



Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum L.*) Produk Rekayasa Genetika Mutan *SoSPS1-S162A* Generasi T₂ Menggunakan Antibiotik Kanamisin

SKRIPSI

Oleh

Anisatul Mukaromah

NIM 141810401045

JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER

2019



Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum L.*) Produk Rekayasa Genetika Mutan *SoSPS1-S162A* Generasi T₂ Menggunakan Antibiotik Kanamisin

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi Strata 1 (S1) Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Oleh:

Anisatul Mukaromah

NIM 141810401045

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

2019

PERSEMBAHAN

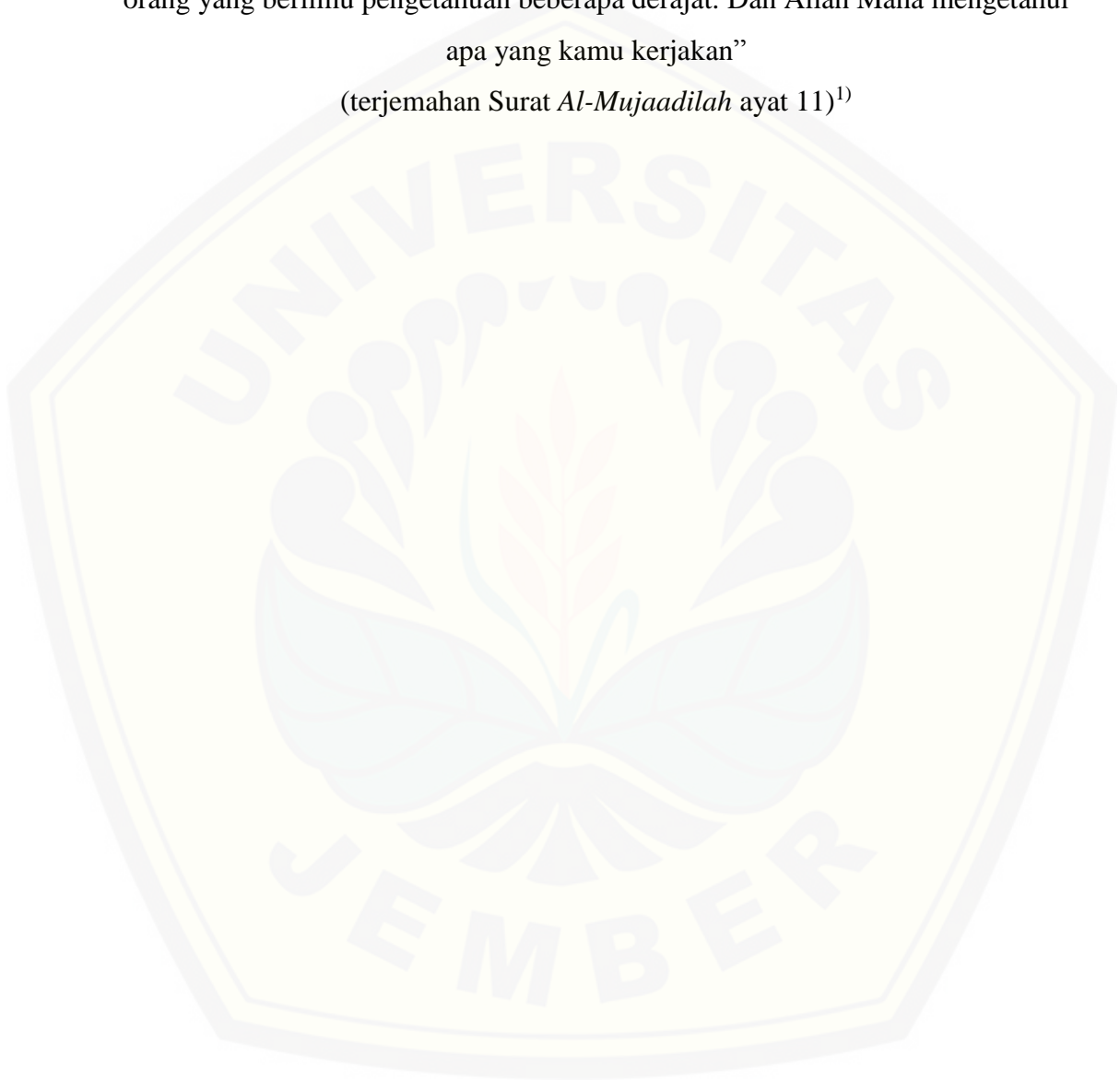
Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, karya tulis ilmiah ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Syaifur Rodi, Ibunda Nur Fadilah, Saudari-saudariku Hurun Ainun Maksuro dan Nasyirotul Firdaus, saya ucapkan terima kasih atas segala dukungan dan do'a yang tiada henti;
2. Seluruh keluarga besar yang telah memberikan do'a, dukungan dan semangat untuk menuntut ilmu;
3. Guru-guru sejak taman kanak-kanak sampai perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu yang berharga;
4. Almamaterku Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember;
5. Sahabat dan teman-temanku yang telah memberikan dukungan dan semangat.

MOTTO

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang berilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha mengetahui apa yang kamu kerjakan”

(terjemahan Surat *Al-Mujaadilah* ayat 11)¹⁾



¹⁾Departemen Agama Republik Indonesia. 2008. Al-Qur'an dan Terjemahan. Jakarta: CV. Pustaka Al-Kautsar.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Anisatul Mukaromah

NIM : 141810401045

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum L.*) Produk Rekayasa Genetika Mutan *SoSPS1-SI62A* Generasi T₂ Menggunakan Antibiotik Kanamisin” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 18 April 2019

Yang Menyatakan,

Anisatul Mukaromah

NIM. 141810401045

SKRIPSI

Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum L.*) Produk Rekayasa Genetika Mutan *SoSPSI-S162A* Generasi T₂ Menggunakan Antibiotik Kanamisin

Oleh:

Anisatul Mukaromah

NIM 141810401045

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : Widhi Dyah Sawitri, S.Si., M. Agr., Ph.D

PENGESAHAN

Karya ilmiah skripsi berjudul “Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum L.*) Produk Rekayasa Genetika Mutan *SoSPS1-S162A* Generasi T₂ Menggunakan Antibiotik Kanamisin” telah diuji dan disahkan pada:

hari :

tanggal :

tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas
Jember

Tim Penguji

Ketua,

Sekretaris,

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

Widhi Dyah Sawitri, S.Si., M. Agr., Ph.D
NRP. 760016794

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Dra. Dwi Setyati, M.Si
NIP. 196404171991032001

M. Su’udi, Ph.D
NRP. 76001678

Mengesahkan,
Dekan

Drs. Sujito, Ph.D
NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum L.*) Produk Rekayasa Genetika Mutan *SoSPS1-S162A* Generasi T₂ Menggunakan Antibiotik Kanamisin; Anisatul Mukaromah; 141810401045; 2019; 47 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Sukrosa merupakan produk akhir dari asimilasi karbon pada proses fotosintesis. Sukrosa akan ditranslokasikan dari daun ke seluruh bagian tanaman untuk mendukung pertumbuhan dan sintesis simpanan cadangan seperti minyak dan pati. Enzim *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) merupakan enzim utama yang menentukan kemampuan tanaman dalam biosintesa sukrosa yang ditranslokasikan dari daun ke bagian tanaman lain. SPS mengkatalis *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine-5-diphospho glucose* (UDPG) menjadi *sucrose-6-phosphate* (Suc6P). Suc6P selanjutnya mengalami pemutusan *phosphate* oleh enzim *sucrose phosphate phosphatase* (SPP) yang kemudian dihasilkan sukrosa. Regulasi aktivitas SPS melibatkan efektor alosterik (glukosa-6-fosfat dan Pi) dan sisi fosforilasi protein (*fosforilasi seryl reversible*). Fosforilasi protein bisa terjadi pada beberapa jenis asam amino seperti serin, threonin dan tirosin. Proses ini terjadi ketika fosfat bereaksi dengan -OH pada rantai samping (residu) serin, threonin dan tirosin melalui reaksi esterifikasi dan menghasilkan formasi fosfoprotein. Salah satu sisi yang dianggap bertanggung jawab terhadap regulasi SPS adalah sisi Serin162 yang dipengaruhi oleh gelap dan terang.

Transformasi genetik dilakukan dengan memutasi asam amino serin 162 menjadi asam amino alanin (S162A) untuk menghilangkan sisi fosforilasi pada SPS. *Gen SoSPS1-S162A* kemudian di transformasi ke tanaman tomat varietas Zamrud. Pewarisan gen ini pada keturunan T₂ masih belum diketahui, oleh karena itu perlu dilakukan konfirmasi keberadaan gen *SoSPS1-S162A*. Selain itu, untuk memperoleh tanaman transgenik homozigot perlu diketahui rasio segregasi pada keturunan berikutnya.

Penelitian ini dilakukan dengan melakukan skrining 10 event tanaman tomat mutan *SoSPSI-S162A* dan menghitung rasio fenotip tanaman transforman dan tanaman non-transforman. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan *chi square test* dengan rasio yang diharapkan yaitu 3:1. Tahap selanjutnya yaitu mengkonfirmasi keberadaan gen *SoSPSI-S162A* pada tanaman tomat transgenik melalui analisis PCR.

Berdasarkan konfirmasi PCR pada generasi T₁, dari 10 tanaman tomat transgenik yang di analisis, diperoleh 9 tanaman positif transforman sedangkan satu tanaman (V11) tidak memiliki gen *SoSPSI-S162A* karena tidak menunjukkan adanya pita DNA berukuran 550 bp. Berdasarkan hasil skrining dan analisis *chi square* pada tanaman transgenik generasi T₂, diperoleh 5 even dengan total 7 tanaman yang memiliki rasio fenotip 3:1, sedangkan 23 tanaman dari 5 even lainnya tidak sesuai dengan rasio Mendel. Hasil skrining juga menunjukkan tidak adanya tanaman homozigot sehingga pada generasi ini pewarisan gen *SoSPSI-S162A* masih belum stabil.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Skrining Stabilitas Genetik Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum L.*) Produk Rekayasa Genetika Mutan *SoSPS1-S162A* Generasi T₂ Menggunakan Antibiotik Kanamisin” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M. Agr.Sc selaku dosen pembimbing utama dan Widhi Dyah Sawitri, S.Si., M. Agr., Ph.D selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, dan saran dalam penulisan skripsi ini;
2. Dra. Dwi Setyati, M.Si dan M. Su’udi, Ph.D selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
3. Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama penulis menempuh pendidikan S1;
4. Ayahanda Syaifur Rodi, Ibunda Nur Fadilah serta Ananda Hurun Ainun Maksuro dan Nasyirotul Firdaus atas dukungan, do’a, perhatian dan kasih sayang tiada henti sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan S1;
5. Teknisi laboratorium CDAST Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman : Purnama Oktaviandari, S.P, M.P., Arsetyo Rahardianto, S. Si, Nurul Hidayati, S.Si, Ni Putu Frida Okta W., S.Si., yang telah membantu memberikan saran dalam penelitian ini;
6. Rekan-rekan kerja di laboratorium yang telah banyak membantu selama penelitian;

7. Teman-teman terdekat saya Azizah, Masrurotul Hasanah, Khilia Nisa', Femin Damayanti, Rosyanda Fisel Koyasa dan Arina Amalia Putri serta teman-teman biologi angkatan 2014 (BIVALVIA) yang telah memberikan dukungan, do'a serta semangat selama pengerjaan skripsi ini;
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Jember, 18 April 2019

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Sucrose Phosphate Synthase (SPS).....	4
2.2 Sisi Regulasi SPS	6
2.3 Skrining <i>In Vitro</i> Tanaman Tomat (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	7
2.4 Pewarisan Sifat Berdasarkan Hukum Mendel	9
2.6 Hipotesis	10
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Tempat dan Waktu	11
3.2 Alat dan Bahan.....	11
3.3 Metode Penelitian	11
3.3.1 Tanaman Tomat	11
3.3.2 Peta Konstruksi Plasmid pRI 101-AN <i>SoSPS1-S162A</i>	11
3.3.3 Rancangan Penelitian.....	12

3.4 Pelaksanaan Penelitian.....	12
3.4.1 Skrining Antibiotik dan Penghitungan Rasio Fenotip	12
3.4.2 Aklimatisasi Tanaman Tomat Transforman	13
3.4.3 Uji <i>Chi Square</i> (X^2)	13
3.4.4 Isolasi Genom Tanaman Transforman.....	14
3.4.5 Analisis PCR Tanaman Transforman	15
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
4.1 Skrining Tanaman Tomat Mutan <i>SoSPSI-SI62A</i>	16
4.2 Analisis PCR Tomat <i>SoSPSI-SI62A</i> Generasi T ₁	19
4.3 Rasio Fenotip Tanaman Mutan <i>SoSPSI-SI62A</i> Generasi T ₂	20
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	22
5.1 Kesimpulan	22
5.2 Saran	22
DAFTAR PUSTAKA	23
LAMPIRAN.....	28

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 Rasio tanaman transforman dan non-transforman 21

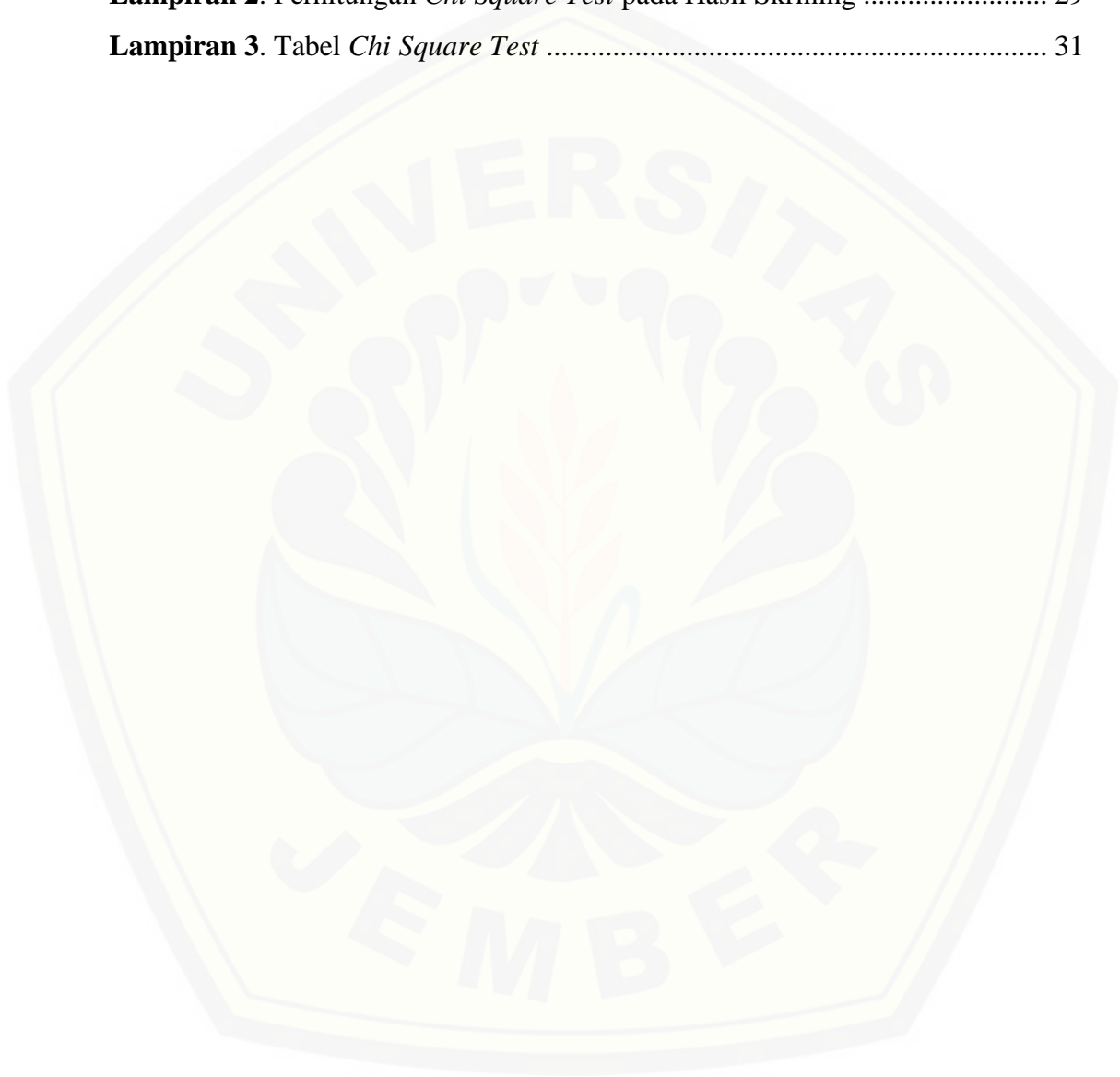


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Sintesis sukrosa pada tanaman yang melibatkan banyak enzim	5
Gambar 2.2 Skema regulasi fosforilasi SPS	7
Gambar 3.1 Peta konstruk plasmid pRI 101-AN <i>SoSPSI-SI62A</i>	12
Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian.....	12
Gambar 4.1 Tanaman tomat pada minggu ketiga masa skrining.....	17
Gambar 4.2 Fenotip tanaman transforman hasil skrining antibiotik kanamisin 75 mg/L dengan perbedaan morfologi warna pada daun	18
Gambar 4.3 Hasil analisis PCR tanaman tomat putatif transforman generasi T ₁ yang lolos seleksi antibiotik kanamisin 75 mg/L.....	19

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media AB Mix.....	28
Lampiran 2. Perhitungan <i>Chi Square Test</i> pada Hasil Skrining	29
Lampiran 3. Tabel <i>Chi Square Test</i>	31



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tomat (*Solanum lycopersicum* L) merupakan tanaman semusim yang banyak dikonsumsi sebagai buah maupun sayur karena memiliki kandungan nutrisi yang cukup untuk memenuhi kebutuhan gizi masyarakat sehari-hari. Kandungan nutrisi pada tomat antara lain adalah mineral, vitamin, likopen dan beta karoten (Liza *et al.*, 2013). Selain digunakan sebagai tanaman pangan, tomat juga dapat digunakan sebagai tanaman model dalam bioteknologi tanaman (Wing *et al.*, 1994) karena dapat digunakan sebagai *molecular genetic map* (Tanskey *et al.*, 1992). Salah satu hasil penerapan bioteknologi pada tanaman tomat adalah transformasi gen *SoSPS1-S162A* untuk peningkatan produksi sukrosa.

Sukrosa merupakan produk akhir dari asimilasi karbon pada proses fotosintesis. Senyawa ini akan ditranslokasikan dari daun ke seluruh bagian tanaman untuk mendukung pertumbuhan dan sintesis simpanan cadangan seperti minyak dan pati. Sukrosa juga digunakan tanaman sebagai respon terhadap cekaman lingkungan (Lunn dan MacRae, 2003). Proses sintesis sukrosa pada tanaman salah satunya dipengaruhi oleh enzim *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS). Enzim SPS berperan dalam mengkatalis *UDP-Glucose* dan *Fructose-6-Phosphate* menjadi *Sucrose-6-Phosphate* (Winter dan Huber, 2015).

Gen penyandi SPS pada tebu ada 2 macam, yaitu *SoSPS1* dan *SoSPS2*. *SoSPS1* lebih dominan diekspresikan di organ fotosintetik (daun) sedangkan *SoSPS2* diekspresikan di organ non-fotosintetik (Sugiharto *et al.*, 1997). Aktivitas enzimatis SPS pada tanaman dipengaruhi oleh regulasi efektor alosterik oleh *Glucose-6-Phosphate* dan *Phosphate Inorganic* (Huber dan Huber, 1992). *Glucose-6-Phosphate* (Glc6P) pada regulasi enzim SPS berperan sebagai aktivator sedangkan *Phosphate inorganic* (Pi) berperan sebagai inhibitor. Selain regulasi efektor alosterik, aktivitas SPS juga dipengaruhi oleh fosforilasi protein (Lunn dan MacRae, 2003).

Proses fosforilasi dapat terjadi pada beberapa asam amino salah satunya adalah serin (Fuhs dan Hunter, 2017). Proses ini dipengaruhi oleh kondisi gelap dan terang. Ketika kondisi gelap, serin akan mengalami fosforilasi sehingga SPS menjadi kurang aktif (Huber dan Huber, 1996). Serin yang terkait dengan proses fosforilasi berada di urutan 158 pada bayam (Toroser *et al.*, 1999) dan 162 pada jagung dan tebu (Takahashi *et al.*, 2000).

Sisi fosforilasi pada tanaman menyebabkan aktivitas SPS menjadi terhambat sehingga mengurangi kadar sukrosa pada tanaman. Rekayasa genetika dengan mutasi genetik berupa penggantian serin dengan asam amino lain telah dilakukan untuk menghilangkan efek fosforilasi pada SPS. Beberapa penelitian yang telah dilakukan yaitu penggantian S158 menjadi threonin (S158T), S158 menjadi asam glutamat (S158E) (Toroser *et al.*, 1999) dan S162 menjadi alanin (S162A) (Takahashi *et al.*, 2000). Alanin merupakan asam amino yang sering digunakan sebagai agen mutasi karena tidak mempengaruhi konfirmasi rantai utama suatu protein. Alanin juga efektif dalam melakukan mutasi *single* amino untuk analisis protein (Lefevre, *et al.*, 1997).

Penelitian mengenai transformasi tanaman tomat dengan mutan gen *SoSPS1-S162A* telah dilakukan dengan menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Hasil yang didapat yaitu 15 even tanaman *SoSPS1-S162A* dengan karakteristik berbunga dan berbuah lebih cepat serta lebih banyak (sekitar 2 kali lipat) dan kandungan sukrosa pada buah lebih tinggi dibanding dengan *wild type* (WT) (Rohmah, 2017). Berdasarkan penelitian dari Worrel *et al.* (1991), tanaman tomat yang disisipkan gen SPS dari tanaman jagung tidak terpengaruh oleh regulasi gelap dan terang. Berdasarkan hasil tersebut, maka akan dilakukan penelitian untuk memastikan sifat mutan *SoSPS1-S162A* diwariskan terhadap keturunan T₁ dan mengetahui stabilitas genetik pada generasi T₂.

1.2 Rumusan Masalah

Enzim SPS adalah enzim yang berperan penting dalam sintesis sukrosa pada tanaman. Kerja enzim ini dipengaruhi oleh sisi fosforilasi yang membuat kerja enzim menjadi kurang aktif dan menghambat sintesis sukrosa. Transformasi

gen *SoSPS1-S162A* telah dilakukan pada tanaman tomat varietas Zamrud dan menghasilkan tanaman tomat dengan karakteristik berbunga dan berbuah lebih banyak serta lebih banyak dan memiliki kandungan sukrosa buah lebih tinggi dari tanaman WT. Namun diperlukan konfirmasi PCR untuk memastikan apakah gen *SoSPS1-S162A* terwariskan pada keturunan selanjutnya. Selain itu, rasio segregasi Mendel pada keturunan T₂ perlu diketahui untuk memastikan kestabilan genetik dari tanaman tomat mutan *SoSPS1-S162A*.

1.3 Batasan Masalah

Tanaman tomat mutan *SoSPS1-S162A* sebanyak 10 even (V1, V2, V4, V5, V6, V7, V9, V10, V11 dan V15). Biji yang di skrining sebanyak 50 biji tiap event selama 3 minggu. Daun tanaman putatif transforman kemudian dicek dengan PCR.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengkonfirmasi gen *SoSPS1-S162A* diwariskan pada keturunan T₁ melalui analisis PCR dan memastikan stabilitas genetik tanaman tomat mutan *SoSPS1-S162A* pada keturunan T₂.

1.5 Manfaat Penelitian

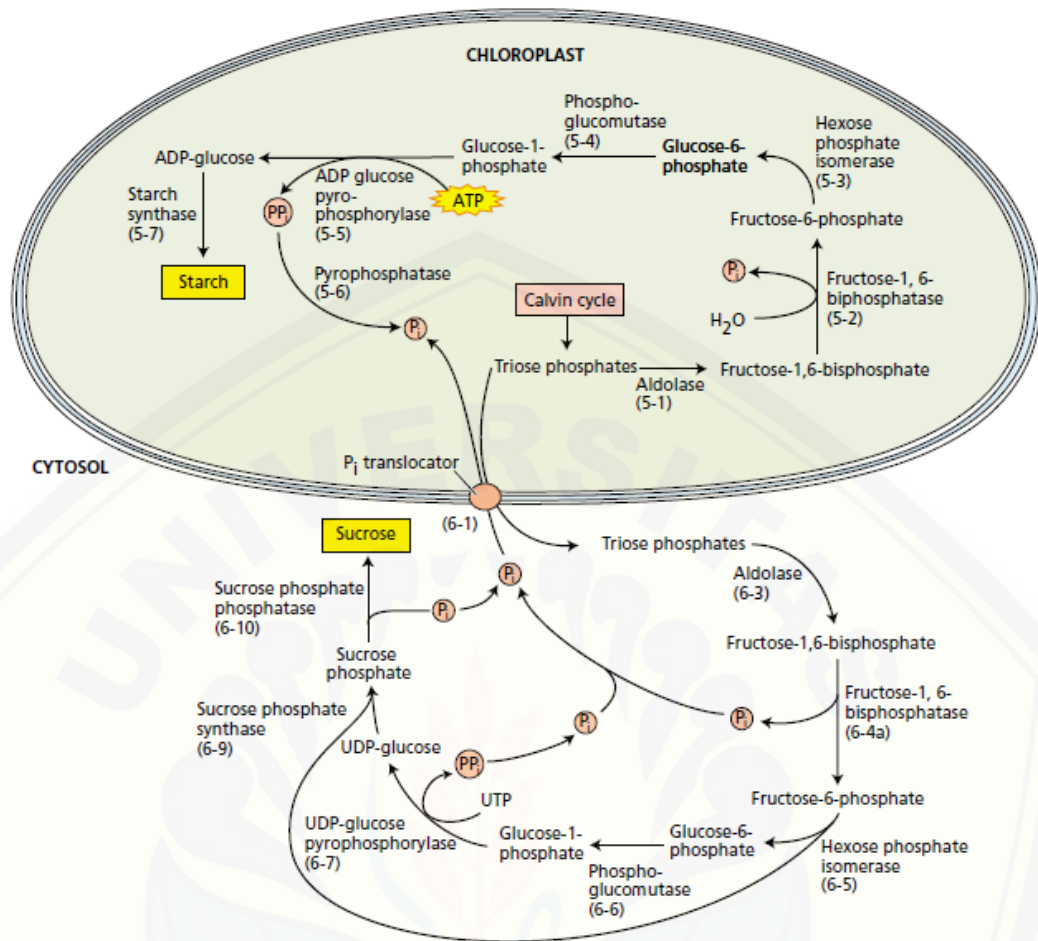
Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui stabilitas genetik pada tanaman Produk Rekayasa Genetika (PRG) mutan *SoSPS1-S162A* keturunan T₂.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sucrose Phosphate Synthase (SPS)

Sukrosa merupakan produk utama dari proses fotosintesis yang berperan penting dalam proses metabolisme sebagai kerangka karbon serta merupakan bentuk karbohidrat yang paling mudah ditranslokasi dari daun menuju ke seluruh bagian tanaman untuk pertumbuhan (Dewanti *et al.*, 2011). Sukrosa pada tanaman berperan sebagai regulator ekspresi gen fotosintetik dan non-fotosintetik (Sugiharto *et al.*, 1997). Sukrosa juga mengatur ekspresi gen yang menyandi suatu enzim, transporter dan penyimpanan protein serta berperan dalam pembelahan dan diferensiasi sel serta mengontrol proses perkembangan tanaman, termasuk induksi pembungaan, diferensiasi jaringan vaskuler, perkembangan biji dan akumulasi produk. Selain itu, tanaman juga menggunakan sukrosa sebagai respon terhadap cekaman lingkungan seperti suhu rendah dan kekeringan (Lunn dan MacRae, 2003).

Ada 3 macam enzim yang berpengaruh terhadap sintesis sukrosa pada tanaman, yaitu *Invertase* yang mendegradasi sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa, *Sucrose Synthase* (SuSy) yang mendegradasi sukrosa dalam sitosol dan *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) yang berperan sebagai katalisator dalam proses sintesis *fructose-6-phosphate* (Fru6P) dan *Uridinie-5-diphospho glucose* (UDP-*glucose*) menjadi *Sucrose-6-Phosphate* (Suc6P) (Gambar 2.1) (Buchanan dan Jones, 2000). *Sucrose-6-Phosphate* kemudian dihidrolisis untuk dihilangkan fosfatnya oleh *Sucrose Phosphate Phosphatase* (SPP) sehingga dihasilkan sukrosa (Lunn *et al.*, 2003). Proses pemutusan grup fosfat dari Suc6P oleh SPP menyebabkan reaksi yang awalnya reversible menjadi irreversible (Pattanayak, 1999).



Gambar 2.1 Sintesis sukrosa pada tanaman yang melibatkan banyak enzim (Sumber : Taiz dan Zeiger, 2002)

Hasil dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa SPS merupakan enzim utama yang menentukan kemampuan tanaman dalam biosintesis sukrosa (Sugiharto *et al.*, 1997) yang ditranslokasikan dari daun ke bagian tanaman lain. SPS memiliki rentang pH optimum yang cukup lebar untuk membantu proses sintesis sukrosa, yaitu sekitar 6,5-7,5 (Pattanayak, 1999). Overekspresi SPS pada tanaman *Arabidopsis thaliana* terbukti meningkatkan fotosintesis pada suhu rendah dan menambah ketahanan terhadap suhu dingin. Tanaman kapas (*Gossypium hirsutum* L.) dengan peningkatan aktivitas SPS menghasilkan serat lebih banyak dengan kualitas yang lebih tinggi. *Populus tremula* L. menunjukkan tingkat fotosintesis dan pertumbuhan yang lebih tinggi ketika aktivitas enzim SPS ditingkatkan (Lunn *et al.*, 2003). Tanaman tomat (*Solanum lycopersicum* L.) yang

diinsersi gen penyandi SPS dari jagung mengalami peningkatan sintesis sukrosa, rasio sukrosa : pati di daun meningkat dan peningkatan kapasitas fotosintesis (Winter dan Huber, 2015).

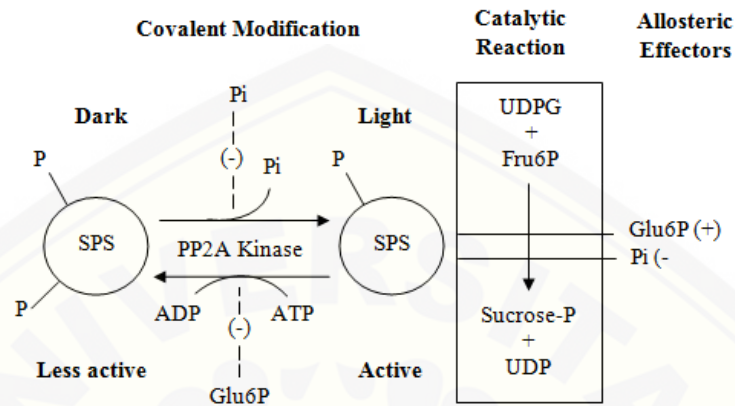
Enzim SPS pada tebu ada 2 jenis, yaitu SoSPS1 yang terdapat pada jaringan fotosintetik dan SoSPS2 yang terdapat pada jaringan non-fotosintetik. SoSPS1 memiliki kesamaan yang tinggi dengan SPS pada jagung, yaitu sekitar 95% sedangkan dengan bayam dan sugarbeet sekitar 56% dan dengan kentang sekitar 55%. SoSPS2 memiliki kemiripan dengan SPS jagung sekitar 50%, bayam sekitar 58%, sugarbeet sekitar 57% dan dengan kentang sekitar 56% (Sugiharto *et al.*, 1997).

2.2 Sisi Regulasi SPS

Regulasi aktivitas SPS melibatkan efektor alosterik (glukosa-6-fosfat dan Pi) dan sisi fosforilasi protein (*fosforilasi seryl reversible*). Fosforilasi protein bisa terjadi pada beberapa jenis asam amino seperti serin, threonin dan tirosin. Proses ini terjadi ketika fosfat bereaksi dengan –OH pada rantai samping (residu) serin, threonin dan tirosin melalui reaksi esterifikasi dan menghasilkan formasi fosfoprotein (Fuhs dan Hunter, 2017). Proses fosforilasi dipengaruhi oleh kondisi gelap dan terang (Huber dan Huber, 1996). Fosforilasi terjadi pada saat gelap dan dipengaruhi oleh protein kinase spesifik (ser/thr kinase) dan defosforilasi terjadi saat terang dikarenakan pengaruh dari 2A protein phosphatase (2A PP) (Takahashi *et al.*, 2000).

Ada 4 sisi pada tanaman yang dianggap bertanggung jawab terhadap regulasi SPS, yaitu S158, S126, S229 dan S424. Lokasi ditemukannya beberapa serin tersebut yaitu S158, S229 dan S424 pada bayam (Toroser *et al.*, 1999) dan S126 pada jagung dan tebu (Takahashi *et al.*, 2010; Sugiharto *et al.*, 1997). Semua sisi aktif tersebut berdasarkan penelitian yang dilakukan dianggap bertanggung jawab terhadap menurunnya aktivitas SPS terkait dengan fosforilasi. Sisi S158 dan S162 terkait dengan kondisi gelap dan terang, sisi S229 terkait dengan protein 14-3-3 dan keberadaan Mg^{2+} pada daun, sedangkan S424 terkait dengan stres osmotik atau cekaman osmotik (Winter dan Huber, 2015).

Serin 158 dan 162 akan mengalami defosforilasi pada kondisi terang sehingga SPS menjadi aktif dan mengalami fosforilasi saat kondisi gelap sehingga SPS menjadi kurang aktif (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Skema regulasi fosforilasi SPS (Sumber : Huber dan Huber, 1992)

Adanya sisi aktif yang mengontrol regulasi SPS tersebut, kemudian dilakukan beberapa rekayasa genetika untuk mencoba menghilangkan efek fosforilasi SPS pada saat kondisi gelap. Beberapa percobaan yang sudah dilakukan adalah penggantian sisi serin dengan alanin S162A/S158A (Takahashi *et al.*, 2000; Toroser *et al.*, 1997), serin dengan threonin S158T dan penggantian serin dengan asam glutamat S158E/S158F (Toroser *et al.*, 1997). Alanin merupakan asam amino yang sering digunakan sebagai agen mutasi karena tidak mempengaruhi konformasi rantai utama suatu protein serta tidak menimbulkan efek elektrostatis dan sterik yang ekstrim (Lefevre, *et al.*, 1997). Selain itu, alanin memiliki bentuk molekul yang hampir sama dengan serin hanya berbeda pada rantai samping. Alanin tidak memiliki -OH pada rantai sampingnya sehingga kemungkinan tidak akan mengikat fosfat sehingga fosforilasi tidak dapat terjadi.

2.3 Skrining *In Vitro* Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum* L.)

Tomat termasuk ke dalam anggota famili Solanaceae yang memiliki >3000 spesies (Bai dan Lindhout, 2007). Tanaman ini tergolong tanaman perdu dan dapat tumbuh dengan tinggi 2-3 meter. Sistem perakaran berupa akar tunggang dengan banyak akar samping. Batang berwarna hijau dan ditumbuhi

bulu-bulu halus. Daun tanaman ini berupa daun majemuk yang bersirip gasal dengan tepi daun bergerigi serta bunga berbentuk terompet berwarna kuning terang dengan mahkota berjumlah lebih dari lima (Agromedia, 2007). Tanaman ini merupakan tanaman perennial yang kemudian dibudidayakan sebagai tanaman annual (semusim) (Bhatia *et al.*, 2004).

Tomat berada pada urutan nomor 2 sebagai hasil panen sayuran terpenting setelah kentang. Hal ini dikarenakan tomat mengandung mineral, vitamin dan asam organik, asam amino esensial dan serat (Liza *et al.*, 2013). Mineral dan vitamin yang terkandung di dalam tomat diantaranya adalah potassium dan folat, vitamin A, vitamin C dan vitamin E (Adams *et al.*, 2005). Senyawa yang paling banyak terkandung dalam tomat adalah likopen (25 mg/buah) yang merupakan antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas dan mencegah kanker (Bhatia *et al.*, 2004). Menurut Gann *et al.* (1999), konsumsi tomat atau sumber makanan yang mengandung likopen dapat menurunkan resiko kanker prostat. Selain sebagai bahan pangan, tomat juga digunakan sebagai agen transformasi dalam bioteknologi tanaman. Hal ini dikarenakan masa tanam tomat cukup singkat, yaitu sekitar 100 hari untuk mendapatkan buah yang siap untuk dipanen (Jones, 2007).

Teknologi transformasi gen untuk perbaikan sifat pada tanaman tomat telah banyak dilakukan, diantaranya adalah peningkatan kandungan sukrosa (Worrel *et al.*, 1991), ketahanan terhadap hama Lepidoptera (Santosa *et al.*, 2009) dan peningkatan translokasi sukrosa (Hackel *et al.*, 2006). Transformasi tomat menggunakan gen mutan *SoSPSI-S162A* menghasilkan tanaman tomat dengan kandungan sukrosa yang lebih tinggi (Rohmah, 2017).

Skrining merupakan suatu proses seleksi biji untuk mengetahui biji yang memiliki gen transforman dan biji non-transforman. Skrining dilakukan pada biji T₁ dan T₂ dari tanaman tomat mutan *SoSPSI-S162A* yang dikulturkan pada media AB Mix yang ditambah dengan antibiotik kanamisin. Media AB Mix merupakan campuran dari dua larutan yang berbeda. Perbedaan dari dua larutan yang menyusun media AB Mix adalah sumber nitrogen pada larutan. Nitrogen yang

terkandung pada larutan satu berasal dari nitrat, sedangkan pada larutan kedua berasal dari amonia sehingga pH-nya lebih rendah (Hothem *et al.*, 2003).

Antibiotik kanamisin ditambahkan pada media AB Mix karena pada tanaman tomat mutan SoSPS1-So162A, gen yang disisipkan adalah gen resisten *nptII*. Kanamisin berperan sebagai selektor tanaman tomat transforman dan non-transforman. Tanaman transforman memiliki ketahanan (resistensi) terhadap antibiotik kanamisin sehingga akan hidup sampai akhir masa skrining, sedangkan tanaman non-transforman tidak memiliki gen resistensi kanamisin sehingga perlahan akan mati.

2.4 Pewarisan Sifat Tanaman Transforman Berdasarkan Hukum Mendel

Pewarisan sifat dikendalikan oleh suatu gen dan hasil ekspresi gen tersebut langsung mengarah ke karakteristik fenotip. Hal ini merupakan konsep penting dalam bioteknologi tanaman, karena sampai saat ini tanaman transgenik yang dihasilkan memiliki sifat yang dikendalikan oleh transgen tunggal. Sifat-sifat Mendel dapat memiliki variasi yang menghasilkan karakteristik protein yang berbeda, namun gen yang mengontrol sifat tersebut merupakan gen yang terletak pada satu lokasi yang sama dalam kromosom (Stewart, 2008).

Setiap individu akan menghasilkan gamet-gamet yang kandungan gennya separuh dari kandungan gen pada individu. Hal ini karena pada saat pembentukan gamet, tiap pasang gen akan disegregasi ke dalam masing-masing gamet yang terbentuk (Hukum Mendel I). Pada saat terjadi persilangan, segregasi suatu pasangan gen tidak bergantung pada segregasi pasangan gen lainnya. Hal ini menyebabkan terjadi pemilihan kombinasi gen-gen secara bebas dalam pembentukan gamet (Hukum Mendel II) (Susanto, 2011).

Menurut Yin *et al.* (2004) karakterisasi gen transgenik pada level molekular (transmisi transgen) dan analisis segregasi pada fenotip transgenik (ekspresi transgen) sangat penting dilakukan untuk tanaman transgenik yang akan ditanam di lapang. Transgen diwariskan secara seksual sebagai karakter dominan dengan rasio Mendel 3:1. Penelitian yang dilakukan oleh Tizaoui dan Kchouk (2012) menunjukkan bahwa 5 dari 11 even tanaman tembakau transgenik *nptII*

mengalami segregasi yang sesuai dengan rasio Mendel, sedangkan enam event lainnya menunjukkan hasil yang tidak sesuai. Menurut Yin *et al.* (2004), penyimpangan hukum Mendel dapat terjadi dengan frekuensi 10-50 % karena transmisi transgen yang tidak stabil atau ekspresi transgen yang rendah. Banyak faktor yang dapat mempengaruhi ekspresi dan pewarisan transgen tersebut, diantaranya yaitu transgen itu sendiri, genom tanaman (*host genom*), dan interaksi keduanya (Tizaoui dan Kchouk, 2012).

2.6 Hipotesis

Gen *SoSPSI-S162A* diwariskan kepada generasi selanjutnya (T_2) dengan genotip yang diperoleh adalah genotip homozigot.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, *Central for Development of Advance Science and Technology* (CDAST), Universitas Jember, mulai bulan Januari 2018 sampai Januari 2019.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah *Laminair Air Flow* (LAF), autoklaf, *gel documentary system*, *sentrifus*, nano drop, oven, peralatan standar kultur jaringan dan peralatan standar PCR

Bahan yang digunakan dalam praktikum adalah tanaman tomat varietas Zamrud, tomat transgenik *SoSPSI-SI62A* (event V1, V2, V4, V5, V6, V7, V9, V10, V11 dan V15), media AB Mix, alkohol 70%, alkohol 97%, NaClO 2%, kertas saring, aquadest steril, antibiotik kanamisin dan bahan-bahan yang digunakan untuk analisis PCR.

3.3 Metode Penelitian

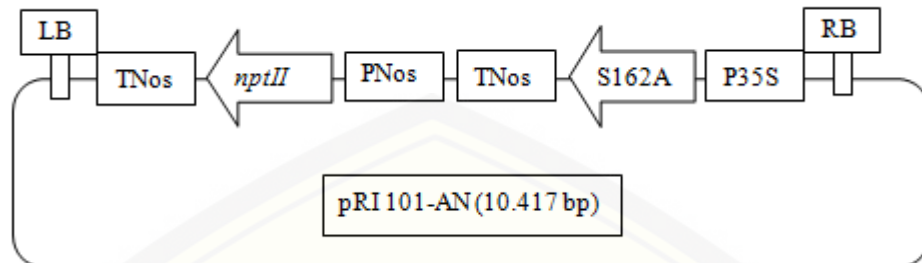
3.3.1 Tanaman Tomat

Tanaman tomat yang digunakan adalah tomat varietas Zamrud sebagai sampel *wild type* dan 10 event mutan tomat *SoSPSI-SI62A*, yaitu V1, V2, V4, V5, V6, V7, V9, V10, V11 dan V15.

3.3.2 Peta Konstruksi Plasmid pRI 101-AN *SoSPSI-SI62A*

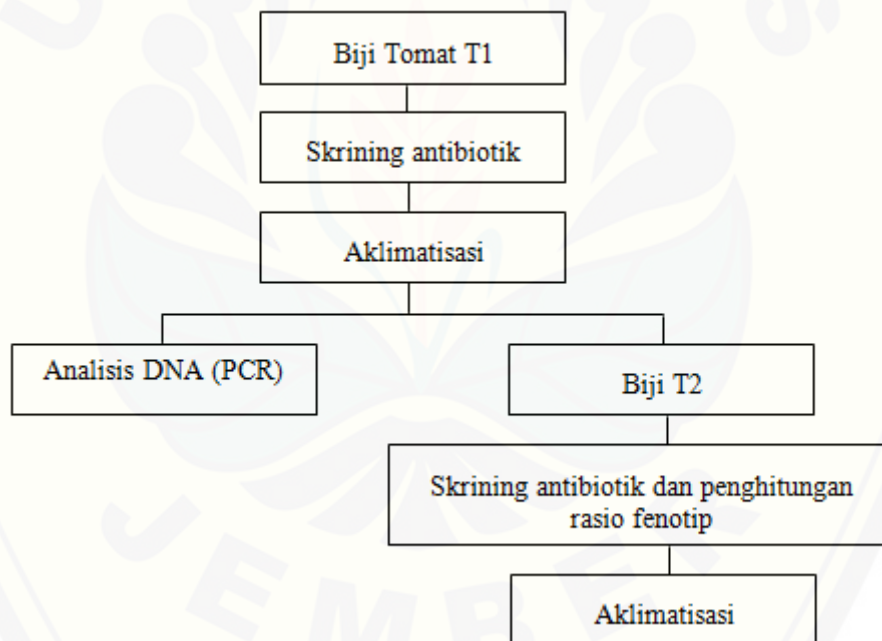
Transformasi gen *SoSPSI-SI62A* pada tomat telah dilakukan oleh Rohmah (2017) dengan menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* yang telah dikonfirmasi dengan *sequencing* dan menunjukkan adanya perubahan mutasi asam amino serin menjadi alanin pada urutan ke-162 dan amplifikasi dengan PCR

menggunakan pasangan primer *nptII*. Adapun peta konstruk plasmid yang telah diintegrasikan pada tanaman tomat ditunjukkan pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Peta konstruk plasmid pRI 101-AN *SoSPS1-S162A* (Sumber: Sawitri, 2013)

3.3.3 Rancangan Penelitian



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Skrining Antibiotik dan Penghitungan Rasio Fenotip Tanaman Transforman

Eksplan yang digunakan adalah biji tomat varietas Zamrud sebagai event *wild type* (WT) dan 10 event mutan *SoSPS1-S162A*, yaitu V1, V2, V4, V5, V6, V7, V9, V10, V11 dan V15. Persiapan eksplan dilakukan dengan merendam biji

tomat dengan aquadest selama 15 menit sehingga didapatkan biji yang bernas. Biji disterilisasi menggunakan NaClO 2% (3,5 ml NaClO : 7 ml aquadest steril) selama 1 menit sebanyak 2 kali, kemudian dibilas aquadest steril sebanyak 3 kali. Biji kemudian dikering anginkan diatas kertas saring, kemudian ditanam pada media AB Mix + antibiotik kanamisin 75 mg/L selama 3 minggu di ruang kultur jaringan.

Penghitungan rasio fenotip tanaman transforman dilakukan dengan menghitung eksplan yang tumbuh. Tanaman transforman ditandai dengan warna tanaman yang masih hijau sedangkan tanaman non-transforman ditandai dengan terjadinya klorosis pada daun (albino) dan mati.

3.4.2 Aklimatisasi Tanaman Tomat Transforman

Aklimatisasi dapat dilakukan pada tanaman putatif transforman yang tetap hidup ketika ditumbuhkan dalam media AB Mix + antibiotik kanamisin 75 mg/L dengan syarat tanaman hasil transformasi tersebut telah memiliki akar yang kokoh, tinggi planlet ± 2 cm dan bewarna hijau. Aklimatisasi dilakukan dengan 2 tahap, yaitu aklimatisasi pada *growth chamber* dan *green house* sampai tumbuh dengan baik. Aklimatisasi dilakukan dengan cara menanam planlet pada media pasir dalam botol plastik yang selanjutnya disungkup dengan plastik dengan tutup berlubang untuk menghindari evapotranspirasi yang berlebihan. Penyiraman dilakukan 2 hari sekali untuk menjaga kelembaban media. Proses aklimatisasi di *growth chamber* dilakukan ± 14 hari sampai diperoleh planlet yang siap untuk dipindah ke *greenhouse*. Media tanam yang digunakan ketika aklimatisasi di *greenhouse* adalah campuran tanah dan *cocopeat* dengan perbandingan 2:1. Selama di *green house*, tanaman tomat disiram sekali dalam sehari.

3.4.3 Uji Chi Square (X^2)

Chi square (X^2) adalah uji nyata apakah data yang diperoleh benar menyimpang dari nisbah yang diharapkan. Berdasarkan hukum Mendel, jika

terintegrasi satu sifat maka nisbah yang diharapkan adalah 3:1. Adapun perhitungan uji *chi square* adalah sebagai berikut :

$$X^2 = \sum (o - e)^2 / e \quad \text{atau} \quad X^2 = \sum d^2 / e$$

Keterangan :

o : jumlah tanaman yang diamati (observed)

e : jumlah tanaman yang diharapkan (expected)

d : selisih pengamatan dan harapan (deviasi)

Nilai X^2 selanjutnya dicari di daftar *chi square* untuk mengetahui penyimpangan tersebut nyata atau tidak (Susanto, 2011).

3.4.4 Isolasi Genom Tanaman Transforman

Isolasi DNA genom tanaman dilakukan dengan menggerus 0,5 gr daun tomat sampai halus. Serbuk daun dimasukkan dalam *ependorf*, kemudian ditambahkan 1 ml buffer ekstraksi (0,2 Tris-Cl; 0,25 M NaCl; dan 13,75 ml H₂O), 50 µl SDS dan 1,25 µl β-Mercaptoetanol lalu divortex dan diinkubasi di suhu 65°C selama 10 menit. Potassium asetat sebanyak 500 µl ditambahkan ke dalam sampel dan diinkubasi *on ice* selama 10 menit. Sampel kemudian disentrifus dengan kecepatan 12000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet ditambah 625 µl isopropanol kemudian di *swirling* dan diinkubasi pada suhu -20°C selama satu jam. Sampel di sentrifus kemudian supernatan dibuang dan pelet ditambah 500 µl buffer TE dan 500 µl PCI. Sampel di vortex sampai terbentuk dua lapisan, kemudian disentrifus.

Supernatan yang terbentuk dipindahkan pada *ependorf* baru, lalu ditambahkan kloroform *equal volume* kemudian disentrifus. Supernatan dipindah ke *ependorf* baru dan ditambah isopropanol sebanyak 0,8 x volume supernatan dan natrium asetat (NaAc) sebanyak 0,2 x volume supernatan kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu -20°C. Setelah disentrifus, pelet dicuci dengan ethanol 70 % sebanyak 800 µl, lalu disentrifus kembali. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan selama ±15 menit pada suhu 45°C, kemudian ditambahkan 50 µl

buffer TE dan 1 µl RNA-se kemudian diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C. DNA hasil pemurnian diukur konsentrasinya menggunakan nano drop *nano vue plus* dan kemudian dianalisis PCR.

3.4.5 Analisis PCR Tanaman Transforman

Analisis PCR dilakukan untuk deteksi keberadaan gen target yang telah terinsersi ke dalam genom tanaman. PCR dilakukan dengan menggunakan primer *nptII* (*neomycin phosphotransferase*) yang akan menghasilkan fragmen DNA berukuran 550 bp. Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan 1 pasang primer, yaitu primer Forward *nptII* (5'- GTC ATC TCA CCT TGC TCC TGC C-3) dan primer Reverse *nptII* (5'- GTC GCT TGG TCG GTC ATT TC-3) untuk mendeteksi tanaman dengan menggunakan *selectable marker* berupa kanamisin. *NptII* digunakan karena pada konstruk plasmid yang digunakan, *selectable markernya* berupa KanR atau resisten terhadap kanamisin.

PCR dilakukan dengan membuat *cocktail* setengah kali reaksi dengan total volume yang digunakan adalah 10µl, dengan komponen master mix kappa sebanyak 5 µl, primer *forward* dan *reverse* masing-masing 0,5 µl, template DNA sebanyak 1 µl, dan ddH₂O sebanyak 3 µl. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 kali siklus yang terdiri dari tahap *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.

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

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan konfirmasi PCR pada generasi T₁, dari 10 tanaman tomat transgenik yang di analisis, diperoleh 9 tanaman positif transforman sedangkan satu tanaman (V11) tidak memiliki gen *SoSPSI-S162A* karena tidak menunjukkan adanya pita DNA berukuran 550 bp. Berdasarkan hasil skrining dan analisis *chi square* pada tanaman transgenik generasi T₂, diperoleh 5 even dengan total 7 tanaman yang memiliki rasio fenotip 3:1, sedangkan 23 tanaman dari 5 even lainnya tidak sesuai dengan rasio Mendel. Hasil segregasi menunjukkan tidak adanya tanaman homozigot sehingga belum menunjukkan stabilitas genetik.

5.2 Saran

Perlu dilakukan skrining lebih lanjut untuk memperoleh tanaman dengan genotip homozigot dan analisis PCR untuk memastikan keberadaan gen *SoSPSI-S162A* pada keturunan selanjutnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, C. K., J. K. Campbell, S. Zaripheh, E. H. Jeffery, J. W. Erdman. Jr.. 2005. Symposium: Relative Bioactivity of Functional Foods and Related Dietary Supplements. *American Society of Nutritional Sciences*. 1226-1230.
- Agromedia. 2007. *Bertanam Tomat*. Surabaya : Agromedia Pustaka.
- Bai, Y. dan P. Lindhout. 2007. Review: Domestication and Breeding of Tomatoes: What Have We Going and What Can We Gain in the Future. *Annals of Botany*. 100: 1085-1094.
- Bashir, K. M. I. dan Cho M. G. 2016. The Effect of Kanamycin and Tetracycline on Growth and Photosythetic Activity of Two Chlorophyte Algae. *BioMed Research International* : 1-8.
- Bhatia, P., N. Ashwath, T. Senaratna, D. Midmore. 2004. Review: Tissue Culture Studies of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 78:1-21.
- Buchanan, B. B. dan W. Jones. 2000. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Society of Plants Physiologies*. 630-674.
- Chen, G. Q. 2011. Effective Reduction of Chimeric Tissue in Transgenics for the Stable Genetic Transformation of *Lesquerella fendleri*. *Hortscience*. 46(1): 86-90.
- Dewanti, P., M. Islahuddin, P. Okviandari, S. Waluyo, B. A. Saputra, T. Wardiyati, B. Sugiharto. 2011. Efisiensi Transformasi Tomat (*Lycopersicon esculentum*) dengan Gen *SoSPSI* Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *Berkala Penelitian Hayati Edisi Khusus*. 4C: 73-78.
- Duan, H., X. Ding, J. Song, Z. Duan, Y. Zhou, C. Zhou. 2009. Effects of Kanamycin on Growth and Development of *Arabidopsis thaliana* Seedling, Cotyledon and Leaf. *Pakistan Journal of Botany*. 41(4): 1611-1618.
- Fadilla, Z. N. Dan Respatijarti. 2018. Induksi Poliploidi pada Bawang Putih (*Allium sativum* L.) dengan Pemberian Kolkisin. *Jurnal Produksi Tanaman*. 6(5): 783-790.

- Fuhs, R. S. dan Hunter, T. 2017. pHisphorylation : The Emergence of Histidine Phosphorylation as a Reversible Regulatory Modification. *Current Opinion in Cell Biology*. 45: 8-16.
- Gann, P. H., J. Ma, E. Giovannucci, W. Willett, F. M. Sacks, C. H. Hennekens, M. J. Stampfer. 1999. Lower Prostate Cancer Risk in Men with Elevated Plasma Lycopene Levels. *Cancer Research*. 59(6): 1225-1230.
- Hackel, A., N. Schaure, F. Cerrari, dan Kubs. 2006. Sucrose Transporter Lesut 1 favrend Lesut 2 Inhibition Affect Tomato Fruit Development in Different Ways. *Plant Journal*. 45: 180-192.
- Hothem, D. S., K. A. Marley, dan R. A. Larson. 2003. Photochemistry i AB Mix's Nutrient Solution. *Journal of Plant Nutrition*. 26(4): 845-854.
- Huber, S. C. dan Huber, J. L. 1992. Role of Sucrose-Phosphate Synthase in Sucrose Metabolism in Leaves. *Plant Physiology*. 99: 1275-1278.
- Huber, S. C. Dan Huber J. L.. 1996. Role and Regulation of Sucrose Phosphate Synthase in Higher Plants. *Annual Review of Plant Phisiology and Plant Molecular Biology*. 47: 431-444.
- Jelenic, S.. 2003. Review: Controversy Associated With the Common Component of Most Transgenic Plants – Kanamycin Resistance Marker Gene. *Food Technology and Biotechnology*. 41(2): 183-190.
- Jones, J. B. 2007. *Tomato Plant Culture: In the Field, Greenhouse and Home Garden, Second Edition*. New York: CRC Press.
- Koul, B., S. Srivastava, I. Sanyal, B. Tripathi, V. Sharma, D. V. Amla. 2014. Transgenic Tomato Line Expressing Modified *Bacillus thuringiensis cryIAb* Gene Showing Complete Resistance to Two Lepidopteran Pests. *SpringerPlus*. 3: 1-13.
- Levefre, F., M. H. Remy, dan J. M. Manson. 1997. Alanin-Stretch Scanning Mutagenesis : A Simple and Efficient Methode to Probe Protein Structure and Function. *Nucleid Acid Research*. 25(2): 447-448.
- Liza, L. N., A. N. M. Nasar, K. M. A. Zinnah, Md. A. M. Chowdurry, dan M. Ashrafuzzaman. 2013. *In Vitro* Growth Media Effect for Regeneration of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) and Evaluation of the Salt Tolerance Activity of Callus. *Journal of Agriculture and Sustainability*. 3(2): 132-143.

- Lunn, E. J. dan MacRae, E. 2003. New Complexities in the Synthesis of Sucrose. *Current Opinion in Plant Biology*. 6: 208-214.
- Lunn, E. J., V. J. Gillespie, dan R. T. Furbank. 2003. Expression of a Cyanobacterial Sucrose-Phosphate Synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in Transgenic Plants. *Journal of Experimental Botany*. 54(381): 223-237.
- Manuhara, Y. S. W., J. Soedarsono, S. Moeljopawiro. 2005. Skrining Hasil Transformasi Gen β -1, 3-Endogulkanase ke dalam Tanaman Tembakau Besuki H382 dengan Perantara *Agrobacterium tumefaciens*. *Prosiding Seminar Nasional Biologi I*: 30 Agustus 2003.
- Miki, B. dan McHugh, S.. 2004. Review: Selectable Marker Genes in Transgenic Plants: Applications, Alternatives and Biosafety. *Journal of Biotechnology*. 107: 193-232.
- Nap, J. P., J. Bijvoet, W. J. Stiekema. 1992. Biosafety of Kanamycin-Resistant Transgenic Plants. *Transgenic Research*. 1: 239-249.
- Norelli, J. L. Dan H. S. Aldwinckle. 1993. The Role of Aminoglycoside Antibiotics in the Regeneration and Selection of Neomycin Phosphotransferase-transgenic Apple Tissue. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 118(2): 311-316.
- Pattanayak, D. 1999. Higher Plant Sucrose-Phosphate Synthase : Structure, Function and Regulation. *Indian Journal of Experimental Biology*. 37: 523-529.
- Rashid, A. 2017. Comparison of Kanamycin Versus Hygromycin Resistance Gene in Transgenic Plant Selection of *Arabidopsis thaliana* L.. *Advance in Cell Science and Tissue Culture*. 1(1): 1-2.
- Register, J. C., D. J. Peterson, P. J. Bell, W. P. Bullock, I. J. Evans, B. Frame, A. J. Greenland, N. S. Higgs, I. Jepson, S. Jiao, C. J. Lewnau, J. M. Sillick, H. M. Wilson. 1994. Structure and Function of Selectable and Non-Selectable Transgenic in Maize After Introduction by Particle Bombardment. *Plant Molecular Biology*. 25: 951-961.
- Rohmah, M. 2017. Transformasi Mutan Gen *SoSPS1-S162A* pada Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. *Tesis*. Jember: Universitas Jember.

- Santosa, T. J., A. Sisharmini, dan M. Herman. 2009. *Respon Regenerasi beberapa Genotip dan Studi Transformasi Genetik Tomat melalui Vektor Agrobacterium tumefaciens*. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi Sumberdaya Genetik Pertanian
- Sawitri, W. D. 2013. Konstruksi Plasmid pRI 101-AN. *Unpublished Data*. Japan: Osaka University.
- Stewart, C. N. 2008. *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques and Applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Sugiharto, B., H. Sakakibara, Sumadi, dan T. Sugiyama. 1997. Differential Expression of Two Genes for Sucrose-Phosphate Synthase in Sugarcane : Molecular Cloning of the cDNAs and Comparative Analysis of Gene Expression. *Plant Cell Physiology*. 38(8): 961-965.
- Suryo. 2005. *Genetika*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Susanto, A. H. 2011. *Genetika*. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Taiz, L. dan Zeiger, E. 2002. *Plant Physiology 3rd Edition*. Sinauer Associates.
- Takahashi, S., K. Ono, M. Ugaki, K. Ishimaru, N. Aoki, dan R. Ohsugi. 2000. Ser162-Dependent Inactivation of Overproduced Sucrose-Phosphate Synthase Protein of Maize Lva1 in Transgenic Rice Plant. *Journal Plant Cell Physiology*. 41(8): 977-981.
- Tankley, S. D., M. W. Ganai, J. P. Prince, M. C. De Vincente, M. W. Bonierbale, P. Broun, T. M. Fulton, J. J. Giovannoni, S. Grandillo, G. B. Martin, R. Messeguer, J. C. Miller, L. Miller, A. H. Paterson, O. Pineda, M. S. Roder, R. A. Wing, W. Wu, N. D. Young. 1992. High Density Molecular Linkage Maps of the Tomato and potato Genomes. *Genetics*. 132(4): 1141-1160.
- Tizaoui, K. dan Kchouk, M. E. 2012. Genetics Approaches for Studying Transgene Inheritance and Genetics Recombination in Three Successive Generations of Transformed Tobacco. *Genetics and Molecular Biology*. 35(3): 640-649.
- Toroser, D. dan Huber, S. C. 1997. Protein Phosphorylation as a Mechanism for Osmotic-Stress Activation of Sucrose-Phosphate Synthase Protein in Spinach Leaves. *Journal of Plant Physiology*. 114: 947-955.

- Toroser, D., R. McMichael Jr, K. P. Krause, J. Kurreck, U. Sonnewald, M. Stitt, dan S. C. Huber. 1999. Site-Directed Mutagenesis of Serine 158 Demonstrates Its Role in Spinach Leaf Sucrose-Phosphate Synthase Modulation. *The Plant Journal*. 17(4): 407-413.
- Wijayanto, T.. 2011. Examination of Chimeric Genetic Structure of To Transformed Lupin Shoots. *Jurnal Agroteknos*. 1 (1): 14-20.
- Wing, R. A., H. B. Zhang, S. D. Tanksley. 1994. Map-Based Cloning in Crop Plants: Tomato as a Model System II. Isolation Characterization os a Set os Overlapping Yeast Artificial Chromosomes Encompassing the *Jointless* Locus. *Molecular and General Genetics*. 244(6): 613-621.
- Winter, H. dan Huber C. S. 2015. Regulation of Sucrose Metabolism in Higher Plants : Localization and Regulation of Activity of Key Enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 35(4): 253-289.
- Worrell, Bruneau, Summerfelt, Boersig, dan Voelker. 1991. Expression of a Maize Sucrose Phosphate Synthase in Tomato Alters Leaf Carbohydrate Partitioning. *Journal of Plant Physiology*. 3: 1121-1130.
- Yin, Z., M. Szwacka, R. Malinowski, S. Malepszy. 2004. Differences in the Inheritance Stability of Kanamycin Resistance Between Transgenic Cucumbers (*Cucumis sativus* L.) Containing Two Construct. *Journal of Applied Genetics*. 45(3): 307-313.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi Media AB Mix

Komposisi Larutan A	Jumlah (g/1000L)
• Kalsium nitrat	1100
• Kalium nitrat	575
• Fe EDTA	38
Komposisi Larutan B	
• Kalium dihidro fosfat	560
• Ammonium sulfat	30
• Kalium sulfat	75
• Magnesium sulfat	1050
• Cupri sulfat	0,4
• Zinc sulfat	1,5
• Asam borat	4,0
• Mangan Sulfat	8
• Amonium hepta molibdat	0,1

Lampiran 2. Perhitungan *Chi Square Test* pada Hasil Skrining

Even	TG		Non-TG		D		d ²		d ² /e		X ²	K
	o	e	o	e	TG	NTG	TG	NTG	TG	NTG		
V1	11	37,5	39	12,5	-26,5	26,5	702,25	702,25	18,73	56,18	74,91	< 0,001
	46	37,5	4	12,5	8,5	-8,5	72,25	72,25	1,93	5,78	7,71	0,01-0,001
	48	37,5	2	12,5	10,5	-10,5	110,25	110,25	2,94	8,82	11,76	< 0,001
V2	13	37,5	35	12,5	-24,5	22,5	600,25	506,25	16,01	40,5	56,51	<0,001
	28	37,5	20	12,5	-9,5	7,5	90,25	56,25	2,41	4,5	6,91	0,01-0,001
	21	37,5	26	12,5	-16,5	13,5	272,25	182,25	7,26	14,58	21,84	< 0,001
V4	20	37,5	30	12,5	-17,5	17,5	306,25	306,25	8,17	24,5	32,67	< 0,001
	22	37,5	28	12,5	-15,5	15,5	240,25	240,25	6,41	19,22	25,63	< 0,001
	34	37,5	16	12,5	-3,5	3,5	12,25	12,25	0,33	0,98	1,31	0,30-0,10
V5	42	37,5	8	12,5	4,5	-4,5	20,25	20,25	0,54	1,62	2,16	0,30-0,10
	38	37,5	12	12,5	0,5	-0,5	0,25	0,25	0,01	0,02	0,03	0,90-0,70
	20	37,5	27	12,5	-17,5	14,5	306,25	210,25	8,17	16,82	24,99	< 0,001
V6	39	37,5	11	12,5	1,5	-1,5	2,25	2,25	0,06	0,18	0,24	0,70-0,50
	40	37,5	10	12,5	2,5	-2,5	6,25	6,25	0,17	0,5	0,67	0,50-0,30
	24	37,5	26	12,5	-13,5	13,5	182,25	182,25	4,86	14,58	19,44	< 0,001
V7	11	37,5	36	12,5	-26,5	23,5	702,25	552,25	18,73	44,18	62,91	< 0,001
	13	37,5	35	12,5	-24,5	22,5	600,25	506,25	16,01	40,5	56,51	< 0,001
	23	37,5	27	12,5	-14,5	14,5	210,25	210,25	5,61	16,82	22,43	< 0,001
V9	27	37,5	22	12,5	-10,5	9,5	110,25	90,25	2,94	7,22	10,16	0,01-0,001
	23	37,5	25	12,5	-14,5	12,5	210,25	156,25	5,61	12,5	18,11	< 0,001
	33	37,5	17	12,5	-4,5	4,5	20,25	20,25	0,54	1,62	2,16	0,30-0,10

V10	21	37,5	28	12,5	-16,5	15,5	272,25	240,25	7,26	19,22	26,48	< 0,001
	21	37,5	29	12,5	-16,5	16,5	272,25	272,25	7,26	21,78	29,04	< 0,001
	25	37,5	25	12,5	-12,5	12,5	156,25	156,25	4,17	12,5	16,67	< 0,001
V11	36	37,5	14	12,5	-1,5	1,5	2,25	2,25	0,06	0,18	0,24	0,70-0,50
	12	37,5	38	12,5	-25,5	25,5	650,25	650,25	17,34	52,02	69,36	< 0,001
	14	37,5	36	12,5	-23,5	23,5	552,25	552,25	14,73	44,18	58,91	< 0,001
V15	29	37,5	21	12,5	-8,5	8,5	72,25	72,25	1,93	5,78	7,71	0,01-0,001
	16	37,5	34	12,5	-21,5	21,5	462,25	462,25	12,33	36,98	49,31	< 0,001
	10	37,5	38	12,5	-27,5	25,5	756,25	650,25	20,17	52,02	72,19	< 0,001

Lampiran 3. Tabel *Chi Square Test*

α	Kemungkinan								
	0,99	0,90	0,70	0,50	0,30	0,10	0,05	0,01	0,001
1	0,002	0,016	0,15	0,46	1,07	2,71	3,84	6,64	10,83
2	0,02	0,21	0,71	1,39	2,41	4,61	5,99	9,21	13,82
3	0,12	0,58	1,42	2,37	3,67	6,25	7,82	11,35	16,27
4	0,30	1,06	2,20	3,36	4,88	7,70	9,49	13,28	18,47
5	0,55	1,61	3,00	4,35	6,06	9,24	11,07	15,09	20,52
6	0,87	2,20	3,83	5,35	7,23	10,65	12,99	16,81	22,46
7	1,24	2,83	4,67	6,35	8,38	12,02	14,07	18,48	24,32
8	1,65	3,49	5,53	7,34	9,52	13,36	15,51	20,09	26,13
9	2,09	4,17	6,39	8,34	10,66	14,68	16,92	21,67	27,88
10	2,56	4,87	7,27	9,34	11,78	15,99	18,31	23,21	29,59
15	5,23	8,55	11,72	14,34	17,32	22,31	25,00	30,58	37,70
20	8,26	12,44	16,27	19,34	22,78	28,41	31,41	37,57	45,32
25	11,52	16,47	16,47	24,34	28,17	34,38	37,65	44,31	52,62
30	14,95	20,60	25,51	29,34	33,53	40,26	43,77	50,89	59,70