

Transformasi Gen SoSPS1 Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Apikal Padi *Indica* cv. Inpari 14 SS

(SoSPS1 Gene Transformation Using *Agrobacterium tumefaciens* Vector and Shoot Apex Explant of *Indica* Rice cv. Inpari 14 SS)

Derta Bagus Rivan Satria¹, Bambang Sugiharto^{1*}, Didik Pudji Restanto²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember (UNEJ)

²Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember (UNEJ)

Jln. Kalimantan 37, Jember 68121

E-mail: sugiharto.fmipa@unej.ac.id

Abstrak

Potensi gen *SoSPS1* dapat dikembangkan pada padi *Indica* melalui metode transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens*. *SoSPS1* 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 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 *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.

Kata Kunci: Transformasi, Gen *SoSPS1*, Vektor *Agrobacterium tumefaciens*, Eksplan tunas apikal, Padi *Indica*

Abstract

SoSPS1 gene potential can be developed in *Indica* rice through transformation method using *A. tumefaciens*. *SoSPS1* is a gene that encode *sucrose phosphate synthase* (SPS) proteins from sugarcane. SPS is an enzyme figure in *sucrose biosynthesis* in plants. *Sucrose* in plants having very important functions, not only providing energy but also as a growth stimulate and plants development. But, the ability of a callus regeneration impact on efficiency of transformation. The development method of the transformation using shoot explant on sugarcane becomes an alternative to be applied to *Indica* rice. The methodology that was done in this research include preparation of the explants, the culture of *A. tumefaciens*, isolation of plasmid DNA and confirming gene of interest, infection *A. tumefaciens*, co-cultivation, elimination *A. tumefaciens*, *putative* transforman plant selection, isolation of *putative* transforman plant DNA genome, acclimatization and PCR analysis. Based on *SoSPS1* gene transformation using *Agrobacterium tumefaciens* vector and shoot apex explant of *Indica* rice cv. Inpari 14 SS Obtained 2 *SoSPS1* GMO rice from first transformation and 10 *SoSPS1* GMO rice from second transformation.

Keywords: Transformation, *SoSPS1* gene, *Agrobacterium tumefaciens* vector, Shoot Apex Explant, *Indica* Rice.

PENDAHULUAN

Transformasi genetik pada tanaman adalah suatu teknik memasukkan gen asing yang diisolasi dari suatu organisme ke dalam genom tanaman [19]. 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 [10], serta lebih murah dan mudah apabila dibandingkan dengan metode transformasi secara langsung seperti penembakan DNA menggunakan partikel bombardment, mikroinjeksi, dan elektroporasi [8].

SoSPS1 adalah gen yang menyandikan protein *Sucrose phosphate synthase* (SPS) yang dikloning dari tanaman tebu [17]. 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 [1]. Sukrosa dalam tanaman memiliki fungsi yang sangat penting, tidak hanya menyediakan energi tetapi juga merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman [4]. Sugiharto *et al.* [17], melaporkan peningkatan aktivitas SPS melalui transformasi gen *SoSPS1* berkorelasi positif dengan peningkatan kandungan sukrosa pada tanaman tebu. Potensi gen *SoSPS1* 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 [5]. Hal ini menjadikan dasar ide

bahwa tidak menutup kemungkinan potensi gen *SoSPS1* 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 [11]. Melalui overekspresi gen *SoSPS1* 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 [12]. Adapun yang dapat dilakukan adalah dengan menggunakan eksplan yang berbeda seperti eksplan tunas. Manickavasagam *et al.* [7], 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 [16], jumlah eksplan yang tersedia banyak, dan memungkinkan melakukan infeksi secara intensif [6].

METODE PENELITIAN

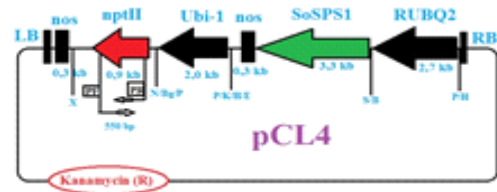
Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember mulai bulan Juli 2014 sampai April 2015

Sterilisasi Eksplan

Sterilisasi biji dapat dilakukan dengan memisahkan bagian *lemma* dan *palea* (sekam). Biji tersebut di sterilisasi menggunakan alkohol 70 % selama 1 menit, 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.

Kultur *A. tumefaciens* GV 3101 dan Konfirmasi Konstruksi 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 konstruksi pCL4 ditunjukkan Gambar 1.



Gambar 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 [2].

A. tumefaciens GV 3101 yang mengandung gen *SoSPS1* dikulturkan ke dalam media YEP cair 2 ml yang mengandung antibiotik rifampicin 100 mgL⁻¹, kanamycin 50 mgL⁻¹, dan gentamycin 12,5 mgL⁻¹. Biakan bakteri tersebut diinkubasi dalam shaker 150 rpm selama 24 jam pada suhu 28°C. Kultur bakteri diisolasi berdasarkan metode Sambrook *et al.* [13]. DNA plasmid yang dihasilkan dilarutkan dalam buffer TE. DNA diamplifikasi dengan alat PCR dan dikonfirmasi dengan elektroforesis gel agarosa, selanjutnya divisualisasi dengan *Gel Documentation System*.

Transformasi gen *SoSPS1* Menggunakan Vektor *A. tumefaciens* dan Eksplan tunas Apikal Padi *Indica*

Starter *A. tumefaciens* GV3101 yang mengandung konstruk pCL4-*SoSPS1* sebanyak 2 ml disubkultur dalam media YEP cair 50 ml yang mengandung antibiotik penyeleksi Kanamycin 50 mgL⁻¹, Rifampicin 100 mgL⁻¹, dan Gentamycin 12,5 mgL⁻¹, diinkubasi shaker 150 rpm pada suhu 28°C hingga kepadatan sel (OD₆₀₀) mencapai 0,6.

Eksplan tunas apikal ditusuk sebanyak 5 tusukan dengan jarum steril dibagian pangkal tunas. Setelah itu eksplan diinfeksi dengan cara direndam pada media YEP cair 50 ml yang berisi kultur *A. tumefaciens* dengan penambahan 100 mgL⁻¹ *acetosyringone* dan di shaker dengan kecepatan 150 rpm, suhu 28°C, pada kondisi gelap, selama 30 menit. Eksplan hasil inkubasi disaring dan ditanam pada media kokultivasi selama 2 hari.

Eksplan setelah memasuki tahap kokultivasi selanjutnya dicuci terlebih dahulu dengan *cefotaxime* 500 mgL⁻¹ dan 200 ml *aquades*. Penanaman eksplan lalu dilakukan pada media eliminasi yang terdiri dari MS(sukrosa 50g) + *cefotaxime* 500 mgL⁻¹ + NAA 0,5 mgL⁻¹ dan kinetin 6 mgL⁻¹ dan diinkubasi pada kondisi terang selama 7 hari. Penambahan hormon NAA 0,5 mgL⁻¹ dan kinetin 6 mgL⁻¹ serta penggunaan sukrosa 50g dilakukan untuk memperbanyak tunas lateral, metode ini berdasarkan hasil optimasi media sebelumnya (data tidak ditampilkan).

Tahapan seleksi dilakukan dalam kurun waktu 5 siklus, inkubasi masing-masing siklus selama 14 hari pada kondisi

terang pada media MS(sukrosa 50g) + cefotaxime 500 mgL⁻¹ + Kanamycin 50 mgL⁻¹ + NAA 0,5 mgL⁻¹ dan kinetin 6 mgL⁻¹. Tanaman padi yang lolos sampai seleksi ke 5 disebut sebagai tanaman padi putatif transforman.

Analisis DNA Genom *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. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya menggunakan *nano vue plus* dan kemudian dianalisis PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

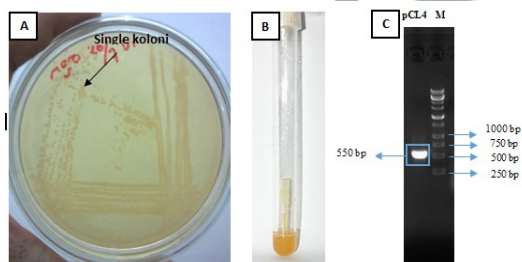
Analisis PCR dilakukan untuk deteksi keberadaan gen target yang telah terinsersi ke dalam genom tanaman. PCR dilakukan menggunakan sepasang primer *nptII* (*neomycin phosphotransferase II*) *nptII*-F (5'-GTCATCTCACCTTGC TCCTGCC-3') dan *nptII*-R (5'-GTCGCTTGGTCGGTC ATTTTCG-3').

DNA yang sudah diamplifikasi selanjutnya dipisahkan dengan agarose gel 1% elektroforesis yang mengandung 1,5µl EtBr (Ethidium Bromide) dengan tegangan 100 Volt selama 25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 kb Ladder sebanyak 3µl. Hasil elektroforesis dilihat dan didokumentasikan menggunakan alat *Gel Documentation System*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Konfirmasi Konstruk 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 2). 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 2. *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).

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 [10]. Kepadatan populasi bakteri diketahui melalui pengukuran *optical density* menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Pada transformasi gen *SoSPS1* pada tanaman padi *optical density* *A. tumefaciens* yang digunakan adalah 0,6. Nishimura et al. [10], menambahkan bahwa kisaran *optical density* 0,5 – 1,0 pada ABS₆₀₀ 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 ABS₆₀₀ mencegah overgrowth *A. tumefaciens*.

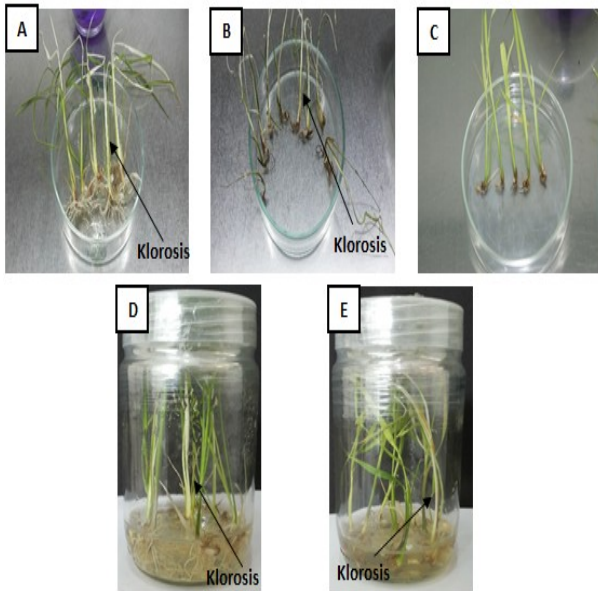
Proses infeksi *A. tumefaciens* pada tanaman diawali dengan menyediakan jalur transmisi bakteri ke tanaman. Pelukaan eksplan dan pemberian *acetocyringone* merupakan cara *artificial* untuk mengaktifkan kemampuan transfer gen *A. tumefaciens*. Tanaman padi merupakan tanaman monokotil dan tidak memiliki senyawa *acetocyringone*. Penambahan 100 mgL⁻¹ *acetocyringone* mampu mengaktifkan gen *virulence* *A. tumefaciens*.

Pada tahap ko-kultivasi, eksplan dan *A. tumefaciens* ditumbuhkan bersama – sama pada suhu 28°C dalam keadaan gelap selama 2 hari [12]. Menurut De la Riva et al. [3], bahwa mekanisme infeksi *A. tumefaciens* pada sel tanaman terjadi dalam keadaan gelap pada suhu optimal *A. tumefaciens* untuk tumbuh yaitu 28°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.

Setelah keluar dari tahapan ko-kultivasi, *A. tumefaciens* dieliminasi 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 [15]. Dalam penelitian ini penggunaan cefotaxime 500 mgL⁻¹ mampu menghambat pertumbuhan *A. tumefaciens* yang tidak terkendali dan tidak mengganggu pertumbuhan tanaman.

Seleksi tanaman non-transforman dengan *putative* transforman menggunakan antibiotik kanamycin sebagai *selectable marker* seperti pada konstruk plasmid yang digunakan (Gambar 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* [9]. Pada penelitian ini tanaman kontrol dan yang telah ditransformasi (anakan / tunas lateral) dipaparkan pada media yang mengandung 50mgL⁻¹ kanamycin, dalam kurun waktu 30 - 40 hari (menuju seleksi ke 3) menunjukkan gejala seperti pada (Gambar 3)

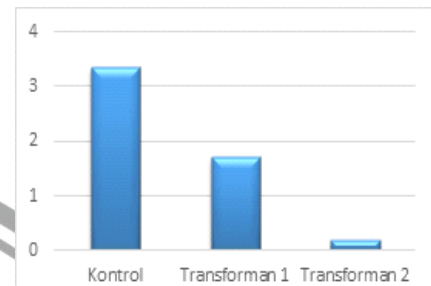


Gambar 3. Klorosis pada tanaman kontrol (A), Klorosis pada tanaman non-transforman (B), Tanaman *putative* transforman tidak mengalami klorosis (C), Tanaman kontrol mengalami klorosis tampak dalam botol (D), Tanaman *putative* transforman dan non-transforman dalam media seleksi.

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 [9]. 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 mgL⁻¹ walaupun kinetin berperan dalam perbanyakannya tunas lateral, namun kinetin berlawanan dalam pembentukan akar, konsentrasi kinetin eksogen yang tinggi berpengaruh terhadap konsentrasi etilen endogen yang menghambat pembentukan akar [14].

Pada tanaman yang telah ditransformasi juga tidak menunjukkan pertumbuhan tunas lateral seperti halnya tanaman non-transforman dengan menggunakan media MS0 dengan penambahan NAA 0,5 mgL⁻¹ dan Kinetin 6 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 [19]. Rata – rata tunas lateral yang terbentuk tanaman *putative* transforman dan non-transforman disajikan dalam Gambar 4.



Gambar 4. Rata – Rata tunas lateral yang terbentuk tanaman *putative* transforman dan non-transforman menggunakan MS0 dengan penambahan NAA 0,5 mgL⁻¹ dan Kinetin 6 mgL⁻¹ serta 50g sukrosa.

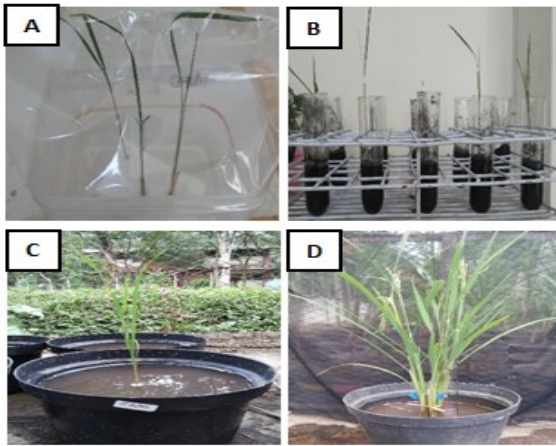
Tanaman yang lolos dari media seleksi dapat disebut sebagai tanaman *putative* transforman. Pada transformasi I dengan jumlah eksplan awal sebanyak 112 eksplan, terdapat 7 eksplan yang lolos dari media seleksi. Pada transformasi II dengan jumlah eksplan awal sebanyak 104 eksplan, terdapat 10 eksplan yang lolos dari media seleksi. Jumlah total tanaman putatif transforman sebanyak 17 tanaman. Selanjutnya pada tanaman putatif transforman tersebut dilakukan isolasi DNA genom sebagai *template* dalam analisis PCR.

Aklimatisasi dan Analisis PCR Tanaman Padi *putative* SoSPS1

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.* [18], Penggunaan media ½ 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 ½ 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 °C – 32°C pada 1 siklus (1 hari). Kondisi tanaman padi yang telah berhasil diaklimatisasi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Tanaman padi *in-vitro* diaklimatisasi pada media ½ MS Cair tanpa penambahan gula dan vitamin (A), diadaptasikan pada media tanah (B), ditempatkan di greenhouse (C), memasuki fase generative (D).

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, 2 Planlet transformasi pertama dan 10 planlet transformasi kedua positif mengandung gen SoSPS1.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Berdasarkan hasil tranformasi 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.

Saran

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

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Masterplan Percepatan dan Perkembangan Pembangunan Ekonomi Indonesia (MP3EI) yang telah memberikan dukungan

finansial atas nama Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr., Sc, tahun 2014.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Buchanan, B. B., W. Gruissem, dan R. L. Jones. 2000. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologist.
- [2] Baskoro, A. 2012. Efektifitas Transformasi Gen *SoSPS1* Menggunakan Vektor Plasmid pCL4 dan Eksplan Tunas Lateral Tebu (*Saccharum officinarum* L.). Jember: Universitas Jember
- [3] 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*.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Mohammed dan Abalaka. 2011. *Agrobacterium* Transformation: A Boost to Agricultural Biotechnology. *Journal of Medical Genetics and Genomics*. Vol. 3 (8): 126-130.
- [9] Nap, P. J., J. Bijvoet and W. J. Stiekema. 1992. Biosafety of Kanamycin-Resistant Transgenic Plants. *Transgenic Research*. Vol. 1: 239-249.
- [10] Nishimura, A., Aichi, I., and Matsuoka, M. 2006. A Protocol for *Agrobacterium* – mediated Transformation in Rice. *Nature Protocols*. Vol. 1.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Sambrook, J., E.F. Fritsch dan T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A laboratory Manual*. 2nd Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- [14] Santoso, B. 2013. Zat pengatur Tumbuh dalam Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman. Universitas Sam Ratulangi.
- [15] 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.
- [16] Sugiharto, B dan H. Safitri. 2011. A Comparison Study for *Agrobacterium* – Mediated Transformation Method in Sugarcane (*Saccharum* spp L.). *Jurnal Ilmu Dasar.* Vol 12 (2): 140 – 147.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.

