

LAPORAN HASIL PENELITIAN

RISET PEMBINAAN DOKTOR BARU NON PNS



**TRANSFORMASI SUCROSE PHOSPHATE SYNTHASE PADA TANAMAN
KAPAS VARIETAS LOKAL DALAM PENINGKATAN
KUALITAS SERAT KAPAS.**

PENGUSUL

Agung Nugroho Puspito, S.Pd., M.P., Ph.D (NRP. 760016793)

UNIVERSITAS JEMBER

Desember 2016

**Didanai DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran 2016 nomor
SP.DIPA-042.01.2.400922/2016 Tanggal 07 Desember 2015**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian : Transformasi Sucrose Phosphate Synthase Pada
Tanaman Kapas Varietas Lokal Dalam Peningkatan
Kualitas Serat Kapas.

Nama Rumpun Ilmu : Bioteknologi

Ketua Peneliti:

a. Nama Lengkap : Agung Nugroho Puspito, S.Pd., M.P., Ph.D

b. NRP : 760016793

c. Jabatan Fungsional : -

d. Program Studi : Program Pascasarjana PS Bioteknologi

e. Nomor HP : 081225550555

f. Alamat surel (*e-mail*) : anpuspito@unej.ac.id

Biaya Penelitian Keseluruhan : Rp 20.000.000

Sumber Dana : DIPA Universitas Jember Tahun Anggaran 2016 nomor
SP.DIPA-042.01.2.400922/2016 Tanggal 07 Desember
2015

Mengetahui,
Ketua CDAST

Jember, 4-12-2016
Peneliti,

Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr
NIP 195510221982121001

Agung Nugroho Puspito, S.Pd., M.P., Ph.D
NRP. 760016793

Mengetahui,
Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Jember

(Prof. Ir. Achmad Subagio, M.Agr., Ph.D)
NIP 196905171992011001

RINGKASAN

Dalam satu dekade ini, tuntutan pemenuhan sumber serat untuk industri tekstil dalam negeri meningkat tajam. Produksi tekstil berupa Warp Yarn (benang lusi), Weft Yarn (benang pakan), Knitting Yarn (benang rajut), Sewing Thread (benang jahit), dan Fancy Yarn (benang hias) merupakan bahan penting dalam membuat kain atau produk garment lainnya.

Serat merupakan bahan baku yang paling utama untuk tekstil. Serat adalah benda padat yang mempunyai ciri atau bentuk khusus yaitu ukuran panjangnya relatif lebih besar dari ukuran lebarnya. Serat diperoleh/berasal dari alam dan buatan. Serat yang dihasilkan secara alami oleh tanaman kapas menjadi bahan pokok utama dalam setiap industri tekstil atau garment.

Oleh karenanya, diperlukan terobosan baru melalui bioteknologi pemuliaan tanaman guna tercukupinya kebutuhan serat kapas yang digunakan sebagai bahan dasar dalam industri tekstil. Rekayasa genetika tanaman kapas menjadi jawaban pasti dalam pemenuhan target tersebut. Seperti pada riset yang sudah dilakukan oleh beberapa peneliti dalam usaha memperbaiki hasil produksi tanaman kapas yaitu dengan cara mengekspresikan beberapa gene yang terkait dengan produksi serat pada kapas, dan diketahui bahwa produksi serat oleh tanaman kapas ternyata dikendalikan oleh multiple gene, sehingga ini menjadi tantangan tersendiri untuk melakukan rekayasa genetika pada tanaman kapas untuk mengejar target yaitu perbaikan secara kuantitas dan kualitas dari serat kapas.

Kami memiliki pandangan lain tentang peningkatan produksi serat oleh tanaman kapas yaitu melalui perspektif pemenuhan sumber carbon sebagai bahan dasar terbentuknya serat, gen SPS yang diidentifikasi terkait dengan produksi sukrosa dalam jaringan tanaman menjadi kunci penting dari hipotesa kami bahwa serat membutuhkan sukrosa untuk disintesa menjadi cellulosa.

Berdasar pada permasalahan dan hipotesa tersebut, kami mengajukan sebuah program penelitian dengan tujuan untuk memperoleh tanaman kapas transgenik dengan menggunakan tanaman kapas varietas lokal Indonesia. Hasil penelitian yang diperoleh diharapkan dapat menjadi kunci penting dalam menjawab tantangan industri tekstil Nasional. Target penelitian yang kami ajukan direncanakan dapat dicapai dalam jangka waktu tiga tahun melalui beberapa tahapan penelitian dengan target-target khusus. Target khusus tahun pertama (satu)

dalam penelitian ini adalah transformasi gen SPS pada tanaman kapas varietas lokal. Strategi-strategi yang akan diterapkan untuk mencapai target khusus pertama antara lain; 1) mencari komposisi hormon auksin dan sitokinin yang optimal untuk penginduksian kalus tanaman kapas, 2) mencari media yang optimum untuk proliferasi sel kalus, 3) mencari metode transformasi dengan efisiensi terbaik. Hasil dari kegiatan penelitian tersebut diharapkan dapat dipublikasikan di *Frontier Plant Science*.

Kata kunci: serat kapas, *sucrose phosphate synthase*, transformasi SPS, *Gossypium hirsutum*.

DAFTAR ISI

Halaman Sampul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Ringkasan.....	iii
Daftar Isi	iv
Daftar Tabel dan Gambar.....	v
BAB 1. Pendahuluan.....	1
BAB 2. Tinjauan Pustaka.....	5
BAB 3. Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	8
3.1 Tujuan Penelitian.....	8
3.2 Manfaat Penelitian.....	8
BAB 4. Metode Penelitian.....	10
4.1 Metode.....	10
4.2 Indikator Kerja.....	11
BAB 5. Hasil dan Luaran Yang Dicapai.....	13
5.1 Hasil Penelitian.....	13
5.2 Luaran Yang Dicapai.....	17
BAB 6. Rencana Tahapan Berikutnya.....	18
BAB 7. Kesimpulan dan Saran.....	19
Daftar Pustaka.....	20

Daftar Tabel

No	Keterangan Tabel	Halaman
1	Indikator Kerja	12
2	Germination dan Plant formation Index	14
3	Perlakuan Hormon dan Level Kombinasi	14

Daftar Gambar

No	Keterangan Gambar	Halaman
1	Kontruk Plasmid SoSPS1 pada Vektor Ekspresi	13
2	Induksi Kalus dengan Perlakuan dan Kosentrasi Level Hormon	15
3	Tanaman Kapas Generasi T ₀ Putative Transgenik	16

BAB 1. PENDAHULUAN

Proyeksi Universitas Jember adalah pencapaian Good University Governance (GUG). Sistem jangka pendek yang diwujudkan dalam kegiatan 5 tahun yaitu Rencana Strategis. Salah satu target capaian yang dituangkan dalam Indikator Kinerja Kegiatan (IKK) adalah peningkatan publikasi internasional atau nasional. Indikator kualitas perguruan tinggi bukan dinilai dari banyak penelitian yang diperoleh, namun didukung oleh output penelitian itu. Salah satu indikator yang dapat dijadikan output adalah produk penelitian dan jumlah publikasi.

Center for Development Advance Sciences and Technology (CDAST) merupakan pusat pengembangan ilmu dan teknologi yang di miliki oleh Universitas Jember, yang memiliki fasilitas bertaraf internasional dengan level biosafety sangat bagus dan di dukung oleh sumber daya manusia yang ada di dalamnya. Oleh karena itu, CDAST mengadakan penelitian tentang pengembangan Kapas transgenik sebagai bagian dari rencana kerja jangka pendek dan jangka panjang. Lebih dari 50 negara di seluruh dunia budidaya tanaman kapas dalam skala besar, kebanyakan berada di daerah tropis dan sub tropis. Tanaman kapas sangat essensial dalam banyak hal termasuk sumber minyak biji, makan ternak dan juga untuk industri berbasis penggunaan serat kapas. Kapas menempati urutan paling atas dalam manufaktur yang berbeda dalam tekstil dan produksi kertas. (Akhtar *et al.*, 2004).

Budidaya tanaman kapas cukup berhasil di kembangkan oleh Cina, Amerika Serikat, India, Brazil dan Pakistan. Area yang di gunakan untuk budidaya kurang lebih diseluruh dunia 10.000 hektar per tahun (Hari, 2007). Bagaimanapun, 87% dari area budidaya kapas terletak di Negara-negara berkembang. Indonesia menempati urutan 12 dan 8 dalam global tekstil dan ekspor produk tekstil. Indonesia memperoleh pendapat kurang lebih 3,7 Miliar USD dari ekspor produk tekstil dan 6,3 miliar USD dari eksport garment sebelum kalender tahun 2008. Tekstil sangat berpengaruh positif pada penyerapan tenaga kerja di Indonesia. Total 1.3 juta tenaga kerja yang terserap dalam industri tekstil dan ini menunjukkan bahwa 10.6% dari seluruh tenaga kerja di segala sektor industri (Tewari, 2006).

Ekspor tekstil dari Indonesia pada tahun 2012 di perkirakan 12.5 miliar USD dan 6.4 miliar USD dari januari sampai dengan juni 2013. Harga pasar dunia untuk kapas tahun 2012 mulai stabil dan konsekuensinya, banyak perusahaan atau industri tekstil mengembangkan daerah operasinya untuk menunjang produksi yang lebih. Dari keseluruhan itu eksport produk tekstil Indonesia untuk eropa mengalami penurunan, tetapi meningkat untuk eksport ke jepang

dengan estimasi 35%. Dan total ekspor serat kapas mengalami peningkatan dari 77.000 MT dalam tahun 2012 menjadi 138.000 MT pada bulan januari-november 2013, sedang tingkat konsumsi untuk industri 3.25 juta bales di tahun 2014/15. (USDA foreign Agriculture Service. 2014)

Dengan melihat pentingnya tanaman kapas sebagai bahan dasar industri tekstil, telah banyak penelitian melalui teknik pemuliaan konvensional sampai dengan penggunaan bioteknologi, yang ditujukan untuk mendapatkan generasi baru yang mampu menunjang hasil produksi tanaman kapas berupa serat berkualitas. Seperti penggunaan DNA peregulasi Crystal protein dari *Bacillus thuringiensis* yang di insersikan pada tanaman kapas, dengan tujuan tanaman kapas mampu memproduksi Crystal protein, hasil dari riset ini untuk mengurangi biaya produksi yaitu penggunaan insektisida. Larva dan serangga dari jenis *Diptera*, *Lepidoptera* dan juga *Coleoptera* dapat mengalami kematian jika larva atau serangga tersebut mengkonsumsi daun tanaman kapas transgenik ini. (Puspito *et al.*, 2015).

Penelitian lain tentang transformasi DNA asing pada tanaman kapas adalah ketahanan pada herbisida. Jalur sintesa asam amino aromatic seperti phenylalanine, tyrosine dan tryptophan dapat di hambat oleh glyphosate-herbisida yang mampu menyebabkan kematian pada tanaman, oleh karenanya teknologi glyphosate-herbisida di dimanfaatkan dalam pengendalian tanaman pengganggu seperti gulma. Pemanfaatan gene EPSPS dari *agrobacterium tumefaciens* CP4 telah di laporkan oleh banyak peneliti yaitu dengan mengekspresikan CP4 EPSPS kedalam beberapa tanaman pangan dan tanaman industri (Puspito *et al.*, 2015). Dengan tujuan memiliki ketahanan terhadap aksi glyposate-herbisida yang mampu menghalangi sintesa asam amino aromatic pada shilkimate pathway.

Untuk pengembangan kapas dalam peningkatan kualitas dan kuantitas fiber yang dihasilkan, telah banyak di kembangkan dengan teknik over ekspresi beberapa jenis DNA sesuai dengan tujuan dari riset tersebut. Seperti, DNA yang berasosiasi dengan Fiber Initiation, fiber elongation, DNA yang berasosiasi dengan Secondary Wall Synthesis (Kamran *et al.* 2013).

Pada serat kapas, pemanjangan satu sel adalah hasil utama dari produksi kapas. Sangat sulit untuk meningkatkan kualitas serat kapas dengan menggunakan teknik pemuliaan konvensional atau tradisional. Di karenakan Kebutuhan mendesak dalam peningkatan produksi serat kapas, sudah banyak peneliti melakukan riset terkait dengan kapas dan produktivitasnya seperti dalam diskripsi di atas melalui rekayasa genetika. Sucrose Phosphate

Synthase (SPS) adalah salah satu enzim kunci dalam biosintesa sukrosa, SPS menggunakan UDP-glucose dan fructose-6-P untuk sintesa sucrose-6-P. (Sugihato *et al.* 1997).

Aktivitas SPS memodulasi perputaran siklus di dalam sel heterotropik. (Haigler *et al.* 2001) dan peningkatan bersamaan dengan tingginya sintesa selulosa pada secondary wall deposition. (Haigler *et al.* 2001).

Peningkatan ini terkait dengan pemotongan sucrose oleh sucrose synthase untuk merilis substrat dalam sintesa selulosa, yaitu UDP-glucose, and fructose (Sugihato *et al.* 1997). Setelah fructose phosphorylation, SPS dapat di daur ulang dari fructose-6-P kembali menjadi sucrose, dengan demikian berpengaruh pada tingkatan sintesa selulosa melalui pasokan sucrose. Bila mana translokasi sukrosa di hidrolisis oleh enzim invertase, maka akan meningkatkan produksi serat kapas, aktivitas SPS dapat di pastikan memiliki pengaruh pada sintesa selulosa (Ningtyas *et al.* 2013).

Pada saat ini satu hal yang sangat penting untuk di pahami, yaitu jenis serat yang dapat diterima untuk kebutuhan tekstil yang menunjukkan standart kualitas sebagai parameter dan berikutnya adalah tanaman kapas yang mampu memproduksi lebih banyak lagi serat per boll weight. Penelitian tentang peningkatan kualitas serta kuantitas serat pada kapas varietas lokal Indonesia dengan mentransformasi fiber related genes diharapkan dapat memenuhi kebutuhan kapas mentah untuk industri tekstil dalam Negeri dan juga diharapkan ekspor kapas mentah atau olahan sebagai sumber devisa Negara.

Keberhasilan dalam penelitian ini akan menjadi acuan untuk pengembangan lebih lanjut kapas transgenik yang memiliki peningkatan dalam produksi serat alami berkualitas, target CDAST/Universitas Jember dalam jangka pendek terpenuhi yaitu tanaman kapas putative transgenik dan untuk jangka panjang di dapatkannya target tanaman transgenic yang homozigot. Dan penelitian ini diharapkan akan menjadi penelitian unggulan yang berkesinambungan. Capaian lain adalah pemanfaatan kapas transgenik yang di produksi oleh CDAST, dapat di manfaatkan oleh para petani kapas Nasional.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Serat Kapas

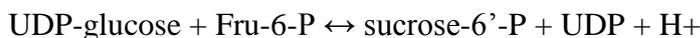
Kapas termasuk dalam keluarga *Malvaceae*, yang meliputi kembang sepatu dan okra, dan dalam genus *Gossypium*, yang tumbuh di seluruh dunia (Cronn *et al.*, 2002). tanaman kapas adalah sumber utama kebutuhan serat alami yang digunakan untuk membuat produk kain. Buah dari tanaman kapas adalah boll yang melindungi biji dan serat kapas, yang lembut dan halus (Constable *et al.*, 2014). Kapas (*Gossypium spp.*) Merupakan salah satu tanaman ekonomi yang paling penting di dunia, terutama *Gossypium hirsutum L.*, yang menyediakan lebih dari 90% dari total serat kapas yang dihasilkan. Serat adalah rambut biji kapas, yang berasal dari sel-sel epidermis permukaan ovulum (Liu *et al.*, 2005). kuntum- kuntum kapas terbuka pada saat serat sudah matang, serat kapas panjang (30-40 mm) dan tipis (15 m) struktur uniseluler yang muncul dari sel-sel epidermis dalam integumen luar bakal biji kapas (Kim dan Triplett, 2001).

Pengembangan serat kapas selesai dalam empat tahap yang berbeda: inisiasi serat, elongasi, biosintesis sekunder dinding sel, dan pematangan. tahap ini tumpang tindih dengan satu sama lain selama pembentukan serat yang matang. pengembangan serat bervariasi antara berbagai jenis spesies kapas, misalnya, serat kain dan bentuk serat bulu pada waktu yang berbeda, sebelum dan setelah bunga mekar, di *G. hirsutum* (Haigler *et al.*, 2005). Waktu yang diperlukan untuk pengembangan boll kapas dari bunga dibuahi adalah sekitar 45-50 hari. Pengembangan boll kapas memiliki tiga tahap: boll pembengkakan, boll mengisi, dan boll meledak (Ruan *et al.*, 2001.).

2.2 Sucrose Phosphate Synthase (SPS)

Sukrosa merupakan produk akhir dari proses fotosintesis yang terjadi di daun. Sukrosa dalam tanaman berperan penting untuk menyediakan energi, merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Fung *et al.*, 2003). Selain itu sukrosa juga berperan sebagai pengatur ekspresi gen-gen fotosintetik (Jang dan Sheen, 1994) dan gen-gen nonfotosintetik seperti gen yang terlibat dalam pembelahan dan diferensiasi sel. Beberapa enzim yang mempengaruhi metabolisme sukrosa pada tanaman yaitu Invertase, Sucrose Synthase, dan Sucrose-Phosphate Synthase. Dalam sel sukrosa disintesis dalam sitosol yang dikatalisis oleh Sucrose-Phosphate Synthase (SPS). SPS merupakan enzim utama yang menentukan kemampuan tanaman dalam sintesis sukrosa (Komatsu *et al.*, 2002).

Sucrose-Phosphate Synthase (SPS) adalah enzim yang berperan utama dan menjadi enzim kunci dalam biosintesis sukrosa pada tanaman tingkat tinggi. Enzim SPS berperan sebagai pengkatalis proses perubahan UDP-glukose dan Fructose-6-Phosphate menjadi Sucrose-6-Phosphate, UDP dan H⁺. Berikut persamaan reaksi yang terjadi:



Enzim SPS diregulasi oleh metabolit dan fosforilasi protein reversible baik pada jaringan fotosintetik maupun pada jaringan nonfotosintetik. Tidak terbatas pada jaringan fotosintetik tetapi enzim SPS bekerja juga pada jaringan nonfotosintetik yang aktif dalam biosintesis sukrosa, seperti dalam pemasakan buah. Selain itu, enzim SPS mengendalikan pada level enzim protein, seperti dalam perkembangan daun (Huber dan Huber, 1996).

2.3 Transformasi Mutan Gen SoSPS1 menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*

Transformasi genetik pada tanaman merupakan suatu upaya untuk memasukkan suatu gen target yang telah diisolasi dari suatu organisme ke dalam sel tanaman tertentu (Ningtyas, 2013). Secara umum proses transformasi dapat dilakukan secara langsung atau tidak langsung. Metode transformasi secara langsung seperti dengan electrophoration, microinjection, penembakan DNA (Particle Bombardment) dan menggunakan polyethelene glycol (Schroder *et al.*, 1989). Sedangkan metode transformasi secara tidak langsung seperti dengan menggunakan bantuan bakteri atau virus sebagai vektor (Hiei *et al.*, 1997).

Transformasi genetik dengan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* merupakan salah satu teknik pemuliaan tanaman yang secara umum digunakan dan dikembangkan. Beberapa keunggulan transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* adalah relatif lebih efektif, murah, mudah digunakan dan jumlah salinan gen yang dapat diintegrasikan ke genomik relatif lebih sedikit (Lessard *et al.*, 2002).

Penyisipan gen mutan SoSPS1 pada tanaman tomat dilakukan dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai vektor transformasi. Gen yang ditransfer oleh *Agrobacterium* menghasilkan tanaman transgenik yang lebih stabil (Hiei *et al.*, 1997) dan metode ini pada umumnya digunakan untuk transformasi pada tanaman dikotil. Gen *SoSPS1* merupakan cDNA penyandi enzim SPS yang merupakan enzim kunci dalam biosintesis sukrosa (Kusrini, 2014). Gen Sucrose Phosphate Synthase (SPS) tebu berhasil dikloning (Sugiharto *et al.*, 1997) dapat digunakan untuk transformasi gen *SoSPS1* pada tanaman kapas sebagai penyedia sumber karbon.

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh tanaman kapas transgenik dengan metode *Agrobacterium* mediated transformation pada kalus atau somatik embriogenesis.

3.2 Manfaat Penelitian

Penelitian ini sebagai salah satu indikator kompetensi yang di miliki CDAST/Universitas Jember untuk menjawab daya saing di tingkat Nasional dan Internasional. Selain itu kontribusi nyata untuk pengembangan pertanian Nasional dengan tanaman industry terbaharui yaitu kapas transgenik. Output ini memiliki tiga sasaran utama yaitu publikasi pada jurnal Internasional, produk yang bisa di manfaatkan dan pengenalan Universitas Jember pada level Internasional guna dan diharapkan akan adanya kerjasama dalam maupun luar negeri.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Metode

4.1.1 Seleksi dan Stabilisasi Transformasi pada Varietas Kapas Lokal

Lima varietas kapas lokal, khususnya Kanesia 8, Kanesia 10, Kanesia 11, Kanesia 12 dan Kanesia 13, diseleksi untuk transformasi dengan melihat kemampuan perkecambahan (%) yaitu dengan teknik seperti yang sebelumnya ditunjukkan oleh Rao *et al.* (2006). Dari beberapa jenis kapas lokal yang ada, kami pilih Kanesia 8 dipilih untuk transformasi karena kemampuan perkecambahan lebih tinggi (%) dalam percobaan perendaman. Satu hari sebelum percobaan transformasi, kultur bakteri dengan gen SPS dimulai pada YEP kaldu (Yeast Extract Peptone Medium) pada 30 °C penggojok. Biji kapas dari var *G. hirsutum*. Kanesia 8 direndam dalam termos diotoklaf air, dalam gelap, di 30-37 ° C selama 48 jam. Pada hari percobaan, kultur bakteri dengan gen SPS dipanen dan dilarutkan dalam media MS. embrio matang diisolasi dari biji berkecambah dan puncak dari tunas dipotong dengan pisau steril. Kemudian, embrio yang co-kultivasi selama 1-2 jam dengan *Agrobacterium* strain LBA-4404 yang mengandung gen SPS. Embrio dikeringkan pada kertas filter steril dan dipindahkan ke media MS (Murashige dan Skoog, 1962) selama 2-3 hari pada suhu 28 ° C di ruang kondisi yang dikendalikan. Setelah 2-3 hari, embrio yang subkultur dalam tabung yang berisi media MS dengan kanamisin sebagai media seleksi. Setiap 15 hari, tanaman kapas transgenik yang subkultur ke tabung baru. Setelah 30-45 hari seleksi pada media kanamisin, tanaman transgenik putatif dipindahkan ke tunas dan media akar regenerasi tanpa kanamisin. Setelah 2 bulan, sehat, diduga tanaman kapas transgenik bergeser ke pot berisi tanah liat. Aklimatisasi tanaman berubah dilakukan. Stabil, tanaman transgenik putatif menjadi sasaran analisis molekuler setelah 15-20 hari dari pergeseran (Hussain *et al*, 2005;. Bajwa *et al*, 2013.).

4.1.2 Deteksi dan Integrasi Gen SPS pada Tanaman Kapas putatif transgenik

Daun yang baru terbentuk dari tanaman kapas transgenik dan dari tanaman kontrol yang digunakan untuk mengekstrak DNA genom menurut Saha *et al.* (1997), dengan beberapa modifikasi. PCR digunakan untuk mengkonfirmasi kehadiran gen SPS pada tanaman kapas transgenik putatif sebagai produk 500 bp PCR dengan primer yang dirancang dari daerah promotor dan wilayah gen (Cronn *et al.*, 2002). Pasangan primer yang digunakan untuk analisis tanaman kapas transgenik di T₀, T₁, dan generasi T₂ hadir sebagai data Tambahan. Kondisi reaksi adalah sebagai berikut: sebuah denaturasi awal pada 95 ° C selama

3 menit; 35 siklus denaturasi pada 94 ° C selama 45 s, anil pada 49 ° C selama 45 s (generasi T₀), 53 ° C selama 30 s (generasi T₁), 51 ° C selama 30 s (generasi T₂), dan penyuluhan di 72 ° C selama 45 s; dan elongasi akhir langkah pada 72 ° C selama 10 menit. Integrasi stabil dan kehadiran Gen SPS dalam genom tanaman dikonfirmasi menggunakan analisis Southern blot. Analisis Southern blot dilakukan dari DNA genomik diekstraksi dari tanaman kapas transgenik dikonfirmasi seperti yang dijelaskan oleh Anklam *et al.* (2002) dan Rao *et al.* (2009). Integrasi stabil terdeteksi dengan gen SPS secara spesifik penyelidikan setelah DNA genom dicerna dengan enzim restriksi EcoR1.

4.1.3 Konfirmasi Tanaman Transgenik dengan NPTII, dan 35S CaMV Primer

Untuk konfirmasi sifat transgenik tanaman kapas, PCR dilakukan untuk amplifikasi NPTII (gen penanda), 35SCaMV (gen promotor), dan Virg (gen virulensi) pada dasar dari DNA genomik diekstraksi dari tanaman kapas transgenik (Anklam *et al.*, 2002; Sundar dan Sakthivel, 2008). Urutan dari pasangan primer yang hadir dalam Data Tambahan (Tambahan Tabel 1). Campuran reaksi PCR adalah sebagai berikut; 20 µl Volume campuran reaksi yang mengandung 1X reaksi penyangga, 15 ng DNA template, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM setiap dNTP, 1 pmole primer masing-masing, dan 1 unit Taq DNA polymerase (Fermentas). PCR dilakukan dalam thermal cycler menggunakan ketentuan sebagai berikut: denaturasi awal pada 95 ° C selama 3 menit; 35 siklus denaturasi pada 94 ° C selama 45 s, anil pada 54 ° C (untuk NPTII), 52 ° C (untuk 35SCaMV) atau 53.9 ° C (untuk Virg) selama 45 s, ekstensi pada 72 ° C selama 45 s; dan ekstensi akhir pada 72 ° C selama 10 menit. fragmen DNA diamplifikasi dielektroforesis pada 1,5% (w / v) agarose gel (Anklam *et al.*, 2002; Sundar dan Sakthivel, 2008).

4.1.4 Ekstraksi Selulosa dari Serat Kapas

Serat itu dicerna dengan reagen asetat-nitrat dan reagen anthrone, dan jumlah selulosa diukur dengan spektrofotometer seperti yang dijelaskan oleh Updegraff (1969). Metode ini digunakan untuk menghilangkan kotoran, seperti lignin, hemiselulosa, dan xylosan, dari serat kapas dengan bantuan asam asetat dan asam nitrat. Anthrone dilarutkan dalam asam sulfat digunakan untuk mengekstrak selulosa dari serat kapas. Senyawa berwarna yang dihasilkan diuji dengan spektrofotometer pada panjang gelombang sekitar 630-635 nm sesuai prosedur (Shu *et al.*, 2009).

4.1.5 Analisis statistik

Dua metode ternama, analisis Fisher dan Co-Stat, yang digunakan untuk menentukan varians analisis data. The setidaknya menguji perbedaan yang signifikan (LSD) pada 5% probabilitas digunakan untuk membandingkan eksperimen dan kontrol tanaman (Petersen, 1994). panjang serat, kekuatan serat, dan serat micronaire nilai dari kapas transgenik tersebut dihitung dengan menggunakan fiber klasik analisis kuantitatif berat boll per tanaman, berat biji per buah kapas, ginning keluar persentase gilirannya dan hasil rata-rata. Analisis statistik juga digunakan untuk korelasi fenotipik dan genotipik tanaman kapas transgenik. prosedur rinci dari fenotipik dan genotipik korelasi hadir sebagai Tambahan data.

4.2 Indikator Kerja

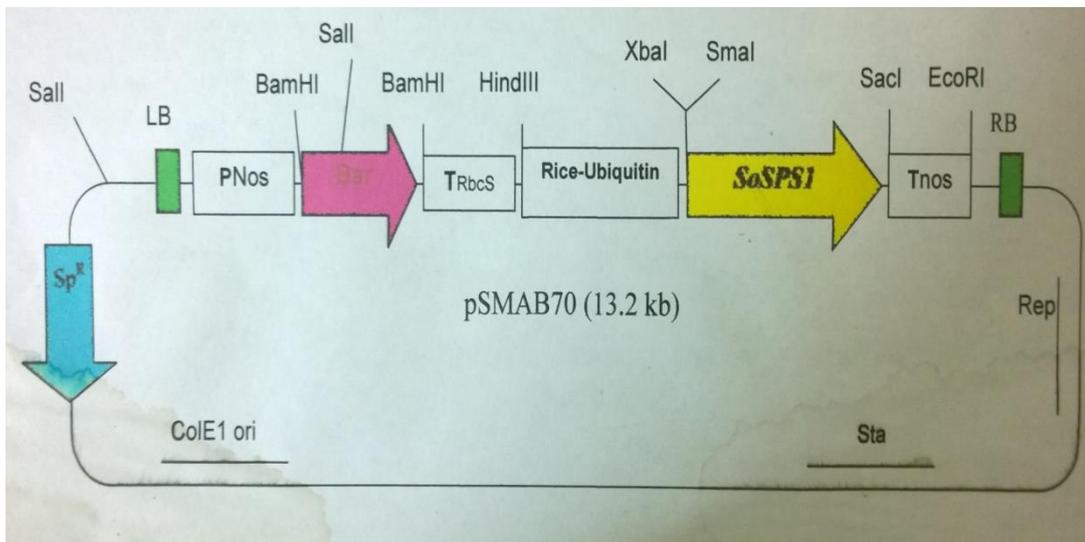
No	Jenis Kegiatan	Tahun I, Bulan ke											
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
1	Transformasi SPS pada embrio kapas												
2	Seleksi antibiotik dan Kultur jaringan putative transgenic												
3	Transfer T ₀ pada tanah												
4	Molecular analisis (PCR, Westerblot)												
5	Observasi karakteristik morfologi												
6	Analisa serat kapas												
7	Koleksi dan penandaan Biji kapas untuk menumbuhkan generasi T ₁												
8	Tabulasi data dan pembuatan laporan												

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Konstruksi Plasmid SoSPS1

Gen SoSPS1 di cloning dengan bantuan SmaI dan SacI sebagai restriction enzyme dan kemudian di ligasi pada Plasmid pSMAB70. Ekspresi pada tanaman kapas menggunakan CaMV 35S promoter (35S promoter). Peta kontruk pSMAB70+SoSPS1 seperti pada gambar 1.



Gambar 1: Kontruks Plasmid SoSPS1 pada vektor ekspresi

5.1.2 Seleksi Varietas Tanaman Kapas Untuk Transformasi

Seleksi tanaman kapas varietas lokal dilakukan guna mendapatkan jenis tanaman yang memiliki kemampuan germinasi sangat baik, ini diperlukan untuk keberhasilan proses transformasi SoSPS1, dengan bantuan agrobacterium gene SoSPS1 di di insersikan pada tanaman kapas. Dari germination index di dapatkan hasil bahwa Kanesia 8 memiliki tingkat germinasi lebih bagus dibanding varietas lainnya, demikian juga dengan plant formation menunjukkan persentase yang tinggi seperti yg di tampilkan dalam Tabel 1.

Table 1. Germination dan Plant formation Index.

Sr. No	Varietas	Germination (%)	Plant Formation (%)
1	Kanesia 8	95%	95%
2	Kanesia 9	90%	85%
3	Kanesia 10	90%	90%
4	Kanesia 11	85%	85%
5	Kanesia 12	85%	85%
6	Kanesia 13	90%	85%

5.1.3 Transformasi SoSPS1

Agrobacterium tumefaciens strain LBA 4404 yang mengandung pSMAB70+SoSPS1 digunakan untuk transformasi. Kontruk vector di kendalikan oleh CaMV 35S promoter dengan seleksi marker nptII, yang mana memiliki ketahanan pada kanamycin. Untuk transformasi menggunakan dua strategi yaitu dengan menggunakan calus (Rao *et al*, 2006) dan embrio cut method (Rao *et al.*, 2009).

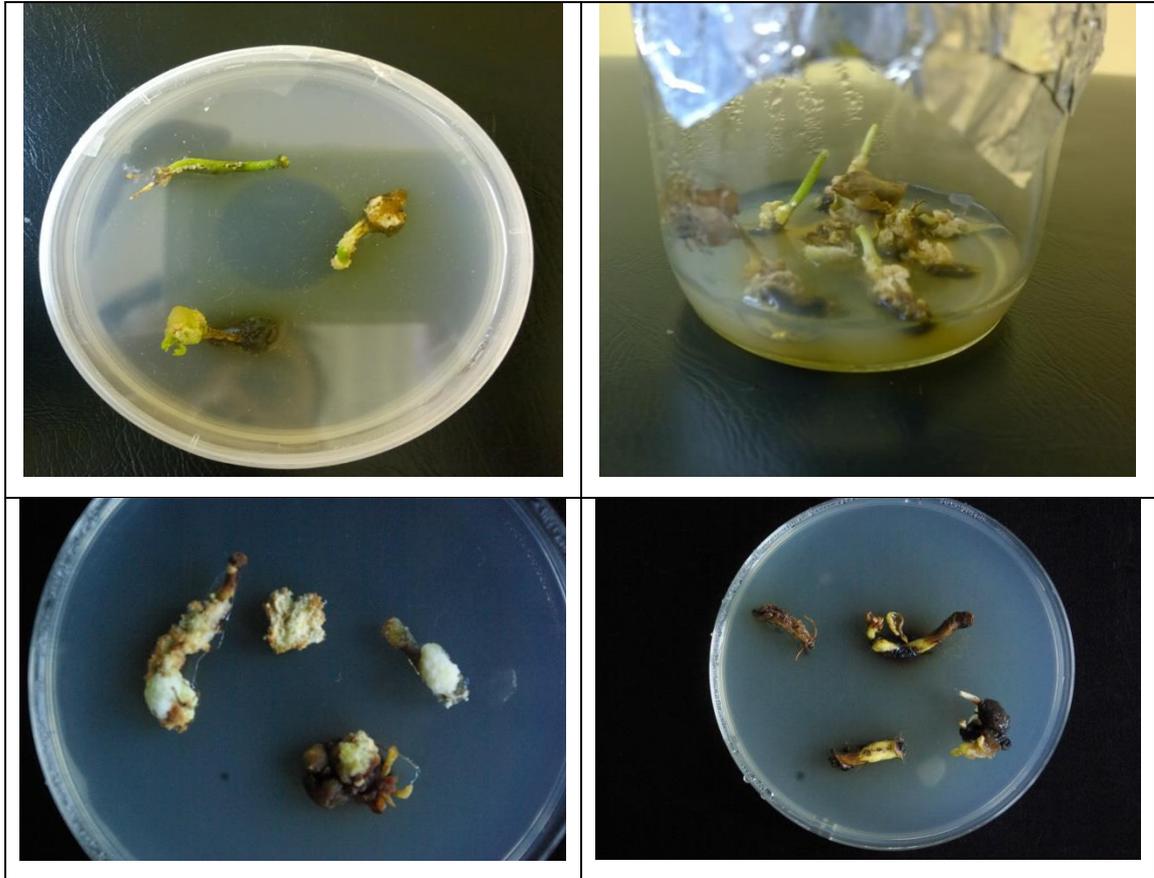
5.1.3.1 Optimasi Pengkalusan dan Proliferasi Embrio Somatik.

Optimasi dalam penggunaan hormon auksin dan sitokinin untuk mendapatkan kalus yang bersifat meristematik di lakukan dengan beberapa macam kombinasi dan kosentrasi yang berbeda-beda. Seperti yang ada dalam tabel berikut ini. Untuk hasil terbaik dari perlakuan hormon dan perlakuan kosentrasi di tunjukan pada (Gambar: 2A), kalus yang dihasilkan bersifat somatis embrionic. Kalus yang dihasilkan akan digunakan untuk proses transformasi menggunakan agrobacterium.

Tabel 2. Perlakuan Kombinasi hormon dan level kombinasi

No	Kombinasi Hormon	Level Kosentrasi
1	2.4 D	0.1/0.5/1.0/1.5/2.0
2	2.4 D+Prolin	0.1+300/0.1+350/0.1+400/0.1+450/0.1+500
3	2,4 D + CH	0.1+300/0.1+350/0.1+400/0.1+450/0.1+500
4	2,4 D + Kinetin	0.1+0.1/0.5+0.5/1.0+1.0/1.5+1.5/2.0+2.0
5	2,4 D + BAP	0.1+0.1/0.5+0.5/1.0+1.0/1.5+1.5/2.0+2.0
6	2,4 D + IAA	0.1+0.1/0.5+0.5/1.0+1.0/1.5+1.5/2.0+2.0
7	2,4 D + NAA	0.1+0.1/0.5+0.5/1.0+1.0/1.5+1.5/2.0+2.0
8	NAA + Kinetin	0.1+0.1/0.5+0.5/1.0+1.0/1.5+1.5/2.0+2.0

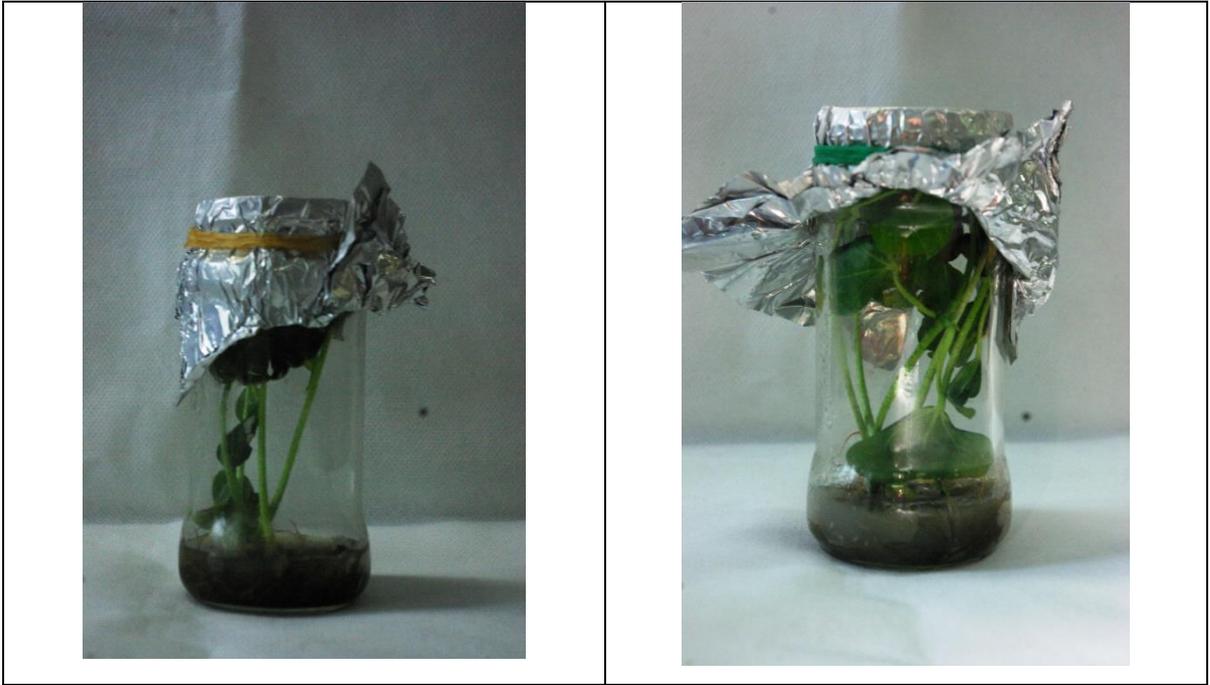
9	BAP + NAA	0.1+0.1/0.5+0.5/1.0+1.0/1.5+1.5/2.0+2.0
10	Kinetin + BAP	0.1+0.1/0.5+0.5/1.0+1.0/1.5+1.5/2.0+2.0



Gambar 2. Induksi kalus dengan perlakuan dan level konsentrasi hormon.

5.1.3.2 Transformasi Dengan Teknik Embriogenesis.

Proses transformasi dilakukan sesuai metode yang dilakukan Rao *et al.* (2013). Infeksi *Agrobacterium* pada potongan embrio dilakukan pada media MS cair. Dengan tehnik ini kami mendapatkan hasil efisiensi transformasi lebih bagus dibanding dengan menggunakan kalus. Tanaman putative transgenik ditumbuhkan dalam media MS dengan seleksi kanamycin dengan pengulangan lima kali dan kami mendapatkan seluruh tanaman putative transgenik mengalami kematian pada seleksi kanamycin yang ketiga. Pada Gambar 3 adalah representasi tanaman putative transgenik yang ditanam pada MS media seleksi satu.



Gambar 3. Tanaman kapas generasi T_0 Putative transgenik

5.2 Luaran Yang Telah Dicapai

Penelitian yang telah dilaksanakan belum menghasilkan luaran yang dijanjikan sebelumnya dikarenakan bahwa kegiatan penelitian yang dilaksanakan baru dilaksanakan selama dua bulan

BAB 6. RENCANA DAN TAHAPAN BERIKUTNYA

Untuk selanjutnya penelitian, beberapa rencana penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut

1. Melakukan optimasi kultur kalus dari beberapa varietas

Optimasi kultur kalus menggunakan tiga macam kapas varietas unggul yaitu Kanesia 8, Kanesia 9, Kanesia 10, Kanesia 11, Kanesia 12 dan Kanesia 13. Untuk penelitian yang akan datang, kami mencoba untuk mengoptimalkan kalus di media MS B5 vit yang mengandung beberapa hormon auksin dan sitokinin serta variasi dari monosakarida atau disakarida seperti glucose, maltosa sebagai pengganti sukrosa yang terkandung di media yang digunakan sebelumnya. Alasan dilakukan adalah untuk mencari data terbaik yaitu kalus yg bersifat embriogenik dan memiliki kemampuan proliferasi tinggi untuk kepentingan transformasi.

2. Teknik Transformasi

Untuk menginsersikan Gen SoSPS1 kami coba menggunakan berbagai macam teknik yang umum dilakukan dalam transformasi pada tanaman kapas seperti penggunaan kalus, shoot apex method.

3. Melakukan Karakterisasi penanda genetik DNA

DNA genom yang diekstrak menggunakan bagian daun dari semua varietas kapas yang digunakan dipergunakan sebagai *template* dari analisa PCR. Karakterisasi penanda DNA akan dilakukan dengan menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian tentang transformasi gen SoSPS1 pada tanaman kapas dengan menggunakan dua metode transformasi di dapatkan hasil efisiensi sementara adalah teknik shoot apex method lebih baik dibanding dengan teknik pengkalusan.

7.2 Saran

Pengoptimalan metode transformasi perlu kajian mendalam, dengan harapan dapat meningkatkan efisiensi transformasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhtar, K. P., Hussain, M., Khan, A. I., Haq, A. A., Iqbal, M. M. (2004). Influence of Plant Age, Whitefly Population and Cultivar Resistance on Infection of Cotton Plants By Cotton Leaf Curl Virus (CLCuV) in Pakistan. *Field Crops Res.*, 86: 15-21.
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., and Van Den Eede, G. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *Eur. FoodRes. Technol.* 214,3–26.doi:10.1007/s002170100415
- Bajwa, K. S., Shahid, A. A., Rao, A. Q., Dahab, A. A., Muzaffar, A., Rehman, H. U., et al. (2014). Stable genetic transformation in cotton (*Gossypium hirsutum L.*) using marker genes. *Adv. CropSci.* 3,811–821.
- Constable, G., Llewellyn, D., Walford, S.A., and Clement, J.D. (2014).“Cotton breeding for fiber quality improvement ” in *IndustrialCrops: Breeding for BioEnergy and Bioproducts*, edsV. M. V. Cruzand D. A. Dierig (NewYork, NY: Springer-Verlag), 191–232.doi:10.1007/978-1-4939-1447-0_10
- Cronn, R., Cedroni, M., Haselkorn, T., Grover, C., and Wendel, J. F. (2002). PCR- mediated recombination in amplification products derived from polyploid cotton. *Theor. Appl. Genet.* 104,482–489.doi:10.1007/s001220100741
- Fung, Langenkamper, Gardner, and MacRae. 2002. Differential Expression within an SPS Gene Family. *J. Plant Science.* Vol. 164: 459-470.
- Haigler, C. H., Ivanova-Datcheva, M., Hogan, P. S., Salnikov, V. V., Hwang, S., Martin, K., et al. (2001). Carbon partitioning to cellulose synthesis. *PlantMol. Biol.* 47,29–51.doi:10.1023/A:1010615027986 Haigler, C. H., Zhang, D., and Wilkerson, C. G. (2005). Biotechnological improvement of cotton fibre maturity. *Physiol.Plant.* 124,285–294.doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00480.x
- Hari, G. (2007). Multiple references to non-wood fibers for paper, Pulp & Paper Resources & Information Site.
- Hiei, Y., T. Komari, and T. Kubo. 1997. Transformation of Rice Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 35: 205-218.
- Huber, S.C., and Huber, J.L. 1996. Role and Regulation of Sucrose Phosphate Synthase in Higher Plants. *J. Plant Physiol.* Vol. 47: 431-444.

- Hussain, S. S., Husnain, T., and Riazuddin, S. (2005). In-ovule embryo culture: a novel method of cotton transformation. *Pak. J. Biol. Sci.* 8,297–301.doi: 10.3923/pjbs.2005.297.301
- Jang, J.C., and Sheen, J. 1994. Sugar Sensing in Higher Plants. *J. Plant Cell.* Vol. 6: 1665-1679.
- Kamran, B., S., Shahid, A. A., Rao, A. Q., kiani, M. S., Ashraf, M. A., Dahab, A. A., et al. (2013). Expression of Calotropis procera expansin gene CpEXPA3 enhances cotton fibre strength. *Aus. J. CropSci.* 7,206–212.
- Kim, H. J., and Triplett, B. A. (2001). Cotton fiber growth in planta and *invitro*. Models for plant cell elongation and cell wall biogenesis. *PlantPhysiol.* 127, 1361–1366. doi: 10.1104/pp.010724
- Komatsu, Moriguchi, Koyama, Omura, and Akihama. 2002. Analysis of Sucrose Synthase Genes in Citrus Suggests Different Roles and Phylogenetic Relationships. *J. Experimental Botany.* Vol. 53: 61-71.
- Kusrini, E. 2014. *Seleksi dan Uji Stabilitas Genetik Tanaman Tebu Produk Rekayasa Genetika (PRG) pCLA-SoSPS1 secara In Vitro. Tidak dipublikasikan.* Skripsi. Jember: Fakultas MIPA Universitas Jember.
- Lessard, Kulaveerasingam, York, Strong, and Sinskey. 2002. Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants. *J. Metabolic Engineering.* Vol. 4: 67-79.
- Liu, J., Yang, H., and Hsieh, Y. L. (2005). Distribution of single fiber tensile properties of four cotton genotypes. *TextRes.J.* 75,117–122. doi: 10.1177/004051750507500205
- Murashige, T., and Skoog, F. A. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *PlantPhysiol.* 15,473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Ningtyas, R.M. 2013. *Transformasi Gen SoSPS1 pada Tanaman Tebu (Saccharum officinarum L. var. BL) Overekspresi Gen SoSUT1 Event 2 Menggunakan Agrobacterium tumefaciens.* Tidak dipublikasikan. Skripsi. Jember: Fakultas MIPA Universitas Jember.
- Petersen, R. G. (1994). *Agricultural Field Experiments: Design and Analysis.* New York, NY: Marcel Dekker Inc.
- Puspito, A. N., Abdul, Q. Rao., Muhammad, N. Hafeez., Muhammad, S. Iqbal., Kamran, S. Bajwa., Qurban, Ali., Muhammad, A. Abbas., Ayasha., Latif, Ahmad, A. Shahid., Idrees, A. Nasir., Tayyab Husnain (2015). Transformation and evaluation of

- Cry1Ac+Cry2A and GTGene in *Gossypium hirsutum* L. *Frontiers in Plant Science*, MID: 150843.
- Rao, A. Q., Bakhsh, A., Kiani, S., Shahzad, K., Shahid, A. A., Husnain, T., et al. (2009). The myth of plant transformation. *Biotechnol. Adv.* 27, 753–763. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.028
- Rao, A. Q., Hussain, S. S., Shahzad, M. S., Bokhari, S. Y. A., Raza, M. H., Rakha, A., et al. (2006). Somatic embryo genesis in wild relatives of cotton (*Gossypium* spp.). *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 7, 291–298. doi: 10.1631/jzus.2006.B0291
- Rao, A. Q., Irfan, M., Saleem, Z., Nasir, I. A., Riazuddin, S., and Husnain, T. (2011). Over expression of the phytochromeB gene from *Arabidopsis thaliana* increases plant growth and yield of cotton (*Gossypium hirsutum*). *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 12, 326–334. doi: 10.1631/jzus.B1000168
- Ruan, Y. L., Llewellyn, D. J., and Furbank, R. T. (2000). Pathway and control of sucrose import into initiating cotton fibre cells. *Func. Plant Biol.* 27, 795–800. doi: 10.1071/PP99154
- Ruan, Y. L., Llewellyn, D. J., and Furbank, R. T. (2001). The control of single-celled cotton fiber elongation by developmentally reversible gating of plasmodesmata and coordinated expression of sucrose and K⁺ transporters and expansin. *Plant Cell* 13, 47–60. doi: 10.1105/tpc.13.1.47
- Saha, S., Callahan, F. E., Douglas, A. D., and Creech, J. B. (1997). Localization of cotton tissue on quality of extractable DNA, RNA and protein. *J. Cotton Sci.* 1, 10–40.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schroder, J., Alt-Morbe, J. and Kithmann, H. 1989. Differences in Induction of Ti-plasmid Virulence Genes virG and virD and Continued Control of virD Expression by Four External Factors. *J. Mol. Plant-Microbe Interact.* Vol. 2: 301-308.
- Shu, H., Zhou, Z., Xu, N., Wang, Y., and Zheng, M. (2009). Sucrose metabolism in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibre under low temperature during fibre development. *Eur. J. Agron.* 31, 61–68. doi: 10.1016/j.eja.2009.03.004
- Sugiharto, Sakakibara, Sumadi, and Sugiyama. 1997. Differential Expression of Two Genes for Sucrose-Phosphate Synthase in Sugarcane: Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. *J. Plant Cell Physiol.* Vol. 38: 961-965.

- Sundar, I. K., and Sakthivel, N. (2008). Advances in selectable marker genes for plant transformation. *J.PlantPhysiol.* 165,1698–1716. doi: 10.1016/j.jplph.2008.08.002
- Takahashi, Ono, Ugaki, Ishimura, Aoki, and Ohsugi. 2000. Ser162-Dependent In activation of Over produced Sucrose-Phosphate Synthase Protein of Maize Leaf in Transgenic Rice Plants. *J. Plant Cell Physiol.* Vol. 4: 977-981.
- Tewari, M. (2006), Is price and cost competitiveness enough for apparel firms to gain market share in the world after quotas. A review. *Global Economy Journal*, 6 (4): Art. 5.
- Updegraff, D. M. (1969). Semi micro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.* 3,420–424. doi: 10.1016/S0003-2697(69)80009-6
- USDA foreign Agriculture Service. 2014.