101 dan mengandung gen *SoSPS1* yang dikonstruksi dalam plasmid pCL4, terdiri dari 7 *event* yaitu DT1A1, DT1A2, DT1A3, DT2A1, DT3A2, DT3A3, dan DT4A1 serta tanaman padi *wild type* sebagai kontrol. Media dasar yang digunakan untuk seleksi adalah kertas saring, larutan nutrisi Hoagland, dan antibiotik kanamycin. Bahan tanam untuk media aklimatisasi antara lain pasir dan tanah, pupuk urea, SP-36, KCL, dan ZA. Adapun bahan kimia yang digunakan untuk analisis antara lain SDS, PCI, buffer TAE, Agarose, EtBr, alkohol 70%, buffer TE, HCL, NaOH, dan akuades steril.

3.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah LAF (*Laminar Air Flow*), sentrifuge, *waterbath*, *microwave*, mesin PCR, perangkat elektroforesis, *gel documentation system* (GELDOC), *nanodrop*, kamera digital, botol kuljar, pinset, mortar, spektrofotometer, *autoclave*, *eppendorf*, tube PCR, tabung falcon, mikropipet, mikro tip, pot, *potray*, dan alat pendukung lain yang mendukung penelitian.

3.3 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Skrining Tanaman Padi Overekspresi gen *SPS*

a. Optimasi Konsentrasi Antibiotik Kanamycin

Optimasi dilakukan dengan meletakkan biji dalam botol yang berisi media seleksi dengan 5 konsentrasi kanamycin yang berbeda yaitu 0 mg/L (kontrol), 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, dan 100 mg/L. Konsentrasi terendah yang menyebabkan perbedaan yang nyata dibandingkan kontrol digunakan untuk skrining tanaman transforman.

b. Skrining Tanaman Transforman Generasi T₄

Tanaman padi generasi T₃ ditanam di *green house* CDAST, kemudian biji yang diperoleh yaitu biji T₄ ditanam di media seleksi. Media seleksi dibuat dengan meletakkan kertas saring dalam botol kuljar, kemudian ditambahkan dengan larutan nutrisi (A-B mix) yang mengandung 75 mg/L kanamycin. Seleksi dilakukan untuk mendapatkan tanaman padi transforman overekspresi gen *SoSPSI*. Biji tanaman padi yang akan ditanam disterilisasi terlebih dahulu. Sterilisasi biji dilakukan dengan merendam biji dalam larutan fungisida selama 30 menit, untuk mencegah kontaminasi jamur. Selanjutnya biji diletakkan pada media seleksi selama 14 hari. Selanjutnya, tanaman yang lolos tahap seleksi (tanaman transforman overekspresi gen *SoSPSI*) kemudian dihitung jumlahnya dan di aklimatisasi.

c. Penghitungan Rasio Fenotip Tanaman Transforman dan Non-transforman

Jumlah tanaman transforman maupun yang non-transforman dihitung. Tanaman non-transforman ditandai dengan terjadinya klorosis pada daun (albino) dan mati, sedangkan tanaman transforman ditandai dengan warna hijau pada tanaman tersebut.

d. Aklimatisasi

Tanaman yang lolos seleksi selanjutnya ditanam di *potray* dengan media tanah dan ditempatkan dalam *growth chamber* pada suhu 26° C – 32° C selama 7 hari, untuk mengadaptasikan tanaman sebelum dipindah ke *green house*. Tanaman selanjutnya ditanam pada pot yang diisi tanah dan diletakkan di *green house*. Tanaman tersebut dipupuk sebanyak tiga kali yaitu: (1) pada umur 7 hari setelah tanam (HST) dengan pupuk urea 0,78 g/pot, SP-36 0,625 g/pot, dan KCL 0,78 g/pot, (2) pada umur 25 HST dengan pupuk urea 0,625 g/pot, dan (3) pada umur 40 HST dengan pupuk ZA 0,625 g/pot. Pemeliharaan tanaman meliputi pengairan, dan pengendalian gulma, hama atau penyakit tanaman. Pemberian air dilakukan sampai menggenang maksimal 2 cm diatas permukaan tanah. Pengendalian gulma dilakukan dengan cara dicabut secara langsung sedangkan pengendalian hama dilakukan dengan penyemprotan insektisida (Wangiyana *et al.*, 2009).

e. Uji *Chi Square*

Chi square adalah uji nyata apakah data yang diperoleh benar menyimpang dari nisbah yang diharapkan. Berdasarkan hukum Mendel, jika terintegrasi satu salinan transgen maka nisbah yang diharapkan adalah 3:1. Jumlah tanaman yang lolos seleksi kemudian dihitung dan dilakukan uji *chi square*. Adapun perhitungan uji *chi square* adalah sebagai berikut :

$$x^2 = \sum (o - e)^2 / e \quad \text{atau} \quad x^2 = \sum d^2 / e$$

Keterangan :

o : jumlah tanaman yang diamati (observed)

e : jumlah tanaman yang diharapkan (expected)

d : selisih pengamatan dan harapan (deviasi)

Nilai x^2 selanjutnya dicari di daftar *chi square* untuk mengetahui penyimpangan tersebut nyata atau tidak (Susanto, 2011).

3.4.2 Konfirmasi Tanaman Padi Overekspresi Gen *SoSPSI*

a. Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom tanaman dilakukan berdasarkan metode dari Zheng *et al.* (1995) dengan menggerus 0,5 gram daun padi dengan nitrogen cair sampai halus kemudian ditambah dengan 1 ml buffer ekstraksi (100 mM Tris-Cl, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, dengan pH keseluruhan 8,0), 50 µl SDS 20% dan 1,25 µl β-mercaptoethanol kemudian divortex sampai homogen. Sampel selanjutnya diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Sampel yang telah diinkubasi kemudian ditambah 500 µl pottasium acetat(5 M), dilakukan *swirling*, dan diinkubasi dalam es selama 10 menit kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C. Supernatan selanjutnya dipindah ke dalam *ependorf* baru dan ditambah 625 µl isopropanol kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu -20°C, dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Setelah itu, pellet (DNA) yang diperoleh dicuci dengan 500 µl buffer TE.

Purifikasi DNA dilakukan dengan penambahan 15 µl RNA-se kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C, selanjutnya ditambahkan 500 µl PCI dan divortex agar homogen. Setelah itu, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh dipindah ke *ependorf* baru, dan ditambah *chloroform* (1:1) kemudian divortex, dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dipindah ke *ependorf* baru, kemudian ditambah isopropanol sebanyak 0,8 kali volume supernatan dan NaAc sebanyak 0,2 kali volume supernatan, serta dilakuka *swirling* agar homogen. Sampel selanjutnya diinkubasi selama 1 jam pada suhu -20°C, kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet yang diperoleh dicuci dengan 1 ml ethanol 70%, dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang kemudian pellet dikeringkan dengan *vacum dry* selama 5 menit. Setelah itu, DNA ditambah 50 µl buffer TE dan diukur kosentrasinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm serta dianalisis menggunakan PCR.

b. Analisis *Polimerase Chain Reaction* (PCR)

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan PCR master mix (PROMEGA) 5 µl ditambah ddH₂O 2 µl, *primer forward* dan *reverse* masing-masing 1 µl, dan DNA template 1 µl dengan volume total 10 µl dalam satu kali reaksi. Primer yang digunakan adalah *nptII* (*neomycin phosphotransferaseII*), dengan sekuen sebagai berikut : primer *nptII-F* (5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3'), primer *nptII-R* (5'-GTCGCTTGGTCGGTCATTTTCG-3') dengan ukuran pita DNA pada hasil elektroforesis yaitu 550 bp. Tahapan PCR meliputi predenaturasi 95°C selama 5 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 60°C selama 20 detik, *elongation* 72°C selama 1 menit dan *final extension* 72°C selama 5 menit dengan 35 siklus. Hasil PCR selanjutnya dielektroforesis menggunakan gel agarose 1 % yang mengandung 3 µl Ethidium Bromida dengan tegangan 100 volt selama 25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah 1 kb DNA *ladder* PROMEGA sebanyak 3 µl. Hasil elektroforesis kemudian dilihat di *gel documentation system* (Satria *et al.*, 2015).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan skrining tanaman transgenik pada generasi T₄, dan analisis chi square dengan derajat kebebasan 0,05 diperoleh 4 tanaman yang memiliki rasio segregasi 3:1. Hasil skrining juga menunjukkan tidak adanya tanaman homozigot sehingga pada generasi ini pewarisan gen *SoSPSI* masih belum stabil. Berdasarkan konfirmasi PCR, dari 14 tanaman yang dianalisis diperoleh 12 tanaman positif transforman sedangkan 2 tanaman lainnya tidak terkonfirmasi mengandung gen *SoSPSI*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan skrining lebih lanjut untuk memperoleh tanaman homozigot transforman dan analisis PCR pada beberapa bagian tanaman untuk membuktikan dugaan adanya tanaman *chimera*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bibi, N., K. Fan, S. Yuan, M. Ni, I. M. Ahmed, W. Malik, dan X. Wang. 2013. An Efficient and Highly Reproducible Approach for the Selection of Upland Transgenic Cotton Produced by Pollen Tube Pathway Method. *Australian Journal of Crop Science*. 7(11):1714-1722.
- Campbell, N. A., J.B. Reece, dan L.G. Michell. 2008. *Biology 8rd Edition*. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Carsono, N., S. Nurlianti, I. N. Indrayani, A. Ismail, T. J. Santoso, dan M. H. Karmana. 2010. Transgen (*Glu-1Dx5*) pada Populasi Padi (*Oryza sativa* L.) Putative Transgenik Kultivar Fatmawati. *Jurnal Agrikultura*. 21(1): 61-67.
- Chavez-Barcenas, A. T., J.J.Valdez-Alarcon, M. Martinez-Trujillo, L. Chen, B. Xoconostle-Ca'zares, W.J. Lucas, dan L. Herrera-Estrella. 2000. Tissue-Specific and Developmental Pattern of Expression of the Rice *sps1* Gene. *Plant Physiology*. 124: 641–653.
- Chen, G. Q. 2011. Effective Reduction of Chimeric Tissue in Transgenics for the Stable Genetic Transformation of *Lesquerella fendleri*. *Hortscience* 46(1):86–90.
- Chen, L., P. Marmey, N. J. Taylor, J. Brizard, C. Espinoza, P. D'Cruz, H. Huetl, S. Zhang, A. Kochko, R. N. Beachy, dan C. M. Fauquet. 1998. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nature Biotechnology*.16: 1060-1064.
- Chen, S., M. Hajirezaei, M. Peisker, H. Tschiersch, U. Sonnewald, dan F. Bornke. 2005. Decreased Sucrose-6-Phosphate Phosphatase Level in Transgenic Tobacco Inhibits Photosynthesis, Alters Carbohydrate Partitioning, and Reduces Growth. *Planta*. 221 : 479-492.
- Crowder, L. V. 1997. *Plant Genetics*. Terjemahan oleh L. Kusdiarti. 1997. *Genetika Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Dai, S., P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen, R. N. Beachy, Dan C. Fauquet. 2001. Comparative Analysis Of Transgenic Rice Plants Obtained By *Agrobacterium*-Mediated Transformation And Particle Bombardment. *Molecular Breeding* 7: 25–33.
- Dekeyser, R., B. Claes, M. Marichal, M. V. Montagu, dan Allan Caplan. 1989. Evaluation of Selectable Markers for Rice Transformation. *Plant Physiol*. 90:217-223.

- Duan, H., X. Ding, J. Song, Z. Duan, Y. Zhou dan C. Zhou. 2009. Effects of Kanamycin on Growth and Development of *Arabidopsis Thaliana* Seedling, Cotyledon and Leaf. *Pak. J. Bot.* 41(4): 1611-1618.
- Duan, X., X. Li, Q. Xue, M. Abo-El-Saad, D. Xu, dan R. Wu. 1994. Transgenic Rice Plant Harbouring an Introduced Potato Proteinase Inhibitor II Gene are Insect Resistant. *Nature Biotechnology.* 14: 494-498.
- FAO. <http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/gbase/data/pf000274.htm>. [Diakses pada 27 Februari 2017].
- Flavell, R.B. 1994. Inactivation of Gene Expression in Plants as Aconsequence of Specific Sequence Duplication. *Proc Natl AcadSci.* 91:3490–3496.
- Hopkins, W.G. 2007. *Plant biotechnology*. New York: Chelsea House.
- Huang, D.L., S.X. Li, Q. Liao, C.X. Qin, L. Lin, F.X. Fang, dan Y.R. Li. 2012. Advances on sucrose phosphate synthase in plants. *China Biotechnology* 32(6): 109–119.
- Huber, S.C. dan Huber, J.L. (1996) Role and Regulation of Sucrose-Phosphate Synthase in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:431-444.
- Ishimaru, K., N. Hirotsu, T. Kashiwagi, Y. Madoka, K. Nagasuga, K. Ono, dan R. Ohsugi. 2008. Overexpression of a Maize *SPS* Gene Improves Yield Characters of Potato under Field Conditions. *Plant Production Scienc.* 11(1) : 104 - 107.
- Kumar, S., dan M. Fladung. 2004. *Molecular Genetics and Breeding of Forest Trees*. New York: Food Products Press.
- Lakitan, B. 2012. *Dasar-Dasar Fisiologi Tumbuhan*. Jakarta : Rajawali Pers.
- Langenkamper, G., R.W.M. Fung, R.D. Newcomb, R.G. Atkinson, R.C. Gardner, dan E.A. MacRae. 2002. Sucrose Phosphate Genes in Plant Belong to Three Different Families. *J. Mol. Evol.* 54 : 322-332.
- Laporte, M. M., J. A. Galagan, J. A. Shapiro, M. R. Boersig, C. K. Shewmaker, dan T. D. Sharkey. 1997. Sucrose-Phosphate Synthase Activity and Yield Analysis of Tomato Plants Transformed with Maize Sucrose-Phosphate Synthase. *Planta.* 203: 253-259.
- Manuhara, Y.S.W.2006. Pengembangan Transformasi Genetik Tanaman untuk Meningkatkan Kesejahteraan Hidup Manusia. *Makalah Seminar Nasional Biodiversitas*. Surabaya: Seminar Nasional Biodiversitas Biologi-FMIPA UNAIR. 22 Juli.

- Manuhara, Y. S.W., I. Sumardi, S. Sudjadi, Taryono, dan Widodo. 2003. Skrining Hasil Transformasi Gen β -1,3-endoglukanase ke dalam Tanaman Tembakau Besuki H382 dengan Perantara *Agrobacterium tumefaciens*. *Prosiding Seminar Nasional Biologi I*: 30 Agustus 2003.
- Miswar. B. Sugiharto, J. Soedarsono, dan S.Moeljopawiro. 2005. Transformasi Gen Sucrose Phosphate Synthase (*SoSPS1*) Tebu (*Saccharum officinarum* L.) untuk Meningkatkan Sintesis Sukrosa pada Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). *Biologi*. 4(5):337-347.
- Ningtyas, R.M., B. Sugiharto, E. Utarti. 2015. Transformasi Gen SoSPS1 pada Tanaman Tebu Overekspresi Gen SoSUT1 Event 2 Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *Berkala Saintek*. 3(1): 20-23.
- Nishimura, A., Aichi, I., dan Matsuoka, M. 2006. A Protocol for *Agrobacterium* – mediated Transformation in Rice. *Nature Protocols*. Vol. 1.
- Norelli, J. L. and Herb S. Aldwinckle. 1993. The Role of Aminoglycoside Antibiotics in the Regeneration and Selection of Neomycin Phosphotransferase-transgenic Apple Tissue. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118(2):311-316.
- OECD. 1999. *Consensus document on the biology of Oryza sativa (rice)*. Paris: OECD Environmental health and Safety Publications.
- Pessarakli, M. 2005. *Handbook of Photosynthesis Second Edition*. Boca Raton: CRC Press.
- Pipatpanukul, T., S. Bunnag, P. Theerakulpisut, dan M. Kosittrakul. 2004. Transformation of Indica Rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD6 Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Songklanakar J. Sci. Technol.* 26 (1) : 1-13.
- Satria, D.B.R., B. Sugiharto, dan D.P. Restanto. 2015. Transformasi Gen *SoSPS1* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Apikal Padi Indica cv. Inpari 14 SS. Digital Repository Universitas Jember. <http://repository.unej.ac.id/handle/123456789/72707>[Diakses pada 27 Februari 2017].
- Smith, C.W., dan R. H. Dilday. 2003. *Rice : Origin, History, Technology, and Production*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Stewart, C. N. 2008. *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications*. New Jersey : John Wiley & Sons, Inc.
- Susanto, A. H. 2011. *Genetika*. Yogyakarta : Graha Ilmu.
- Taiz, L., dan E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology 3rd Edition*. Sinauer Associates.

- Tizaoui, K., dan M. E. Kchouk. 2012. Genetic Approaches for Studying Transgene Inheritance and Genetic Recombination in Three Successive Generations of Transformed Tobacco. *Genetics and Molecular Biology*. 35(3): 640-649.
- Vaucheret H, Bclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J.B, Mourrain P, Palauqui J.C, dan Vernhetters S. 1998. Transgene Induced Gene Silencing in Plants. *Plant J*. 16:651–659.
- Vaughan, D. A., H. Morishimay dan K. Kadowaki. 2003. Diversity in the *Oryza* genus. *Current Opinion in Plant Biology*. 6:139-146.
- Wang, L., N. Cui, K. Zhang, H. Fan, dan T. Li. 2013. Research Advance of Sucrose Phosphate Synthase (SPS) in Higher Plant. *International Journal of Agriculture & Biology*. 15 (6):1221-1226.
- Wangiyana, W., Zaprill L. dan Sanisah. 2009. Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Padi Var. Ciherang dengan Teknik Budidaya “Sri (*System Of Rice Intensification*)” pada Berbagai Umur dan Jumlah Bibit Per Lubang Tanam. *Crop Agro*. 2(1):70-78.
- Watson, J. D., J. Tooze, dan D. T. Kurtz. 1988. *Recombinant DNA*. Terjemahan oleh W. Gunarso. *DNA Rekombinan*. Jakarta : Erlangga.
- Weng, H., A. Pan, L. Yang, C. Zhang, Z. Liu dan D. Zhang. 2004. Estimating Number of Transgene Copies in Transgenic Rapeseed by Real-Time PCR Assay With *HMG I/Y* as an Endogenous Reference Gene. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22: 289–300.
- Yin, Z., M. Szwacka, R. Malinowski, Dan S. Malepszy. 2004. Differences In The Inheritance Stability Of Kanamycin Resistance Between Transgenic Cucumbers (*Cucumis Sativus* L.) Containing Two Constructs. *J. Appl. Genet*. 45(3), 2004, Pp. 307–313
- Zheng, K., N. Huang, P. Bennet., dan G. S. Khush. 1995. PCR-Based Marker-assisted selection in rice breeding. Manila: IRRI. *IRRI Discussion Paper Series No. 12*.

LAMPIRAN**Lampiran 4.1** Komposisi Media A-B Mix

Komposisi Larutan A	Jumlah (g/1000L)
• Kalsium nitrat	1100
• Kalium nitrat	575
• Fe EDTA	38
<hr/>	
Komposisi Larutan B	
• Kalium dihidro fosfat	560
• Ammonium sulfat	30
• Kalium sulfat	75
• Magnesium sulfat	1050
• Cupri sulfat	0,4
• Zinc sulfat	1,5
• Asam borat	4,0
• Mangan Sulfat	8
• Amonium hepta molibdat	0,1

Lampiran 4.2 Perhitungan *Chi Square Test* pada Hasil Skrining

Event	Tanaman	Karakter	Jumlah Tanaman		O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E	X ² = Σ(O-E) ² /E
			O (Observed)	E(Expected)				
1	1	transforman	6	37,5	-31,5	992,25	26,46	82,64
		non-transforman	39	12,5	26,5	702,25	56,18	
	2	transforman	17	37,5	-20,5	420,25	11,21	41,63
		non-transforman	32	12,5	19,5	380,25	30,42	
	3	transforman	19	37,5	-18,5	342,25	9,13	33,63
		non-transforman	30	12,5	17,5	306,25	24,5	
2	1	transforman	19	37,5	-18,5	342,25	9,13	14,91
		non-transforman	21	12,5	8,5	72,25	5,78	
	2	transforman	23	37,5	-14,5	210,25	5,61	10,11
		non-transforman	20	12,5	7,5	56,25	4,5	
	3	transforman	28	37,5	-9,5	90,25	2,41	9,63
		non-transforman	22	12,5	9,5	90,25	7,22	
3	1	transforman	28	37,5	-9,5	90,25	2,41	3,39
		non-transforman	16	12,5	3,5	12,25	0,98	
	2	transforman	35	37,5	-2,5	6,25	0,17	0,35
		non-transforman	11	12,5	-1,5	2,25	0,18	
	3	transforman	45	37,5	7,5	56,25	1,5	6
		non-transforman	5	12,5	-7,5	56,25	4,5	
4	1	transforman	37	37,5	-0,5	0,25	0,01	0,03
		non-transforman	13	12,5	0,5	0,25	0,02	

Event	Tanaman	Karakter	Jumlah Tanaman		O-E	(O-E) ²	(O-E) ² /E	X ² = Σ(O-E) ² /E
			O (Observed)	E(Expected)				
	2	transforman	16	37,5	-21,5	462,25	12,33	31,55
		non-transforman	28	12,5	15,5	240,25	19,22	
4	3	transforman	15	37,5	-22,5	506,25	13,5	54
		non-transforman	35	12,5	22,5	506,25	40,5	
	1	transforman	20	37,5	-17,5	306,25	8,17	29,95
		non-transforman	29	12,5	16,5	272,25	21,78	
5	2	transforman	12	37,5	-25,5	650,25	17,34	54,32
		non-transforman	34	12,5	21,5	462,25	36,98	
	3	transforman	10	37,5	-27,5	756,25	20,17	80,67
		non-transforman	40	12,5	27,5	756,25	60,5	
	1	transforman	0	37,5	-37,5	1406,25	37,5	150
		non-transforman	50	12,5	37,5	1406,25	112,5	
6	2	transforman	18	37,5	-19,5	380,25	10,14	34,64
		non-transforman	30	12,5	17,5	306,25	24,5	
	3	transforman	19	37,5	-18,5	342,25	9,13	36,51
		non-transforman	31	12,5	18,5	342,25	27,38	
	1	transforman	19	37,5	-18,5	342,25	9,13	30,91
		non-transforman	29	12,5	16,5	272,25	21,78	
7	2	transforman	37	37,5	-0,5	0,25	0,01	0,03
		non-transforman	12	12,5	-0,5	0,25	0,02	
	3	transforman	26	37,5	-11,5	132,25	3,53	12,35
		non-transforman	23	12,5	10,5	110,25	8,82	

Lampiran 4.3 Tabel *Chi-Square Test*Tabel Distribusi χ^2

α		0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
db	1	2.70554	3.84146	5.02390	6.63489	7.87940
	2	4.60518	5.99148	7.37778	9.21035	10.59653
	3	6.25139	7.81472	9.34840	11.34488	12.83807
	4	7.77943	9.48773	11.14326	13.27670	14.86017
	5	9.23635	11.07048	12.83249	15.08632	16.74965
	6	10.64464	12.59158	14.44935	16.81187	18.54751
	7	12.01703	14.06713	16.01277	18.47532	20.27774
	8	13.36156	15.50731	17.53454	20.09016	21.95486
	9	14.68366	16.91896	19.02278	21.66605	23.58927
	10	15.98717	18.30703	20.48320	23.20929	25.18805
	11	17.27501	19.67515	21.92002	24.72502	26.75686
	12	18.54934	21.02606	23.33666	26.21696	28.29966
	13	19.81193	22.36203	24.73558	27.68818	29.81932
	14	21.06414	23.68478	26.11893	29.14116	31.31943
	15	22.30712	24.99580	27.48836	30.57795	32.80149
	16	23.54182	26.29622	28.84532	31.99986	34.26705
	17	24.76903	27.58710	30.19098	33.40872	35.71838
	18	25.98942	28.86932	31.52641	34.80524	37.15639
	19	27.20356	30.14351	32.85234	36.19077	38.58212
	20	28.41197	31.41042	34.16958	37.56627	39.99686