



**TRANSFORMASI GEN MUTAN *SoSPS1-ΔN* PADA
TANAMAN TOMAT RAMPAI (*Lycopersicon esculentum*)
MENGUNAKAN VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens***

TESIS

Oleh:

Inyana Dwi Agustien

NIM: 141820401001

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

Dosen Pembimbing II : Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P

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

2017



**TRANSFORMASI GEN MUTAN *SoSPS1-ΔN* PADA TANAMAN TOMAT
RAMPAI (*Lycopersicon esculentum*) MENGGUNAKAN VEKTOR
*Agrobacterium tumefaciens***

TESIS

Oleh:

Inyana Dwi Agustien

NIM: 141820401001

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

2017



**TRANSFORMASI GEN MUTAN *SoSPS1-ΔN* PADA TANAMAN TOMAT
RAMPAI (*Lycopersicum esculentum*) MENGGUNAKAN VEKTOR
*Agrobacterium tumefaciens***

TESIS

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S2) dan mencapai gelar magister

Oleh:

Inyana Dwi Agustien

NIM: 141820401001

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

2017

PERSEMBAHAN

Dengan nama Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, tesis ini penulis persembahkan kepada:

1. Ibunda Mudjiwati, Bapak Isnanto Hadi, Ibu Siti Aisyah, dan Bapak Juma'a yang telah memberikan kasih sayang, segala pengorbanan, dan doa yang selalu mengiringi perjalanan hidup saya;
2. suamiku tercinta Ismail Marzuki atas motivasi, dan semangat untuk penyelesaian tesis ini;
3. anak-anakku tersayang Salsabila Jahroh Marzuqi, Rona Nabilah Zahro' Marzuki, Carissa Dona Ivana Marzuki, dan Clarissa Dona Ivana Marzuki yang telah rela berbagi waktu hingga selesainya tesis ini;
4. seluruh keluarga besar yang telah memberikan banyak dukungan dalam setiap langkahku;
5. semua guru dan dosen dari sekolah dasar hingga perguruan tinggi yang telah mendidik, terima kasih yang tak terhingga atas bimbingan dan ilmu-ilmu yang sangat bermanfaat bagi kehidupan saya;
6. almamater Jurusan Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTO

“Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari segala urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain.”

(Surat Al Insyiroh, ayat 6 dan 7)*



*) Yayasan Penyelenggara Penerjemah/ Pentafsir Al qur'an. 1971. Al qur'an dan Terjemahan. Saudi Arabia

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Inyana Dwi Agustien

NIM : 141820401001

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul **“Transformasi gen mutan *SoSPSI-ΔN* pada tanaman Tomat Rampai (*Lycopersum esculentum*) menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, 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, Juni 2017

Inyana Dwi Agustien

NIM 141820401001

TESIS

**TRANSFORMASI GEN MUTAN *SoSPS1-ΔN* PADA TANAMAN TOMAT
RAMPAI (*Lycopersicon esculentum*) MENGGUNAKAN VEKTOR
*Agrobacterium tumefaciens***

Oleh:

Inyana Dwi Agustien

NIM: 141820401001

Pembimbing :

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

Dosen Pembimbing II : Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P

PENGESAHAN

Tesis berjudul “Transformasi Mutan Gen *SoSPSI*- N pada Tanaman Tomat Rampai (*Lycopersum esculentum*) menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*” telah diuji dan disahkan pada:

Hari :

Tanggal :

Tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji :

Ketua

Sekretaris

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

Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P.

NIP 195510221982121001

NIP 196504251990022002

Anggota :

Penguji I

Penguji II

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

Dr. Rike Oktarianti, M.Si

NIP 197509132000032001

NIP. 196310261990022001

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D

NIP 19610204198711101

RINGKASAN

Transformasi Mutan Gen *SoSPS1-N* pada Tanaman Tomat Rampai (*Lycopersum esculentum*) menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*;
Inyana Dwi Agustien, 141820401001; 2017: 35 halaman; Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Sucrose Phosphate Synthase (SPS) merupakan enzim yang penting pada jalur biosintesis sukrosa yang terjadi di sitosol. Sukrosa yang dihasilkan kemudian ditranslokasikan dari jaringan asal (*source tissue*) melalui floem menuju berbagai macam jaringan penyimpan (*sink tissue*) untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Truernit, 2001; Eckardt, 2003)

Aktivitas SPS dipengaruhi oleh ada dan tidak adanya sinar. Ketika tidak ada sinar, enzim SPS mengalami fosforilasi dengan mengikat fosfat inorganik (Pi) dan aktifitas enzim SPS menjadi kurang aktif, sebaliknya bila ada sinar enzim SPS mengalami defosforilasi dengan melepaskan fosfat inorganik (Pi) sehingga aktivitasnya menjadi aktif. Perubahan ini disebabkan oleh protein khusus yaitu protein kinase yang mengkatalis fosforilasi asam amino residu serin dari protein SPS dan protein fosfatase yang menyebabkan defosforilasi residu asam amino serin (Huber dan Huber, 1992).

Daerah ΔN -terminal adalah daerah fosforilasi yang bertanggung jawab mengatur regulasi gelap-terang untuk mengaktifasi aktifitas enzim SPS pada tumbuhan (Huber *et al.*, 1989; Currati *et al.*, 1998; Lunn, 2002; Lunn dan Mac Rae, 2003; Castleden *et al.*, 2004 dalam Chua *et al.*, 2008). Sisi ΔN -terminal juga bertanggung jawab terhadap regulasi serin (Neliana, 2015). Sawitri *et al.* (2015) pernah melakukan penghilangan ΔN -terminal pada bakteri *Escherichia coli* dan hasil penelitian menunjukkan bahwa penghilangan ΔN -terminal dapat meningkatkan aktivitas SPS dibandingkan dengan yang *full length* SPS. Berdasarkan penelitian tersebut maka akan dilakukan penelitian pada tanaman tomat dengan penghilangan ΔN -terminal. Penelitian tersebut digunakan untuk

melihat apakah ada pengaruh peningkatan aktivitas SPS pada tanaman tomat yang telah diinsersikan gen mutan *SoSPSI* dari tanaman tebu dengan penghilangan ΔN -terminal. Penelitian dilakukan dengan menggunakan vektor *A. tumefaciens* yang merupakan bakteri yang hidup pada tanaman dikotil.

Penelitian dilakukan dalam dua tahap awal yaitu terdiri dari persiapan eksplan transformasi dan persiapan vektor transformasi. Tahapan transformasi diantaranya meliputi infeksi, ko-kultivasi, eliminasi, seleksi, dan aklimatisasi. Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tunas apikal tanaman tomat varietas rampai secara *in vitro* umur 14 hari. Transformasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali ulangan yang masing-masing merupakan penelitian yang terpisah (*Independent Experiment*). Seleksi dilakukan sebanyak 5 kali dengan masing-masing tahapan seleksi membutuhkan waktu 2 minggu. Agen penyeleksi yang digunakan mulai seleksi 1-5 yaitu menggunakan antibiotik *kanamycin* sebesar 50 mg/L-1. Eksplan yang lolos seleksi 5 dan aklimatisasi kemudian dikonfirmasi keberadaan gen target dengan menggunakan primer *nptII* F/R, serta dilakukan pengamatan tambahan agronomi berupa jumlah buah, berat buah, dan kandungan sukrosa buah.

Hasil transformasi mutan gen *SoSPSI- ΔN* dengan efektifitas 6,6% didapatkan 10 tanaman positif terinsersi gen *SoSPSI- ΔN* , yaitu T1.2, T1.5, T2.13, T2.20, T3.3, T3.4, T3.5, T3.10, T3.12, dan T3.14. Akumulasi sukrosa akibat transformasi mutan gen *SoSPSI- ΔN* terjadi pada tanaman positif transformasi dengan nilai bervariasi, diikuti dengan peningkatan jumlah dan berat buah tomat. Berdasarkan hasil analisis korelasi antara berat buah tomat transforman dengan kandungan sukrosa didapatkan hubungan positif, yaitu setiap penambahan satu gram buah tomat transgenik akan terjadi peningkatan kandungan sukrosa buah sebesar 0,138 μ g.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, karunia serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tesis yang berjudul “Transformasi Gen Mutan *SoSPSI-ΔN* pada Tanaman Tomat Rampai (*Lycopersum esculentum*) menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*”. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata dua (S2) pada Jurusan Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan tesis ini penulis menerima banyak bantuan dari berbagai pihak yang bersifat materiil, bimbingan maupun motivasi. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc selaku Dosen Pembimbing Utama, Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P. selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, perhatian dan bimbingan dalam penulisan tesis ini;
2. Dr. rer. nat. Kartika Senjarini, S.Si., M.Si. dan Dr. Rike Oktarianti, M.Si selaku Dosen Penguji atas masukan dan saran guna kesempurnaan penulisan tesis ini;
3. Prof. Sudarmadji selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan saran selama penulis menjadi mahasiswa di Universitas Jember;
4. Orang tua Mudjiwati, Isnanto Hadi, Siti Aisyah, Juma'a yang selalu memberikan kasih sayang, pengorbanan dan doa sepanjang perjalanan hidup;
5. Suamiku tercinta Ismail Marzuki yang selalu memberikan motivasi, dan semangat;
6. Anak-anakku tersayang Salsabila Jahroh Marzuqi, Rona Nabilah zahro' Marzuki, Carissa Dona Ivana Marzuki, dan Clarissa Dona Ivana Marzuki yang selalu memberi kasih sayang dan motivasi untuk mama selama ini,
7. Purnama Okviandari, S.P., M.P., Arsetyo Rahardhianto, S.Si., Nurul Hidayati, S.Si., Putu Frida Oktaningtias Widiarthi, S.Si, dan Ken Melati, S.Si. yang telah

memberikan masukan dan mengajari kedisiplinan selama melaksanakan tugas akhir di CDAST;

7. seluruh civitas akademika serta staf dan karyawan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember yang telah membantu selama masa perkuliahan;
8. seluruh kawan seperjuangan di Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman CDAST Universitas Jember (Ncus, Intan, Weny, Retno, Novita, Kiki, Suvia, Nana, Warda, Mbun, Chesa, Winda, Diqita, Agnes, Aping, Pika, Lutfi, Gerda, Ifa, Guruh, Amir, Retna, Febri, Rosyadi, dan Afid), *tomato group* (mbak Evi, mas Obama, mas Reza, dan mbak Ayu), Dosen Pendamping Penelitian (Pak Fafan dan Mbak Widhi), terima kasih atas seluruh kebersamaan, suka duka dan bantuan dalam menyelesaikan penelitian ini;
10. seluruh mahasiswa Magister Biologi angkatan 2014 (S2 Biologi: mbak Evi, mbak Qusnul, mbak Esti, mbak Sheila, dan mas Djoni) yang telah memberikan banyak kenangan yang tidak terlupakan selama menjalani kuliah di Magister Biologi;
12. sahabatku Mila Susanti, terima kasih atas segala kebersamaan, dukungan, dan bantuannya.
13. seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu dan memberi semangat selama di Universitas Jember.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas segala bantuan dan dukungan yang telah diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa banyak kekurangan dalam penulisan tesis ini. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya bagi perkembangan ilmu biologi.

Jember, Juli 2017

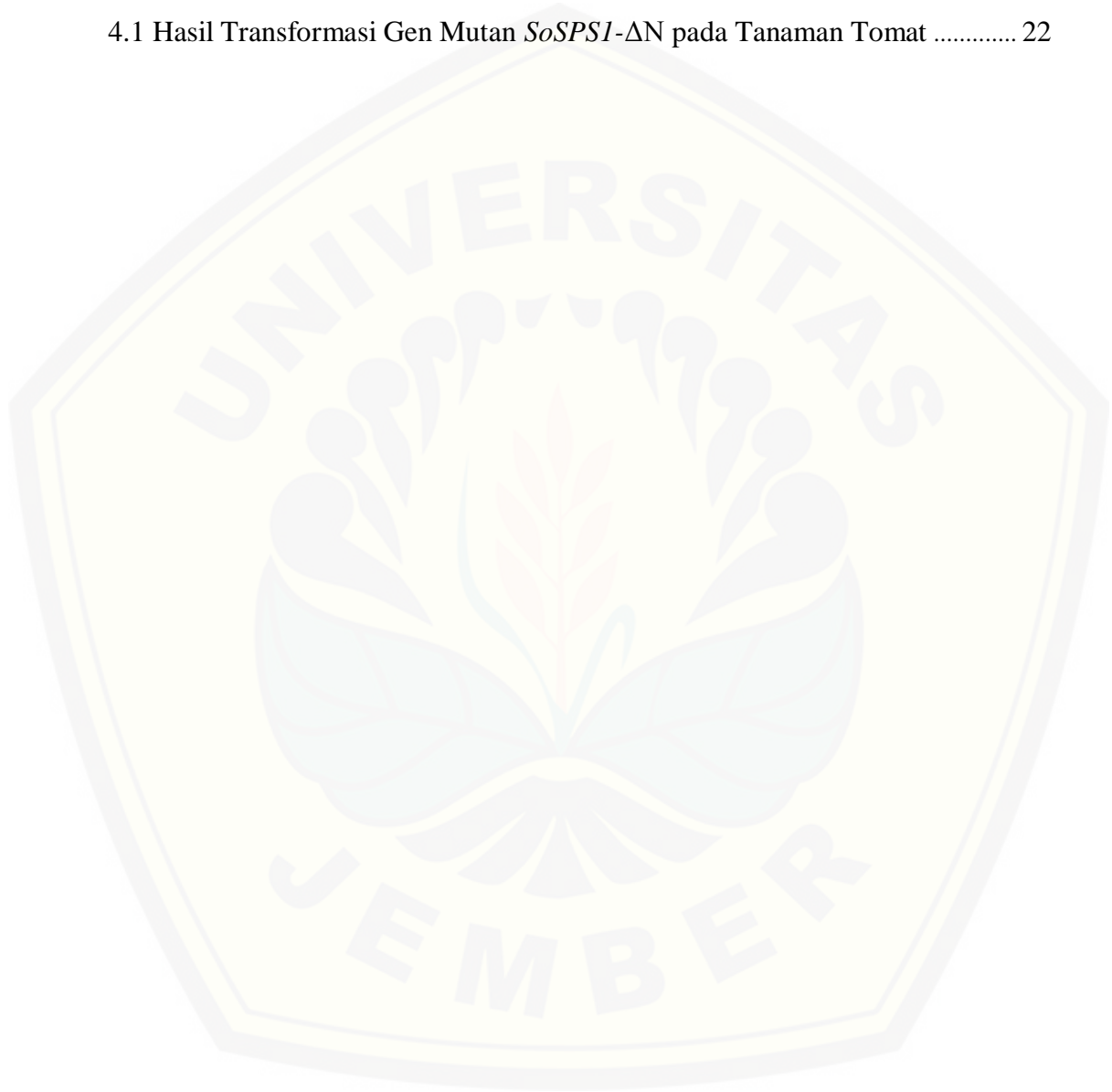
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR ISTILAH	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	2
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Sucrose Phospat Synthase</i> (SPS) dalam Akumulasi Sukrosa	4
2.2 Transformasi Gen oleh <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	5
2.3 Peranan Gen <i>SoSPS1</i> dalam Biosintesis Sukrosa	7
2.4 Regulasi <i>Sucrose Phospat Synthase</i> (SPS)	8
2.5 Hipotesis	9
BAB 3. METODE PENELITIAN	10
3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan	10
3.2 Alat dan Bahan	10

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.3 Hasil Transformasi Gen Mutan <i>SoSPSI-ΔN</i> pada Tanaman Tomat	17
4.1 Hasil Transformasi Gen Mutan <i>SoSPSI-ΔN</i> pada Tanaman Tomat	22

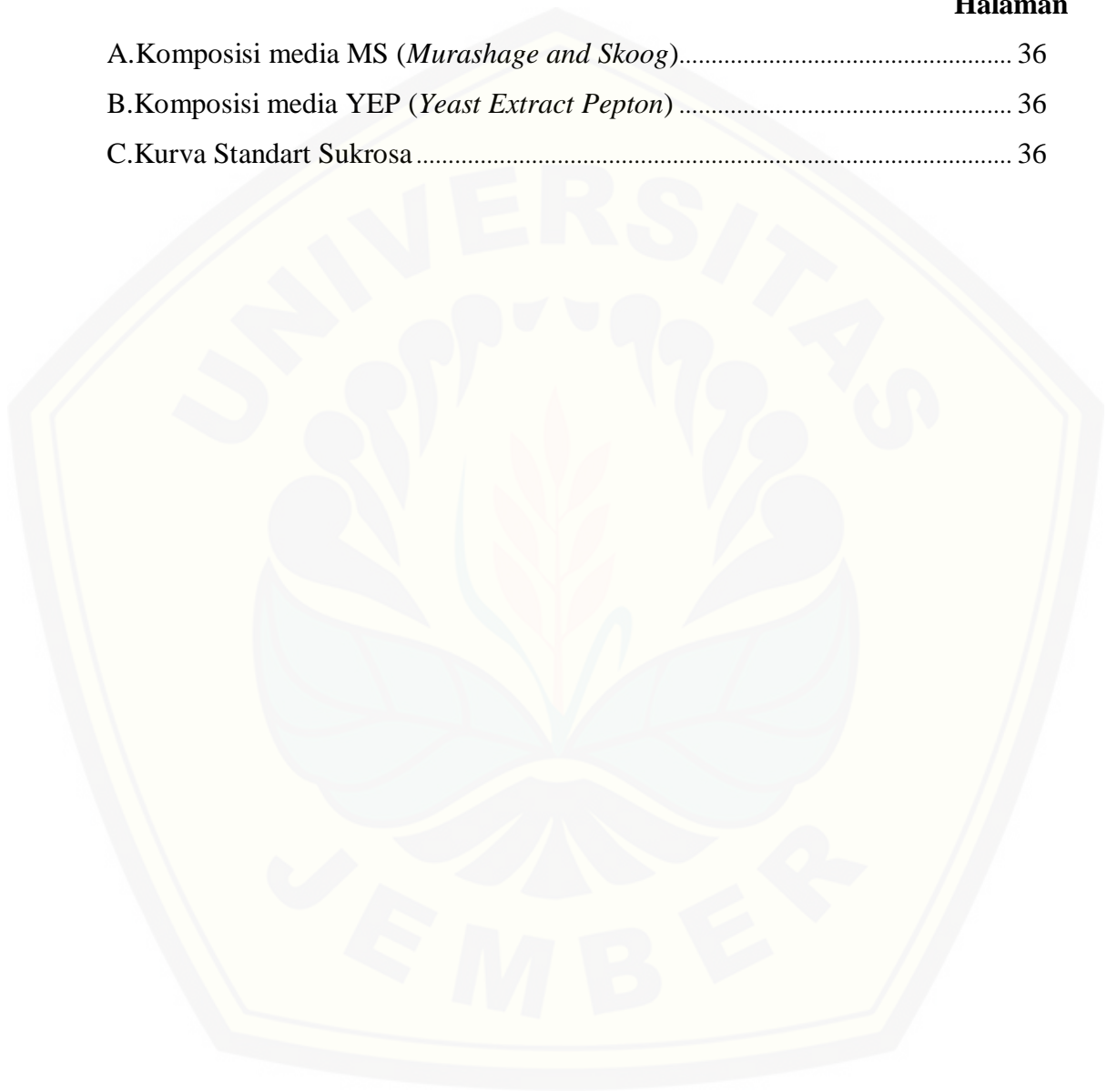


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
3.1 Sucrose Phospate Synthase	4
3.2 Rancangan Alur Penelitian	11
4.1a Peta Konstruk Plasmid pRI-101-AN SoSPS1- Δ N	19
4.1b Hasil PCR menggunakan primer F/R nptII dan DNA template	20
4.2 Tahapan transformasi	20
4.3 Hasil Elektroforesis PCR tanaman putatif transforman	24
4.4 Jumlah buah tomat	25
4.5 Berat buah tomat	25
4.6 Hasil uji sukrosa buah	27
4.7 Korelasi antara berat buah dan sukrosa	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi media MS (<i>Murashige and Skoog</i>).....	36
B. Komposisi media YEP (<i>Yeast Extract Pepton</i>)	36
C. Kurva Standart Sukrosa	36



DAFTAR ISTILAH

DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
F6P	: <i>Fructose-6-phosphate</i>
NOS	: <i>Nopaline synthase gene</i>
MS	: <i>Murahige skoog</i>
Npt II	: <i>The neomycin phosphotransferase gene</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
T-DNA	: <i>Transfer deoxyribonucleic acid</i>
Ti Plasmid	: <i>Tumor Inducing plasmid</i>
SoSPS	: <i>Shacharum officinarum Sucrose Phosphate Synthase</i>
SPS	: <i>Sucrose phosphate synthase</i>
YEP	: <i>Yeast extract pepton</i>

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Transformasi genetik dengan *Agrobacterium tumefaciens* merupakan salah satu teknik pemuliaan tanaman yang banyak dikembangkan. Kelebihan transformasi menggunakan *A. tumefaciens* dibandingkan dengan *particle bombardment* dan *electroporation* yaitu lebih efektif, murah, mudah digunakan dan jumlah DNA yang dapat dimasukkan lebih spesifik (Lessard *et al.*, 2002).

Transformasi genetik dapat diketahui dengan memanfaatkan tanaman tertentu sebagai tanaman model. Tomat merupakan salah satu tanaman model yang umum digunakan dalam transformasi gen pada tanaman buah (Hille *et al.*, 1989). Tomat dipilih sebagai tanaman model karena merupakan tanaman yang berumur pendek (Tugiyono, 1991) dan termasuk tanaman dikotil yang merupakan tanaman inang bagi *A. tumefaciens* sehingga dapat memudahkan proses transformasi gen.

Transformasi genetik pada tanaman tomat telah dilakukan untuk meningkatkan kandungan sukrosa pada tanaman tomat (Worrell *et al.*, 1991). *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) merupakan enzim yang berperan penting pada jalur biosintesis sukrosa yang terjadi di sitosol. Enzim ini mengkatalisis pembentukan *sucrose-6-phosphat* (S-6-P) dari *fructose-6-phosphate* (F-6-P) dan *uridine -5-disphospho glucose* (UDP glucose) (Huber dan Huber, 1996). Selanjutnya fosfat pada S-6-P dihidrolisis oleh enzim *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) sehingga dihasilkan sukrosa dan phosphate anorganik (Pi), Sukrosa yang dihasilkan kemudian ditranslokasikan dari jaringan asal (*source tissue*) melalui floem menuju berbagai macam jaringan penyimpanan (*sink tissue*) untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Truernit, 2001; Eckardt, 2003)

Aktivitas SPS dipengaruhi oleh adanya sinar matahari. Ketika tidak ada sinar, enzim SPS mengalami fosforilasi dengan mengikat fosfat inorganik (Pi) dan aktifitas enzim SPS menjadi kurang aktif, sebaliknya bila ada sinar enzim

SPS mengalami defosforilasi dengan melepaskan fosfat inorganik (Pi) sehingga aktivitasnya menjadi aktif. Perubahan ini disebabkan oleh protein khusus yaitu protein kinase yang mengkatalis fosforilasi asam amino residu serin dari protein SPS dan protein fosfatase yang menyebabkan defosforilasi residu asam amino serin (Huber dan Huber, 1992).

Daerah Δ N-terminal adalah daerah fosforilasi yang bertanggung jawab mengatur regulasi gelap-terang untuk mengaktifasi aktivitas enzim SPS pada tumbuhan (Huber *et al.*, 1989; Currati *et al.*, 1998; Lunn, 2002; Lunn dan Mac Rae, 2003; Castleden *et al.*, 2004 dalam Chua *et al.*, 2008). Sisi N-terminal juga bertanggung jawab terhadap regulasi serin (Neliana, 2015). Sawitri *et al.* (2015) pernah melakukan penghilangan Δ N-terminal pada bakteri *Escherichia coli* dan hasil penelitian menunjukkan bahwa penghilangan Δ N-terminal dapat meningkatkan aktivitas SPS dibandingkan dengan yang *full length* SPS. Berdasarkan penelitian tersebut maka akan dilakukan penelitian pada tanaman tomat dengan penghilangan Δ N-terminal. Penelitian tersebut digunakan untuk melihat apakah ada pengaruh peningkatan aktivitas SPS pada tanaman tomat yang telah diinsersikan gen mutan *SoSPSI* dari tanaman tebu dengan penghilangan N-terminal. Penelitian dilakukan dengan menggunakan vektor *A. tumefaciens* yang merupakan bakteri yang hidup pada tanaman dikotil.

1.2 Rumusan Masalah

Transformasi gen SPS pada tanaman tomat telah terbukti meningkatkan aktivitas enzim SPS dan akumulasi sukrosa pada tanaman tomat. Namun aktivitas SPS tersebut dipengaruhi oleh ada tidaknya sinar matahari yang disebabkan adanya fosforilasi pada daerah Δ N-terminal. Oleh karena itu dilakukan penelitian tentang transformasi gen mutan *SoSPSI- Δ N* pada tanaman tomat dan mengetahui pengaruhnya terhadap aktivitas enzim *SPS* dalam proses biosintesis sukrosa.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini meliputi; tomat yang digunakan yaitu tomat varietas rampai dengan menggunakan eksplan yaitu tunas apikal. Plasmid

yang digunakan yaitu PRI-101-AN, dengan gen mutan *SoSPSI-ΔN* yang disisipkan pada *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101. Transformasi dilakukan sebanyak 3 kali merupakan penelitian terpisah (*Independent Experiment*). Konfirmasi keberadaan gen target pada tanaman tomat putative transforman gen mutan *SoSPSI-ΔN* dilakukan dengan mendeteksi keberadaan gen penyeleksi menggunakan primer nptII F/R.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mendapatkan tanaman tomat PRG hasil transformasi genetik dengan gen mutan *SoSPSI- ΔN*
2. Mengetahui hasil akumulasi sukrosa pada tanaman tomat PRG hasil transformasi genetik dengan gen mutan *SoSPSI- ΔN*

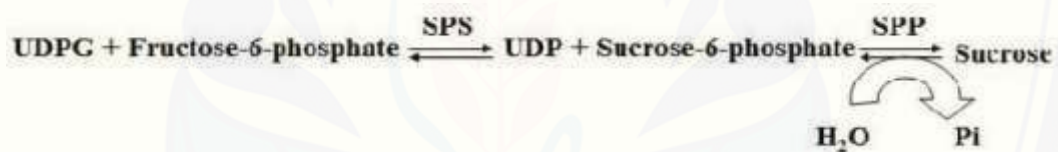
1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diperoleh adalah didapatkan tanaman PRG gen mutan *SoSPSI – ΔN* yang mempunyai aktivitas SPS lebih tinggi dan dapat digunakan sebagai sampel yang akan diujikan untuk analisis ekspresi mutan gen *SoSPSI- ΔN* pada tanaman tomat transgenik .

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Sucrose phosphate synthase* (SPS) dalam akumulasi Sukrosa

Biosintesa sukrosa yang tinggi pada tanaman melibatkan enzim-enzim pembentuk dan perombak sukrosa antara lain adalah *sucrose phosphate synthase* (SPS), *Sucrose synthase* (SuSy), dan invertase. *Sucrose phosphate synthase* (SPS) merupakan enzim yang penting pada jalur biosintesis sukrosa yang terjadi di sitosol. Enzim ini mengkatalisis pembentukan *sucrose-6-phosphate* dari *fructose-6-phosphate* dan *uridine-5-diphospho glucose*. Selanjutnya *phosphate* pada *sucrose-6-phosphate* dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) sehingga dihasilkan sukrosa dan *phosphate* organik (Langenkamper *et al.*, 2002). *Sucrose synthase* (SuSy) yang mendegradasi reaksi katalitik dari enzim SPS-SPP adalah sebagai berikut:



(Wang, *et al.*, 2013)

Gambar 3.1 *Sucrose Phosphate Synthase*

Sel tanaman memiliki kandungan SPS sangat rendah dan mudah mengalami inaktivasi (Huber *et al.*, 1989). Peningkatan aktivitas SPS sangat menguntungkan untuk pertumbuhan tanaman dan peningkatan produksi. Sampai saat ini gen SPS telah berhasil diisolasi dari beberapa spesies tanaman antara lain dari jagung dan *Arabidopsis thaliana* (Langenkamper *et al.*, 2002; Lunn dan McRae, 2003). Dilaporkan bahwa pada tanaman terdapat lebih dari satu gen yang mengkode SPS. Pada tanaman tebu terdapat 2 gen yang mengkode SPS yaitu *SoSPS1* dan *SoSPS2* (Sugiharto, *et al.*, 1997b). Pada tanaman tebu peningkatan aktivitas SPS mempunyai korelasi yang positif terhadap tingkat pertumbuhan dan produksi gulanya (Sugiharto *et al.*, 1997). Berdasarkan analisis Northern blot, gen *SoSPS1* lebih dominan diekspresikan pada jaringan fotosintetik (daun) sedangkan *SoSPS2*

diekspresikan di akar. Pada tingkatan transkripsi, ekspresi gen *SoSPS1* dipengaruhi oleh cahaya dan mencapai maksimum setelah pemberian cahaya selama 24 jam. Hal ini berlawanan dengan gen *SoSPS2* dimana ekspresinya pada tingkat transkripsi tidak dipengaruhi oleh cahaya (Sugiharto *et al.*, 1997).

2.2 Transformasi Gen oleh *Agrobacterium tumefaciens*

Metode transfer gen pada tanaman dapat diklasifikasikan menjadi dua yaitu metode langsung (*direct method*) dan metode tidak langsung (*indirect method*) (Khoichi *et al.*, 2002). Metode langsung dapat dilakukan dengan *Particle bombardment* dan *Electroporation*, sedangkan metode tidak langsung menggunakan vektor *Agrobacterium*. *Agrobacterium tumefaciens* merupakan bakteri tanah (*soil borne pathogen*) gram negatif yang bersifat fitopatogen pada tanaman dikotil. Sel pada *Agrobacterium tumefaciens* memiliki kemampuan dalam mentransfer T-DNA yang dapat menyebabkan penyakit tumor (*crown gall*) pada tanaman dikotil.

Terdapat tiga komponen genetik penting yang terlibat dalam proses pembentukan tumor dan transfer DNA ke dalam sel tanaman di dalam sel *Agrobacterium*. Komponen yang pertama adalah gen virulen kromosom (*Chromosomal virulence*), yang terdapat pada kromosom *Agrobacterium* dan berfungsi dalam pelekatan bakteri dengan sel tanaman. Komponen yang kedua, sekelompok gen virulen yang terdapat dalam plasmid Ti (*Tumor inducing*) yang berukuran besar (200 kb) yang berperan dalam menginduksi transfer dan integrasi T-DNA. Komponen ketiga adalah daerah T-DNA yang juga terletak pada plasmid Ti (*Tumor inducing*). Daerah T-DNA dibatasi oleh LB (*Left Border*) dan RB (*Right Border*) yang mengandung gen penting bagi *Agrobacterium* (Rahmawati, 1997).

Tahapan transfer T-DNA dari *Agrobacterium* ke dalam tanaman, diawali dengan adanya jaringan yang terluka dari tanaman, sehingga eksplan tersebut akan mengeluarkan senyawa fenol monosiklik yaitu asetosiringon. Asetosiringon berinteraksi dengan *virA* dan menghasilkan sinyal intraseluler yang berupa aktivasi *virG*. *VirG* yang aktif ini mengaktifkan gen virulen lainnya (*virB*, *C*, *D* dan *E*) yang merupakan gen-gen yang terletak di dalam kromosom *Agrobacterium*

dan mempunyai fungsi untuk pelekatan bakteri pada sel tanaman dengan membentuk senyawa protein β -1,2-glukan melalui pergerakan kemotaksis (Douglas *et al.*, 1986). Induksi gen *vir* diikuti dengan pengenalan sekuen pembatas 25 pasang basa terulang (*imperfect direct repeat/border sequences*) yang mengapit T-DNA. Pembatas T-DNA kemudian dipotong oleh dua protein yang dihasilkan oleh operon *virD* yaitu VirD1 dan VirD2 (Filichkin dan Gelvin, 1993), sehingga diperoleh untai tunggal T-DNA.

T-kompleks yang merupakan kesatuan T-strand dan kompleks protein Vir E keluar dari sel bakteri dan masuk ke dalam sel tanaman. Proses pemindahan T-DNA dikode oleh operon *virB* yang terdiri dari 11 gen (Christie, 1997). Masing-masing gen, kecuali *virB1*, berperan pada proses terbentuknya tumor (Berger dan Christie, 1994). Protein VirB menunjukkan aktivitas ATPase dan diduga digunakan sebagai sumber energi untuk melepaskan subunit yang menyerupai pili konjugatif (Fullner *et al.*, 1996) VirB2 menjadi subunit yang memungkinkan kompleks T-DNA-VirD2 dipindahkan ke dalam sitoplasma sel tanaman. Kompleks T-DNA-VirD2 dibungkus oleh protein VirE2 yang berperan melindungi T-DNA dari degradasi yang disebabkan oleh enzim-enzim nuklease tanaman (Manuhara, 2006). Kompleks T-DNA-VirD2 dan protein VirE yang telah berada di dalam sitoplasma sel tanaman kemudian masuk ke dalam inti sel tanaman. VirD2 dan VirE2 mengandung NLS (*nuclear localization signal*) yang dikenali oleh faktor yang terdapat dalam sitosol inti sel yang disebut importin yang berfungsi memasukkan protein ke dalam inti sel tanaman (Ballas dan Citovsky, 1997) T kompleks yang menembus dinding inti sel kemudian mayor dari pili-pili tersebut. Jembatan berupa pili yang dibentuk oleh *VirB* berintegrasi dengan kromosom tanaman (Zupan dan Zambryski, 1995).

Transformasi menggunakan vektor *A. tumefaciens* memiliki beberapa keuntungan antara lain bersifat dapat diulang (*reproducible*), relatif lebih murah, memberikan pola integrasi yang tegas, jumlah salinan dalam genom sedikit (1-3 salinan), dan memungkinkan insersi sekuens dengan salinan tunggal yang stabil dan efisien terhadap genom tanaman (Enung, 2009). Keberhasilan proses transformasi gen melalui *A. tumefaciens* sangat ditentukan oleh berbagai hal

antara lain kesesuaian antara strain *A. tumefaciens* dengan jenis tanaman dan plasmid vektor yang dipergunakan, kerapatan sel *Agrobacterium* yang digunakan pada saat proses transformasi genetik, lama waktu ko-kultivasi, kondisi kultur *in vitro* dan sebagainya (Cheng *et al.* 2004). Transformasi menggunakan vektor *A.tumefaciens* telah banyak dilakukan salah satunya untuk meningkatkan biosintesis sukrosa dengan menginsersi gen *SoSPSI* (Okviandari, 2008).

2.3 Peranan Gen *SoSPSI* dalam Biosintesis Sukrosa

Sukrosa merupakan hasil fotosintesis utama dalam asimilasi karbon dan berperan dalam metabolisme tanaman (Buchanan, 2000) yang disintesis pada jaringan daun lalu didistribusikan pada jaringan nonfotosintetik melalui jaringan floem. Biosintesis sukrosa dipengaruhi oleh beberapa enzim, salah satunya *Sucrosa Phosphate Synthase* (SPS). SPS merupakan enzim yang penting pada jalur biosintesis sukrosa yang terjadi di sitosol. Enzim ini mengkatalis pembentukan *sucrose-6-phosphate* dari *fruktose-6-phosphate* dan *uridine-5-diphospho glucose*. Selanjutnya *phosphate* pada *sucrose-6-phosphate* dihidrolisis oleh *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) sehingga dihasilkan sukrosa dan *phosphate* anorganik (Pi) (Langenkamper, *et al.*, 2002).

Aktivitas SPS dipengaruhi oleh cahaya, pada kondisi gelap, SPS akan terfosforilasi oleh Pi. Hal ini menyebabkan afinitas SPS terhadap substrat meningkat (Huber and Huber, 1996). Menurut Sugiharto (2001), peningkatan aktivitas SPS dapat meningkatkan akumulasi sukrosa pada daun dan pertumbuhan tebu. Hal ini menunjukkan bahwa sintesa sukrosa yang tinggi menyebabkan kandungan sukrosa meningkat sehingga pengangkutan sumber karbon ke bagian tanaman yang lain menjadi lebih besar dan pertumbuhan lebih baik.

Sampai saat ini telah berhasil diisolasi gen SPS dari jagung (*Zea mays*) (Worrel *et al.*, 1991), bayam (*Spinach oleraceae*) (Sonnewald *et al.*, 1993), jeruk (*Citrus ushiu*) (Komatsu *et al.*, 1999), bit gula (Heese *et al.*, 1995) dan *Arabidopsis thaliana* (Langenkamper *et al.*, 2002; Lunn and McRae, 2003). Pada tanaman tebu terdapat dua gen yang mengkode SPS yaitu *SoSPSI* dan *SoSPS2* (Sugiharto, *et al.*, 1997b). Berdasarkan analisa northern blot, gen *SoSPSI* lebih

dominan diekspresikan pada jaringan fotosintetik (daun) sedangkan *SoSPS2* diekspresikan pada jaringan non fotosintetik (akar) dan tidak dipengaruhi cahaya (Sugiharto *et al.*, 1997), Berdasarkan alasan diatas maka gen yang digunakan adalah gen *SoSPS1*.

2.4 Regulasi *Sucrose phosphate synthase* (SPS)

Sucrose phosphate synthase (SPS) diketahui memiliki 3 situs regulasi yang penting yaitu situs regulasi cahaya, situs regulasi aktivasi stres osmotik dan situs regulasi 14-3-3 protein spesifik (Wang *et al.*, 2013). Aktifitas SPS pada tanaman juga dipengaruhi oleh regulasi enzim SPS yaitu alosterik efektor (*glucose-6-phosphat*) spesifik untuk merespon perubahan gelap-terang dan Pi melalui protein fosforilasi yang bereaksi balik dengan *seryn* spesifik untuk merespon perubahan gelap terang (Stitt *et al.*, 1987:217-218; dan Huber dan Huber, 1996:433). Sisi *seryn-162* pada jagung (*Zea mays*) dan *seryn-158* pada bayam (*Spinicia oleracea*) bertanggung jawab terhadap regulasi gelap-terang untuk mengaktivasi aktivitas enzim SPS pada tanaman (Winter dan Huber, 2000:258-260) sedangkan *seryn-424* terkait dengan stress osmotik atau cekaman osmotik (Toroser, 1999).

SPS tanaman memiliki peranan penting pada fotosintesis, yang aktivitasnya memodulasi bagian activator alosterik *glucose-6-phosphate* (G6P). Produksi *SPS* tebu rekombinan pada *E.coli* digunakan untuk meneliti hubungan struktur dan fungsi SPS. Ketika diekspresikan pada *E.coli* ditemukan dua bentuk SPS dengan ukuran yang berbeda . Ukuran yang lebih besar identik dengan enzim yang terdapat pada tanaman, sedangkan yang lebih pendek tidak memiliki daerah N-terminal 20 kDa. Penghilangan N-terminal sampai 171 asam amino ditemukan bahwa aktivitas *glucose-6-phosphate* (G6P) meningkat dengan penghilangan Δ N-terminal pada SPS tebu (Sawitri, 2015).

SPS tumbuhan memiliki dua domain yaitu *glukosiltransferase* domain (N-domain) yang terkait dengan *glucosyl transference* dan domain menyerupai SPP (C-domain). Aktivitas SPS tanaman tebu dipengaruhi oleh intensitas cahaya

gelap-terang, apabila intensitas cahaya rendah memungkinkan SPS terinaktivasi sehingga pembentukan sukrosa terhambat.

2.5 Hipotesis

Terjadi peningkatan aktivitas enzim SPS dan akumulasi sukrosa pada tanaman tomat PRG overekspresi mutan gen *SoSPSI- ΔN*.



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan pada Maret 2016 sampai April 2017. Tempat pelaksanaan penelitian adalah Laboratorium Divisi Biologi dan Bioteknologi, *Center of Development Advanced Science and Technology* (CDAST) Universitas Jember.

3.2 Alat dan Bahan

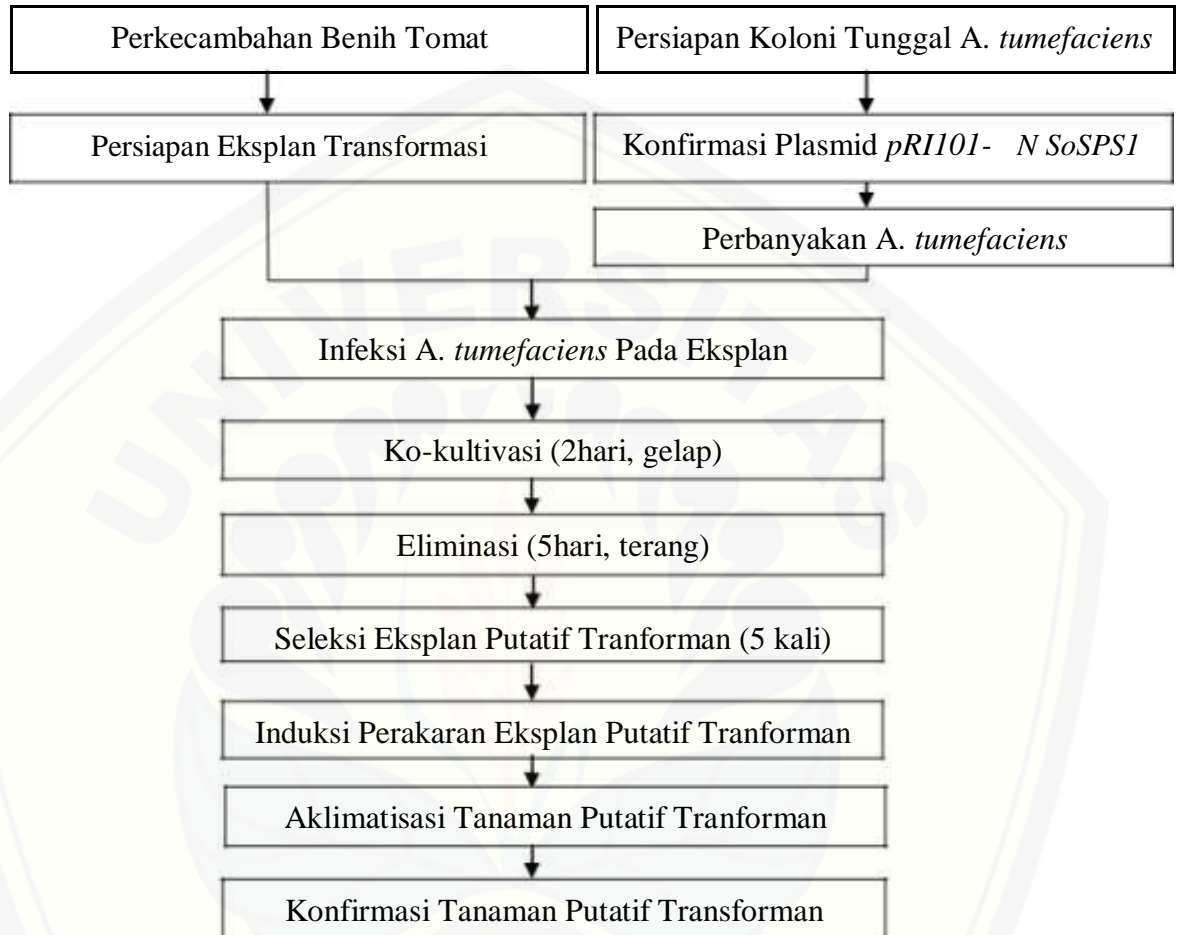
Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: *Autclave*, *Spectrofotometer*, *Laminar Air Flow* (LAF), *gel documentation system*, *nanodrop*, *shaker inkubator*, *growth chamber*, mesin elektroforesis, dan peralatan standar kultur jaringan, dan peralatan standar PCR.

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: biji tanaman tomat varietas rampai, *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, plasmid pRI 101-AN yang mengandung gen mutan *SoSPSI-N*, berbagai macam antibiotik antara lain *rifampycin*, *gentamycin*, *kanamycin*, *acetosiringone*, *cefotaxime*, Media *Murashige and Skoog*, media *Yeast Extract Pepton* (YEP), kertas saring, *Sodium hypochlorite* (NaCLO) 1,57%, Alkohol 70% dan bahan kimia untuk isolasi DNA dan bahan lain yang digunakan untuk analisis PCR.

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Prosedur Penelitian

Alur penelitian dalam penelitian ini sebagai berikut:



Gambar 3.2 Rancangan Alur Penelitian

3.3.2 Perkecambahan Benih Tomat secara *in vitro*

Semua proses penanaman dilakukan dalam *Laminar Air Flow*. Biji tomat varietas rampai (± 50 /botol kultur) direndam menggunakan aquadest steril hangat (± 5 ml) selama ± 5 menit, sehingga didapatkan biji yang bernas, buang air dan gojok biji menggunakan NaClO 1,57 % selama 1,5 menit. Kemudian bilas biji tomat dengan cara digojok dengan aquadest steril. Pembilasan diulang sebanyak 6 kali, kemudian dikeringkan dengan kertas filter steril. Setelah biji kering, biji ditanam ke dalam media MS0, didalam botol kultur selama ± 14 hari di ruang

kultur jaringan. Tunas apikal yang terbentuk digunakan sebagai eksplan untuk transformasi.

3.3.3 Persiapan Koloni Tunggal *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens yang digunakan dalam penelitian ini adalah *A. tumefaciens* yang mengandung gen mutan N-terminal tanaman tebu yang telah disimpan dalam *gliserol stock*, diambil sebanyak 25 μl , kemudian diinokulasikan ke media YEP cair 2 ml dalam tabung reaksi yang mengandung antibiotik *rifampycin* 100 mgL^{-1} , *kanamycin* 50 mgL^{-1} , *gentamycin* 12,5 mgL^{-1} . Hasil inokulasi diinkubasi dalam shaker 150 rpm pada suhu 28°C.

Biakan *A. tumefaciens* yang telah tumbuh diambil 1 ose, kemudian diinokulasikan dengan metode *streak quadrant* pada media YEP padat yang mengandung antibiotik *rifampycin* 100 mgL^{-1} , *Kanamycin* 50 mgL^{-1} , *gentamycin* 12,5 mgL^{-1} , dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28°C. Koloni tunggal yang diperoleh selanjutnya diisolasi DNA plasmid untuk dikonfirmasi keberadaan gen mutan *SoSPSI- N* sebelum digunakan dalam transformasi.

3.3.4 Isolasi DNA Plasmid dan Konfirmasi Gen Mutan *SoSPSI- N* pada *A. tumefaciens*

Isolasi plasmid dilakukan untuk konfirmasi keberadaan gen mutan *SoSPSI- N* dalam *A. tumefaciens*. Teknik isolasi dari sel bakteri dilakukan berdasarkan metode yang disebutkan dalam Sambrook *et al* (1989). *A. tumefaciens* strain GV3101 memiliki ketahanan terhadap antibiotik *rifampycin* (marker strain), *gentamycin* (marker gen virulen) (Erickson, *et al.* 2004), sedangkan plasmid pRI-101-AN-*SoSPSI* memiliki marker ketahanan terhadap antibiotik *kanamycin*. Oleh adanya marker terhadap beberapa antibiotik tersebut, maka bakteri *A. tumefaciens* dengan plasmid pRI-101-AN-*SoSPSI* akan bisa tumbuh dengan medium YEP (*Yeast Extract Pepton*) yang telah ditambahkan dengan 3 macam antibiotik tersebut (*rifampycin*, *gentamycin*, dan *kanamycin*).

Sel-sel bakteri *A. tumefaciens* ditumbuhkan pada media YEP 2 ml yang mengandung antibiotik *rifampycin* 100 mgL^{-1} , *kanamicin* 50 mgL^{-1} , *gentamycin*

12,5 mgL⁻¹, dan di inkubasi shaker pada suhu 28°C selama *overnight*. Kemudian sel dapat dipanen, dengan dilakukan ekstraksi plasmid dari sel. DNA Plasmid yang dihasilkan dilarutkan dalam 20 µl buffer TE. Kemudian DNA diamplifikasi dengan alat PCR dan dikonfirmasi dengan elektroforesis 1 % agarose. Selanjutnya divisualisasi dengan *gel documentation system*.

3.3.5 Proses Infeksi dan Kokultivasi

Koloni tunggal *A. tumefaciens* yang mengandung gen mutan *SoSPSI- N* diinokulasikan pada media YEP cair 2 ml yang mengandung antibiotik *rifampycin* 100 mgL⁻¹, *kanamycin* 50 mgL⁻¹, dan *gentamycin* 12,5 mgL⁻¹, biakan diinkubasi pada *orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28°C selama 24 jam. Starter sebanyak 2 ml disubkultur dalam media YEP cair 50ml yang mengandung antibiotik *rifampycin* 100mgL⁻¹, *kanamycin* 50mgL⁻¹, dan *gentamycin* 12,5 mgL⁻¹, diinkubasi *shaker* 150 rpm pada suhu 28°C dengan OD ± 0,5. Kepadatan populasi yang dibutuhkan yakni sebesar 0.5-1(OD600). Kepadatan sel sebesar 0.5-1 adalah kisaran yang optimal untuk transformasi, karena pada rentangan tersebut bakteri mencapai fase logaritmik sehingga mampu mengoptimalkan proses infeksi pada tanaman (Nishimura *et al*, 2006). Fase logaritmik tersebut dapat meningkatkan infeksi pada tanaman (Kusmiati, 2007). Infeksi yang berlebih dapat menyebabkan terganggunya proses regulasi pada tanaman, sedangkan bila *A. tumefaciens* belum mencapai fase log maka dapat menyebabkan proses infeksi pada tanaman kurang efektif (mengurangi frekuensi insersi T-DNA). Pengukuran OD diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm (A₆₀₀). Koloni tunggal dari *Agrobacterium* pada media 50 YEP cair di sentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit dan peletnya disuspensikan pada media MS cair sebanyak 50 ml. Eksplan tomat dimasukkan digojok dengan shaker selama 15 menit pada suhu 28⁰C dan kecepatan 50 rpm. Eksplan ditanam pada media kokultivasi selama 2 hari (gelap).

3.3.6 Eliminasi dan Seleksi Eksplan Putatif Transforman

Eliminasi *Agrobacterium* dilakukan setelah kokultivasi, dengan cara eksplan dicuci dengan larutan *cefotaxime* 500 mgL^{-1} , selanjutnya dibilas dengan aquadest steril. Proses pencucian dilakukan sebanyak 3 kali. Eksplan dikeringkan diatas kertas saring steril dan ditanam pada media eliminasi (MS + *cefotaxime* 500 mgL^{-1}) dan di inkubasi pada media *cefotaxime* selama 5 hari dalam kondisi terang .

Tahapan seleksi eksplan dilakukan dengan subkultur planlet dari media eliminasi ke medium seleksi yang mengandung *cefotaxime* 500 mgL^{-1} dan *kanamycin* 50 mgL^{-1} . Tahapan seleksi dilakukan 5 kali seleksi dengan masing-masing membutuhkan waktu selama 14 hari. *Cefotaxime* merupakan antibiotik golongan sefalosporin yang aktif menghambat sintesis peptidoglikan dinding sel terutama bakteri gram negatif (Mathias dan Boyd, 1986). Penggunaan *kanamycin* pada media seleksi ini berfungsi sebagai *selectble marker* sesuai dengan penanda pada plasmid yang telah disisipkan. Planlet yang lolos sampai pada seleksi 5 atau tinggi tunas $\pm 2 \text{ cm}$, dipindahkan pada medium perakaran . Medium perakaran terdiri dari MS, *phytagel* 2,5gr, pH 5,8, *Cefotaxime* 500 mgL^{-1} . Tanaman yang mampu bertahan pada media seleksi merupakan tanaman putative transforman. Planlet yang berukuran sekitar 5 cm siap diaklimatisasi.

3.3.7 Aklimatisasi

Aklimatisasi dilakukan pada plantlet tomat dengan tinggi tunas $\pm 5 \text{ cm}$, yang berumur ± 70 hari. Plantlet dibersihkan dari sisa-sisa agar pada air mengalir dan direndam dalam larutan fungisida (*Dithane* 0,1%) selama 3 menit. Media yang digunakan adalah campuran pasir dilakukan dengan penyemprotan aquadest dan pemberian larutan nutrisi hougland. Aklimatisasi dilakukan bertahap yaitu tanaman diletakkan dalam ruangan sungkup plastik untuk menghindari evapotranspirasi yang berlebihan, kemudian dipindah ke dalam *greenhouse*.

3.3.8 Isolasi DNA Genom

Isolasi DNA genom dilakukan seperti metode yang disebutkan oleh Zheng

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

Purifikasi DNA dilakukan dengan menambahkan 10 µl RNA-*se*, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan dilanjutkan dengan menambahkan 300 µl PCI serta dihomogenkan dengan vorteks. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C Supernatan dipindah ke *microtube* baru, dan ditambah dengan kloroform (1 supernatan : 1 Kloroform) kemudian divorteks, dan sentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu 4°C. Supernatan dipindah ke *microtube* baru, kemudian ditambah isopropanol sebanyak 0,8 kali supernatan dan NaAc sebanyak 0,2 kali supernatan, dibolak-balik secara perlahan. Sampel diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam, disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu 4°C. Pelet di cuci dengan Ethanol 70% sebanyak 600 µl, disentrifugasi lagi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit, pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan dengan *vacum dry* selama 5 menit kemudian ditambah 20 µl buffer TE. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya menggunakan *nano vue plus* dan dianalisis menggunakan PCR.

3.3.9 Analisis PCR Genom Tanaman Putatif Transforman

Analisis PCR menggunakan primer *nptII* F/R dengan sekuen sebagai berikut menggunakan primer *nptII* (*Neomycin phosphotransferase*) - F (5'- GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGCC-3'), primer *nptII*-R (5'- GTC GCT TGG TCG GTC ATT TCC - 3') yang berukuran 550bp merupakan primer (*forward* dan *reverse*) digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen *SoSPS1*. Digunakan *nptII* karena pada konstruk plasmid yang digunakan, *selectable markernya* berupa Kan^R atau resisten terhadap *Kanamycin*.

PCR menggunakan PCR *Master Mix* (KAPA) yang dalam satu kali reaksi memiliki total volume 10µl dengan komposisi larutan yang terdiri dari komponen master mix kappa sebanyak 5 µl, *forward* dan *reverse* masing-masing 0,5 µl, template DNA sebanyak 1 µl dan ddH₂O sebanyak 3 µl. Proses PCR dengan *pre-denaturation* 95°C selama 3 menit, *denaturation* 95°C selama 30 detik, *annealing* 58°C selama 30 detik, *extention* 72°C selama 1 menit, dan *final extention* 72°C selama 5 menit dilakukan sebanyak 35 siklus.

Hasil PCR yang telah didapatkan selanjutnya akan dielektroforesis menggunakan gel agarose 1 % yang mengandung 1,5 µl *ethidium bromide* (Sigma) pada tegangan 100 Volt, selama 25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb Ladder sebanyak 3 µl untuk melihat pita DNA yang teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat dan didokumentasikan menggunakan *gel documentation system*.

3.3.10 Pengamatan

Dalam penelitian ini yang diamati antara lain:

- a. Jumlah tanaman yang putative transforman (Tabel 3.1, di halaman berikutnya)
- b. Konfirmasi keberadaan mutan gen *SoSPS1-N* pada tanaman tomat yang sudah masuk tahapan aklimatisasi (putatif transforman) dengan PCR menggunakan *npt II* F/R, kemudian di elektroforesis dan selanjutnya divisualisasi dengan menggunakan *gel documentation system* hingga diperoleh pita DNA sebesar 550 bp.

Tabel 3.3 Hasil transformasi mutan gen *SoSPS1-ΔN* tanaman tomat

Transformasi	Efisiensi tahapan transformasi				
	Eksplan	I	Co-cul	ES1	S2 S3 S3S4S5
1					
2					
3					

Keterangan:

- Ekplan : jumlah eksplan awal tunas apikal yang digunakan
- I: jumlah eksplan yang berhasil diinfeksi dengan *A. Tumefaciens*
- Co-cul : jumlah eksplan yang berhasil survive dari kokultivasi (2 hari)
- E: jumlah eksplan yang berhasil survive dari eliminasi (5 hari)
- S: jumlah eksplan yang berhasil survive dari tiap tahapan seleksi (@ 14 hari)

Jumlah tanaman yang survive juga dapat dipresentasikan dengan %, yaitu dengan cara:

$$\frac{\text{jumlah eksplan yang lolos seleksi}}{\text{jumlah eksplan awal}} \times 100\%$$

c. Perhitungan Jumlah buah dan Berat Total Buah

Tanaman tomat putatif transforman yang berhasil melalui tahapan aklimatisasi dan telah berbuah kemudian dipanen buahnya yang seragam, yaitu ketika buah sudah bewarna merah. Setelah itu tiap tanaman dihitung jumlah buah yang dihasilkan serta ditimbang berat buah hingga diperoleh berat buah total dalam tiap panen sampai tanaman tomat putative transforman sampai berumur 5 bulan dari awal aklimatisasi. Tomat yang telah dipanen kemudian diambil bijinya dengan cara diambil secara manual dengan tangan, membersihkan biji dari salut biji, kemudian membilasnya dengan air, kemudian dikering anginkan hingga biji benar-benar kering. Biji-biji tersebut disimpan kemudian nantinya akan ditanam dan dianalisis oleh peneliti selanjutnya.

d. Uji Sukrosa

Buah yang telah dipanen yang berwarna merah matang adalah buah yang digunakan untuk uji sukrosa. Adapun uji kandungan sukrosa dilakukan dengan cara buah ditimbang per tanamannya untuk mengetahui berat buah pertanaman. Setelah itu, buah digerus dan diambil sarinya lalu dimasukkan pada *eppendorf* dan di *sentrifuge* 12.000 rpm, selama 10 menit. Supernatan yang digunakan sebanyak 50 μ l ditambah dengan NaOH 1M 70 μ l. Kemudian dimasukkan dalam *dry block* 100°C selama 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 250 μ l resorcinol 0.1% dan 750 μ l HCl 30%. Kemudian dimasukkan di dalam *dry block* 80°C selama 8 menit. Kemudian diukur menggunakan *spektrofotometer* dengan panjang gelombang 520 nm (per sampel 200 μ l, dengan pengulangan sebanyak 3x). Hasil uji kandungan sukrosa tersebut kemudian dimasukkan dalam *standart sucrose* untuk menentukan kandungan *sucrose* pada buah tomat yang telah diuji.

BAB 5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Hasil transformasi gen mutan *SoSPSI-ΔN* menghasilkan efektifitas 6,6% dari 10 tanaman positif terinsersi gen *SoSPSI-ΔN*.
2. Akumulasi sukrosa akibat transformasi gen mutan *SoSPSI-ΔN* terjadi pada tanaman positif transformasi dengan nilai bervariasi, diikuti dengan peningkatan jumlah dan berat buah tomat. Pada tanaman T2.20 mempunyai berat buah 2,8 kali lebih tinggi dibandingkan *Wild Type* (WT), dan juga mempunyai sukrosa yang tinggi pula yaitu 1,8 kali dibandingkan *Wild Type* (WT).

5.2 Saran

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan biosintesis sukrosa pada positif transforman, perlu dilakukan konfirmasi pada generasi selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ballas, n. dan Citovsky, v. 1997. Nuclear Localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* virD2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:10723-10728
- Berger, BR. dan Christie, P.J (1994). Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* vir B2 through vir B1 are essential virulence genes. *Journal of Bacteriology* 176: 3646-3660
- Bruneau, J.M., A.C. Worrel, B. Cambow, D.Lando and T.A. Volker. 1991. *Sucrose Phosphate Synthase*, a Key Enzyme for Sucrose Biosynthesis In Plant *Plant Physiol.* 89: 518-524
- Buchanan, B.B., W. Gruissem dan R.L. Jones. 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists USA. 630-674
- Curatti, Folco, Desplats, Abratti, Limones, Herrera-Estrella dan Salerno. 1998. Sucrose-Phosphate Synthase from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 : Identification of the *spsA* Gene and Characterization of the Enzyme Expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(24) : 6776-6779
- Chua, Bujnicki, Tan, Huynh, Patel, dan Sivarman. 2008. The Structure Of Sucrose Phosphate Synthase from *Halothermothrix orenii* Reveals Its Mechanism of Action and Binding Mode, *The Plant Cell*, 20: 1059-1072
- Cheng, M., Hu, T.C., Layton, J., Liu, C. N. dan Fry, J. E. (2003) Desiccation of plant tissues post *Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 39, 595-604
- Christie, P.J. (1997) *Agrobacterium tumefaciens* T-Complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *Journal Of Bacteriology* 179, 3085-3094
- Dewanti, P. 2011. *Peningkatan Kandungan Sukrosa dan Hasil Tomat Melalui Overekspresi Gen SoSPS1 dan Gen SoSUT1*. Tidak dipublikasikan. Disertasi. Program Pascasarjana fakultas Pertanian Universitas Brawijaya: Malang.
- Dong, M.A, 1993. Glyphosate tolerant flax plants from *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Report* 7 (4): 281-4

- Eckardt, N.A. 2003. The Function of SUT2/ SUT3 Sucrose Transporter: The Debate Continue. *The Plant Cell*. 14: 1259-1262
- Ericksson, Ziegler, Guevera, Abel, Klosgen, Mathur, Rothstein dan Schattat, 2004 Agrobacterium-derived Cytokinin Influence plastid morphology and Starch Accumulation in *Nicotiana bethamiana* during transtient assay. *J Plant Biology*. Vol. 14:127
- Enung si mulyaningsih. 2009. Pemanfaatan *agrobacterium* untuk transformasi genetik tanaman dan jamur. *Biotrends* vol.4:26-31
- Heineke. D., U. Sonnewald. D Bussis, G. Gunter, K. Leidreiter, I. Wilke, K. Raschke, L. Willmitzer, dan HW. Heldt 1992. Expression of yeast derived invertase in the apoplast of potato plants results in an inhibition of photosynthesis caused by an increase of osmotic pressure in the leaf cells due to the accumulation of hexoses and amino acids and affects an increase in the protein to starch ration in tuber. *Plant Physiology*. 100: 301-308
- Hesse, H., U. Sonnewald, dan L. Willmitzer. 1995. Cloning and expression analysis of sucrose phosphate synthase from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Mol. Gen. Genet*. 247: 515-520
- Hille, J., Koornneef, M., Ramanna, M.S. dan Zael, P. 1989. Tomato: A Crop Species Amenable To Improvement By Cellular and Molecular Methods. *Euphytica* 42: 1-3
- Huber, J.L. A., Huber, S.C. dan Nielsen, T.H. (1989) *Arch. Biochem. Biophys*. 9, 329-343
- 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*. 47:431-444
- Huber, SC dan JL. Huber. 1992. Role of *sucrose Phosphate Synthase* in Sucrose Metabolism in Leaves. *Plant Physiol* 99:1275-1278
- Khaitovich, Enard, Lancamann, dan Paabo. 2006, Evolution of Primate Gene Expression. *Nature Review*, 7-693-702
- Koichi, Toyama. Chang-Hyu Bae, Mi –Suk Seo, In-Ja Song, Yong Pyo Lim, Pil Soon song. Hyu- Yeon Lee (2002). Overcoming Barriers to Transformation in Monocot Plants, *Journal of Plant Biotechnology*. 4. 135-147
- Komatsu, A., Y. Takanokura, T. Moriguchi, M. Omura dan T. Akihama.1999. Differential expression of sucrose-phosphat synthase isoforms during sucrose accumulating in citrus fruits (*Citrus unshiu March*). *Plant Sci*. 140: 169-178

- Langenkamper, G, Fung R.W.M., Newcomb, R.D., Aktinson, R.G., Gardner, RC. Dan MacRae, EA. 2002. Sucrose Phosphate Synthase Genes in Plant Belong to Three Different Families. *J. Mol.* 54:322.
- Lessard, Philip A., Hariskrisna Kulaveerasingram, Gregory M. York, Amie Strong and Anthony J. Sinskey (2002). Manipulating gene Ekspresion for Metabolic of Plants. *Metabolic Engineering*.4. 67-69.
- Liliandra, R. 2015. Pengaruh Rasio Daun Buah Terhadap Ukuran dan Kualitas Buah Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) 'Kristal'. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Lunn. J.E Macrae, E. 2003. New Complexities in The Synthesis of Sucrose. *Current Opinion In Plant Biology*, 6:208-214
- Lunn. J.E, Gillespie. V.J, dan Furbank. R.T. 2002. Expression of a cyanobacterial sucrose-phosphate synthase from Synechocystic sp. PCC 6803 in transgenic plants, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54, No. 381, pp. 223-237
- Lunn, John Edward. 2002. Evolution of Sucrose Synthesis, *Plant Physiol*, 128: 1490-1200
- Mathias, R.,J., and Boyd, L.A. 1986. Cefotaxime Stimulates Callus Growth, Embryogenesis and Regeneration in Hexaploid Bread Wheat (*Triticum aestivum* L Em. Thell). *J. Botani*. Vol. 41(6): 3239-3246.
- Matthews, saunders, Gebhardt, Lin, dan Koehlr. 1995. *Methods in Molecular Biology: Reporter Genes and Transient Assays for Plants*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Neliana, R., Sugiharto, B, dan Aisyiah., N, 2015. Ekspresi Mutan Gen SoSPS1 dari Tanaman Tebu(*Saccharum officinarum* L.) Pada Sel Bakteri *Escherichia coli* Strain BL21” Tidak Diterbitkan. *Skripsi*. Jember. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan. Universitas Jember.
- Nishimura, A., Aichi, L., dan Matsuoka, M. 2006. A Protocol for Agrobacterium mediated Transformation in Rice. *Nature Protocols*. Vol. 1
- Okviandari, P. Islahuddin, M. Dewanti, P. 2008. Transformasi Gen Sucrose Phosphate Synthase Tebu Untuk Meningkatkan Kandungan Sukrosa Pada Tomat (*Lycopersicon Esculentum*). Universitas Muhammadiyah Jember: Tidak Dipublikasikan
- Rahmawati, S., 2003. Gen Penyeleksi Alternatif untuk Transformasi Tanaman *Buletin AgroBio* 6:26-33
- Rahmawati, S., 2006. Status perkembangan perbaikan sifat genetik padi menggunakan transformasi Agrobacterium. *Jurnal AgroBiogen* 2: 36-44

- Raineri, D.M., dan Botino, P. 1990. Agrobacterium mediated transformation of Rice (*Oryza sativa* L). *Nature Biotechnology* 8:33-38
- Sambrook, J., E.F. Fritsh dan T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning a Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. America.
- Sawitri, D., Narita, H., Ishizaka-Ikeda, E., Sugiharto, B., Hase, T., dan Nakagawa, A., (2015) Purification and characterization of recombinant sugarcane sucrose phosphate synthase expressed in *E.coli* and insect Sf9 cells: an importance of the N-Terminal domain for an allosteric regulatory property. *The Journal of Biochemistry*, 1-33
- Silvia, J Fukai, S. 2001. The Impact of carbenecillin, ceftotaxime, and vancomycin on Chrysanthemum and Tobacco TCL morphogenesis and Agrobacterium Growth. Kagawa University. *Journal of Applied Horticulture*, volume 3 (1)
- Sheng, J dan Citovsky, V, 1996. Agrobacterium- Plant Cell DNA transport : Have virulence Proteins, Will Travel. *Plant Cell* 8: 1699-1710
- Stitt, M., Wilke, I., Feil, R., dan Heldt, H.W. 1988. Coarse control of Sucrose Phosphate Synthase in Leaves :Alterations of The Kinetic Properties in Response the Rate of Photosynthesis and the Accumulation of Sucrose. *Planta*, 174:217-230
- Sugiharto B., Sakakibra H., Sumadi, dan Sugiyama T., (1997a) Differential expression of two genes for sucrose-phosphate synthase in sugar cane: Molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression. *Plant Cell Physiol* 38:961-965
- Sugiharto, B., T. Handoyo, dan Sumadi (1997b) Variabilitas Genetik Dalam Enzim Fotosintetik dan Enzim Metabolisme Sukrosa Pada beberapa Varietas Tebu (*Saccharum officinarum*L.) *Zuriat* 7:76-85
- Sugiharto, B. 2001. Identifikasi dan Karakterisasi Multi-Bentuk *Sucrose-Phosphate Synthase* pada Tanaman Tebu. *Jurnal Ilmu Dasar*, vol.2.No.2, 2001: 72-78
- Sonnewald, U., W.P. Quick, E. MacRae, K.P. Krause, dan M. Stitt. 1993. Purification, Cloning and expression of spinach leaf sucrose phosphate synthase in *Escherichia coli*. *Planta* 189: 174-181
- Toroser, D., and Huber, 1997. Protein Phosphorylation as a Mechanism for Osmotic-Stress Activation of Sucrose-Phosphate Synthase in Spinach leaves. *J. Plant Physiol.* Vol. 114: 947-955
- Toroser, McMichael Jr. Krause, Kurreck, Sonnewald, Stitt, dan Huber. 1999. Site-directed Mutagenesis of Serin 158 Demonstrate its Role of Spinach Leaf

- Sucrose-Phosphate Synthase Modulation. *J The Plant Journal*. Vol. 17(4):407-413.
- Truernit, E. 2001. Plant Physiology: The Importance of Sucrose Transporters. *Current Biology* 2001 11: 169-R171
- Tugiyono, H. 1991. *Bertanam Tomat*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Wang, Cu, Zhang, Fan, dan La. 2013. Carbon Partitioning in sugarcane (Saccharum species). *Frontiers in Plant Science*, 4:1-6
- Winter, H. dan Huber, S.C. 2000. Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants: Localizations and Regulation of Activity of Key Enzymes. *Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology*, 35 (4): 253-289
- Worrel, A. C., J. M. Bruneu, K. Summerfelt, M. Boersiy dan T.A. Voelker. 1991. Expression of maize sucrose-phosphate synthase in tomato leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell*. 3:1121-1130
- Yasmeen, A., B. Mirza, S. Inayatullah, N. Safdar, M. Jamil, S Ali dan M. F. Choudhry. 2009. In Planta Transformation of Tomato. *Plant Mol Biol Rep* 27: 20-28
- Zupan, J.R. dan P. Zambryski. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the Plant Cell. *Plant Physiol*. 107: 1041-1047

LAMPIRAN

A. Komposisi Media MS (*Murashige and Skoog*)

Bahan	Jumlah/ L
MS Makro	50 ml
MS Mikro	0.5 ml
Fe ₂ EDTA	5 ml
B ₅ Vitamin	0.5 ml
Sukrose	30 gr
Phytageal	2.5 gr

B. Komposisi Media YEP (*Yeast Extract Pepton*)

Bahan	Massa (gr/L)
Yeast	10
Pepton	10
NaCl	5
Agar bakteriologi	14

C. Kurva Standart Sukrosa

