



**ANALISIS PERTUMBUHAN, PRODUKSI DAN KANDUNGAN SUKROSA
PADA TANAMAN TOMAT PRODUK REKAYASA GENETIKA
OVEREKSPRESI GEN *SoSPSI* DAN *SoSUTI* GENERASI KEDUA**

SKRIPSI

Oleh

**Putri Eka Devi Anugrah Raharjo
101810401031**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**ANALISIS PERTUMBUHAN, PRODUKSI DAN KANDUNGAN SUKROSA
PADA TANAMAN TOMAT PRODUK REKAYASA GENETIKA
OVEREKSPRESI GEN *SoSPSI* DAN *SoSUTI* GENERASI KEDUA**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh
Putri Eka Devi Anugrah Raharjo
101810401031

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbal ‘alamin, segala puji bagi Allah SWT, Rabb semesta alam. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada bimbingan kita Rasulullah Muhammad SAW. Dengan kerendahan dan ketulusan hati, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Evi Kasidaryati dan Ayahanda Surono Raharjo tercinta, yang telah memberikan kasih sayang, pengorbanan, dan untaian doa yang tulus tiada henti;
2. Adik-adikku Riang Taufik Dwi Surya, Ramadhani Triadi, dan Muhammad Maulana Ifan Saputra atas motivasi dan doa yang terus menerus dipanjatkan;
3. Guru-guruku sejak TK hingga perguruan tinggi yang terhormat, yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh kesabaran dan keikhlasan;
4. Almamater di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

MOTTO

“ Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagimu dan boleh jadi (pula) kamu menyukai sesuatu, padahal ia amat buruk bagimu Allah mengetahui, sedang kamu tidak mengetahui.

(Terjemahan Surat *Al-Baqarah* ayat 216) ⁱ

“ Kita tidak akan pernah mendahului nasib ”

(Andrea Hirata) ⁱⁱ

“ Bermimpilah karena Tuhan akan memeluk mimpi-mimpi itu “

(Andrea Hirata) ⁱⁱ

-
- ⁱ⁾ Departemen Agama Republik Indonesia. 2009. *Al-Qur'an dan Terjemahan*. Jakarta: CV. Pustaka Al-Kautsar
- ⁱⁱ⁾ Hirata, A. 2008. *Sang Pemimpi*. Yogyakarta: Bentang



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Putri Eka Devi Anugrah Raharjo

NIM : 101810401031

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “**Analisis Pertumbuhan, Produksi dan Kandungan Sukrosa Pada Tanaman Tomat Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* Generasi Kedua**” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang saya sudah sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun dan bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh MP3EI tahun 2014 atas nama Prof. Dr. Bambang Sugiharto M.Agr.Sc. 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, September 2015
Yang menyatakan,

Putri Eka Devi Anugrah Raharjo
NIM 101810401031



SKRIPSI

**ANALISIS PERTUMBUHAN, PRODUKSI DAN KANDUNGAN SUKROSA
PADA TANAMAN TOMAT PRODUK REKAYASA GENETIKA
OVEREKSPRESI GEN *SoSPS1* DAN *SoSUT1* GENERASI KEDUA**

Oleh

**Putri Eka Devi Anugrah Raharjo
101810401031**

Pembimbing

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

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



PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Analisis Pertumbuhan, Produksi dan Kandungan Sukrosa Pada Tanaman Tomat Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* Generasi Kedua” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, Tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Tim Penguji,

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc
NIP. 19551022198212001

Dra. Dwi Setyati, M.Si
NIP. 196404171991032001

Anggota,

Penguji I,

Penguji II,

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini
NIP. 197509132000032001

Kahar Muzakhar, S.Si, Ph. D
NIP. 196805031994011001

Mengesahkan
Dekan,

Prof. Drs. Kusno, DEA., Ph. D
NIP 196101081986021001

RINGKASAN

Analisis Pertumbuhan, Produksi dan Kandungan Sukrosa pada Tanaman Tomat Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* Generasi Kedua : Putri Eka Devi Anugrah Raharjo, 101810401031; 2015, 26 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Tanaman tomat PRG adalah tomat hasil rekayasa genetika, yang memiliki habitus mirip tanaman asalnya, kecuali sifat-sifat tertentu, yakni sifat baru yang disisipkan pada genom tomat, yang menyebabkannya lebih unggul dibanding tanaman asalnya. Teknologi rekayasa genetika yang berhasil diterapkan pada tanaman tomat yaitu transformasi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* dari tebu ke dalam genom tanaman tomat untuk peningkatan sukrosa. Overekspresi gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* pada tanaman tomat PRG generasi pertama dapat meningkatkan produksi tomat, kadar sukrosa pada buah, dan prosentase pembentukan bunga menjadi buah. Tanaman tomat overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* generasi kedua belum diuji kestabilan genetiknya, oleh karena itu, perlu dikonfirmasi keberadaan gen target pada tomat PRG generasi kedua dan dilakukan penelitian terkait analisis pertumbuhan, produksi dan kandungan sukrosanya.

Tanaman tomat PRG yang digunakan adalah overekspresi *single* gen *SoSPSI event* SPS 3.2, gen *SoSUTI event* SUT 4, SUT 5, SUT 7 dan SUT 8, *double* gen *SoSPS-SoSUTI event* DO 2.1; DO 2.5; DO 5.1; DI 2.1; DI 2.5; dan DI 5.1 serta tanaman kontrol (WT). Benih tanaman tomat hasil generasi pertama dikecambahkan terlebih dahulu sebelum dipindahkan ke dalam pot yang berisi media tanah, pasir dan kompos (perbandingan 2:1:1). Tanaman tomat PRG generasi kedua selanjutnya dilakukan isolasi DNA untuk konfirmasi keberadaan gen target pada tomat PRG generasi kedua menggunakan metode PCR. Analisis pertumbuhan meliputi tinggi tanaman, jumlah buah dan berat buah. Pengukuran tinggi tanaman dengan cara mengukur tinggi tanaman pada 45 HST, sedangkan jumlah buah dan berat buah diamati setelah buah dipanen. Pemanenan buah dilakukan pada tanaman yang berumur \pm 59 HST atau pemasakan buah sudah mencapai 60% kemudian dilakukan analisis kandungan sukrosa dengan metode Seliwanoff.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tidak semua gen target *single* dan *double* gen *SoSPSI-SoSUTI* diekspresikan pada tanaman tomat PRG generasi kedua. Hasil PCR menunjukkan bahwa gen target yang diturunkan pada

tomat PRG generasi kedua hanya yang overekspresi *single* gen *SoSUT1* yaitu *event* SUT 4.3; SUT 5.1; SUT 5.3; SUT 7.1; SUT 7.2 dan SUT 8.1. Tanaman tomat PRG generasi kedua memiliki habitus tanaman lebih bervariasi dibandingkan WT. Tanaman tomat PRG generasi kedua yang memiliki pertumbuhan, produksi dan kandungan sukrosa lebih baik dari WT adalah tanaman tomat PRG *overekspresi* gen *SoSUT1*.



PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Analisis Pertumbuhan, Produksi dan Kandungan Sukrosa Pada Tanaman Tomat Produk Rekayasa Genetika Overekspresi Gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* Generasi Kedua”. 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 menyampaikan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc, selaku pembimbing utama dan Dra. Dwi Setyati, M.Si selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, saran dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini selaku dosen penguji I dan Kahar Muzakhar, S.Si, Ph. D selaku dosen penguji II atas saran, kritikan dan masukan dalam penyusunan skripsi ini;
3. Eva Tyas Utami, S.Si, M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah sabar membimbing selama menjadi mahasiswa;
4. Ayahanda Suroho Raharjo dan Ibunda Evi Kasidaryati tercinta, adik-adikku Riang Taufi D.S, Ramadhani Triadi, M. Maulana Ifan S, dan Wahyu Fajar K dan keluarga besarku yang telah memberi dukungan penuh, doa yang berlimpah, pengorbanan, kebahagiaan dan keceriaan yang tidak ada habisnya. Dwi Gesang Ageng Pangapuri, ST yang selalu memberi nasehat, dukungan dan doa yang tiada henti;
5. rekan-rekan kerja di CDAST Narita A.M, S.Si, Nurul Mufitdah, S.Si, Wardatus S, S.Si, Fragaria V.P, S.Si, Qoyimatul N, S.Si, Ahmil S, S.Si, Derta B.R.S, S.Si, Kunti A, S.Si, Dwi Ratna P, S.Si, Almansyah, SP, Firdha N.A, SP, Laili I.W, SP, Rachmita, S.Si, Novita B, S.Si, Wimbuh T.W, S.Si, adik-

adik lab (Intan, Retna, Ryan, Wulan, Iffah dan Retno) atas bantuan, dukungan, dan semangat dalam menyelesaikan penelitian; keluarga besar biologi 2010 “BOLU” yang memberikan warna hidup selama kuliah;

6. rekan-rekan paduan suara UNEJ, Jember Madusvara Singers (JMS), Nyco Hendrawan S.Si, Hengki Tumpak P, S.KM, Adhya Pranoto, S.Farm, Yoki Prasetyo, SP, M. Gufron, SP, Ifa Maghfira, S.Kg, Hamidah Azzahra, S.Kg, Rima F, S.Sos, Fitra A, S.Sos, Fitri S.Si, Syahar Banu H, S.Pd yang selalu memberikan keceriaan, kebahagiaan, dukungan dan semangat;
7. semua pihak yang tidak dapat disebut satu per satu yang telah membantu dan memberi dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan karya ilmiah tertulis ini masih banyak kekurangan, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi penyempurnaan karya ilmiah tertulis ini. Semoga karya ilmiah tertulis ini bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi pengembangan ilmu biologi.

Jember, September 2015

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 SINGKATAN.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tomat PRG	4
2.2 <i>Sucrose Phosphate Synthase (SPS)</i>	5
2.3 <i>Sucrose Transporter (SUT)</i>	6
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....	8
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	8
3.2 Alat dan Bahan	8
3.3 Metode Penelitian	8

3.3.1 Perkecambahan dan Pertumbuhan Tomat PRG	8
3.3.2 Isolasi DNA Genom	9
3.3.3 Analisis PCR untuk DNA Genom	10
3.3.4 Analisis Pertumbuhan dan Produksi	11
3.3.5 Analisis Kandungan Sukrosa Buah	11
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	13
4.1 Konfirmasi Keberadaan Gen Target	13
4.2 Pertumbuhan dan Produksi Tanaman Tomat PRG	15
4.2.1 Tinggi Tanaman	15
4.2.2 Produksi Tanaman Tomat PRG	16
4.3 Kandungan Sukrosa Buah.....	19
BAB 5. PENUTUP.....	21
5.1 Kesimpulan.....	21
5.2 Saran	21
DAFTAR PUSTAKA	23


DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Hasil analisis PCR pada 15 tanaman tomat PRG <i>single</i> gen <i>SoSUT1</i> dan <i>SOSPS1</i> generasi kedua.....	14
Tabel 4.2 Hasil analisis PCR pada 18 tanaman tomat PRG <i>double</i> gen <i>SOSPS1</i> dan <i>SoSUT1</i> generasi kedua	14

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 4.1. Hasil analisis PCR pada 12 tanaman tomat PRG <i>single</i> gen <i>SoSUT1</i> generasi kedua.....	13
Gambar 4.2. Tinggi tanaman tomat PRG dan WT.....	15
Gambar 4.3 Jumlah buah tanaman tomat PRG dan WT	17
Gambar 4.4 A: Daun tomat PRG terserang penyakit, B: Daun tomat PRG sehat	18
Gambar 4.5 Berat buah total per tanaman tomat PRG dan WT.....	19
Gambar 4.6 Kandungan Sukrosa Buah Tanaman Tomat PRG dan WT	20

DAFTAR SINGKATAN



bp	: <i>basepair</i>
ddH ₂ O	: <i>Double Distilled Hydrogen Oxide (water)</i>
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i>
EtBr	: <i>Ethidium Bromide</i>
F	: <i>Forward</i>
<i>hptII</i>	: <i>Hygromycin Phosphotransferase II</i>
<i>nptII</i>	: <i>Neomycin Phosphotransferase II</i>
PCI	: <i>Phenol Chloroform Isoamylalcohol</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PRG	: <i>Produk Rekayasa Genetika</i>
R	: <i>Reverse</i>
rpm	: <i>Rotation per Minute</i>
SDS	: <i>Sodium Dedocyl Sulfate</i>
<i>SoSPS1</i>	: <i>Saccharum officinarum Sucrose Phospat Synthase I</i>
<i>SoSUT1</i>	: <i>Saccharum officinarum Sucrose Transporter I</i>
SPS	: <i>Sucrose Phospat Synthase</i>
SUT	: <i>Sucrose Transporter</i>
TE	: <i>Tris-EDTA</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) merupakan tanaman semusim yang sering dikonsumsi sebagai sayur maupun buah karena memiliki kandungan penting yang dapat memenuhi gizi masyarakat sehari-hari. Kandungan nutrisi pada tomat antara lain adalah vitamin C, vitamin A (karotien), licopen dan mineral (Tugiyono, 1991). Selain digunakan sebagai tanaman pangan, tomat juga digunakan sebagai tanaman model dalam bioteknologi (Wing *et al.*, 1994) karena dapat digunakan sebagai *molecular genetic maps* (Tanksley *et al.*, 1992).

Tanaman tomat PRG adalah tomat hasil rekayasa genetika, yang memiliki habitus mirip tanaman asalnya, kecuali sifat-sifat tertentu, yakni sifat baru yang disisipkan pada genom tomat, yang menyebabkannya lebih unggul dibanding tanaman asalnya. Tanaman PRG yang disetujui untuk tanaman pangan adalah tanaman yang direkayasa untuk memiliki sifat seperti; ketahanan terhadap hama, penyakit, herbisida, peningkatan kandungan nutrisi dan daya simpan (Manuhara, 2006).

Teknologi rekayasa genetika yang berhasil diterapkan pada tanaman tomat yaitu transformasi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* dari tebu ke dalam genom tanaman tomat untuk peningkatan sukrosa. Overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* pada tanaman tomat PRG generasi pertama dapat meningkatkan produksi tomat (Dewanti, 2011). Tanaman tomat PRG overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* juga menunjukkan peningkatan kadar sukrosa pada buah (Cristanto, 2011), dan peningkatan pembentukan bunga menjadi buah yang menyebabkan produksi tomat juga meningkat (Prasetyo, 2013). Sukrosa merupakan hasil fotosintesis yang berfungsi untuk menunjang pertumbuhan dan perkembangan tanaman, cadangan energi dan menentukan hasil panen (Christina dan Christopher, 2010).

Tanaman tomat PRG yang digunakan untuk penelitian ini didapatkan dari penelitian sebelumnya yang merupakan tanaman tomat generasi kedua, antara lain adalah overekspresi gen *SoSUT1 event* SUT 4, 5, 7, dan 8, overekspresi gen *SoSPS1 event* SPS 3.2 (Anur, 2014), serta overekspresi *double* gen *SoSPS1-SoSUT1 event* DO 2.1; DO 2.5; DO 5.1 (Anur, 2014); DI 2.1; DI 2.5 dan DI 5.1. Tanaman tomat overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi kedua belum diuji kestabilan genetiknya, oleh karena itu, perlu dikonfirmasi keberadaan gen target pada tomat PRG generasi kedua dan dilakukan penelitian terkait analisis pertumbuhan, produksi dan kandungan sukrosanya.

1.2 Rumusan Masalah

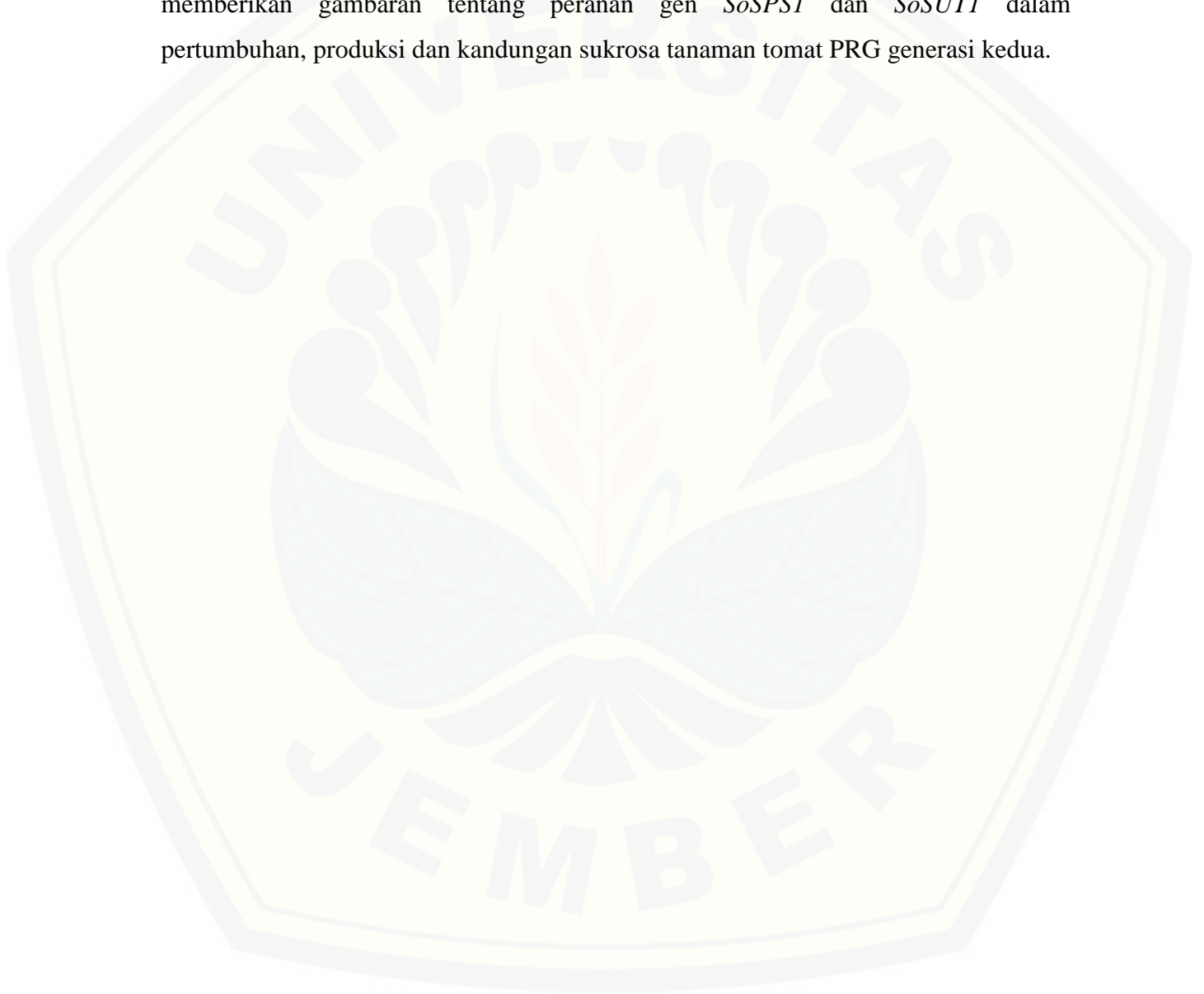
Pada penelitian sebelumnya telah didapatkan tanaman tomat PRG generasi kedua overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*, akan tetapi masih belum diuji kestabilan gen targetnya. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan konfirmasi keberadaan gen target, pengamatan pertumbuhan dan produksi serta analisis sukrosa buah pada tanaman tomat PRG overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi kedua.

1.3 Tujuan

Mengetahui kestabilan gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*, pertumbuhan, produksi dan kandungan sukrosa buah pada tanaman tomat PRG overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi kedua.

1.4 Manfaat

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi untuk penelitian berikutnya tentang kestabilan *single* dan *double* gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* pada tanaman tomat PRG generasi kedua *event* SUT 4, SUT 5, SUT 7, dan SUT 8, SPS 3.2 dan *event* DO 2.1; DO 2.5; DO 5.1; DI 2.1; DI 2.5 dan DI 5.1 serta memberikan gambaran tentang peranan gen *SoSPSI* dan *SoSUTI* dalam pertumbuhan, produksi dan kandungan sukrosa tanaman tomat PRG generasi kedua.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tomat PRG

Tanaman tomat PRG (Produk Rekayasa Genetika) merupakan suatu hasil dari manipulasi gen dengan cara membuat DNA rekombinan melalui penyisipan gen, sehingga didapatkan tanaman yang memiliki sifat unggul dan menghilangkan sifat bawaan yang tidak diinginkan (Manuhara, 2006). Pengembangan produk rekayasa genetika telah banyak dilakukan, salah satu produk rekayasa genetika adalah tomat yang memiliki sifat tanpa biji atau tomat partenokarpi (Yelli, 2009), tomat PRG yang memiliki sifat tahan cekaman kekeringan (Roy *et al.*, 2006) dan tanaman tomat PRG bersukrosa lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman tomat kontrol (Dewanti, 2011).

Metode yang digunakan untuk mentransfer gen pada suatu tanaman yang pertama yaitu dengan menggunakan *partical bombardment* dan *electroporation* ini merupakan metode langsung (Sugiri dan Makagiansar, 1996). Metode selanjutnya yaitu menggunakan bantuan *Agrobacterium* sebagai vektor. Pada umumnya tanaman dikotil lebih sering menggunakan metode ini. Gen yang ditransfer oleh *Agrobacterium* menghasilkan tanaman transgenik yang stabil, metode ini merupakan metode tidak langsung, selain menggunakan bakteri juga dapat menggunakan virus sebagai vektor (Hiei *et al.*, 1997).

Perakitan tanaman PRG memiliki suatu kendala bahwa gen tidak dapat terintegasi secara stabil pada tanaman model yang diinsersi dengan gen target, sehingga menyebabkan gen target tersebut tidak diturunkan pada generasi berikutnya (Christou *et al.*, 1992). Suatu cara untuk mengidentifikasi tanaman transgenik yaitu *selectable marker* telah diinsersikan ke dalam T-DNA, sehingga tanaman transgenik dapat diseleksi berdasarkan ketahanannya terhadap antibiotik dan herbisida (Primrose *et al.*, 2003). *Selectable marker* yang umum digunakan pada tanaman adalah *hygromycin phosphotransferase (hpt)* untuk gen penanda resisten terhadap higromisin, *neomycin phosphotransferase (npt)* untuk gen penanda resisten terhadap

gen kanamisin dan *phosphinothricin acetyltransferase (pat/bar)* (Opabode, 2006). Tanaman PRG selain dapat dianalisis dengan melalui media antibiotik maupun herbisida dapat juga dibuktikan dengan cara menganalisis DNA tanaman menggunakan PCR.

2.2 *Sucrose Phosphate Synthase (SPS)*

Metabolisme sukrosa yang terjadi di dalam *source tissue* dilakukan oleh beberapa enzim yang saling mempengaruhi dalam proses metabolisme sukrosa. Enzim tersebut antara lain adalah *sucrose synthase (SS)*, *acid invertase*, dan *sucrose phosphate synthase (SPS)* (Komor, 2000), serta keberadaannya telah ditemukan pada *source tissue* (Batta dan Singh, 1986). Adapun peranan dari masing-masing enzim tersebut adalah *sucrose synthase (SS)* merupakan enzim yang berperan dalam mendegradasi sukrosa di sitosol, *acid invertase* berperan mengubah sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa.

Enzim SPS adalah enzim yang paling dominan dalam peranannya sebagai pengkatalis sukrosa, sehingga enzim SPS juga disebut sebagai enzim kunci pada sintesis sukrosa. Dalam sintesis sukrosa, enzim SPS mengkatalis *UDP-Glucose* dan *Fruktosa-6-Phosphate* menjadi *Sucrose-6-Phosphate*, UDP dan H^+ . Enzim SPS memiliki peranan penting dalam peningkatan laju fotosintesis dan sintesis sukrosa yang menunjang perkembangan dan pertumbuhan tanaman (Huber dan Huber, 1996).

Enzim SPS dapat ditemukan di daun tepatnya pada bagian sitosol (Stitt dan Heldt, 1988), enzim SPS juga dapat ditemukan di jaringan pada embrio biji (Bruneau *et al.*, 1991). Tanaman yang overekspresi gen *SoSPS1* memiliki kandungan sukrosa yang tinggi dibandingkan dengan tanaman kontrol. Sugiharto *et al.*, (1997) melaporkan bahwa aktivitas SPS berbanding lurus dengan hasil sukrosa pada tebu transgenik. Begitu pula yang dinyatakan oleh Micallef *et al.*, (1995) bahwa tanaman tomat overekspresi gen *SPS*, fase pembungaannya akan lebih cepat, terjadi peningkatan jumlah buah dan berat buah.

2.3 *Sucrose Transporter (SUT)*

Sukrosa merupakan produk utama, hasil fotosintesis pada tanaman tingkat tinggi. Sukrosa ditransportasikan dari *source tissue* menuju *sink tissue* (Christina dan Christopher, 2010) seperti batang, buah, akar, bunga dan jaringan meristem. Transport sukrosa terjadi didalam floem secara apoplas dan simplas (Sauer, 2007).

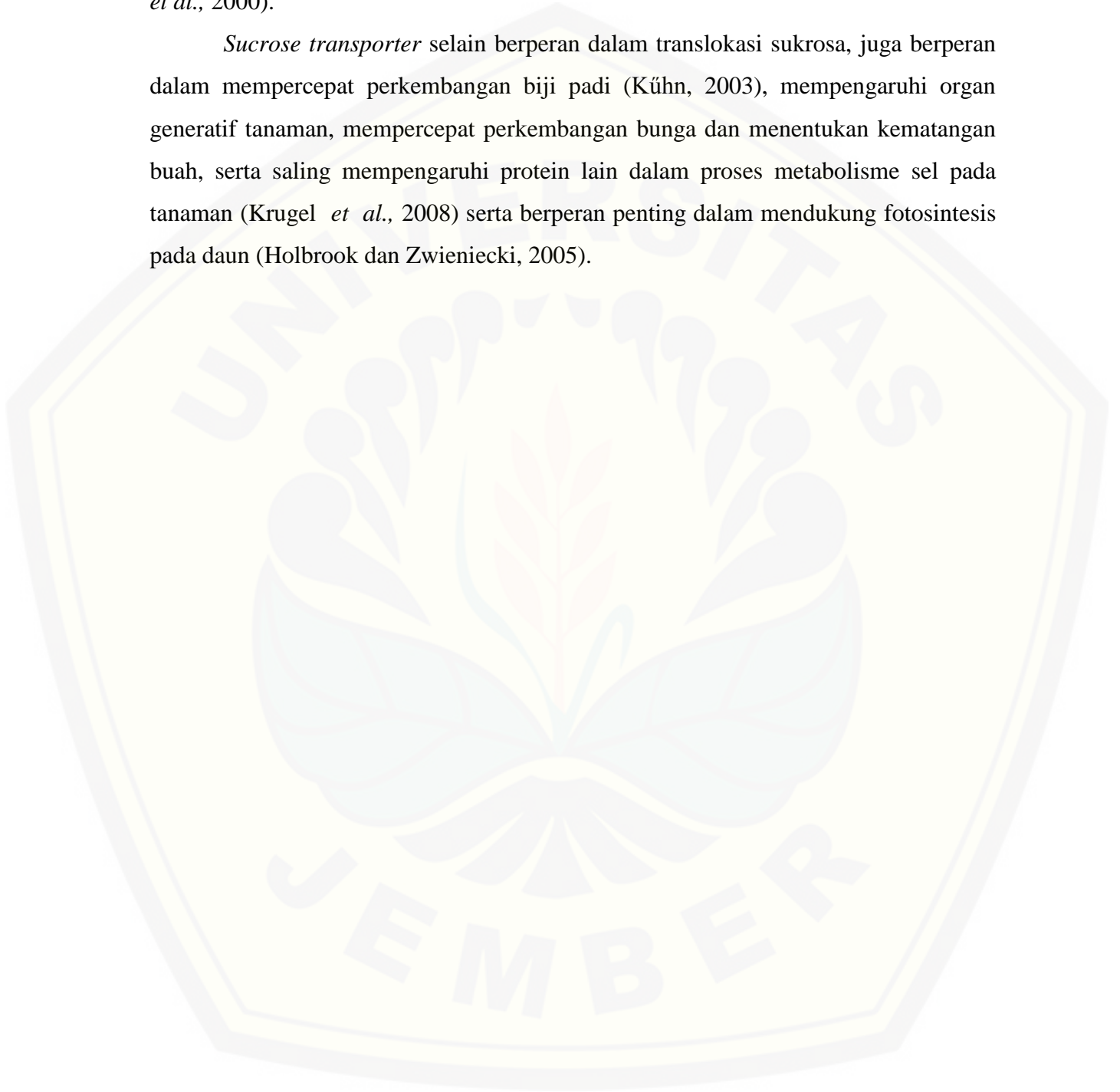
Sukrosa yang masuk dan keluar dari sel satu ke sel yang lain melalui plasmodesmata merupakan transport sukrosa secara simplas, sedangkan apoplas, sukrosa akan keluar dan masuk dari sel satu ke sel yang lain melalui sel mesofil (Holbrook dan Zwieniecki, 2005). Pada apoplast, transport sukrosa dapat terjadi secara pasif maupun aktif. Transport aktif terjadi karena melawan gradien konsentrasi yang difasilitasi oleh protein *sucrose transporter* yang terdapat pada membran plasma (Kehr, 2006).

Protein *sucrose transporter* merupakan protein yang bertanggung jawab terhadap translokasi sukrosa secara apoplas. Protein ini diketahui sebagai *sucrose proton cotransporters* yang berfungsi dalam konjugasi H^+ -ATPase. Pompa proton akan mengeluarkan proton dari floem menggunakan energi dari hasil hidrolisis ATP, sehingga menyebabkan gradien proton mampu melintasi membran plasma. Protein *sucrose transporter* memungkinkan difusi proton pada gradien konsentrasi rendah dari apoplast ke dalam sel floem, dan menggunakan perubahan proton yang terjadi secara terus menerus untuk mendorong translokasi sukrosa. Protein SUT ini bertanggung jawab terhadap transportasi sukrosa melalui floem dari *source tissue* ke *sink tissue* (Lemoine, 2000).

Pada dasarnya tumbuhan tingkat tinggi memiliki gen *SUT* yang dikelompokkan ke dalam 3 subfamili berdasarkan filogenetiknya, yaitu *SUT1*, *SUT2* dan *SUT4* (Kühn, 2003; Shiratake, 2007). Ketiga subfamili tersebut didapatkan dari hasil karakterisasi gen *SUT* pada *Solanaceae* (Kühn, 2003). Transport sukrosa pada tanaman dikotil didistribusi oleh ketiga subfamili tersebut, sedangkan pada tanaman monokotil yang berperan dalam mendistribusikan sukrosa hanya *SUT2* dan *SUT4* (Shiratake, 2007). Gen *SUT* pada beberapa tanaman tingkat tinggi yang berhasil

diidentifikasi, misalnya pada padi lima gen *SUT* dan dua gen *SUT* pada tomat (Barker *et al.*, 2000).

Sucrose transporter selain berperan dalam translokasi sukrosa, juga berperan dalam mempercepat perkembangan biji padi (Kühn, 2003), mempengaruhi organ generatif tanaman, mempercepat perkembangan bunga dan menentukan kematangan buah, serta saling mempengaruhi protein lain dalam proses metabolisme sel pada tanaman (Krugel *et al.*, 2008) serta berperan penting dalam mendukung fotosintesis pada daun (Holbrook dan Zwieniecki, 2005).



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biomolekular dan Bioteknologi *Center for Development of Advanced Sciences and Technology* (CDAST) Universitas Jember dimulai pada bulan Juli 2014 hingga April 2015.

3.2 Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain biji tomat rekayasa genetika overekspresi *single* gen *SoSPS1 event* SPS 3.2, gen *SoSUT1 event* SUT 4, SUT 5, SUT 7 dan SUT 8, *double* gen *SoSPS-SoSUT1 event* DO 2.1; DO 2.5; DO 5.1; DI 2.1; DI 2.5; dan DI 5.1 serta tanaman kontrol (WT).

Alat yang digunakan adalah alat laboratorium yang disebutkan dalam prosedur penelitian yang meliputi alat-alat untuk penanaman biji tomat di *greenhouse*, PCR untuk konfirmasi adanya gen *SPS-SUT* yang telah berhasil diinsersikan pada penelitian sebelumnya dan spektrofotometer digunakan untuk uji kandungan sukrosa buah serta parameter pertumbuhan dan produksi tanaman tomat PRG.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Perkecambahan dan Pertumbuhan Tomat PRG

Biji tomat direndam didalam air hangat selama 30 menit untuk melunakkan kulit biji tomat sehingga memudahkan imbibisi dan mempercepat perkecambahan. Biji tomat yang telah direndam kemudian ditanam pada plastik kecil berukuran \pm 5cm yang berisi media pasir. Bibit tomat kemudian disiram dengan Hoagland. Dua minggu setelah tanam, bibit tanaman tomat selanjutnya dipindah ke dalam pot besar dengan media campuran tanah, pasir dan kompos (perbandingan 2:1:1).

3.3.2 Isolasi DNA Genom

Pengambilan sampel daun dilakukan pada tanaman tomat PRG berumur 30 sampai dengan 45 hari dihitung dari awal pemindahan bibit tomat kedalam pot. Pengambilan sampel untuk isolasi DNA dan protein dilakukan pada daun yang telah berkembang sempurna. Sampel daun kemudian disimpan pada suhu -80°C sebelum analisis dilakukan. Hal ini dilakukan agar tidak terjadi kerusakan protein pada daun.

Isolasi DNA genom dilakukan seperti metode yang disebutkan oleh Zheng *et al.* (1995) dengan menggerus 0,3 gr daun tomat dalam nitrogen cair, kemudian serbuk dimasukkan ke dalam *microtube* 2 ml dan ditambah 600 μl buffer ekstraksi (100 mM Tris, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, dengan pH keseluruhan 8,0), 1,25 μl β -*mercaptoethanol* dan 30 μl SDS 20% lalu divortex hingga homogen dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Setelah itu ditambah 300 μl kalium asetat (5M) sambil dicampur dengan cara dibolak-balik secara perlahan kemudian diinkubasi dalam es selama 10 menit dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu 4°C . Supernatan yang didapatkan dipindah ke dalam *microtube* baru dan ditambah 375 μl isopropanol sambil dicampur dengan cara dibolak-balik secara perlahan kemudian diinkubasi selama 1 jam pada -20°C , lalu disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C untuk mengendapkan DNA. DNA yang mengendap (pelet) dicuci dengan buffer TE sebanyak 300 μl .

Purifikasi DNA dilakukan dengan menambahkan 10 μl RNA-*se*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan dilanjutkan dengan menambahkan 300 μl PCI serta dihomogenkan dengan vorteks. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C . Supernatan dipindah ke *microtube* baru, dan ditambah dengan kloroform (1 supernatan : 1 kloroform) kemudian divorteks, dan sentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu 4°C . Supernatan dipindah ke *microtube* baru, kemudian ditambah isopropanol sebanyak 0,8 kali supernatan dan NaAc sebanyak 0,2 kali supernatan, dibolak-balik secara perlahan. Sampel diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam, disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu 4°C . Pelet di cuci dengan Ethanol 70% sebanyak 600 μl , disentrifugasi lagi dengan

kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan dengan *vacum dry* selama 5 menit kemudian ditambah 20 µl buffer TE. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya menggunakan NanoVue Plus Spektrofotometer dan dianalisis menggunakan PCR.

3.3.3 Analisis Polimerase Chain Reaction (PCR) untuk DNA Genom

Analisis pada gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* secara umum tahapan yang dilakukan adalah sama, yang membedakan adalah primer (*forward* dan *reverse*) yang digunakan berbeda untuk masing-masing gen. Penggunaan primer (*forward* dan *reverse*) pada *event* yang memiliki gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* akan diuji satu persatu keberadaannya.

Primer *nptII-F* (5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3') dan *nptII-R* (5'-GTCGCTTGGTCGGTCATTTC-3') yang berukuran 550bp merupakan primer (*forward* dan *reverse*) yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen *SoSPS1*, sedangkan primer *hptII-2F* (5'-GAGCTATTGCATCTCCCGCC-3') dan *hptII-2R* (5'-GATCCTGCAAGCTCCGGATG-3') dengan ukuran 470bp digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen *SoSUT1*.

PCR menggunakan PCR Master Mix (KAPA) yang dalam satu kali reaksi memiliki total volume 20µl dengan komposisi larutan yang terdiri dari PCR Master Mix (KAPA) 10µl, masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) 1µl, *template* genom 2µl dan ddH₂O 6µl. Terdapat beberapa tahapan dalam PCR antara lain adalah predenaturasi 95°C selama 4 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 50°C (untuk primer *hptII*) dan 55°C (untuk primer *nptII*) selama 20 detik, elongation 72°C selama 50 detik dan final elongation 72°C selama 7 menit.

Hasil PCR yang telah didapatkan selanjutnya akan dielektroforesis menggunakan gel agarose 1% yang mengandung 3 µl ethidium bromide (Sigma) pada tegangan 100 Volt. selama 20-25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb Ladder (iNtRON BIOTECHNOLOGY) sebanyak 3 µl untuk melihat

pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat di *Gel imaging system* (Major Science) dan didokumentasi.

3.3.4 Analisis Pertumbuhan dan Produksi

Pengamatan dilakukan pada tinggi tanaman (cm), jumlah dan berat buah pertanaman (gr). Pengamatan tinggi tanaman dilakukan dengan mengukur tanaman pada 15, 30 dan 45 HST, sedangkan jumlah buah dan berat buah diamati setelah buah dipanen. Pemanenan buah dilakukan pada tanaman yang berumur ± 59 HST atau pemasakan buah sudah mencapai 60% kemudian dilakukan analisis kandungan sukrosa.

3.3.5 Analisis Kandungan Sukrosa

a. Ekstraksi Sukrosa Buah

Ekstraksi sukrosa buah dilakukan dengan menggerus 3 gr buah tomat dimasukkan ke dalam *microtube*, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit, pada suhu 4°C diambil supernatannya. Supernatan kemudian digunakan untuk analisis kandungan sukrosa buah.

b. Pengukuran Kandungan Sukrosa Buah

Analisis kandungan sukrosa dilakukan menggunakan metode Seliwanoff (1887 dalam Widodo 2014), dengan menambahkan 70 μ l NaOH 1 N pada 10 μ l sampel hasil ekstraksi dan dihomogenkan menggunakan vortek. Campuran dipanaskan pada suhu 100°C selama 10 menit, setelah dingin direaksikan dengan 250 μ l *resorcinol* 0,1 % (dalam *ethanol* 95%) dan 750 μ l HCl 30% kemudian diinkubasi pada suhu 80°C selama 8menit. Setelah dingin, warna yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm.

Pembuatan standart dilakukan dengan mengukur absorbansi sukrosa yang telah diperlakukan seperti sampel pada konsentrasi 5, 10, 15, 20,25 dan 50 μ g/ μ l lalu dibuat regresi linear hubungan antara konsentrasi sukrosa dan absorbansinya.

Kandungan sukrosa diperoleh dengan mengkonversikan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan regresi linier dari standart sukrosa yang telah dibuat.



BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Konfirmasi Keberadaan Get Target

Konfirmasi keberadaan gen target pada tanaman tomat PRG overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi kedua dilakukan dengan analisis PCR. Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan sampel DNA yang diambil dari sampel daun tomat PRG. Analisis PCR menggunakan primer *nptII-F/R* (untuk konfirmasi gen *SoSPS1*) dan primer *hptII-F/R* (untuk konfirmasi gen *SoSUT1*). Hasil PCR menunjukkan terdapat pita tunggal berukuran 470bp untuk primer *hptII-F/R*, yang membuktikan bahwa pada tanaman tomat PRG generasi kedua sebanyak 6 sampel positif mengandung gen *SoSUT1*. Keenam tanaman PRG generasi kedua yang overekspresi *single* gen *SoSUT1* yaitu tanaman *event* SUT dengan nomer 3, 4, 6, 7, 8 dan 10 (Gambar 4.1).



Gambar 4.1. Elektroforesis 1% gel agarose DNA hasil PCR menggunakan pasangan primer *hptII-F/R* dan template DNA genom tanaman tomat PRG *single SoSUT1 event* 3: SUT 4.3; 4: SUT 5.1; 6: SUT 5.3; 7: SUT 7.1; 8: SUT 7.2 dan 10: SUT 8.1, M: 1kb Marker DNA, K+: plasmid pAct-SoSUT1, K-: tanaman kontrol.

Sedangkan tanaman tomat PRG *single* gen *SoSPS1 event* SPS nomer 13, 14 dan 15 tidak menunjukkan adanya pita DNA pKYS-*SoSPS1* (550bp) serta *double* gen *SoSPS1-SoSUT1* nomer 16 hingga 33 tidak menunjukkan ukuran fragmen DNA yang sesuai dengan plasmid pKYS-*SoSPS1* (550bp) dan pAct-*SoSUT1* (470bp) sebagai *selectable marker*.

Tabel 4.1 Hasil analisis PCR pada 15 tanaman tomat PRG *single* gen *SoSUT1* dan *SoSPS1* generasi kedua

Event	Gen <i>SoSUT1</i>	Event	Gen <i>SoSUT1</i>	Event	Gen <i>SoSPS1</i>
SUT 4.1 (1)	Negatif	SUT 7.1 (7)	Positif	SPS 3.2.1 (13)	Negatif
SUT 4.2 (2)	Negatif	SUT 7.2 (8)	Positif	SPS 3.2.2 (14)	Negatif
SUT 4.3 (3)	Positif	SUT 7.3 (9)	Negatif	SPS 3.2.3 (15)	Negatif
SUT 5.1 (4)	Positif	SUT 8.1 (10)	Positif	-	-
SUT 5.2 (5)	Negatif	SUT 8.2 (11)	Negatif	-	-
SUT 5.3 (6)	Positif	SUT 8.3 (12)	Negatif	-	-

Tabel 4.2 Hasil analisis PCR pada 18 tanaman tomat PRG *double* gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* generasi kedua

Event	Hasil PCR Gen		Event	Hasil PCR Gen	
	<i>SoSPS1</i>	<i>SoSUT1</i>		<i>SoSPS1</i>	<i>SoSUT1</i>
DO 2.1.1 (16)	Negatif	Negatif	D1 2.1.1 (25)	Negatif	Negatif
DO 2.1.2 (17)	Negatif	Negatif	D1 2.1.2 (26)	Negatif	Negatif
DO 2.1.3 (18)	Negatif	Negatif	D1 2.1.3 (27)	Negatif	Negatif
DO 2.5.1 (19)	Negatif	Negatif	D1 2.5.1 (28)	Negatif	Negatif
DO 2.5.2 (20)	Negatif	Negatif	D1 2.5.2 (29)	Negatif	Negatif
DO 2.5.3 (21)	Negatif	Negatif	D1 2.5.3 (30)	Negatif	Negatif
DO 5.1.1 (22)	Negatif	Negatif	D1 5.1.1 (31)	Negatif	Negatif
DO 5.1.2 (23)	Negatif	Negatif	D1 5.1.2 (32)	Negatif	Negatif
DO 5.1.3 (24)	Negatif	Negatif	D1 5.1.3 (33)	Negatif	Negatif

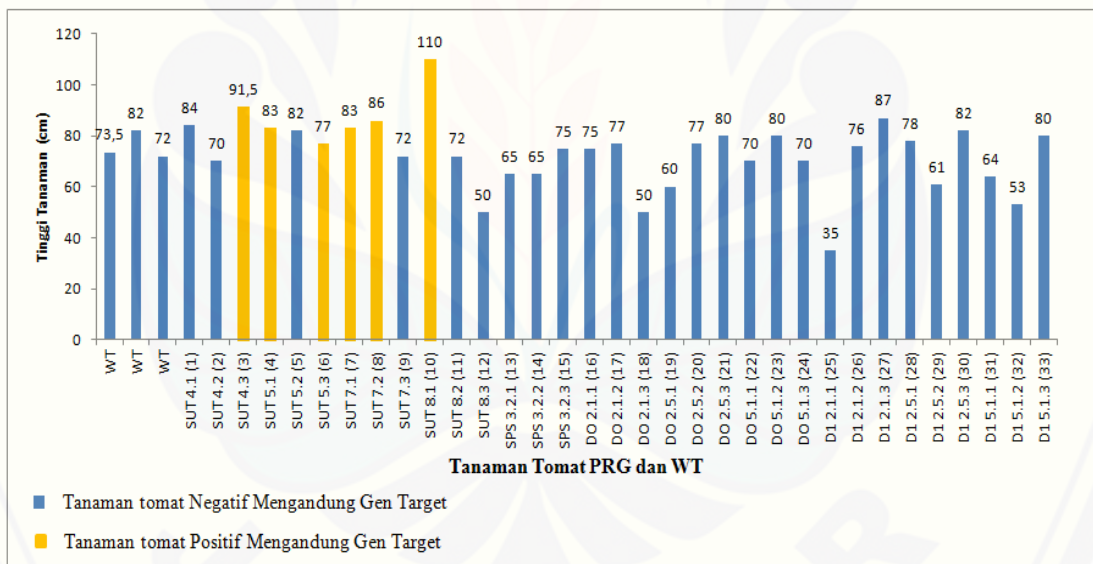
Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* yang tidak ditemukan pada tanaman tomat PRG generasi kedua *event* SPS maupun *event* DO-DI kemungkinan disebabkan oleh gen yang bersifat *chimera*. Gen target yang diinsersikan tidak diekspresikan pada semua jaringan tanaman (Yasmeen *et al.*, 2009). Dewanti (2011) juga menyebutkan bahwa gen target yang diinsersikan pada tanaman tomat tidak termultiplikasi secara merata

pada daun tanaman tomat PRG yang digunakan sebagai sumber DNA yang digunakan untuk analisis PCR sebagai *template*.

4.2 Pertumbuhan dan Produksi Tanaman Tomat PRG

4.2.1 Tinggi Tanaman

Secara keseluruhan tomat PRG *event* SUT mempunyai habitus yang lebih tinggi dibandingkan dengan *event* SPS dan *event* DO-DI. Hal ini dikarenakan tomat PRG *event* SUT memiliki gen *SoSUT1* yang diturunkan dari indukan yang tertransformasi oleh gen tersebut sedangkan untuk *event* SPS dan *event* DO-DI tidak terkonfirmasi adanya *single* dan *double* gen *SoSPS1* maupun *SoSUT1*. Beberapa tanaman PRG memiliki tinggi tanaman yang hampir sama dengan tinggi WT dan ada yang lebih rendah (Gambar 4.2).



Gambar 4.2. Tinggi tanaman tomat PRG dan WT

Tanaman PRG *event* SUT merupakan tanaman yang overekspresi gen *SoSUT1*. Tanaman yang overekspresi gen *SoSUT1* dapat meningkatkan proses translokasi sukrosa dari *source tissue* ke *sink tissue*. Sukrosa sangat penting bagi tanaman, terutama pada jaringan meristem yang memerlukan sukrosa untuk

membantu pembelahan sel untuk mendukung pertumbuhan tanaman. Overekspresi gen *SoSUT1* mampu mempercepat translokasi sukrosa pada organ pertumbuhan, sehingga sukrosa yang digunakan untuk proses pertumbuhan tanaman akan lebih cepat tersedia. Oleh karena itu, tanaman tidak mengalami hambatan dalam pertumbuhannya (Anur, 2014).

Tanaman PRG yang negatif mengandung gen target secara umum memiliki tinggi yang hampir sama dengan tanaman WT bahkan ada yang lebih rendah dibandingkan dengan WT, misalnya pada *event* DI 2.1.1 hanya memiliki tinggi 35cm. Hal dikarenakan tanaman terserang penyakit yang menyebabkan pertumbuhan tanaman terganggu. Sintesis dan translokasi sukrosa pada tanaman negatif gen *single* maupun *double SoSPS1* dan *SoSUT1* hanya berasal dari gen endogen tanaman tomat, apabila tanaman terserang penyakit maka proses sintesis maupun translokasi sukrosa bagi jaringan tanaman yang sedang mengalami pertumbuhan maupun perkembangan akan terhambat.

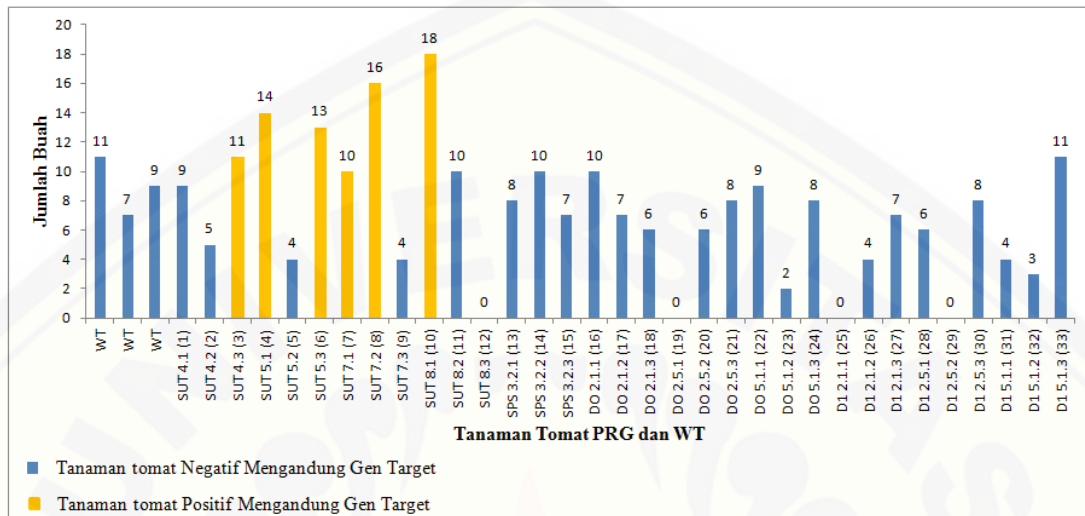
Sukrosa akan dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim *invertase* dan *sucrose synthase* yang akan ditranslokasikan pada jaringan tanaman lainnya seperti pada titik tumbuh tanaman. Glukosa dan fruktosa akan dirombak menjadi ATP serta sumber kerangka karbon sebagai energi untuk pembentukan sel baru dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman, dalam hal ini adalah untuk meningkatkan tinggi tanaman (Dewanti, 2011).

4.2.2 Produksi Tanaman Tomat PRG Generasi Kedua

a. Jumlah Buah

Tanaman tomat PRG *event* SUT yang positif mengandung gen *SoSUT1* secara umum memiliki jumlah buah yang lebih banyak dibandingkan dengan WT maupun PRG *event* SPS dan *event* DO-DI (Gambar 4.3). Beberapa tomat PRG *event* DO-DI, merupakan tomat PRG yang jumlah buahnya lebih rendah dibandingkan dengan WT. Penurunan produksi disebabkan oleh penyakit yang menyerang tanaman tomat,

sehingga proses fotosintesis tidak maksimal dan mempengaruhi proses sintesis serta translokasi sukrosa pada tanaman tomat.



Gambar 4.3. Jumlah buah tanaman tomat PRG dan WT

Translokasi sukrosa terjadi secara apoplas maupun simplas. Sukrosa merupakan hasil akhir dari fotosintesis yang ditranslokasikan ke seluruh jaringan tanaman untuk perkembangan. Sukrosa yang telah dirombak akan digunakan sebagai ATP dan sumber kerangka karbon untuk pembentukan sel dalam proses perkembangan buah. Overekspresi gen *SoSUT1* mempercepat translokasi sukrosa dari *source tissue* ke *sink tissue*.

Produksi buah dipengaruhi oleh beberapa faktor, selain faktor genetik seperti adanya overekspresi gen *SoSUT1* maupun *SoSPS1* juga dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain lingkungan, hama dan penyakit (Ganefianti dan Hasannudin, 2009). Salah satu hama dan penyakit yang menyerang adalah hama ulat dan busuk buah yang mengakibatkan menurunnya hasil produksi. Pada daun tanaman tomat PRG *double* overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* lebih banyak terserang penyakit (Gambar 4.4). Daun pada tanaman tomat PRG mengalami penuaan, klorosis daun dan terserang penyakit dengan gejala daun menebal, luas daun menyempit dan sedikit

menggulung serta pada pinggiran daun terdapat bercak kuning yang menyebabkan proses fotosintesis yang tidak maksimal.

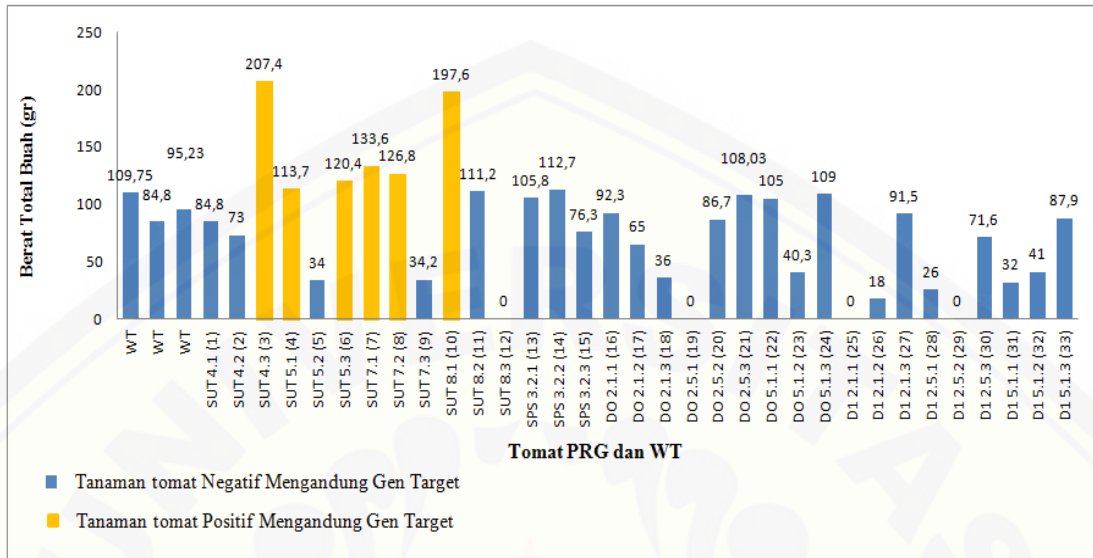


Gambar 4.4 A: Daun tomat PRG terserang penyakit, B: daun tomat PRG sehat

Tanaman tomat PRG *double* overekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* merupakan tanaman yang banyak terserang oleh penyakit tersebut. Anur (2014) juga mengatakan bahwa pada penelitian sebelumnya tanaman PRG *double SoSPS1* dan *SoSUT1* lebih banyak terserang penyakit dengan gejala yang sama. Anur (2014) melaporkan bahwa tanaman *double* ekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1* terserang penyakit dengan gejala bercak kuning yang menyebar pada daun tomat PRG lebih besar yaitu 40% dari luasan daun. Adanya penyakit yang menyerang tanaman PRG yang membuat hasil produksi lebih rendah dibandingkan dengan WT.

b. Berat Buah Per Tanaman

Berat buah tanaman tomat PRG generasi kedua *event SUT* memiliki berat lebih tinggi dibandingkan dengan PRG lainnya dan WT. Berat buah tomat PRG *event SUT 4.3* memiliki berat buah tertinggi 207,4 gr. Tomat PRG *event SPS* dan *event DO-DI* berat buah total hampir sama dengan WT dan beberapa tanaman ada yang lebih rendah. Tomat PRG yang mempunyai berat buah terendah *event DI 2.1.2* yaitu 18 gr (Gambar 4.5).



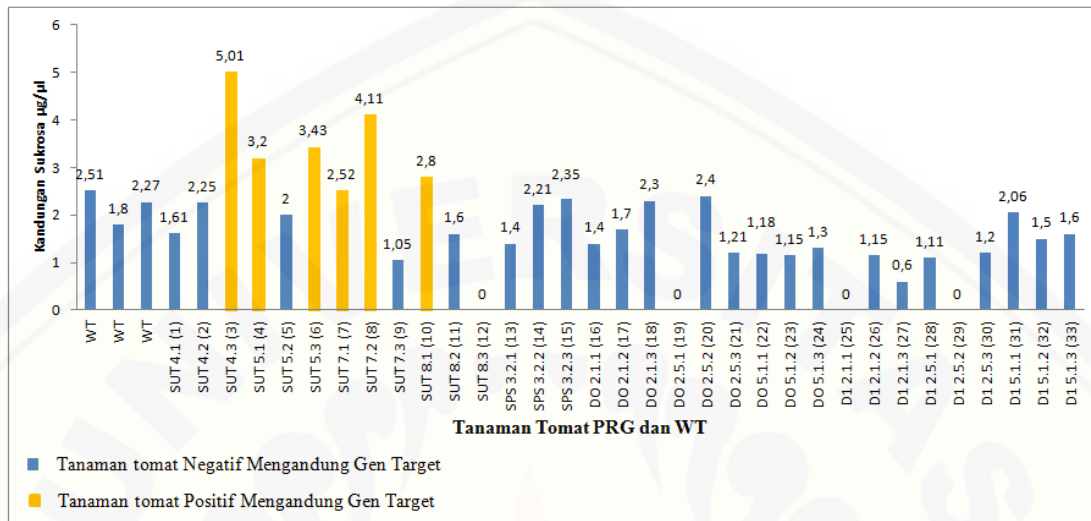
Gambar 4.5. Berat buah total per tanaman tomat PRG dan WT

Tanaman yang overekspresi gen *SoSUT1* pada tomat PRG *event* SUT mengalami peningkatan berat buah total. Namun hal ini tidak terjadi pada tanaman PRG lain yang tidak mengandung overekspresi gen *SoSUT1*. Keterlambatan translokasi sukrosa pada tanaman PRG disebabkan oleh penyakit, sehingga laju translokasi sukrosa terganggu dan menyebabkan keterlambatan penyediaan sukrosa untuk menunjang perkembangan buah. Penyakit pada tanaman PRG juga menyebabkan buah matang prematur, sehingga ukuran buah tidak maksimal, begitu pula dengan berat buah menjadi rendah.

4.3. Kandungan Sukrosa

Pengukuran kandungan sukrosa dilakukan pada buah untuk mengetahui besarnya kandungan sukrosa pada buah tomat PRG generasi ke dua. Secara umum kandungan sukrosa pada tanaman overekspresi gen *SoSUT1* yaitu *event* SUT lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman tomat PRG *event* SPS, *event* DO-DI, dan WT tetapi kandungan sukrosa WT masih lebih tinggi dibandingkan PRG *event* DO-DI.

Kandungan sukrosa tertinggi pada tomat PRG *event* SUT 4.3 adalah 5,01 $\mu\text{g/g}$ dan terendah pada PRG *event* DI 2.1.3 yaitu 0,6 $\mu\text{g/g}$ (Gambar 4.5).



Gambar 4.6 Kandungan Sukrosa Buah Tanaman Tomat PRG dan WT

Pada tanaman PRG *event* SPS, DO-DI yang negatif mengandung *single* dan *double* gen *SoSPS1* maupun *SoSUT1* pada *event* SPS 3.2 memiliki kandungan sukrosa yang lebih rendah dibandingkan dengan tanaman tomat *event* SUT. Hal ini terjadi karena sintesis dan transport sukrosa hanya didukung oleh gen *SPS* dan *SUT* endogen, sedangkan pada tanaman overekspresi gen *SoSUT1* pada *event* SUT 4, 5, 7 dan 8 kandungannya lebih besar dibandingkan dengan tanaman kontrol. Penyebabnya adalah adanya akumulasi dari ekspresi gen *SUT* endogen dan eksogen yang dengan cepat mentranslokasi sukrosa ke organ penyimpanan, sehingga terjadi peningkatan kemampuan akumulasi sukrosa di organ penyimpanan (Kuhn, 2003) dalam hal ini adalah buah.

Sukrosa merupakan produk akhir dari proses fotosintesis dan mudah ditranslokasikan *source tissue* ke *sink tissue* dengan cara melewati plasmodesmata yang biasa disebut dengan transport *simplast*, selain itu dapat ditransportasikan melalui dinding sel dan ruang interseluler (Salisbury and Ross, 1995). Sukrosa yang telah ditransportasikan ke organ penyimpanan dengan bantuan protein SUT kemudian

akan diakumulasi di organ penyimpanan seperti pada buah. Kuhn (2003) juga mengatakan bahwa *overekspresi* gen yang mengkode transporter sukrosa, dalam hal ini adalah gen *SUT*, dapat meningkatkan laju transportasi sukrosa, sehingga meningkatkan kemampuannya untuk mengakumulasi sukrosa di *sink*. Hal inilah yang terjadi pada tanaman tomat PRG *event* SUT yang mempunyai kandungan sukrosa lebih tinggi dari PRG lain dan WT.

Akumulasi sukrosa pada buah dipengaruhi oleh enzim pendegradasi sukrosa yakni enzim *invertase* dan *sucrose synthase*. Miron dan Schaffer (1991) menyatakan bahwa kandungan sukrosa selain ditentukan oleh pendegradasi sukrosa, juga dipengaruhi oleh aktivitas SPS. Enzim *invertase* dan *sucrose synthase* berperan dalam mengubah sukrosa menjadi fruktosa dan glukosa pada buah. Enzim *sucrose synthase* lebih aktif merombak sukrosa pada organ penyimpanan yang mengakibatkan kandungan sukrosa berkurang seperti yang terjadi pada *event* SUT 8. Stommel (1992) melaporkan bahwa sedikit atau tidak adanya sukrosa telah berhasil dideteksi pada buah tomat. Buah tomat mengalami penurunan sukrosa sebanyak 98 % dari total gula larut dalam buah tomat yang matang (Stommel, 1992).

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa tidak semua gen target overekspresi *single* dan *double* gen *SoSPS1-SoSUT1* diturunkan pada tanaman tomat PRG generasi kedua. Hasil PCR menunjukkan bahwa gen target yang diturunkan hanya pada tomat PRG generasi kedua adalah overekspresi *single* gen *SoSUT1 event* SUT 4.3; SUT 5.1; SUT 5.3; SUT 7.1; SUT 7.2 dan SUT 8.1. Tanaman tomat PRG generasi kedua memiliki habitus tanaman lebih bervariasi dibandingkan WT. Tanaman tomat PRG generasi kedua yang memiliki pertumbuhan, produksi dan kandungan sukrosa lebih baik dari WT adalah tanaman tomat PRG *overekspresi* gen *SoSUT1*.

5.2 Saran

Penelitian lebih lanjut pada tanaman tomat PRG ini masih perlu dilakukan evaluasi yaitu dengan menguji kestabilan gen, menganalisis ekspresi gen *SoSUT1* pada tingkat transkripsi maupun translasi pada tanaman T3 dari tomat PRG *event* SUT, sedangkan pada tomat PRG *event* SPS dan *event* DO-DI perlu dilakukan transformasi ulang hingga tanaman tersebut benar-benar stabil.

DAFTAR PUSTAKA

- Anur, R.M. 2014. Potensi Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Produk Rekayasa Genetika (PRG) Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*
- Barker, Kuhn, Weise, Schulz, Gebhardt, Himer, Hellmann, Schulze, Ward, and Frommer. 2000. SUT2 A Putative Sucrose Sensor in Sieve Elements. *Plants Cell* **12**, 1153-1164
- Batta SK, and Singh R. 1986. Sucrose Metabolism in Sugarcane Grown Under Varying Climatic Conditions: Synthesis and Storage of Sucrose in Relation to The Activities of Sucrose Synthase, Sucrose-Phosphate Synthase and Invertase. *Phytochemistry* **25**:2431-2437
- Bruneau, Worrell, Cambou, Lando, And Voelker. 1991. Sucrose phosphate synthase, a key enzyme for sucrose biosynthesis in plants: protein purification from corn leaves and immunological detection. *Plant Physiol.* **96**: 473-478
- Cristanto, S. 2011. Transformasi Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Dengan Gen *SoSUT1* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Universitas Jember
- Christina, K. And Christopher, PLG. 2010. Sucrose Transporter of Higher Plants. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 1-11
- Christou, Vain, Kohli, Leech, Oard and Linscpmbe. 1992. Introduction of Multiple Genes Into Elite Rice Varieties: Evaluation of Transgene Stability, Gene Expression and Field Performance of Herbicide-Resistant Transgenic Plant. *Annal of Botany* **77**: 223-235
- Dewanti, P. 2011. Peningkatan Kandungan Sukrosa dan Hasil Tomat (*Lycopersicon sculentum*, L.) Melalui Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*. Tidak Diterbitkan. *Disertasi*. Malang: Brawijaya
- Ganefianti, S dan Hasannudin. 2009. Analisa Stabilitas enam Genotip Cabai menggunakan Metode Additive Main Effect Multiplicate Interaction (AMMI). *Akta Agrosia* Vol 12 no 2
- Hiei, Y., T. Komari, and T. Kubo. 1997. Transformation of Rice Mediated by *Agrobacterium tumrfaciens*. *Plant Mol. Biol.* **35**: 205-218

- Holbrook, N.M and Zwieniecki, M. A. 2005. *Vascular Transport in Plants*. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Huber, S.C. and J.L. Huber. 1996. Role and Regulation of Sucrose Phosphate Synthase In Higher Plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47** : 431 – 444
- Kehr, J. 2006. Phloem Sap Proteins: Their Identities and Potential Roles in The Interaction Between Plants and Phloem Feeding Insects. *J. Exp. Bot.* **57**, 767–774
- Kühn, C. 2003. A Comparison of The Sucrose Transporter System of Defferent Plant Species. *Plant Biol* vol **5** :215-232
- Komor, E. 2000. The physiology of sucrose storage in sugarcane. In:Gupta AK, Kaur N (eds) Carbohydrate reserves in plants:synthesis and regulation. *Elsevier, Amsterdam*, 35–53
- Krugel, Veenhoff, Langbein, Wiederhold, Liesche, Friedrich, Grimm, Martinoia, Poolman, Kuhn. 2008. Transport and sorting of the *Solanum tuberosum* sucrose transporter SUT1 is affected by posttranslational modification. *Plant Cell.* **20**: 1-17.
- Lemoine, R. 2000. Sucrose Transporter in Plant : Update on Function and Structure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465** : 246-262
- Manuhara, Y.S.W. 2006. Pengembangan Metode Transformasi Genetik Tanaman Untuk Meningkatkan Kesejahteraan Hidup Manusia. *Makalah Seminar Nasional Biodiversitas*. Surabaya: Unair
- Micallef, Haskins, Vanderveer, Roh, Shewmarker and Sharkey. 1995. Altered Fotosynthesis, Flowering and Fruiting in Transgenic Tomato Plants that have an increased Capacity for Sucrose Synthesis. *Planta* **196**: 327-334
- Miron, D. and A.A. Schaffer. 1991. Sucrose phosphate synthase,sucrose synthase and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicum esculentum* Mill and sucrose accumulating *Lycopersicum hirsutum*. *Plant Physiol.* **95**: 623-627
- Opabode, J.T. 2006. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Plants: Emerging Factors that Influence Efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review* **1** (1):12-20

- Prasetyo, F.H. 2013. Karakterisasi Fisiologis Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Transgenik Overekspresi Gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*. *Skripsi*. Universitas Negeri Jember
- Primrose, S.B, Twyman, R.M and Old, R.W. 2003. *Principles of Gene Manipulation*. USA : Blackwell Science
- Roy, Purty, Agrawa, Veena and Gupta. 2006. Transformation of tomato cultivar 'Pusa Ruby' with *bspA* gene from *Populus tremula* for drought tolerance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **84**: 55–67
- Sauer, N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* **581**, 2309–2317
- Salisbury, F.B and C.W. Ross. 1995. *Plant Physiology*. California : Wadsworth Publishing Company.
- Shiratake, K. 2007. Genetics of Sucrose Transporter in Plants. *Gene, Genomes and Genomics* **1(1)**, 73-80
- Stitt, F and Heldt. 1988. Coarse Control of Sucrose Phosphatase Synthase in Leaves: Alternation of The Kinetic Properties in Response to The Rate of Photosynthesis and The Accumulation of Sucrose. *Planta* **174**, 217-230
- Stommel. J.R. 1992. Enzymic Components of Sucrose Accumulation in the Wild Tomato Species *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Physiol.* **99**, 324-328
- Sugiharto B., T. Handoyo dan Sumadi. 1997. Variation and correlation in photosynthetic and sucrose metabolism enzymes in some genotype of sugarcane. *Zuriat* **7**: 76-85
- Sugiri, A dan Makagiarsar, I.T. 1996. Tanaman Unggul Hasil Transgenik. *Agrimedia* Volume 2 No 2
- Tanksley, Ganal, Prince, Vicente, Bonierbale, Broun, Fulton, Giovannoni, Grandillo, Martin, Messeguer, Miller, Paterson, Pineda, Röder, Wing, Wu, and Young. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* **132**:1141–1160
- Tugiyono, H. 1991. *Bertanam Tomat*. Jakarta: Penebar Swadaya
- Widodo, W. T., 2014. Aktivitas *Sucrose Phosphate Synthase* dan Kandungan Protein *Sucrose Transporter* serta Akumulasi Sukrosa pada Tanaman Tebu Hasil

Transformasi Ganda Gen *SoSPS1-SoSUTI*. *Skripsi*. Jember : Universitas Jember

Wing RA, Zhang HB, and Tanksley SD. 1994. Map-based cloning in crop plants: tomato as a model system. I. *Genetic and physical mapping of jointless*. *Mol Gen Genet* **242**:681–688

Yasmeen, A., B. Mirza, S. Inayatullah, N. Safdar, M. Jamil, S Ali and M. F. Choudhry. 2009. In Planta Transformation of Tomato. *Plant Mol Biol Rep* **27**: 20-28

Yelli, F. 2009. Transformasi dan Regenerasi Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) dengan Gen Partenokarpi Melalui Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. *Seminar Hasil Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat, Unila* 21-28

Zheng, K., Huang, N., Bennet P., and Khush G. S. 1995. PCR Based Marker Assisted Selection in Rice Breeding. *IRRI news lett* 2