

**OPTIMASI METODE TRANSFORMASI GEN SUCROSE PHOSPHAT SYNTHASE (SPS) PADA TANAMAN TOMAT (*Lycopersicon esculentum*) DENGAN BANTUAN *Agrobacterium tumefaciens***

**Purnama Okviandari<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universitas Jember, Jember, Jawa Timur, email : [purnama.arin@unej.ac.id](mailto:purnama.arin@unej.ac.id)

Submisi: 21 Oktober 2018 ; Diterima: 05 Agustus 2019

**ABSTRAK**

Metode transformasi gen adalah cara mentransfer gen ke tanaman dengan tujuan tertentu yang dapat dilakukan secara alami dan buatan, dalam penelitian ini dilakukan secara alami dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens*. Didalam proses transformasi banyak faktor teknis yang mendukung keberhasilan tertransferynya gen. Oleh karena itu pada peneltian Optimasi Metode Transformasi gen Sucrose Phosphat Synthase (SPS) pada Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum*) dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* ini bertujuan mengoptimalkan faktor-faktor yang mendukung transformasi gen secara alami dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 yang mengandung konstrak gen SPS1 dari tanaman tebu, dikendalikan oleh promotor CaMV35S dan gen NPT II sebagai marker ketahanan terhadap kanamisin. Dalam penelitian ini dilakukan optimalisasi penggunaan metode penelitian mulai penggunaan eksplan kotiledon, proses transformasi, kokultivasi, regenerasi, seleksi tanaman potatif transforman, aklimatisasi dan analisa DNA genom dengan harapan mendapatkan tanaman putatif transforman dengan persentase tinggi. Metode transformasi gen yang diperoleh akan mendukung kegiatan penelitian transformasi gen di UPT Laboratorium Terpabu dan Sentra Inovasi Universitas Jember dan di laboratorium lain yang memerlukannya.

**Kata Kunci** : Tomat (*Lycopersicon esculentum*); gen SoSPS1; Transformasi; *Agrobacterium tumefaciens*.

**PENDAHULUAN**

Transformasi diantaranya adalah upaya memanipulasi sifat genetik dan mentransfer gen-gen asing yang diisolasi dari tanaman, virus, bakteri atau hewan ke dalam suatu latar belakang genetic baru (Arencibia *et al.*, 1992). Pada umumnya *Agrobacterium* adalah vektor transformasi pada tanaman dikotil (Wunn, *et al.*, 1997). Ketersediaan gen *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) tebu yang sudah berhasil dikloning (Sugiharto, 1997) merupakan modal utama dilakukannya transformasi gen SPS pada tanaman tomat .

Tanaman tomat merupakan tanaman model transformasi gen sebelum ditransformasikan ke tanaman lain, dalam hal ini ke tanaman tebu. Dipilihnya tomat

karena merupakan tanaman dikotil, tanaman dikotil adalah inang dari *Agrobacterium* dan tomat tanaman semusim yang memiliki umur lebih pendek daripada tebu sehingga lebih mudah untuk diamati hasilnya, disamping itu tanaman tomat memiliki morfologi tanaman yang mudah untuk diamati (Chang Karen *et all*, 2016). Optimasi metode transformasi yang dilakukan mengacu pada jurnal transformasi tomat oleh Qia Dongliang *et all*, 2007 dan dilakukan beberapa optimasi meode untuk mendapatkan hasil yang lebih baik.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengoptimalkan faktor-faktor yang mendukung transformasi gen secara alami menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 yang

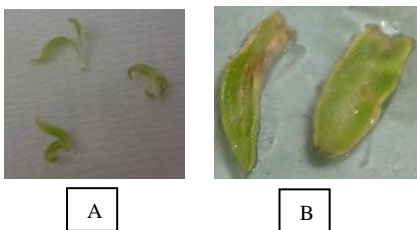
mengandung konstrak gen *Sacharum officinarum* *Sucrose Phosphate Synthase* 1 (SoSPS1) dan hasil optimasi metode transformasi yang diperoleh dapat digunakan untuk penelitian transformasi gen pada tanaman.

**BAHAN DAN METODE**

Langkah-langkah yang dilakukan dalam proses transformasi pada tanaman tomat secara umum hampir sama dengan transformasi pada tanaman lainnya. Transformasi dilakukan menggunakan teknik propagasi tanaman secara *in-vitro* atau perbanyak tanaman dengan teknik kultur jaringan, vektor transformasi menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*, kokultivasi, regenerasi tanaman sampai tahapan aklimatisasi.

**A. Tahapan Persiapan Infeksi Eksplan**

Eksplan yang digunakan yaitu kotiledon tomat varietas Liontin (Gambar 1), Sterilisasi biji tomat menggunakan Natrium hipoclorit 5%. Selanjutnya biji dikecambahkan secara invitro pada media Murashige dan Skoog (MS), selama lebih kurang 14 hari untuk mendapatkan eksplan kotiledon dan eksplan yang diperoleh bisa langsung diinfeksi .



Gambar 1. Kotiledon tomat sebagai eksplan yang akan diinfeksi dengan gen SPS. (A) Kotiledon utuh, (B) Kotiledon dibelah menjadi dua bagian

**B. Metode Infeksi, Kokultivasi dan Seleksi**

Metode infeksi, kokultivasi dan seleksi mengacu pada jurnal Qia Dongliang *et all*, 2007 menggunakan *Optical Density* pada  $\lambda$  600 ( $OD_{(600)} = 0,2$  dan optimasi metode transformasi menggunakan  $OD_{(600)} = 0.5$  sampai 0.8 (Tabel 1). *Agrobacterium* ditumbuhkan pada media *Yeast Extract Peptone* (YEP), dipanen menggunakan atau tanpa disentrifus pada besaran  $OD_{600}$  yang sudah ditentukan. Proses infeksi dilakukan dengan memasukkan eksplan ke dalam suspensi bakteri dengan atau tanpa penggojokan (*shaker*) dalam jangka waktu tertentu.

Tabel 1. Data perbandingan hasil optimasi metode tranformasi antara metode dari jurnal Qia Dongliang *et all*, 2007 pada  $OD_{(600)} = 0.2$  dan optimas metode transformasi pada  $OD_{(600)} = 0.5-0.8$

OD <sub>(600)</sub>	Pe manenan	infeksi	Waktu Infeksi (menit)	Waktu Kokulti vasi (jam)
0,2	Dengan sentrifus 4000 rpm 15 menit	Shaker, suhu 28°C	30	72
0,5 - 0.8	Tanpa disentrifus	Shaker, suhu 28°C	15	96

Keterangan : Metode tranformasi infeksi dilakukan pada  $OD_{(600)} = 0,2$ , pemanenan dengan sentrifugasi 4000 rpm, proses infeksi menggunakan shaker lama infeksi 30 menit, dan lama kokultivasi 72 jam. Optimasi metode tranformasi, infeksi dilakukan pada  $OD_{(600)} = 0,5 - 0,8$ , pemanenan tanpa sentrifugasi, proses infeksi menggunakan shaker dan lama infeksi menggunakan shaker dan lama infeksi 15 menit, lama kokultivasi 96 jam

Eksplan yang telah terinfeksi di kokultivasi pada media MS padat dan diletakkan di tempat gelap pada 28°C. Suspensi bakteri dan media kokultivasi

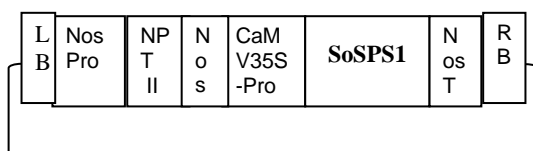
ditambah 100 mg l<sup>-1</sup> acetosyringone. Setelah masa kokultivasi kultur dicuci dengan 500 mg l<sup>-1</sup> cefotaxime dalam aquades steril, kemudian dipindah ke medium padat yang mengandung 500 mg l<sup>-1</sup> cefotaxime. Kultur dipelihara lebih kurang satu minggu di tempat gelap pada 25°C kemudian ditransfer ke medium selektif ditambah dengan penambahan antibiotik kanamicin 50 mg l<sup>-1</sup> selama 2-3 minggu.

**C. Metode Regenerasi Planlet Resisten dan Metode Aklimatisasi**

Regenerasi kultur diletakkan pada ruangan beruhu 25°C sampai dengan lima kali seleksi. Dua tahapan seleksi terakhir menggunakan media perakaran untuk menginduksi munculnya akar. Planlet diregenerasi pada media MS, setelah 21 hari tunas-tunas resisten disubkultur ke medium yang sama. Seleksi dilakukan selama 5 kali, tanaman yang sehat dan berakar siap untuk dilakukan *aklimatisasi*. Media aklimatisasi berisi campuran pasir dan kompos steril dengan perbandingan 1:1.

**E. Metode Isolasi DNA Genom dan Polimerase Chain Reaction (PCR)**

Isolasi DNA genom dan isolasi DNA plasmid berdasarkan metode Sambrook 1989. Isolasi DNA daun tomat dilakukan pada tanaman umur lebih kurang dua bulan setelah aklimatisasi. Dna dianalisa PCR menggunakan 2xPCR mastermix (Intron) menggunakan primer *Neophospo transferase* II (NPT II) dan *Cauly Mosaic Virus* (CaMV). Untuk mengetahui jenis primer yang akan digunakan dalam PCR maka harus diketahui peta gen pKYS-SoSPS1 seperti pada Gambar 2, dari peta ditentukan jenis primer yang digunakan yaitu primer NPT II dan CaMV. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan 1% gel agarose.



Gambar 2. Peta gen pKYS-SoSPS1, cDNA-SPS dibawah kendali promoter CaMV35S dan gen ketahanan terhadap kanamisin NPT II

**Parameter Pengamatan.**

Pengamatan dilakukan pada tanaman *putatif* transforman yang lolos seleksi sampai pada tahapan seleksi ke lima dan berhasil diaklimatisasi serta positif tranfer gen SoSPS1.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**A.Transformasi Gen SPS**

Transformasi gen SPS dilakukan pada eksplan kotiledon hasil penanaman secara invitro selama 14 hari. Pemilihan eksplan *kotiledon* dikarenakan kemampuan untuk beregenerasi lebih baik. Kotiledon adalah tahap awal perkecambahan dimana kulit biji masih melekat di ujung tunas. Dewanti *et al.*, (2011) menyebutkan bahwa transformasi gen SPS menggunakan kotiledon berhasil mendapatkan tanaman *putatif transforman* tomat.

Pada tahapan *transformasi* gen, metode yang dioptimasi adalah penentuan OD (*Optikal Density*) suspensi bakteri, infeksi dan kokultivasi. Pada tabel 1 Infeksi dengan OD<sub>(600)</sub> 0,2, pemanenan bakteri dengan sentrifugasi diperoleh planlet yang tidak bisa bertahan sampai seleksi 3. Kepadatan bakteri terlalu rendah mempengaruhi kemampuan menginfeksi tanaman juga rendah sehingga tanaman tidak tahan di media seleksi antibiotik dan menyebabkan kematian. Pemanenan suspensi bakteri dengan *sentrifugasi* akan meningkatkan stres pada bakteri dan mengurangi daya infeksi.

Optimasi metode yang dilakukan yaitu yang mengimakan kepadatan

suspensi bakteri OD<sub>(600)</sub> sebesar 0,5 sampai 0.8 mampu menghasilkan planlet tahan sampai seleksi lima, akan tetapi OD<sub>(600)</sub> tidak boleh melebihi nilai 0,8 karena terlalu tinggi akan mengakibatkan pertumbuhan berlebih (*over growt*). Pada kedua metode proses infeksi , eksplan di *shaker* dengan kecepatan 20 rpm selama 15 - 30 menit ditempat gelap. Tahapan ini membantu infeksi bakteri karena kondisi gelap merupakan kondisi optimum pertumbuhan *agrobacterium* yang tergolong bakteri tanah.

**B. Seleksi dan Regenerasi**

Hasil optimasi metode transformasi pada Tabel 1 sampai dengan seleksi ke lima menunjukkan hasil beberapa eksplan ada yang tidak bertahan hidup dan sebagian bisa bertahan.

Tabel 2. Data optimasi metode pada 100 eksplan tomat.

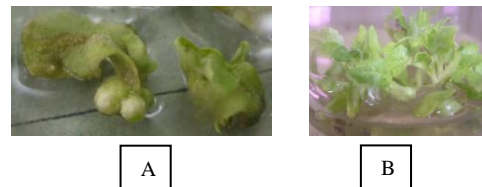
Metode	Jumlah eksplan	S1 %	S2 %	S3 %	S4 %	S5 %
Optimasi Metode	100	82	54	31	19	12
Metode Acuan	100	80	27	0	0	0

Keterangan : Persentase planlet bertahan hidup pada media seleksi 1 sampai seleksi 5 (S1 – S5) pada media antibiotik (500 mg l<sup>-1</sup> cefotaxime dan 50 mg l<sup>-1</sup> kanamisin)

Nilai persentase planlet hidup mengalami penurunan disebabkan tekanan antibiotik pada media seleksi sehingga sebagian planlet mati. Kematian juga disebabkan oleh terjadinya pertumbuhan berlebih dari *Agrobacterium* yang berakibat matinya planlet (Tabel 2).

Keberhasilan transformasi gen diindikasikan adanya kemampuan tumbuhnya tunas baru. Eksplan *kotiledon* memunculkan tunas yang bertahan sampai pada seleksi ke lima di media antibiotik. Kemampuan bertahan *kotiledon* menunjukkan adanya gen SoSPS1 yang

tertransfer ke eksplan. Beberapa tunas yang muncul beregenerasi menjadi planlet (Gambar 3). Sampai seleksi lima planlet yang beregenerasi dengan sempurna sebanyak 12 dan siap untuk diaklimatisasi.

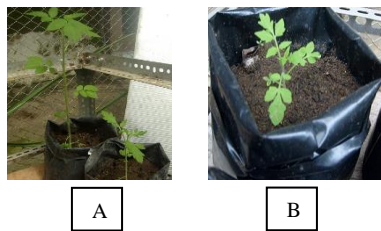


Gambar 3. Pertumbuhan planlet pada media seleksi. Pertumbuhan pada seleksi 3/S3 (A) dan pada seleksi 5/S5 (B).

**C. Aklimatisasi**

Aklimatisasi adalah proses penyesuaian diri tanaman terhadap faktor lingkungan, tanaman sudah mampu memenuhi kebutuhannya sendiri. Planlet tomat yang lolos sampai dengan seleksi 5 dan berakar ada 12 tanaman dan dilakukan aklimatisasi. Dari 12 tanaman yang diaklimatisasi ada 4 tanaman yang bisa bertahan dan siap untuk dianalisa. Proses aklimatisasi planlet putatif transforman ditanam pada media kompos dicampur tanah (1:1) dan diletakkan di luar ruangan dengan perlakuan khusus, yaitu pengaturan pencahayaan, pemupukan dan pemberian insektisida jika diperlukan.

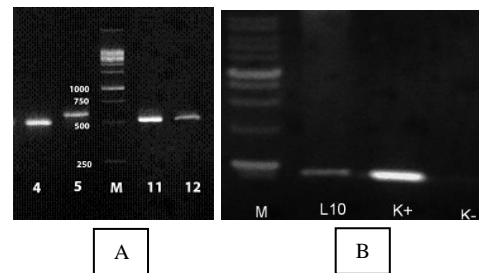
Pada saat proses aklimatisasi ada kemungkinan tanaman mengalami kematian karena faktor lingkungan tumbuh dan serangan hama penyakit sehingga jumlah tanaman yang akan dianalisa lebih lanjut tidak selalu sama dengan jumlah tanaman yang diaklimatisasi.



Gambar 4. Aklimatisasi tanaman putative transforman yang sudah melewati lima tahapan seleksi, Tanaman berumur 30 hari setelah tanam/HST (A) dan 15 HST.

Analisa DNA genom dilakukan untuk mengetahui kebenaran DNA yang *ditransformasi* ke tanaman. Dilakukan isolasi DNA genom dan alisis PCR. Isolasi dilakukan pada tiga genom tanaman putatif transforman yaitu klon 10,11 dan 12 dilanjutkan dengan analisa PCR.

Hasil analisa PCR Dna genom menggunakan primer NPT II yang menunjukkan hasil positif transforman yaitu pada klon 11 dan 12, ditunjukkan dengan adanya pita DNA sebesar 600 bp. Pita Dna sama besarnya dengan positif kontrolnya yaitu DNA plasmid pKYSSPS. Dna plasmid pKYSSPS adalah kontrol positif yaitu DNA di isolasi dari plasmid yang digunakan pada proses transformasi. Hasil PCR DNA genom klon 5 tidak menghasilkan pita DNA sebesar 600 bp sehingga diduga tidak putatif transforman. Pada penggunaan primer CaMV sebesar 500 bp menunjukkan hasil klon 10 putatif transforman diindikasikan adanya pita DNA yang sama dengan kontrol positif DNA plasmid pKYSSPS (K+). Sebagai kontrol negatif digunakan tanaman tomat yang tidak *ditransformasi* gen SoSPS1 sehingga jika di PCR tidak ada pita DNA yang muncul pada saat menggunakan primer CaMV (Ganbar 5).



Gambar 5. Hasil analisa DNA dengan analisa PCR pada DNA genom tomat putative *transforman*. Analisa PCR menggunakan primer NPT II (A) target sebesar 600 bp. hasilnya no.4 (kontrol positif DNA plasmid pKYSSPS), M (marker). 5,11,12 (DNA genom tomat) dan B adalah analisa PCR menggunakan primer CaMV dengan target 500 bp dengan hasil K+ (kontrol positif DNA plasmid pKYSSPS), M (marker). 10 (DNA genom tomat), K- Tomat kontrol negatif.

## KESIMPULAN

Hasil penelitian tentang Optimasi Metode Transformasi gen *Sucrose Phosphat Synthase* (SPS) pada tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum*) dapat disimpulkan bahwa Optimasi metode transformasi yang dilakukan dibandingkan metode yang ada di jurnal memberikan hasil lebih baik dengan besarnya OD<sub>(600)</sub> yang digunakan adalah 0,5-0,8. Dipanen tanpa sentrifugasi, proses infeksi dishaker pada suhu 28°C selama 15 menit di tempat gelap dan menghasilkan tanaman putatif transforman sebesar 3% .

## DAFTAR PUSTAKA

- Arencibia, A.D., Elva R. Carmona, Pillar Tellez, Ming-Tsair Chan, Su-May Yu, Luis E Trujillo And Pedro Oramas 1998. *An Efficient Protocol for Sugarcane (Saccharum spp. L.) Transformation Mediated by Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic Research. 7: 213-222

- Caren Chang, John L Bowman, Elliot M Mayerowitz 2016. *Field Guide to Plant Model Systems*. Cell .167 (2) : 325 - 339.
- Dewanti Parawita, Muhammad Islahuddin, Purnama Okviandari, Seagames Waluyo, Bernet Agung Saputra, Tatik Wardiyah, Bambang Sugiharto 2011. *Effisiensi Transformasi Tomat (Lycopersicon esculentum) Dengan Gen SoSPS1 menggunakan Agrobacterium tumefaciens*. Hayati 4C : 73 – 78.
- Qiu Dongliang, Gianfranco Diretto, Raffaella Tafarza, Giopvanni Giuliano 2007. *Improved protocol for Agrobacterium Mediated Transformation of Tomato and Production of Transgenic Plant Containing Carotenoid Biosynthetic Gene CsZCD*. Science Direct.112 : 172 -175
- Sambrook, J., E.F. Fritsh and T. maniatitis. 1989. *Moleculer Cloning a laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. America
- Sugiharto B., Sakakibara H., Sumadi, and Sugiyama T., 1997. *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.
- Wunn, Uze M.J., J. Puonti-Kaerlas, I. Potrykus, C. Sautter 1997. *Plasmolysis of Precultures Immature Embryos Improves Agobacterium Mediated Gene Transfer to Rice (Oryza sativa L.)*. Plant Science .130 : 87-95.