



**TRANSFORMASI GEN *SoSPS 1* MENGGUNAKAN VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens* dan EKSPLAN TUNAS APIKAL PADI INDICA CV. INPARI 14 SS**

**SKRIPSI**

Oleh

**Derta Bagus Rivian Satria  
NIM 101810401008**

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

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Bapak Sugiarto dan ibu Sumiani atas segala dukungan, kasih sayang dan doa yang tiada henti;
2. adik Dwiky Bagas Regio Perkasa dan adik Rafi Akhmad Galih Pamungkas atas sumber motivasi agar menjadikan kakak sebagai contoh yang baik;
3. para guru yang telah memberikan ilmu, mendidik, membimbing dengan penuh kesabaran;
4. Almamater Universitas Jember.

**MOTTO**

Pekerjaan yang dilakukan tanpa suatu dasar ilmu, hanya akan menuai kegagalan

(B.S)



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Derta Bagus Rivan Satria

NIM : 101810401008

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “ Transformasi Gen SoSPS1 Menggunakan Vektor Agrobacterium tumefaciens dan Eksplan Tunas Apikal Pada Padi Indica cv. Inpari 14 SS ” 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, 26 Juni 2015

Yang Menyatakan,

Derta Bagus Rivan Satria  
NIM 101810401008

**SKRIPSI**

**TRANSFORMASI GEN *SoSPS 1* MENGGUNAKAN VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens* dan EKSPLAN TUNAS APIKAL PADI INDICA  
CV. INPARI 14 SS**

Oleh

Derta Bagus Rivan Satria  
NIM 101810401008

Pembimbing:

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

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

**PENGESAHAN**

Karya ilmiah skripsi berjudul “Transformasi Gen *SoSPSI* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Apikal Pada Padi *Indica* cv. Inpari 14 SS” 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 195510221982121001

Ir. Didik Pudji Restanto, MS.,Ph.D  
NIP 196504261994031001

Penguji I,

Penguji II,

Dra. Dwi Setyati, M.Si  
NIP 196404171991032001

Dr. rer. nat. Kartika Senjarini  
NIP 19750913200002001

Mengesahkan  
Dekan,

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

**RINGKASAN**

**Transformasi Gen *SoSPSI* menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Apikal Padi *Indica* cv. Inpari 14 SS** : Derta Bagus Rivan Satria, 101810401008; 2010, 31 halaman; Jurusan Biologi dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

*SoSPSI* adalah gen yang menyandikan protein *Sucrose phosphate synthase* (SPS) yang dikloning dari tanaman tebu. SPS merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman. SPS mengkatalisis reaksi pembentukan *sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG). Suc-6-P dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) menghasilkan sukrosa. Sukrosa dalam tanaman memiliki fungsi yang sangat penting, tidak hanya menyediakan energi tetapi juga merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Potensi gen *SoSPSI* dapat dikembangkan pada padi *Indica* melalui metode transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens*. Namun, kemampuan regenerasi kalus yang rendah berpengaruh terhadap efisiensi transformasi. Pengembangan metode transformasi menggunakan eksplan tunas seperti pada tanaman tebu dapat menjadi alternatif untuk diterapkan pada tanaman padi *Indica*.

Metode yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi persiapan eksplan transformasi, kultur *A. tumefaciens*, isolasi DNA plasmid dan konfirmasi gen *interest* Infeksi *A. tumefaciens*, ko-kultivasi, eliminasi *A. tumefaciens*, Seleksi tanaman *putative* transforman, isolasi DNA genom tanaman *putative* transforman, aklimatisasi dan analisis PCR.

Berdasarkan hasil transformasi gen *SoSPSI* menggunakan vektor *A. tumefaciens* dan eksplan tunas apikal pada padi *Indica* cv. Inpari 14 SS diperoleh padi yang positif gen *SoSPSI* sebanyak 2 tanaman pada transformasi pertama dan 10 tanaman untuk transformasi kedua. Efektivitas transformasi gen *SoSPSI*

menggunakan konstruk plasmid *pCL4-SoSPS1* yang dikendalikan promoter *RUBQ2* pada tanaman padi transforman gen *SoSPS1* pertama sebesar 1,78% dan untuk transformasi kedua 9,61%. Hasil aklimatisasi menunjukkan dari 12 tanaman transforman hanya 7 tanaman yang dapat dikondisikan di kondisi lingkungan, sedangkan 5 tanaman transforman lain tidak dapat beradaptasi dengan lingkungan.





## PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah S.W.T atas segala rahmat dan karunia – Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Transformasi Gen *SoSPSI* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Apikal Pada Padi *Indica* cv. Inpari 14 SS”. 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 terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr. Sc selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Akademik, Ir. Didik Pudji Restanto, MS.,Ph.D selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian dan bimbingan dalam penulisan skripsi ini;
2. Dra. Dwi Setyati, M.Si dan Dr. rer. nat. Kartika Senjarini selaku dosen penguji atas masukan dan saran guna kesempurnaan penulisan skripsi ini;
3. bapak dan ibu dosen serta seluruh staf di lingkungan FMIPA Universitas Jember, atas segala ketulusan dan keikhlasannya dalam membantu penulis selama masa perkuliahan;
4. kedua orang tua, adik dan keluarga besar yang selalu memberikan semangat dan doa serta segala dukungan kepada penulis demi terselesaikannya skripsi ini;
5. saudara seperjuangan Erwin Dwi Putra, Ega Dimas Saputra, Galih Gumilang dan Chandra Ghandi yang telah memberikan masukan dan semangat selama melaksanakan perkuliahan.
6. saudari seperjuangan Dinda Ayu Lestari, Ratna Rachmasari, Siti Mashita, Erista Octavia dan Novita Niswatun Azizah yang telah memberi motivasi untuk menjadi lebih baik.

7. Keluarga besar sugar group (Frenky, Wimbuh T.W., Novita B., Fadrian R., Eni K., Rizki, Ifan Y., Dina, Ana, Ahmil, Nurul, Kunti, Narita, Warda, Nana, Putri, Qoyim, Almansyah, Firdha, Loly, Halimah, Ryan, Wulan, Retna, Bapak Aswan, Ibu Nia, Ibu Maisaroh, Bapak Fafan), phage team HSA, Melinjo Group, Tekhnisi Group, Lab Mikrobiologi Group;
8. seluruh sahabat seperjuangan Biologi 2010, Biologi 2011, Biologi 2012 dan Biologi 2013 yang telah memberi dukungan dan motivasi;
9. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu dan memberi semangat selama di Universitas Jember.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan karya ilmiah tertulis ini masih terdapat banyak kekurangan, untuk itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi penyempurnaan karya tulis ilmiah ini.

Jember, Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan masalah</b> .....	2
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Kemampuan <i>A. tumefaciens</i> sebagai Vektor Transfer Gen</b> .	4
<b>2.2 Asimilasi Karbon, Biosintesa Sukrosa dan Akumulasi Pati</b>	5
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	9
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	9
<b>3.2 Alat dan Bahan</b> .....	9
<b>3.3 Prosedur Penelitian</b> .....	9
3.3.1 Sterilisasi Eksplan .....	9
3.3.2 Kultur <i>A. tumefaciens</i> GV 3101 dan Konfirmasi Konstruksi Plasmid pCL4 – <i>SoSPSI</i> .....	10
3.3.3 Transformasi <i>A. tumefaciens</i> .....	11
3.3.3.1 Infeksi dan Ko-kultivasi.....	11
3.3.3.2 Eliminasi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	12

3.3.3.3 Seleksi Eksplan <i>Putative</i> Transforman .....	12
3.3.3.4 Analisis DNA Genom Tanaman <i>Putative</i> Transforman .....	12
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Konfirmasi Konstruk Plasmid pCL4 – <i>SoSPS1</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Transformasi Gen <i>SoSPS 1</i> Pada Tanaman Padi .....</b>	<b>15</b>
<b>4.3 Hasil Analisis PCR Tanaman Padi <i>Putative</i> Gen <i>SoSPS1</i> .....</b>	<b>21</b>
<b>4.4 Aklimatisasi Tanaman Padi <i>Invitro</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1 Kesimpulan .....</b>	<b>25</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>25</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>26</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>29</b>

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Transformasi genetik pada tanaman adalah suatu teknik memasukkan gen asing yang diisolasi dari suatu organisme ke dalam genom tanaman (Webb and Morris, 1992). Penggunaan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai vektor untuk transfer gen pada tanaman sudah umum digunakan karena efisiensi penyisipan gen yang stabil, jumlah *copy* gen yang diintegrasikan ke genom tanaman berjumlah sedikit (Nishimura *et al.*, 2006), serta lebih murah dan mudah apabila dibandingkan dengan metode transformasi secara langsung seperti penembakan DNA menggunakan partikel bombardment, mikroinjeksi, dan elektroporasi (Mohammed dan Abalaka, 2011).

*SoSPSI* adalah gen yang menyandikan protein *Sucrose phosphate synthase* (SPS) yang dikloning dari tanaman tebu (Sugiharto *et al.*, 1997). SPS merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman. SPS mengkatalisis reaksi pembentukan *sucrose-6-phosphate* (Suc-6-P) dari *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG). Suc-6-P dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) menghasilkan sukrosa (Buchanan *et al.*, 2000). Sukrosa dalam tanaman memiliki fungsi yang sangat penting, tidak hanya menyediakan energi tetapi juga merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Fung *et al.*, 2003). Sugiharto *et al.*, (1997) melaporkan peningkatan aktivitas SPS melalui transformasi gen *SoSPS 1* berkorelasi positif dengan peningkatan kandungan sukrosa pada tanaman tebu. Potensi gen *SoSPSI* masih dapat dikembangkan, seperti halnya overekspresi SPS bayam ke kapas menunjukkan peningkatan sintesis sukrosa pada daun kapas sehingga meningkatkan kualitas serat dalam lingkungan yang terkontrol (Haigher *et al.*, 2007). Hal ini menjadikan dasar ide bahwa tidak menutup kemungkinan potensi gen *SoSPSI* dikembangkan pada padi *Indica* yang banyak ditanam di Indonesia. Ketika upaya peningkatan akumulasi sukrosa pada padi *Indica*

ini berhasil maka sukrosa akan digunakan untuk meningkatkan metabolisme seluler, biosintesis dinding sel, jalur respirasi ataupun disimpan dalam organ penyimpanan tanaman (Park *et al.*, 2008). Melalui overekspresi gen *SoSPSI* diharapkan terjadi peningkatan biosintesis sukrosa sehingga meningkatkan kandungan sukrosa ke jaringan lain utamanya pada biji padi.

Penelitian saat ini menunjukkan bahwa transformasi menggunakan *A. tumefaciens* pada padi *Indica* masih terdapat kendala apabila menggunakan eksplan kalus. Berbeda dengan padi *Japonica*, kemampuan regenerasi kalus yang rendah pada padi *Indica* mengarah ke rendahnya efisiensi transformasi. Berbagai upaya dilakukan untuk mengembangkan metode transformasi genetik pada tanaman padi *Indica* yang mudah, cepat, dapat diulang, dan dapat digunakan secara rutin (Sahoo *et al.*, 2011). Adapun yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan eksplan yang berbeda seperti eksplan tunas. Manickavasagam *et al.*, (2004) telah berhasil melakukan transformasi menggunakan *A. tumefaciens* pada tunas tanaman tebu. Keberhasilan tersebut memunculkan ide untuk melakukan transformasi pada tunas padi *Indica*. Penggunaan eksplan tunas untuk transformasi genetik melalui *A. tumefaciens* memiliki beberapa keuntungan seperti rendahnya tingkat variasi somaklonal, tanpa menunggu pembentukan kalus (Sugiharto dan Safitri, 2011), jumlah eksplan yang tersedia banyak, dan memungkinkan melakukan infeksi secara intensif (Hazmi *et al.*, 2009).

## 1.2 Rumusan Masalah

Potensi gen *SoSPSI* dapat dikembangkan pada padi *Indica* melalui metode transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens*. *SoSPSI* adalah gen yang menyandikan protein *Sucrose phosphate synthase* (SPS) yang dikloning dari tanaman tebu. SPS merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman. Sukrosa dalam tanaman memiliki fungsi yang sangat penting, tidak hanya menyediakan energi tetapi juga merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Namun,

kemampuan regenerasi kalus yang rendah pada padi *Indica* berpengaruh terhadap efisiensi transformasi. Pengembangan metode transformasi menggunakan eksplan tunas seperti pada tanaman tebu dapat menjadi alternatif untuk diterapkan pada tanaman padi *Indica*.

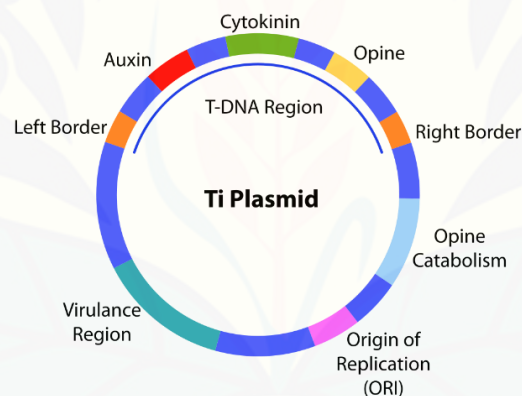
### 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode transformasi padi *Indica* menggunakan eksplan tunas apikal dan vektor *A. tumefaciens* serta mendapatkan tanaman padi *Indica* cv. Inpari 14 SS overekspresi gen *SoSPS1*.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kemampuan *A. tumefaciens* sebagai Vektor Transfer Gen

Kemampuan *A. tumefaciens* sebagai vektor transfer gen pada tanaman diketahui karena kemampuannya untuk mentransfer DNA-nya yang kemudian dikenal sebagai *transfer DNA* (T-DNA) ke dalam genom tanaman yang menyebabkan terbentuknya tumor (*crown gall*) terhadap tanaman dikotil (De la riva *et al.*, 1998). Kemampuan tersebut sangat bermanfaat untuk menyisipkan gen *interest* ke dalam tanaman dengan menggantikan gen yang berperan dalam sintesis hormon (auksin dan sitokinin) dan sintesis opine menjadi gen *interest* yang diinginkan untuk perbaikan sifat tanaman. Peta T-DNA pada *A. tumefaciens* ditunjukkan pada Gambar 2.1.

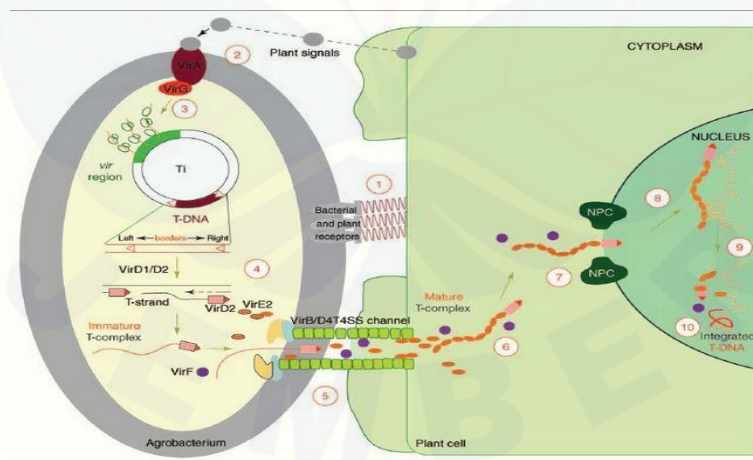


Gambar 2.1 *Tumor inducing* plasmid pada *Agrobacterium tumefaciens* penyebab tumor pada tanaman dikotil. Terdapat T-DNA yang dapat disisipi gen *interest* (Kakkar dan Verma, 2011).

Mekanisme transfer gen *SoSPSI* ke genom tanaman sama dengan proses *A. tumefaciens* mentransformasikan gen pengkode produksi hormon dan opine secara alami. Terdapat tiga komponen yang dimiliki *A. tumefaciens* untuk melakukan transfer DNA. Komponen yang pertama adalah *chromosomal virulence* yang terdapat pada kromosom *A. tumefaciens* dan berfungsi untuk melekatkan bakteri dengan sel tanaman. Komponen yang kedua adalah gen *virulence* yang terletak di sebelah kiri T-



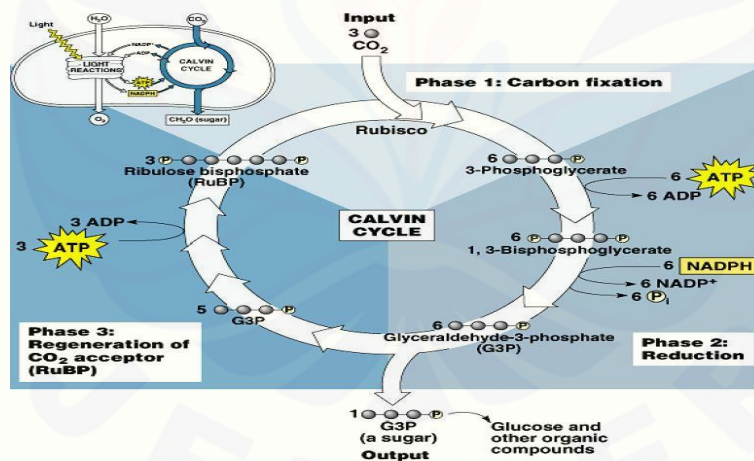
*DNA Border*. Gen *virulence* berperan untuk menginduksi terjadinya transfer dan integrasi DNA ke dalam tanaman. Senyawa kimia yang dikeluarkan oleh tanaman dikotil saat terluka diketahui sebagai inducer yang menyebabkan aktifnya gen *virulence*. Berbeda dengan tanaman monokotil, secara alami *A. tumefaciens* tidak menginfeksi tanaman monokotil. Hal ini dikarenakan tanaman monokotil tidak menghasilkan senyawa inducer yang mengaktifkan gen *virulence*. Namun, pemberian *acetosyringone* mampu menyebabkan *A. tumefaciens* aktif menginfeksi tanaman monokotil (Raineri *et al.*, 1990). Pemberian *acetosyringone* diharapkan dapat menjadikan tanaman padi sebagai *host range* *A. tumefaciens*. Komponen yang ketiga adalah daerah T-DNA yang dibatasi oleh *Left T-DNA Border* dan *Right T-DNA Border*. T-DNA *A. tumefaciens* secara alami menyandikan enzim untuk biosintesis hormon (auksin dan sitokinin) sehingga terbentuk tumor dan gen yang berperan dalam sintesis opine untuk pertumbuhan *A. tumefaciens* (Hiei *et al*, 1997). T-DNA ini dapat dimodifikasi untuk menyisipkan gen *SoSPS1* dan diharapkan terintegrasi pada DNA genom padi *Indica* cv. Inpari 14 SS dan terjadi overekspresi gen *SoSPS1*. Mekanisme transfer gen oleh *A. tumefaciens* secara umum ditunjukkan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Mekanisme transfer gen oleh bakteri *A. tumefaciens* ke dalam sel inang (Zupan *et al.*, 2000).

## 2.2 Asimilasi Karbon, Biosintesa Sukrosa dan Akumulasi Pati

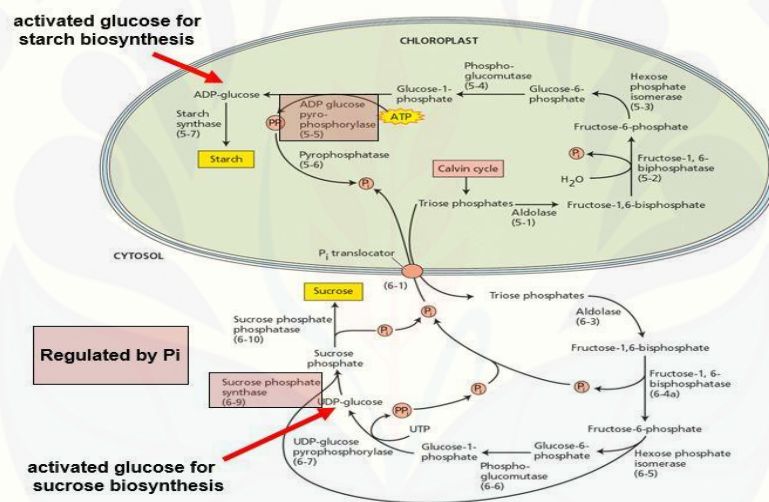
Tanaman padi merupakan tanaman C<sub>3</sub> yang asimilasi karbonnya terjadi di sel mesofil. Jalur asimilasi karbon tanaman C<sub>3</sub> dimulai dari CO<sub>2</sub> yang menautkan diri pada gula berkarbon – lima yang dinamai *ribulosa biphosphate* (RuBP) dan dikatalis oleh RuBP karboksilase atau dikenal dengan nama rubisco. Hasil fiksasi karbon tersebut menghasilkan 2 molekul *3-phosphoglycerate*. Selanjutnya setiap molekul *3-phosphoglycerate* menerima gugus fosfat baru yang ditransfer oleh suatu enzim dari ATP membentuk *1,3-bisphosphoglycerate* sebagai produknya. Tahap selanjutnya sepasang elektron yang disumbangkan dari NADPH mereduksi *1,3-bisphosphoglycerate* menjadi *glyceraldehyde-3-phosphate* (G3P) yang menyimpan lebih banyak energi potensial. Dalam suatu rangkaian reaksi yang rumit, 5 rangka karbon G3P disusun ulang menjadi tiga molekul RuBP dan 1 rangka G3P yang dikeluarkan ke sitosol digunakan sebagai materi awal untuk mensintesis senyawa organik (Campbell *et al.*, 2002). Secara umum proses fiksasi karbon, reduksi dan regenerasi CO<sub>2</sub> pada tanaman C<sub>3</sub> dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Siklus Calvin pada Tanaman C<sub>3</sub> (Campbell *et al.*, 2002).

Pada siang hari, G3P yang dihasilkan dalam siklus Calvin, sebagian digunakan untuk membentuk pati di kloroplas dan ada yang dikeluarkan dari kloroplas untuk membentuk sukrosa di sitosol. Di dalam sitosol, senyawa G3P

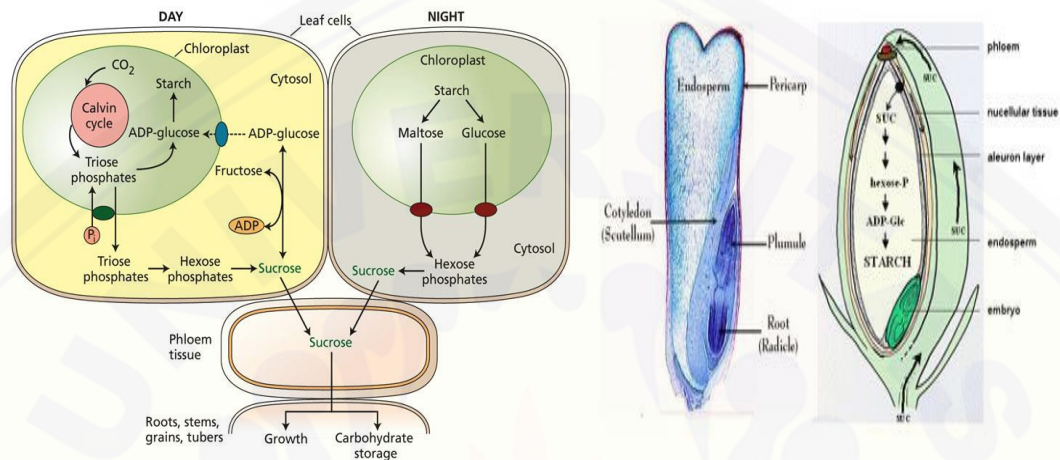
tersebut dikonversi menjadi *fructose-1,6-biphosphate* yang dikatalis oleh *aldolase*. *Fructose-1,6- biphosphate* akan akan dirubah menjadi *fructose-6-phosphate* oleh *fructose 1,6- biphosphatase* yang kemudian hasilnya akan diisomerasikan oleh *hexose phosphate isomerase*. *Fructose-6-phosphate* yang terbentuk sebagian dikonversi menjadi *UDP-glucose* yang merupakan substrat untuk sintesis sukrosa. SPS akan mengkatalis pembentukan *sucrose-6-phosphatase* dari *fructose-6-phosphate* dan *uridine-5-diphospho glucose*. Enzim *sucrose-phosphat phosphatase* akan melakukan pemutusan ikatan *phosphate* dari *sucrose-6-phosphate* sehingga menghasilkan sukrosa dan *phosphate anorganik* ( Taiz and Zeiger, 2010) Proses pembentukan sukrosa dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Proses Pembentukan Sukrosa pada Tanaman C3 ( Taiz and Zeiger , 2010)

Pada malam hari, pati di kloroplas diubah dalam bentuk *maltose* dan *glucose* yang akan diubah menjadi *hexose phosphate* oleh *hexose phosphatase* yang diubah dalam bentuk sukrosa di sitosol (Taiz and Zeiger, 2010). Koch (2004) menyatakan bahwa akan terjadi proses pengangkutan sukrosa dari *source tissue* menuju *sink tissue* melalui floem. Saat di translokasikan ke *sink tissues*, sukrosa digunakan untuk menyediakan energi, merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Fung et

*al.*, 2003), memperbaiki metabolisme seluler, biosintesis dinding sel, untuk respirasi serta dapat diubah dalam bentuk pati untuk disimpan (Park *et al.*, 2008). Proses akumulasi pati ke sink tissue tanaman padi ditunjukkan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Mekanisme Transport Sukrosa dan Akumulasi Pati ke *Sink Tissue* Tanaman Padi (Taiz and Zeiger, 2010)

Tanaman yang telah ditransformasi dengan gen penyandi enzim SPS memiliki laju fotosintesis yang tinggi dibanding tanaman kontrol (Huber and Huber, 1996). Laju fotosintesis yang meningkat berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman serta meningkatkan akumulasi cadangan makanan di *sink tissue*. Melalui overekspresi gen *SoSPS1* diharapkan terjadi peningkatan biosintesis sukrosa sehingga meningkatkan aliran karbon ke jaringan utamanya pada biji padi.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) dan Laboratorium Biologi Dasar FMIPA Universitas Jember mulai bulan Juli 2014 sampai April 2015.

### 3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *laminar air flow* (LAF), penyaring steril, botol kultur, pinset, gunting, cawan petri steril, pisau *scalpel*, pipet, neraca analitis, *magnetic stirrer*, *rotary shaker*, tisu, kertas saring, *aluminium foil*, *beaker glass*, *microwave*, *autoclave*, pH meter, plastik *autoclavable*, kertas label, *gel documentation system* (GELDOC), *nanodrop*, spektrofotometer dan peralatan standart PCR.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain biji tanaman padi *Indica* cv. Inpari 14 SS, biakan bakteri *A. tumefaciens* strain GV 3101 yang mengandung gen *SoSPSI* yang dikonstruksi dalam plasmid pCL4, media *Murashige and Skoog* (MS), media ko-kultivasi, media eliminasi, media seleksi, NAA, Kinetin, media *yeast extract peptone* (YEP), alkohol 70 %, *natrium hipoklorit* (NaClO) 5,25%, *aquadest* steril, standart isolasi dan analisis PCR.

### 3.3 Prosedur Penelitian

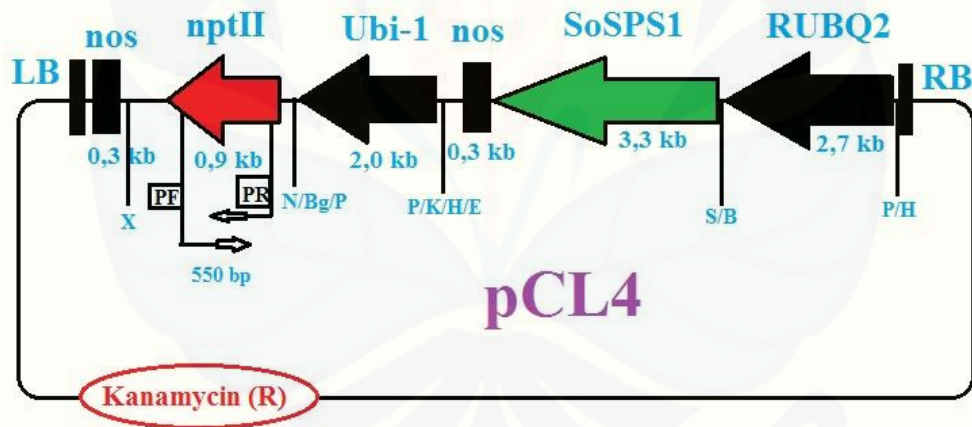
#### 3.3.1 Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi biji dapat dilakukan dengan memisahkan bagian *lemma* dan *palea* (sekam) biji padi *Indica* cv. Inpari 14 SS sehingga didapatkan kariopsis (beras) yang masih memiliki embrio. Biji tersebut di sterilisasi menggunakan alkohol 70 % selama 1 menit, kemudian dibilas menggunakan *aquadest* steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya

biji tersebut dicuci menggunakan NaClO 5,25% selama 1 menit dan dibilas menggunakan *aquadest* sebanyak 3 kali. Biji tersebut kemudian dikering anginkan dengan kertas saring dan ditanam pada media MS selama 5 hari ditempat gelap. Tunas apikal yang terbentuk digunakan sebagai eksplan transformasi. Tunas lateral diperbanyak menggunakan media MS0 (Lampiran A) dengan penambahan NAA 0,5 mgL<sup>-1</sup> dan Kinetin 6 mgL<sup>-1</sup> serta peningkatan sukrosa dari 30g menjadi 50g.

### 3.3.2 Kultur *A. tumefaciens* GV 3101 dan Konfirmasi Konstruk Plasmid pCL4 – *SoSPS1*

*A. tumefaciens* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *A. tumefaciens* strain GV 3101 mengandung *binary vector* plasmid pCL4 yang telah disisipkan gen penyandi enzim *SoSPS1* dibawah kontrol promoter *Rice Ubiquitin 2* (RUBQ2) dan dilengkapi dengan gen penanda *Neomycin Phosphotransferase II* (nptII). Peta konstruk pCL4 ditunjukkan Gambar 3.1



Gambar 3.1 Peta konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1* yang tersusun dalam T-DNA. LB: *left border*, RB: *right border*, nos: *nopaline synthetase gene*, nptII: *neomycin phosphotransferase gene*, Ubi-1: *maize ubiquitin promoter*, *SoSPS1*: *Saccharum officinarum sucrose phosphate synthase gene*, RUBQ2: *rice ubiquitin promoter* (Baskoro, 2012).

*A. tumefaciens* GV 3101 yang mengandung gen *SoSPS1* diambil sebanyak 50 µl dari *gliserol stock* untuk diinokulasikan ke dalam media YEP cair 2 ml (Lampiran

B) yang mengandung antibiotik *rifampicin* 100 mgL<sup>-1</sup>, *kanamycin* 50 mgL<sup>-1</sup>, dan *gentamycin* 12,5 mgL<sup>-1</sup>. Biakan bakteri tersebut diinkubasi dalam shaker 150 rpm selama 24 jam pada suhu 28<sup>0</sup>C. Biakan yang telah ditumbuhkan tersebut selanjutnya diinokulasi dengan metode *streak quadrant* pada media YEP padat yang mengandung antibiotik yang sama dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28<sup>0</sup>C. Koloni tunggal yang diperoleh dikonfirmasi keberadaan konstruk plasmid pCL4 – *SoSPSI* yang diinsersikan pada *A. tumefaciens* sebelum digunakan untuk transformasi.

Konfirmasi keberadaan konstruk plasmid pCL4 – *SoSPSI* dalam *A. tumefaciens* diawali dengan mengkulturkan kembali koloni tunggal dalam media YEP cair 2 ml dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28<sup>0</sup>C. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA plasmid menggunakan metode Sambrook *et al.*, (1989). Pellet DNA hasil isolasi dikeringkan, kemudian dilarutkan dalam 20 µl buffer TE dan diukur konsentrasinya dengan nanodrop. Selanjutnya dilakukan analisis PCR menggunakan primer *nptII* - F (5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3') dan primer *nptII* - R (5'-GTCGCTTGGTCGGTCATTTTCG-3') dengan ukuran 550 bp. Tahapan PCR meliputi pre-denaturasi, denaturasi, *annealing*, elongasi dan *final extention* berturut-turut pada suhu 95<sup>0</sup>C selama 3 menit, 95<sup>0</sup>C selama 30 detik, 58<sup>0</sup>C selama 30 detik, 72<sup>0</sup>C selama 1 menit dan 72<sup>0</sup>C selama 1 menit. DNA hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada 1% gel agarosa yang mengandung 3 µl ethidium bromida. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* sebanyak 3 µl untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat di *gel documentation system*.

### 3.3.3 Transformasi *A. tumefaciens*

#### 3.3.3.1 Infeksi dan Ko – kultivasi

Inokulum *A. tumefaciens* dalam media YEP cair 2 ml yang mengandung antibiotik *rifampicin* 100 mgL<sup>-1</sup>, *kanamycin* 50 mgL<sup>-1</sup>, dan *gentamycin* 12,5 mgL<sup>-1</sup> dituangkan ke dalam YEP 50 ml yang berisi antibiotik sama dan diinkubasi dalam shaker 150 rpm pada suhu 28<sup>0</sup>C hingga mencapai kepadatan populasi pada ABS<sub>600</sub>

=0,6 OD. Infeksi dilakukan dengan memasukkan eksplan tunas apikal yang telah ditusuk – tusuk sebanyak 5 tusukan dengan jarum steril pada pangkal tunas ke dalam 50 ml media YEP cair berisi kultur *A. tumefaciens* dengan penambahan  $100 \text{ mgL}^{-1}$  *acetosyringone*, lalu diinkubasi dalam shaker dengan kecepatan 150 rpm pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit. Setelah 30 menit, eksplan ditiriskan diatas kertas saring steril dan ditanam pada media ko-kultivasi yang bertujuan untuk mengoptimalkan proses infeksi dengan menumbuhkan *A. tumefaciens* bersama dengan eksplan selama 2 hari pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  di tempat gelap.

### 3.3.3.2 Eliminasi *Agrobacterium tumefaciens*

Eliminasi dilakukan setelah 2 hari ditumbuhkan dalam media ko – kultivasi. Tujuan eliminasi adalah untuk menghambat pertumbuhan *A. tumefaciens*. Eksplan dari media ko-kultivasi dicuci dengan larutan *cefotaxime*  $500 \text{ mgL}^{-1}$  sebanyak 3 kali dan dibilas menggunakan *aquadest* steril setiap pencucian eksplan. Eksplan kemudian ditiriskan, kemudian ditanam pada media eliminasi yang telah ditambahkan hormon NAA  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  dan kinetin  $6 \text{ mgL}^{-1}$  serta peningkatan sukrosa dari 30g menjadi 50g. Eksplan diinkubasi selama 7 hari dalam kondisi terang.

### 3.3.3.3 Seleksi Eksplan *Putative* Transforman

Seleksi dilakukan setelah inkubasi 7 hari dalam media eliminasi. Eksplan dipindahkan ke dalam media seleksi (MSO +  $50 \text{ mgL}^{-1}$  kanamycin + *cefotaxime*  $500 \text{ mgL}^{-1}$ ) yang telah ditambahkan hormon NAA  $0.5 \text{ mgL}^{-1}$  dan kinetin  $6 \text{ mgL}^{-1}$  serta peningkatan sukrosa dari 30g menjadi 50g. Tahap seleksi bertujuan untuk memisahkan antara eksplan transforman dan eksplan non-transforman. Tahap seleksi dilakukan sebanyak 5 kali, masing – masing seleksi membutuhkan waktu inkubasi 14 hari dalam ruang inkubasi kultur jaringan pada suhu  $24^{\circ}\text{C}$ . Selanjutnya eksplan yang lolos tahap seleksi ditetapkan sebagai *putative* transforman dan siap untuk di aklimatisasi.



### 3.3.3.4 Analisis DNA Genom Tanaman *Putative* Transforman

. Keberhasilan dari proses insersi suatu gen ke dalam sel tanaman diawali dengan keberhasilan gen tersebut diintegrasikan ke dalam genom tanaman. DNA target yang terintegrasi ke dalam genom tanaman *putative* transforman dapat diuji DNA genomnya dengan cara mengisolasi DNA genom tanaman *putative* transforman tersebut dan menganalisis dengan analisis PCR.

Isolasi DNA genom dapat dilakukan dengan menggerus 0,5 gram daun padi menggunakan nitrogen cair. Serbuk daun padi dimasukkan ke dalam *micro tube* sentrifuge 2 ml yang berisi 1 ml buffer ekstraksi DNA (100 mM Tris, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl yang diatur hingga mencapai pH 8,0), 1,25 µl β- mercaptoethanol dan 50 µl SDS 20%. Campuran larutan dan serbuk tersebut divortex dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit. Langkah selanjutnya dilakukan penambahan 500 µl potasium asetat (5 M) dan di *swirling* serta di inkubasi dalam es selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang dihasilkan ditambah 625 µl isopropanol lalu di *swirling* dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 30 menit - 1 jam. Selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm 10 menit pada suhu 4°C. Pellet ditambah 500 µl buffer TE dan 15 µl RNA-se (*stock* 10 mg/ml) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam.

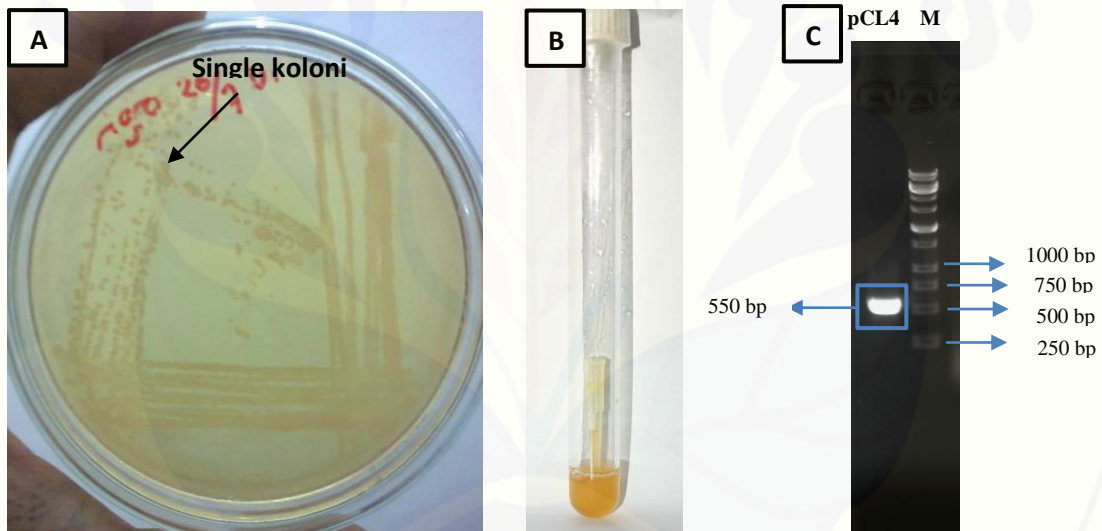
Setelah inkubasi selesai, dilakukan penambahan PCI 500 µl dan divortex serta disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Lapisan atas dipindah ke *micro tube* sentrifuge baru dan ditambah chloroform equal volume. Campuran tersebut divortex dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Lapisan atas dipindah ke *micro tube* sentrifuge baru, ditambah 0,8 kali isopropanol dan 0,2 kali NaAc kemudian di *swirling* dan di inkubasi dalam -20°C selama 1 jam. Selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet ditambah 1 ml ethanol 70% dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet yang dihasilkan dikeringkan dengan *vacum dry* selama 5 menit dan ditambah 35 µl buffer TE. DNA tersebut sebelum di analisis PCR diukur terlebih dahulu kemurniannya menggunakan *nanodrop*.

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan primer *nptII* F/R dengan sekuen sebagai berikut: primer *nptII*-F (5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3'), primer *nptII*-R (5'-GTCGCTTGGTCGGTCATTTTCG-3') dengan ukuran 550 bp. Tahapan PCR meliputi pre-denaturasi, denaturasi, *annealing*, elongasi dan *final extention* berturut-turut adalah pada suhu 95°C selama 3 menit, 95°C selama 30 detik, 58°C selama 30 detik, 72°C selama 50 1 menit dan 72°C selama 1 menit.. DNA hasil PCR kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada 1% gel agarosa. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* sebanyak 3 µl untuk melihat ukuran pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat di *gel documentation system*.

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1. Konfirmasi Konstruk Plasmid pCL4 – *SoSPS1*

Konfirmasi konstruk plasmid pCL4- *SoSPS1* pada *single* koloni *A. tumefaciens* strain GV 3101 diperlukan untuk mendeteksi bahwa pada vektor tersebut telah terinsersi gen target *SoSPS1*. Berdasarkan analisis PCR menggunakan primer *nptII* yang memiliki panjang DNA 550 bp, hasil visualisasi pada gel agarose 1% menunjukkan pita DNA dengan panjang 550 bp (Gambar 4.1). Berdasarkan hasil konfirmasi ini maka *single* koloni *A. tumefaciens* strain GV 3101 dapat digunakan sebagai vektor transformasi karena terbukti telah mengandung gen target *SoSPS1*.



Gambar 4.1. Single koloni *A.tumefaciens* dilakukan uji PCR (A), Kultur *A.tumefaciens* yang akan diisolasi DNA plasmid (B), Hasil elektroforesis gel agarose 1% DNA hasil PCR menggunakan primer F/R *nptII* dan template DNA plasmid *A. tumefaciens* strain GV 3101 (C); (M) DNA marker (1 Kb Ladder).

### 4.2. Transformasi Gen *SoSPS1* Pada Tanaman Padi

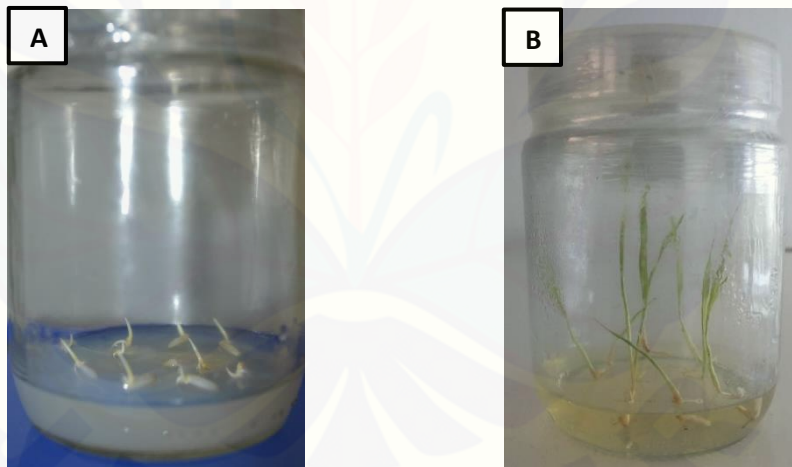
Single koloni *A. tumefaciens* yang telah dikonfirmasi keberadaan gen target *SoSPS1* dengan analisis PCR digunakan untuk transformasi. Hal pertama yang harus

diperhatikan dalam penggunaan kultur bakteri *A. tumefaciens* adalah kepadatan populasi bakteri tersebut. Kepadatan populasi bakteri yang terlalu rendah dapat mengurangi efektivitas transformasi, sedangkan kepadatan populasi bakteri yang terlalu tinggi dapat mengganggu pertumbuhan tanaman (Nishimura *et al.*, 2006). Kepadatan populasi bakteri diketahui melalui pengukuran *optical density* menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Pada transformasi gen *SoSPSI* pada tanaman padi *optical density* *A. tumefaciens* yang digunakan adalah 0,6. Nishimura *et al* (2006) menambahkan bahwa kisaran *optical density* 0,5 – 1,0 pada  $ABS_{600}$  sangat baik digunakan untuk transformasi karena pada kisaran tersebut bakteri berada pada fase logaritmik sehingga mengoptimalkan proses infeksi pada tanaman. Selain itu penggunaan *optical density* 0,5 – 1,0 pada  $ABS_{600}$  mencegah overgrowth *A.tumefaciens*.

Proses infeksi *A. tumefaciens* pada tanaman diawali dengan menyediakan jalur transmisi bakteri ke tanaman. Pelukaan eksplan dan pemberian *acetocyringone* merupakan cara *artificial* untuk mengaktifkan kemampuan transfer gen *A. tumefaciens*. Pada tanaman, keberhasilan transformasi genetik ditunjukkan oleh keberhasilan pertumbuhan tanaman baru yang normal, fertil dan dapat mengekspresikan gen baru hasil insersi (Webb and Morris, 1992). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, metode pelukaan tanaman berpengaruh terhadap keberhasilan transformasi. Hasil optimasi pelukaan eksplan pada proses infeksi *A. tumefaciens* menggunakan tunas apikal tanpa pemotongan bagian epikotil dan dilakukan penusukan jarum sebanyak 5 tusukan menunjukkan gejala pertumbuhan tanaman yang lebih baik (Lampiran C). Hal ini berkaitan dengan morfologi tanaman padi. Masuknya *A. tumefaciens* pada rongga tanaman padi menyebabkan pertumbuhan *A. tumefaciens* tidak terkendali. Infeksi *A. tumefaciens* dapat menyebabkan stress pada tanaman. Selain pelukaan, untuk mengaktifkan kemampuan transfer gen *A. tumefaciens* dilakukan dengan menambahkan senyawa *acetocyringone*. Senyawa *acetocyringone* diketahui sebagai induser yang mampu mengaktifkan gen *virulence* *A. tumefaciens* yang berperan untuk menginduksi

terjadinya transfer dan integrasi DNA ke dalam tanaman (Raineri *et al.*, 1990). Tanaman padi merupakan tanaman monokotil dan tidak memiliki senyawa *acetocyringone* sehingga penambahan  $100 \text{ mgL}^{-1}$  *acetocyringone* diharapkan mampu mengaktifkan *gen virulence A. tumefaciens*. Eksplan yang telah diinfeksi ditanam pada media ko-kultivasi (Gambar 4.2).

Pada tahap ko-kultivasi, eksplan dan *A.tumefaciens* ditumbuhkan bersama – sama pada suhu  $28^{\circ}\text{C}$  dalam keadaan gelap selama 2 hari (Sahoo *et al.*, 2011). Menurut De la Riva (1998) bahwa mekanisme infeksi *A. tumefaciens* pada sel tanaman terjadi dalam keadaan gelap pada suhu optimal *A. tumefaciens* untuk tumbuh yaitu  $28^{\circ}\text{C}$ . Periode ko-kultivasi dapat meningkatkan efisiensi transformasi namun periode ko-kultivasi yang terlalu panjang menyebabkan terjadinya *overgrowth A. tumefaciens*. Pertumbuhan *A.tumefaciens* yang tidak terkendali akan menyebabkan efisiensi transformasi menurun dan mengganggu pertumbuhan tanaman yang berujung pada kematian tanaman.



Gambar 4.2. Eksplan tanaman padi pada media ko-kultivasi (A), Eksplan tanaman padi pada media eliminasi (B).

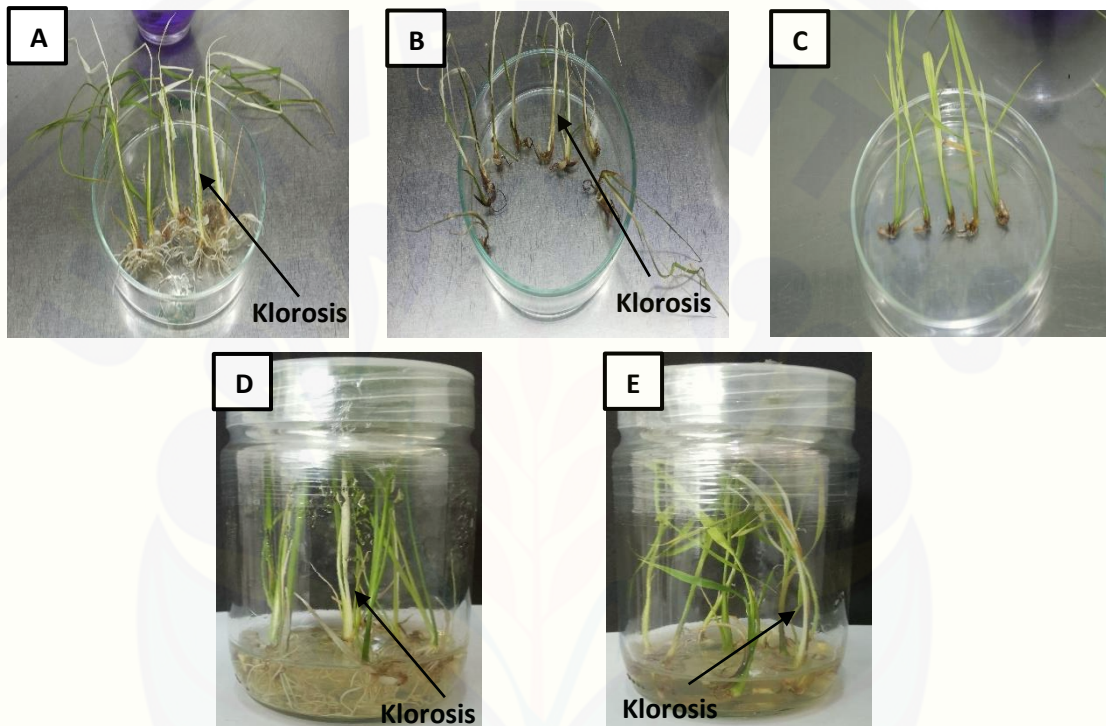
Setelah keluar dari tahapan ko-kultivasi, *A.tumefaciens* di eliminasi menggunakan antibiotik cefotaxime. Cefotaxime merupakan antibiotik yang umum digunakan untuk mengeliminasi bakteri dengan menghambat biosintesis dinding sel

bakteri dalam pembentukan peptidoglikan melalui penonaktifan enzim transpeptidase (Silva dan Fukai, 2001). Dalam penelitian ini penggunaan cefotaxime  $500 \text{ mgL}^{-1}$  mampu menghambat pertumbuhan *A. tumefaciens* yang tidak terkontrol dan tidak mengganggu pertumbuhan tanaman. Pada tahap eliminasi ini mulai digunakan media perbanyak tunas lateral.

Penggunaan sitokinin dan auksin dalam satu media dapat memacu multiplikasi tunas karena ada pengaruh sinergisme Antara zat pengatur tumbuh tersebut (Thorpe, 1987). Pembentukan tunas dapat dipacu dengan memanipulasi dosis auksin dan sitokinin eksogen (Flick *et al.*, 1993), untuk masing – masing kultivar tidak sama. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan optimasi media perbanyak tunas lateral yang telah dilakukan, komposisi media MS0 dengan penambahan NAA  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  dan Kinetin  $6 \text{ mgL}^{-1}$  serta peningkatan sukrosa dari 30g menjadi 50g menunjukkan pembentukan tunas yang lebih baik dibandingkan 9 komposisi media lainnya (Lampiran D). Tunas lateral yang terbentuk banyak dengan media tersebut hal ini dikarenakan kinetin merupakan sitokinin sintetik memacu pembelahan sel dalam jaringan meristematik dan mendorong pertumbuhan tunas samping, sedangkan auksin berperan terhadap pemanjangan sel. Dalam media kultur jaringan pada umumnya digunakan sukrosa 30g, sukrosa ini digunakan sebagai sumber karbon sama halnya hasil fotosintesis tanaman yang nantinya digunakan untuk pertumbuhan tanaman. Peningkatan gula dari 30g menjadi 50g berpengaruh positif terhadap perbanyak jumlah tunas lateral, dan tidak mengganggu pertumbuhan tanaman meskipun kepekatan media menjadi bertambah.

Seleksi tanaman non-transforman dengan putative transforman menggunakan antibiotik kanamycin sebagai *selectable marker* seperti pada konstruk plasmid yang digunakan (Gambar 3.1). Antibiotik kanamycin beracun terhadap tumbuhan, hewan dan fungi. Pada konstruk plasmid pCL4-*SoSPS1*, T-DNA mengandung gen *nptII* yang apabila berhasil diekspresikan oleh promotor *Ubi-1* dalam genom tanaman padi maka enzim yang dikode oleh gen *nptII* akan menginaktivasi kanamycin sehingga padi putative transforman memiliki ketahanan terhadap antibiotik golongan

*aminoglycoside* tersebut. Enzim yang dikode gen *nptII* mengkatalisis fosforilasi ATP-*dependent* gugus 3'-hydroxyl amino-hexose *aminoglycoside* (Nap et al., 1992). Pada penelitian ini tanaman kontrol dan yang telah ditransformasi dipaparkan pada media yang mengandung  $50\text{mgL}^{-1}$  kanamycin, dalam kurun waktu 30 - 40 hari (menuju seleksi ke 3) menunjukkan gejala klorosis seperti pada (Gambar 4.3).



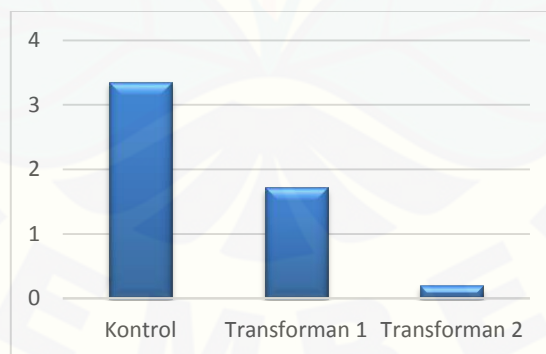
Gambar 4.3. Klorosis pada tanaman kontrol (A), Klorosis pada tanaman non-transforman (B), Tanaman *putative* transforman tidak mengalami klorosis (C), Tanaman kontrol mengalami klorosis tampak dalam botol (D), Tanaman *putative* transforman dan non-transforman dalam media seleksi.

Tanaman yang mengalami klorosis disebabkan karena tanaman tersebut tidak memiliki gen *nptII* sehingga tidak dapat menginaktivasi kanamycin dalam media tersebut. Pada prinsipnya kanamycin menghambat sintesis protein plastid dan mitokondria. Kanamycin berperan sebagai inhibitor, berikatan dengan sub unit 30 ribosomal dan menyebabkan penghambatan inisiasi translasi dan secara otomatis

menghambat sintesis protein (Nap *et al.*, 1992). Sedangkan tanaman putative transforman terinsersi gen *nptII*, apabila gen tersebut terekspresi maka proses sintesis protein akan tetap berlangsung sehingga tanaman tidak mengalami klorosis.

Selain gejala klorosis, pada tanaman yang telah ditransformasi menunjukkan terhambatnya pembentukan akar. Hal ini dapat terjadi karena beberapa hal, kemungkinan pertama komposisi media yang mengandung kinetin  $6 \text{ mgL}^{-1}$  walaupun kinetin berperan dalam perbanyakan tunas lateral, namun kinetin berlawanan dalam pembentukan akar, konsentrasi kinetin eksogen yang tinggi berpengaruh terhadap konsentrasi etilen endogen yang menghambat pembentukan akar (Santoso, 2013).

Pada tanaman yang telah ditransformasi juga tidak menunjukkan pertambahan tunas lateral seperti halnya tanaman non-transforman dengan menggunakan media MS0 dengan penambahan NAA  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  dan Kinetin  $6 \text{ mgL}^{-1}$  serta 50g sukrosa. Hal ini dikarenakan masuknya gen target pada genom tanaman yang tidak dapat diketahui gen target tersebut terintegrasi dalam lokus kromosom yang spesifik, terekspresi positif atau negatif, sehingga berpengaruh terhadap fenotip tanaman (Webb and Morris, 1992). Rata – rata tunas lateral yang terbentuk tanaman putative transforman dan non-transforman disajikan dalam Gambar 4.4.



Gambar 4.4. Rata – Rata tunas lateral yang terbentuk dari tanaman putative transforman dan non-transforman menggunakan MS0 dengan penambahan NAA  $0,5 \text{ mgL}^{-1}$  dan Kinetin  $6 \text{ mgL}^{-1}$  serta 50g sukrosa. Untuk tanaman transforman ditambahkan  $50 \text{ mgL}^{-1}$  kanamycin untuk seleksi.



Pada penelitian ini, transformasi dilakukan sebanyak 2 kali masing – masing merupakan penelitian terpisah. Efektivitas transformasi hingga tahapan seleksi ke-5 dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1. Efektivitas transformasi menggunakan eksplan tunas apikal pada padi indica cv. Inpari 14 SS dan vector *A. tumefaciens* yang mengandung konstruk plasmid pCL4 - *SoSPS1*

T	Persentase dan jumlah planlet tiap tahapan							
	K	E	S1	S2	S3	S4	S5	A
1	100%	100%	98,21%	42,85%	17,85%	7,14%	6,25%	1,78%
	112	112	110	48	20	8	7	2
2	100%	100%	100%	89,42%	69,23%	41,34	9,61%	9,61%
	104	104	104	93	72	43	10	10

**Ket:** T: Transformasi, K: Ko-kultivasi, E: Eliminasi, S: Seleksi, A: Aklimatisasi  
 Jumlah eksplan awal (K) pada transformasi 1 sebanyak 112 dan transformasi 2 sebanyak 104.

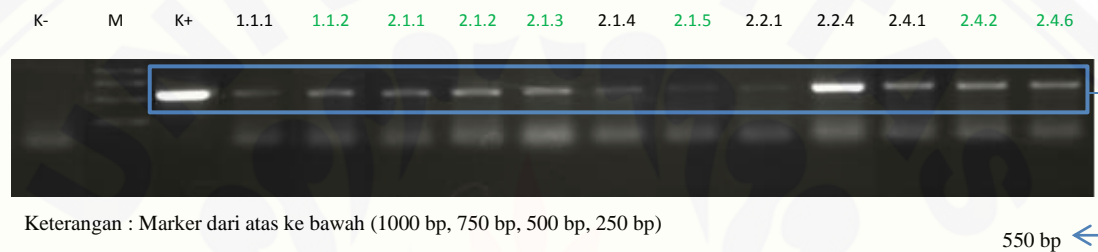
Berdasarkan tabel di atas, persentase planlet padi putative transforman yang mampu bertahan selama 5 periode seleksi yaitu 6,25% (7 planlet) dari 112 planlet pada transformasi pertama dan 9,61% (10 planlet) dari 104 planlet pada transformasi kedua.

Planlet hasil seleksi 5 (*putative* transforman) selanjutnya di aklimatisasi sebelum di analisis PCR. Selama aklimatisasi 5 planlet transforman hasil transformasi pertama mati.

#### 4.3. Hasil Analisis PCR Tanaman Padi *Putative* Gen *SoSPS1*

. Keberhasilan dari proses insersi suatu gen ke dalam sel tanaman diawali dengan keberhasilan gen tersebut diintegrasikan ke dalam kromosom tanaman. Untuk

mengetahui keberhasilan proses integrasi tersebut pada tanaman target dapat dilacak dengan menggunakan analisis PCR. Berdasarkan analisis PCR tanaman putative transforman menggunakan primer *nptII*, 1,78% (2 Planlet) transformasi pertama dan 9,61% (10 planlet) transformasi kedua positif mengandung gen *SoSPS1*. 5 planlet putative transforman dari transformasi pertama belum dilakukan analisis PCR, mati saat di subkultur di media ½ MS (perakaran). Hasil Analisis PCR Padi Putative transforman disajikan dalam gambar 4.5.



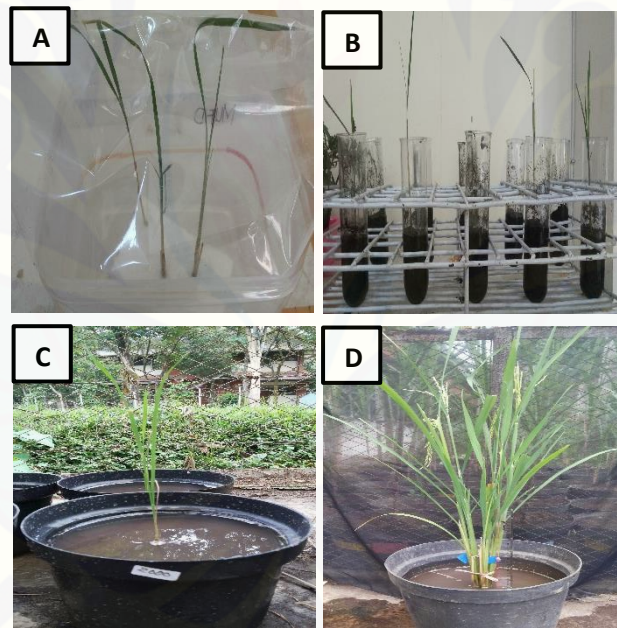
Gambar 4.5. Hasil elektroforesis gel agarose 1% DNA hasil PCR menggunakan primer F/R *nptII* dan template DNA genom padi; M: DNA marker (1 Kb *Ladder*); (K+) = kontrol positif; (K-) = tanaman kontrol non-transforman.

Keberadaan fragment DNA *nptII* sebesar 550bp hasil PCR menunjukkan integrasi konstruk plasmid pCL4 - *SoSPS1* pada genom tanaman padi sehingga dapat dikatakan sebagai tanaman padi transforman.

#### 4.4. Aklimatisasi Tanaman Padi *In-vitro*

Aklimatisasi dilakukan untuk mengadaptasikan tanaman *in-vitro* dengan kondisi lingkungan luar. Beberapa hal yang diperhatikan saat aklimatisasi meliputi unsur hara, kelembapan lingkungan, suhu lingkungan, dan serangan hama. Pada awal aklimatisasi digunakan media ½ MS cair tanpa penambahan gula dan vitamin (myo-inositol, tymin, dan pyridoxine). Hal ini untuk mengadaptasikan tanaman padi *in-vitro* dari media kaya nutrisi ke lingkungan yang sedikit nutrisi. Pengurangan unsur hara juga ditujukan untuk menumbuhkan akar.

Menurut (Tyas dkk., 2013) Penggunaan media  $\frac{1}{2}$  MS menyebabkan tanaman *in-vitro* tumbuh lambat, pembentukan daun dan panjang tunas menurun, sedang pembentukan dan pemanjangan akar meningkat sebagai sarana penyerapan hara. Pada media  $\frac{1}{2}$  MS cair ini tidak ditambahkan gula karena gula merupakan sumber kontaminasi. Untuk mengadaptasikan kelembapan lingkungan, tanaman *in-vitro* sebelum di kondisikan di lingkungan luar disungkup dengan plastik terlebih dahulu dan dilubangi dengan perforator (sebanyak 3 lubang) setiap hari dilihat dan dilubangi (1 lubang) selama 7 hari. Untuk mengadaptasikan suhu, tanaman padi *in-vitro* ditempatkan dalam growth chamber pada suhu  $26^{\circ}\text{C} - 32^{\circ}\text{C}$  pada 1 siklus (1 hari). Kondisi tanaman padi yang telah berhasil diaklimatisasi dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5. Tanaman padi *in-vitro* diaklimatisasi pada media  $\frac{1}{2}$  MS Cair tanpa penambahan gula dan vitamin (A), diadaptasikan pada media tanah (B), ditempatkan di greenhouse (C), memasuki fase generative (D).

Hasil aklimatisasi dari 12 tanaman padi transforman dari transformasi pertama dan kedua, 7 tanaman yang dapat bertahan, 5 tanaman transforman mati. Kematian tanaman transforman dikarenakan tidak dapat beradaptasi dengan lingkungan.



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil transformasi gen *SoSPS1* menggunakan vektor *A. tumefaciens* dan eksplan tunas apikal pada padi *Indica* cv. Inpari 14 SS diperoleh padi yang positif gen *SoSPS1* sebanyak 2 tanaman pada transformasi pertama dan 10 tanaman untuk transformasi kedua. Efektivitas transformasi gen *SoSPS 1* menggunakan konstruk plasmid *pCLA-SoSPS 1* yang dikendalikan promoter *RUBQ2* pada tanaman padi transforman gen *SoSPS 1* pertama sebesar 1,78% dan untuk transformasi kedua 9,61%. Hasil aklimatisasi menunjukkan dari 12 tanaman transforman gen *SoSPS1* hanya 7 tanaman yang dapat dikondisikan di kondisi lingkungan, sedangkan 5 tanaman transforman lain tidak dapat beradaptasi dengan lingkungan.

### 5.2 Saran

Perlu dilakukan analisis fisiologi pada tanaman padi transforman dan analisis protein *SoSPS1* untuk melihat gen *SoSPS 1* terekspresi pada genom tanaman.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Buchanan, B. B., W. Gruissem, dan R. L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologist.
- Baskoro, A. 2012. Efektifitas Transformasi Gen SoSPS1 Menggunakan Vektor Plasmid pCL4 dan Eksplan Tunas Lateral Tebu (*Saccharum officinarum* L.). Jember: Universitas Jember
- Campbell, N. A., J.B. Reece, dan L.G. Michell. 2002. *Biology*. Disadur oleh Safitri, A., L.Simamarta, dan H.W.Hardani. Biologi. 2002. Jakarta: Erlangga
- De la Riva, G. A., J. Gonzalez Cabera, R. Vazquez Padron dan C. Ayra-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens* : A Natural Tool for Plant Transformation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*.
- Flick, C.E.,D. A. Evans, and W.R. Sharp. 1993. Organogenesis. Handbook of Plant Cell Culture Collier Macmillan. Publisher London. P. 13-81.
- Fung, R.W.M., Langenkamper, G., Gardner, R.C., dan MacRae, E. 2003. Differential expression within an SPS gene family. *Plant Sci*. 164: 459-470.
- Haigler, C.H., B.Singh, Zhang, D., Hwang, S., Wu Chunfa, Wendy, X.C., Hozain, M., Kang, W., Kiedaisch, B.,Strauss, E.R, Hequet, F.E., Bobby, G.W., Jividen, M.G., and Scott Holaday. 2007. Transgenic Cotton Over-producing Spinach Sucrose Phosphate Synthase Showed Enhanced Leaf Sucrose Synthesis and Improved Fiber Quality Under Controlled Environmental Conditions. *Plant Mol Biol*. 63: 815-832.
- Hazmi, M., Iskandar, S., Sumitro, B., dan B. Sugiharto. 2009. Studi Penggunaan Pangkal Tunas Tebu Sebagai Eksplan Transformasi DNA dengan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. *Berk. Penel. Hayati*.Vol. 3: 81-85.
- Hiei Y, T. Komari, T. Kubo. 1997. Transformation of Rice Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol*. 35:205-218.
- Huber, S. C dan J. L. Huber. 1996. Role and Regulation of Sucrose Phosphate Synthase In Higher Plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. Vol. 47: 431 – 444.

- Kakkar, A dan V.K Verma. 2011. *Agrobacterium Mediated Biotransformation. Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 1 (7): 29-35
- Koch, Karen. 2004. Sucrose Metabolism: Regulatory Mechanisms and Pivotal Roles in Sugar Sensing and Plant Development. *Elsevier Science*. 7:235-246.
- Manickavasagam M., Ganapathi, A., Anbazhagan, V.R., Sudhakar, B., Selvaraj, N. A., Vasudevan, A., dan Kasthuriengan, S. 2004. *Agrobacterium Mediated Genetic Transformation and Development of Herbicide Resistant Sugarcane (Saccharum species hybrids) Using Axillary Buds. Plant Cell. Rep.* 23: 134–143.
- Mohammed dan Abalaka. 2011. *Agrobacterium Transformation: A Boost to Agricultural Biotechnology. Journal of Medical Genetics and Genomics*. Vol. 3 (8): 126-130
- Nap, P. J., J. Bijvoet and W. J. Stiekema. 1992. Biosafety of Kanamycin-Resistant Transgenic Plants. *Transgenic Research*. Vol. 1: 239-249.
- Nishimura, A., Aichi, I., and Matsuoka, M. 2006. A Protocol for *Agrobacterium* – mediated Transformation in Rice. *Nature Protocols*. Vol. 1
- Park, J.Y., Canam, T., Kang, K.Y., Ellis, D.D., and Mansfield, S.D. 2008. Over-Expression of Arabidopsis Family A Sucrose Phosphate Synthase (SPS) Gene Alters Plant Growth and Fibre Development. *Transgenic Res.* 17: 181-192.
- Raineri, D. M., Bottino, P., Gordon, M.P., dan E. W. Nester. 1990. *Agrobacterium-Mediated Transformation of Rice (Oryza sativa L.)*. *Biotechnology* 8: 33 - 38.
- Sahoo, K., Tripathi, K., Pareek, A., Sopory, K., and Singla, L. 2011. An Improved Protocol for Efficient Transformation and Regeneration of Diverse Indica Rice Cultivars. *Plant Methods* 7:49
- Sambrook, J., E. F. Fritsch dan T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> Edition*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santoso, B. 2013. *Zat pengatur Tumbuh dalam Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman*. Universitas Sam Ratulangi.
- Silva, T and Fukai. 2001. The Impact of Carbenecillin, Cefotaxime and Vancomycin on Chrysanthemum and Tobacco TCL Morphogenesis and *Agrobacterium* Growth. *J.Appl.Hort*. Vol. 3 (1): 3-12.

- Sugiharto, B., Sakakibara, H., Sumadi, dan T. Sugiyama. 1997. Differential Expression of Two Genes for Sucrose Phosphate Synthase in Sugarcane: Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. *Plant Cell Physiol.* Vol. 38: 961-965.
- Taiz, L., and Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology: Fifth Edition.* Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Thorpe, T.A. 1987. Micropropagation of softwood and hard woods. Proceeding of the Seminar on Tissue Culture of Forest Species. Kuala lumpur, 15-18 Juni.
- Tyas, K.N., Susanto, S., Dewi, I.S., dan Khumaida, N. 2013. Konservasi *In Vitro* Pamelu (*Citrus maxima* (Burm.) Merr) *Using Slow Growing Method.* J Agron. 41(1): 32 -39.
- Webb, K. J. and Morris, P. 1992. Methodologies of Plant Transformation, In: Gatehouse, A. M. R., Hilder, V.A and Boulter, D. (ed). *Plant Genetic Manipulation For Crop Protection.* C A B International. United Kingdom
- Zupan, J., Theodore, T., Draper, O., and Zambryski. 2000. The Transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into Plants: A Feast of Fundamental. *The Plant Journal* 23(1), 11-28



**LAMPIRAN A**

A. Komposisi Media Murashige and Skoog (MS)

Larutan Stok	Bahan	Jumlah (g/L)	Pengambilan (ml/L)
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,5	20
B	KNO <sub>3</sub>	95	20
C	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	88	5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,24	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	34	
D	CoCl <sub>2</sub>	0,0052	5
	Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,05	
	KI	0,166	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	74	
E	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,72	5
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0052	
	MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3,01	
F	Na <sub>2</sub> EDTA	7,44	5
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5,56	
Vitamin	Myo-inositol	0,001	5
	Pyridoxin	0,004	
	Tymin	0,0004	
	Sukrosa	30	
	Phytigel	2,5	

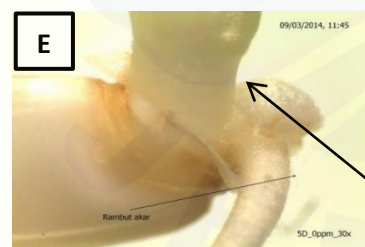
**LAMPIRAN B**

A. Komposisi Media Yeast Extract Pepton (YEP)

Bahan	Jumlah (g/L)
Ekstrak Yeast	10
Pepton	10
NaCl	5
Agar Bakteriologi	14

LAMPIRAN C

- A. Uji Pendahuluan Pertumbuhan Planlet dengan Metode Pelukaan Menggunakan Eksplan Tunas Apikal dan Tunas Lateral Pada Proses Infeksi *Agrobacterium tumefaciens*



perbatasan pangkal batang dan akar ditusuk (5 tusukan).

Keterangan : Pertumbuhan terbaik pada gambar (D), Menggunakan metode pelukaan dengan 5 tusukan pada pangkal batang tunas apikal tanpa pemotongan bagian epikotil tanaman.

LAMPIRAN D

A. Hasil optimasi pengaruh komposisi media terhadap pembentukan tunas lateral

<u>Perlakuan</u>	<u>Kode</u>	<u>Ulangan</u>							<u>TOTAL</u>
		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	
MS0 S30	A	0	0	1	0	0	0	0	1
MS0 1 mgL <sup>-1</sup> NAA S30	B	0	2	0	0	1	0	0	3
MS0 2 mgL <sup>-1</sup> NAA S30	C	0	0	0	2	0	0	0	2
MS0 3 mgL <sup>-1</sup> NAA S30	D	0	0	0	0	0	0	0	0
MS0 2 mgL <sup>-1</sup> KN S30	E	2	2	0	1	2	2	0	9
MS0 4 mgL <sup>-1</sup> KN S30	F	0	2	0	2	2	2	0	8
MS0 6 mgL <sup>-1</sup> KN S30	G	5	0	0	1	3	4	4	17
MS0 1NAA +2KN S30	H	2	1	2	1	1	2	1	10
MS0 3NAA +6KN S30	I	2	2	2	0	2	3	1	12
MS0 0.5NAA + 6KN S50	J	3	3	3	1	6	8	3	27
<b>TOTAL</b>		14	12	8	8	17	21	9	<b>89</b>

B. Tabel Anova perbandingan F. hitung dan F. Tabel

<b>TABEL ANOVA</b>					
<u>Sumber Variansi</u>	<u>db</u>	<u>JK</u>	<u>KT</u>	<u>F.HITUNG</u>	<u>F. TABEL 0.05</u>
<u>Ulangan</u>	6	69.56	11.59	8.09	2.27
<u>Perlakuan</u>	9	28.94	3.22	2.25	2.06
<u>Galat</u>	54	77.34	1.43		
<b>Total</b>	69	175.84			

C. Uji Duncan Taraf Nyata 5%

<u>Perlakuan</u>	<u>Rerata</u>		<u>Beda</u>								<u>p</u>	<u>SSR</u>	<u>LSR</u>
	<u>(x)</u>	<u>(x-D)</u>	<u>(x-A)</u>	<u>(x-C)</u>	<u>(x-B)</u>	<u>(x-F)</u>	<u>(x-E)</u>	<u>(x-H)</u>	<u>(x-I)</u>	<u>(x-G)</u>			
J (a)	3.86	3.86*	3.71*	3.57*	3.43*	2.71*	2.57*	2.43*	2.14*	1.43	10	3.34	1.50
G (ab)	2.43	2.43*	2.29*	2.14*	2.00*	1.29	1.14	1.00	0.71		9	3.31	1.49
I (bc)	1.71	1.71*	1.57*	1.43	1.29	0.57	0.43	0.29			8	3.28	1.48
H (bcd)	1.43	1.43	1.29	1.14	1.00	0.29	0.14				7	3.25	1.46
E (bcd)	1.29	1.29	1.14	1.00	0.86	0.14					6	3.20	1.44
F (bcd)	1.14	1.14	1.00	0.86	0.71						5	3.15	1.42
B (cd)	0.43	0.43	0.29	0.14							4	3.08	1.39
C (cd)	0.29	0.29	0.14								3	2.98	1.34
A (d)	0.14	0.14									2	2.84	1.28
D (d)	0.00												

Keterangan: Angka yang diberi tanda (\*) menunjukkan beda nyata uji Duncan pada taraf nyata 5%.