

TERAKREDITASI

SK No. 134/DIKTI/Kep/2001

ISSN: 0852-6834

Berkala **PENELITIAN**
HAYATI
(*Journal of Biological Researches*)

FEB 2007

Vol. 13

No. 1

DAFTAR ISI VOL 13 NO 1 (2007)

KEANEKARAGAMAN JENIS BENALU PARASIT PADA TANAMAN KOLEKSI DI KEBUN RAYA EKA KARYA BALI
Tahan Uji, Sunaryo Sunaryo, Erlin Rachman

KARAKTERISASI HIDROLISAT PROTEIN KEDELAI HASIL HIDROLISIS MENGGUNAKAN PROTEASE DARI TANAMAN BIDURI *Calotropis gigantea*
Yuli Witono, Aulanniâam Aulanniâam, Achmad Subagio, Simon Bambang Widjanarko

KONSTRUKSI VEKTOR BINER UNTUK EKSPRESI GEN *dp22* YANG DIISOLASI DARI TEBU VARIETAS M 44251 PADA TANAMAN
Wiwit Budi Widvasari, Sonv Suhandono

PERBANDINGAN PERTUMBUHAN DAN PERKEMBANGAN GONAD IKAN MAS *Cyprinus carpio* Linn DIPLIOD DAN TETRAPLOID
Akhdad Taufiq Mukti

EMBRIOGENESIS SOMATIK ANGGREK BULAN *Phalaenopsis amabilis* L Bl. STRUKTUR DAN POLA PERKEMBANGAN
Edy Setiti Wida Utami, Issirep Soemardi, Tarvono Tarvono, Endang Semarti

STUDI PERBANDINGAN METODE TRANSFORMASI DNA MENGGUNAKAN VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens* PADA TANAMAN TEBU *Saccharum hybrid*
Sri Setyati, Purnama Oktaviandari, Muhammad Hazmi, Bambang Sugiharto

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK AIR DAN EKSTRAK METANOL BEBERAPA VARIAN BUAH KENITU *Chrysophyllum cainito* L DARI DAERAH JEMBER
Moch. Amrun H., Umivah Umivah, Evi Umavah U

SEMI PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE *Bacillus* sp
Eldar Naila, Nunuk Widhvastuti

PENGARUH MUTASI DENGAN RADIASI SINAR GAMMA Co60 TERHADAP PRODUKTIVITAS JAMUR TIRAM ABUABU *Pleurotus sajorajju*
Ira Djajanegara, Priyo Wahyudi, Donowati Tjokrokusumo, Netty Widhvastuti, Harsovo Harsovo

IMMUNOGENESITY OF SPESIFIC PROTEIN MOLECULAR WEIGHT 16 KDa PS16 LEAF OF SIAM CITRUS INFECTED BY CITRUS VEIN PHLOEM DEGENERATION CVPD DISEASE
Made Sritamin, Aulanni â€am Aulanni â€am, IGP, Wirawan, Liliek Sulistyowati

PROFIL DAN PERSEPSI PARA PEDAGANG BURUNG TERHADAP PERDAGANGAN PERKICI PELANGI *Trichoglossus haematodus* DAN UPAYA PELESTARIANNYA
W. Widodo

KEPADATAN BIOMASSA DAN POLA DISTRIBUSI KEONG LOLA *Trochus niloticus* DI PULAU SAPARUA KABUPATEN MALUKU TENGAH
Handy Erwin Pier Leimena, Tati. S. Subahar, Adiarto Adiarto

PENGUNAAN *Bacillus* ISOLAT LOKAL UNTUK MENEKAN PENYAKIT LINCAT TEMBAKAU TEMANGGUNG
Triwido Arwivanto, Rahmad Asfanudin, Arif Wibowo, Toekidjo Martoredjo, Gembong Dalmadiyo

PBI
KOMISARIAT
JAWA TIMUR

Digital Repository Universitas Jember

Journal of Biological Researches is a peer-reviewed, open access journal, published by Indonesia Biological Association, East Java, Indonesia. It publishes articles and short communications in biological field. Author whose work is accepted for publication is subjected to pay 1000.000 IDR (100 USD) per printed article up to 5 pages. Additional page will be charged 50.000 IDR (5 USD) per printed page without photo(s). Color photo(s) page will be charged 100.000 (10 USD) per printed page.

Information about Indonesia Biological Association membership, please contact PBI board.

Indonesia Biological Association, East Java Board:

Chairman: Prof. Sutiman B. Sumitro, M.Sc., D.Sc

Secretary: Dra. Herawati Susila, M.Sc., Ph.D

Treasurer: Dr. dr. Tjandrakirana M. Sjaifullah Noer, M.Sp. And

EDITORIAL BOARD

Editor in chief : Prof. Sutiman B. Sumitro, M.Sc., D.Sc

Member : Prof. Dr. Bambang Irawan

Prof. Dr. Hitoshi Sawada

Prof. Roger Price

Prof. Fatchiyah, Ph.D

Prof. Wolfgang Nellen

Dr. Paul Kessler

Dr. Bagyo Yanuwadi

Dr. Akira Kikuchi

Editorial Officer:

Romaidi, M.Si

Roudlotul Jannah, S.Si

Office:

Jl, Surakarta No. 5 Malang

East Java, Indonesia 65114

Telp / Fax: (0341) 570631

Website: www.berkalahayati.org

Email: berkalahayati@yahoo.com

Indexed by:



MANUSCRIPT FORMATTING GUIDE

- 1 Please provide the manuscript with no authors identity.
- 2 Manuscript is written in 12 point Times New Roman font **double space** in A4 paper. Margins on all four sides are 2 cm with **left alignment** and do not split it into double-columns (**should be single-column**).
- 3 Page numbers are located at the right bottom.
- 4 Use Line numbers. In Microsoft Word program, to add the line numbers, go to the "Layout" menu in the "Page Setup" main menu. Click Line Numbers, make a tick in "Add line numbering" and choose "Continuous" option.
- 5 **Figures** and **Tables** are uploaded separately in other file. Provide figure in jpeg/jpg and compile in pdf format, while tables are provided and compiled in Ms. Excel

***Title Page** is provided in separated documents either in Ms. Word or pdf format. It consists of authors' full name (no abbreviation), e-mail address and affiliation (full address with postcode).

***Cover Letter** is sent by email after submission. It contains an introduction stating the title of the manuscript, the reason of the study is important and relevant to Journal of Biological Researchers Berkala Penelitian Hayati field, major experimental results and overall findings, short conclusion, statement explains that the manuscript has not been published and is not under consideration for publication in any other journal, and statement that all authors approved the manuscript and its submission to the journal.

***Plagiarism form** should be filled by the authors. In this document, author should attach no plagiarism prove.

Title consists no more than 20 words. Authors have to give a running title (maximum of 50 characters includes spaces) which is short title used as page header.

Abstract. Abstract is around 150-250 words without references and numbers, abbreviation, acronym or measurement unless essential. Abstract should commence with clear introduction of two or three sentences mentioning the research background. Subsequently, state the general problem of the research. Results are the main findings that directly answer the research problem(s). One or two sentence(s) discuss the finding(s) or prospective(s). Editor has the right to edit the Abstract for reason of clarity.

Key Words. Maximum 6 words and written in alphabet order.

INTRODUCTION. Write down the research background and mention the previous studies that had been done. State the problem(s) that are needed to be answered through your work. Give a short description (local and scientific name) about the organism of interest.

METHODS. The method section need to be brief and detailed enough to allow reviewers to answer some or all of the following questions: (i) Is the study an experimental or an exploration? (ii) Are the methods described in sufficient detail so that the study can be replicated? (iii) If your research uses the previous researcher method, please describe briefly that method. If you make any modification, describe the modified part (iv) Name the number of the samples, give courtesy to whom you obtain the samples (v) State seasonal variation of the habitat (if applicable) or date of sampling (vi) Human materials should be collected in conformation to standard ethics and got with informed consent, provide the department that approved your ethical clearance for the research.

RESULTS. Results are written separately with discussion. All data given in Result should be stated in the tables, graph, or figures. See Figures and Tables criteria below. State the obtained

results based on methods. Do not present the same data in both table and graph format. Do not state references in Result section. Means should be given standard deviation.

DISCUSSION. Discuss your data by comparing with current related reports. Highlight the similarities, as well as the differences and the uniqueness of your findings. Explain why your result(s) is coming to be. End the discussion by giving a conclusion and future research in that particular topic.

ACKNOWLEDGEMENT. State the grant source (Institution, year of the contract) and the person to whom the grant was given. Name the person(s) that help your work.

REFERENCES. Journal of Biological Researchers Berkala Penelitian Hayati follows the name-year citation style. They should be referred to in the text by the name(s) of the first author and the year of publication in parentheses, using the following format: (Brower & deSalle 1998) or Brower and deSalle (1998). Use the first author's name and "et al." when there are more than two authors. The order for references within parentheses in the text should be typed start from the oldest year (Monteiro & Pierce 2001; Morinaka et al. 2002; Rubinoff & Sperling 2002). If the references have the same year, place them alphabetically.

Journal article

Author AB, Author CD, Author EF. 2001. Title of article. *Journal* 60:128-132.

Example: Bagnara JT., and Fernandes PJ., 1993. Hormonal Influences on the Development of Amphibian Pigmentation patterns. *Zoological Science* 10: 733-748.

Book

Author GH, Author IJ. 2006. Title of Book. City of publication: Publisher's name.

Example: Brown TA., 1993. Genetics a Molecular Approach, 2nd ed. Chapman & Hall, London, 270,302-303.

Chapter in a book

Author KL, Author MN. 1999. Title of a chapter: a subtitle. In: Editor MN, Editor OP (eds). Title of Book. 2nd ed. City of publication: Publisher's name. p 200-235.

Example: Templeton AR.,1989. The Meaning of Species and Speciation; A Genetics Prespective dalam Otte D., dan Endler, JA. (Ed.) Speciation and its Consequences. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 1-27.

Thesis or Dissertation

Author MN. 2002. Title [Dissertation]. Location of university: Name of university.

Example: Widayanti KA. 2006. Color perception of L4M5 gene carrier female *Macaca fascicularis* [Thesis]. Bogor: Bogor Agricultural Univ.

FIGURES are uploaded in pdf (combined with the title and explanation) and separately in jpeg/jpg format that are compiled in ppt/word (original image and big size or clear enough). For pdf, present graph in maximum width of 8.5 cm. Numbers and title are written in 8 point. Add measurement scale if needed. Arrows should be given to point certain objects.

STATISTICAL GRAPHS. Give standard deviation to every mean value. Authors that used Microsoft Excel Program need to give the raw data.

TABLES. Give standard deviation to every mean value. Table titles should be concise. Explanatory material, notes on measurements, and other general information that applies to the whole table should be included as the first, unnumbered footnote and not in the table title. Numbers and table title are written in 8 point Times New Roman font. Please provide an editable files.

LIST OF CONTENTS VOL 13, NO 1 (2007) :

KEANEKARAGAMAN JENIS BENALU PARASIT PADA TANAMAN KOLEKSI DI
KEBUN RAYA EKA KARYA BALI

Tahan Uji, Sunaryo Sunaryo, Erlin Rachman

KARAKTERISASI HIDROLISAT PROTEIN KEDELAI HASIL HIDROLISIS
MENGUNAKAN PROTEASE DARI TANAMAN BIDURI *Calotropis gigantea*

Yuli Witono, Aulanni^{am} Aulanni^{am}, Achmad Subagio, Simon Bambang Widjanarko

KONSTRUKSI VEKTOR BINER UNTUK EKSPRESI GEN *dip22* YANG DIISOLASI DARI
TEBU VARIETAS M 44251 PADA TANAMAN

Wiwit Budi Widyasari, Sony Suhandono

PERBANDINGAN PERTUMBUHAN DAN PERKEMBANGAN GONAD IKAN MAS
Cyprinus carpio Linn DIPLOID DAN TETRAPLOID

Akhmad Taufiq Mukti

EMBRIOGENESIS SOMATIK ANGGREK BULAN *Phalaenopsis amabilis* L Bl: STRUKTUR
DAN POLA PERKEMBANGAN

Edy Setiti Wida Utami, Issirep Soemardi, Taryono Taryono, Endang Semiarti

STUDI PERBANDINGAN METODE TRANSFORMASI DNA MENGGUNAKAN VEKTOR
Agrobacterium tumefaciens PADA TANAMAN TEBU *Sacharum hybrid*

Sri Setyati, Purnama Oktaviandari, Muhammad Hazmi, Bambang Sugiharto

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK AIR DAN EKSTRAK METANOL BEBERAPA
VARIAN BUAH KENITU *Chrysophyllum cainito* L DARI DAERAH JEMBER

Moch. Amrun H., Umiyah Umiyah, Evi Umayah U

SEMI PURIFIKASI DAN KARAKTERISASI ENZIM PROTEASE *Bacillus* sp

Elidar Naiola, Nunuk Widhyastuti

PENGARUH MUTASI DENGAN RADIASI SINAR GAMMA $Co60$ TERHADAP
PRODUKTIVITAS JAMUR TIRAM ABUABU *Pleurotus sajurcaju*

Ira Djajanegara, Priyo Wahyudi, Donowati Tjokrokusumo, Netty Widyastuti, Harsoyo Harsoyo

IMMUNOGENESITY OF SPESIFIC PROTEIN MOLECULAR WEIGHT 16 KDa PS16 LEAF
OF SIAM CITRUS INFECTED BY CITRUS VEIN PHLOEM DEGENERATION CVPD
DISEASE

Made Sritamin, Aulanni^{am} Aulanni^{am}, IGP. Wirawan, Liliek Sulistyowati

PROFIL DAN PERSEPSI PARA PEDAGANG BURUNG TERHADAP PERDAGANGAN
PERKICI PELANGI *Trichoglossus haematodus* DAN UPAYA PELESTARIANNYA

W. Widodo

KEPADATAN BIOMASSA DAN POLA DISTRIBUSI KEONG LOLA *Trochus niloticus* DI PULAU SAPARUA KABUPATEN MALUKU TENGAH

Handy Erwin Pier Leimena, Tati. S. Subahar, Adianto Adianto

PENGUNAAN *Bacillus* ISOLAT LOKAL UNTUK MENEKAN PENYAKIT LINCAT TEMBAKAU TEMANGGUNG

Triwidodo Arwiyanto, Rahmad Asfanudin, Arif Wibowo, Toekidjo Martoredjo, Gembong Dalmadiyo

ISOLASI MIKROBA ENDOFITIK DARI TANAMAN OBAT SAMBUNG NYAWA *Gynura procumbens* DAN ANALISIS POTENSINYA SEBAGAI ANTIMIKROBA

Rumella Simarmata, Sylvia Lekatompessy, Harmastini Sukiman

BIOREMEDIASI TUMPAHAN MINYAK MENTAH DENGAN METODE BIOSTIMULASI NUTRIEN ORGANIK DI LINGKUNGAN PANTAI SURABAYA TIMUR

Munawar Munawar, Mukhtasor Mukhtasor, Tini Surtiningsih



STUDI PERBANDINGAN METODE TRANSFORMASI DNA MENGGUNAKAN VEKTOR *Agrobacterium tumefaciens* PADA TANAMAN TEBU (*Sacharum hybrid*)

Sri Setyati*, Purnama Oktaviandari*, Muhammad Hazmi**, dan Bambang Sugiharto***

* Pusat Penelitian Biologi Molekul dan *** Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam Universitas Jember

** Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Jember.

ABSTRACT

In order to compare transient expression of *gus* gene driven by CaMV 35S and rice ubiquitin RUBQ2 promoters, a DNA transformation was conducted using embryogenic callus and suspension cultures of sugarcane. The transient *gus* expression was observed by histochemical staining method. The histochemical observation of GUS activity after co-cultivation showed that RUBQ2 promoter produced high level of clear blue spots both in embryogenic callus and suspension cultures, while the CaMV35S promoter was not detected. The suspension cultures slightly increased transient *gus* gene expression compared to embryogenic callus. However, the histochemical analysis of regenerated putative transformant plants after 5 successive cycles on the selection medium showed no blue spots of *gus* gene expression. PCR amplification of DNA for CaMV35 or *nptII* in putative transformant plants confirmed that there was no integration of the transformed gene in the genome DNA. The results suggested a possibility of somaclonal variation with callus propagation, thus did not produce transformed plants. To avoid the somaclonal variation, the transformation was conducted using in vitro plants and multiple shoots without intervening callus phase. Histochemical observation of infected materials after co-cultivation showed that almost all of the infected materials partially exhibited blue color in the basal region. In case of in vitro plants, they rapidly grow and multiplied in the selection medium, thus the method provided an excellent system for the transformation in sugarcane. The results suggest that in vitro plants as well as multiple shoots need further investigation to be used as target tissues for *Agrobacterium*-mediated transformation in sugarcane.

Key words: DNA transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, rice ubiquitin promoter, CaMV35S promoter, sugarcane

PENGANTAR

Teknik pemuliaan tanaman telah banyak digunakan dalam perbaikan sifat-sifat tanaman yang mempunyai nilai ekonomis penting. Akan tetapi teknik tersebut memerlukan tenaga dan waktu banyak, seperti yang ada pada tanaman tebu. Perkembangan bioteknologi menawarkan teknik transformasi DNA untuk memasukkan gen penting dalam perbaikan sifat tanaman, di mana hal semacam itu tidak dapat dilakukan menggunakan teknik pemuliaan tanaman.

Perkembangan bioteknologi tanaman saat ini menunjukkan bahwa transformasi DNA menggunakan *Agrobacterium* telah berhasil dilakukan pada tanaman monokotil seperti padi (Raineri *et al.*, 1990; Park *et al.*, 1996), jagung (Ishida *et al.*, 1996), dan pisang (May *et al.*, 1995). Metode ini memberikan beberapa keuntungan seperti, tekniknya sederhana, tidak banyak mengubah genom tanaman transforman, dan mampu mentransfer DNA lebih besar. Walaupun metode menggunakan *Agrobacterium* telah dicobakan pada tanaman tebu (Arencibia *et al.*, 1998; Enriquez-Obregon *et al.*, 1998), tetapi rendahnya akurasi hasil untuk dapat diulang kembali, menyebabkan teknik ini

masih perlu diperbaiki untuk dapat dimanfaatkan secara rutin.

Promoter DNA merupakan elemen regulator atau pengendali yang secara langsung mengendalikan ekspresi gen baik secara konstitutif maupun spesifik. Ada beberapa tipe promoter yang dapat mengendalikan ekspresi gen secara kuat, konstitutif atau secara spesifik. Sebagai contoh, promoter Cauliflower Mosaic Virus 35S (CaMV 35S) biasanya digunakan pada transformasi beberapa tanaman dikotil maupun monokotil. Namun aktivitas promoter CaMV 35S ini rendah pada tanaman tebu (Chowdhury *et al.*, 1992). Promoter *actin* padi 1 dan elemen emu menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan CaMV 35S pada jaringan tebu (Gallo-Meager dan Ervine, 1996), dan saat ini dilaporkan bahwa promoter *ubiquitin* padi RUBQ2 mempunyai ekspresi lebih tinggi pada tanaman transgenik tebu (Liu *et al.*, 2003). Oleh karena itu, studi perbandingan beberapa tipe promoter pada transformasi tebu penting untuk melihat efisiensinya.

Pertimbangan utama dalam transformasi DNA adalah munculnya sifat yang dikehendaki pada tanaman

transgenik. Selain sifat dari DNA yang ditransformasikan tidak dikehendaki munculnya sifat lain yang berbeda dengan tanaman asalnya. Akan tetapi metode regenerasi tanaman menggunakan kultur kalus sering memunculkan terjadinya risiko variasi somaklonal, khususnya pada tebu (Lee, 1987). Variasi somaklonal telah dilaporkan pada tanaman transgenik tebu resisten terhadap insekta yang diperoleh dari elektroforasi embriogenik tebu (Arencibia *et al.*, 1999). Regenerasi secara langsung dari tanaman tanpa pembentukan kalus terlebih dahulu dilaporkan memerlukan waktu lebih pendek, efisiensi transformasi lebih tinggi sekitar 50%, dan dapat menekan terjadinya variasi somaklonal (Manickavasagam *et al.*, 2004).

Pada tulisan ini dilaporkan hasil penelitian transformasi gen *gus* yang dikendalikan oleh CaMV 35S dan *ubiquitin* padi RUBQ2 (Liu *et al.*, 2003) dengan target jaringan (eksplan) tebu yang berbeda.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Tanaman

Kalus tebu dari cultivar Ni9 dan NiF4 didapat dari Laboratorium Crops Breeding, Japan International Research Center for Agricultural Sciences. Kalus dipropagasi menggunakan medium *Murashige-Skoog* (MS) ditambah 3 mg l⁻¹ 2,4 D (MS1) dalam kondisi gelap dengan suhu 26 °C dan setiap tiga minggu sekali disubkultur pada medium yang baru.

Tunas samping (*axillary buds*) diisolasi dari batang tebu (cultivar BL) yang diambil dari lapangan secara aseptik dan disterilkan menggunakan etanol 70%, selanjutnya ditumbuhkan pada media MS ditambah 0,1 Mg l⁻¹ 6-*benzyladenin* (BA) pada ruangan bercahaya bersuhu 26 °C selama 3 minggu untuk menghasilkan tanaman *in vitro*.

Persiapan Eksplan

Kalus disubkultur pada media MS1 baru dan diinkubasi dengan kondisi yang sama dengan interval 3 minggu. Kalus embriogenik (EC) diperoleh dengan menyeleksi kalus dengan ciri-ciri nodular, kompak, dan menunjukkan warna kekuningan (Matsuoka *et al.*, 2002). Kultur EC ditransfer pada MS1 cair untuk membuat kultur sel (SC) dengan cara seperti yang dilaporkan oleh Arcencibia *et al.* (1998).

Tanaman pertama yang diperoleh dari tunas samping disubkultur pada media yang sama untuk memperoleh tunas dan diinkubasi pada kondisi yang sama. Tunas-tunas yang hijau dan sehat (± 3 cm) dipisahkan dan dikultur dalam MS tanpa hormon untuk memacu pertumbuhan akar pada tanaman *in-vitro* selama 2 minggu. Bagian basal (pangkal)

tunas tanaman ini (0,5 cm) dipisahkan dan digunakan sebagai eksplan untuk transformasi.

Plasmid Vektor dan Kultur *Agrobacterium*

Transformasi dilakukan dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 yang mengandung plasmid pB1121 atau pCL4. Plasmid pB1121 (Toyobo, Inc) dan pCL4 berisi gen *gus* masing-masing dengan promotor CaMV35S dan *ubiquitin* padi (RUBQ2) (Liu *et al.*, 2003). Koloni tunggal *Agrobacterium* yang berisi masing-masing plasmid diinokulasi dalam 3 ml media YEP cair yang mengandung 50 mg l⁻¹ kanamisin dan 50 mg l⁻¹ rifamicin dan diinkubasi pada *shaker inkubator* dengan suhu 28 °C selama 2 hari. Satu ml dari kultur *Agrobacterium* tersebut disubkultur pada 50 ml media YEP cair dan diinkubasi pada kondisi yang sama sampai mencapai OD₆₀₀ 0,8–1,0. Kemudian kultur *disentrifuga* pada 4000× g selama 10 menit dan sel bakteri disuspensikan pada media 2 ml LB medium.

Infeksi *Agrobacterium* dan Ko-kultivasi

Kurang-lebih 2 gram EC atau SC dikumpulkan dan diberi perlakuan pengeringan di atas kertas saring steril di dalam *laminar air flow* selama 30 menit. EC dan SC ditempatkan dalam Erlemeyer yang berisi 50 ml media LB dan disonifikasi selama 5 menit. Infeksi *Agrobacterium* dilakukan dengan cara merendam EC dan SC dalam suspensi *Agrobacterium* (OD₆₀₀ akhir disetarakan 0,8) yang mengandung *acetosyringone* (100 mg l⁻¹), yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 28 °C selama 30 menit. Sebelum ko-kultivasi, material yang telah terinfeksi dicuci satu kali dengan air steril kemudian dikeringkan dalam *laminar air flow*. Ko-kultivasi dilakukan dengan menginokulasi kalus yang diinfeksi pada media MSI padat berisi *acetosyringone* pada kondisi gelap dengan suhu 28 °C selama 3 hari.

Untuk infeksi tanaman *in-vitro*, bagian basal tanaman *in-vitro* ditusuk 4–5 kali menggunakan jarum steril dan tanaman yang telah dilukai direndam dalam suspensi *Agrobacterium* (OD₆₀₀ 1.0) yang mengandung *acetosyringone* (100 mg l⁻¹), selanjutnya diinkubasi pada *shaker* (150 rpm) pada suhu 28 °C selama 30 menit. Eksplan terinfeksi dikeringkan menggunakan kertas filter steril dan diinokulasi pada media MS padat yang mengandung *acetosyringone*. Ko-kultivasi dilakukan selama 3 hari pada kondisi gelap dengan suhu 28 °C.

Seleksi dan Regenerasi Transforman

Bahan yang telah diko-kultivasi dicuci tiga kali dengan 500 mg l⁻¹ *cefotaxime* dan kemudian dikeringkan di atas kertas filter steril dalam *laminar air flow*. Materi yang

terinfeksi diinokulasi pada media MS yang berisi *cefotaxime* (500 mg l⁻¹) dan diinkubasi pada kondisi gelap (EC dan SC) dan ada sinar (tanaman *in-vitro*) pada suhu 26 °C selama satu minggu. Kemudian kultur ditransfer pada media seleksi yang mengandung antibiotik *geneticin* (50 mg l⁻¹) dan *cefotaxime* (500 mg l⁻¹), serta diinkubasi pada kondisi yang sama selama 2–3 minggu.

Kalus resisten (tahan) antibiotik yang tumbuh dari EC dan SC disubkultur pada media seleksi untuk regenerasi yang mengandung *cefotaxime* dan *geneticin* selama 3 minggu. Tunas yang tumbuh kemudian disubkultur pada media seleksi yang sama dan setelah 3 siklus subkultur, tanaman kemudian dipindahkan ke media seleksi untuk pembentukan akar selama 3 minggu. Tunas yang diperoleh dari kalus tunggal ditetapkan sebagai satu klon *putative transforman*.

Pengujian Ekspresi Gen Gus

Materi yang terinfeksi diuji ekspresi gen *gus* dengan prosedur histokimia sesuai metode yang ditunjukkan oleh Jefferson *et al.*, (1987) dengan beberapa modifikasi. Uji histokimia dilakukan terhadap eksplan terinfeksi EC, SC, dan tanaman *in-vitro* satu minggu setelah ko-kultivasi. Sampel dicuci satu kali dengan larutan 0,1 M bufer *potassium phosphate* (pH 7,0), dan kemudian diinkubasi dengan larutan yang mengandung 2% metanol, 0,3% Triton X-100, 0,5 mM *potassium ferricyanide*, 0,5 mM *potassium ferrocyanide* dan 0,5 mg ml⁻¹ 5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-glucuronide pada suhu 37 °C semalam. Pengamatan *spot* atau bercak berwarna biru karena adanya ekspresi gen *gus* dilakukan menggunakan mikroskop.

Analisis PCR

Total genomik DNA diisolasi dari daun yang masih muda tanaman *putative transforman* menggunakan Kit Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen). Analisis PCR dilakukan

dengan DNA genom yang telah diisolasi menggunakan TaKaRa Ex Taq polymerase (Takara Bio Inc) dan satu set primer yang didesain dari sekuen DNA CaMV, *nptII* atau *gus*. Kondisi reaksi PCR yang digunakan untuk denaturasi, *annealing*, dan *extention* berturut-turut adalah pada 98 °C selama 10 detik, 55 °C selama 30 detik, 72 °C selama 1 menit dengan 30 siklus. DNA yang teramplifikasi kemudian dianalisis dengan elektroforesis pada 1% gel agarosa dan difoto.

HASIL

Transformasi Menggunakan Kalus Embriogenik (EC) dan Kultur Sel (SC)

Untuk membandingkan ekspresi sementara gen *gus* yang dikendalikan oleh promoter CaMV dan RUBQ2 dilakukan analisis histokimia. Pengamatan histokimia ekspresi gen *gus* setelah ko-kultivasi menunjukkan bahwa promoter ubiquitin padi RUBQ2 menghasilkan lebih banyak noda biru pada EC maupun SC, sementara promoter CaMV35S tidak terdeteksi (Gambar 1). Pengamatan dilakukan dengan menghitung sekurangnya satu noda biru yang mengekspresikan gen *gus* pada setiap gerombol kalus diberi nilai satu. Tabel 1 menunjukkan perbandingan ekspresi gen *gus* antara SC dan EC (Tabel 1). Hasilnya menyatakan bahwa promoter RUBQ2 merupakan elemen (DNA) regulator yang dapat memberikan ekspresi lebih tinggi dibandingkan CaMV35S pada transgen tebu.

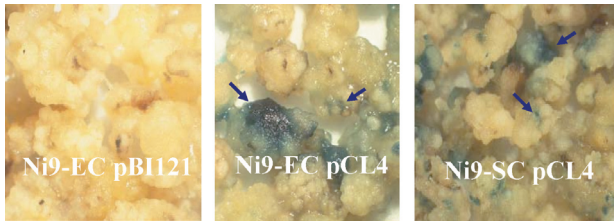
Untuk perbanyak sel transforman, kalus yang telah diinfeksi dari EC maupun SC dikulturkan satu minggu setelah ko-kultivasi tanpa seleksi, kemudian ditransfer pada media seleksi induksi kalus. Kalus resisten terhadap antibiotik yang terbentuk selanjutnya disubkultur pada media seleksi untuk regenerasi. Kalus yang tidak transforman tidak menunjukkan pertumbuhan lebih lanjut dan berubah menjadi

Tabel 1. Perbandingan efektivitas transformasi menggunakan *Agrobacterium* LBA4404 dengan perbedaan kultivars, eksplan, dan plasmid vektor

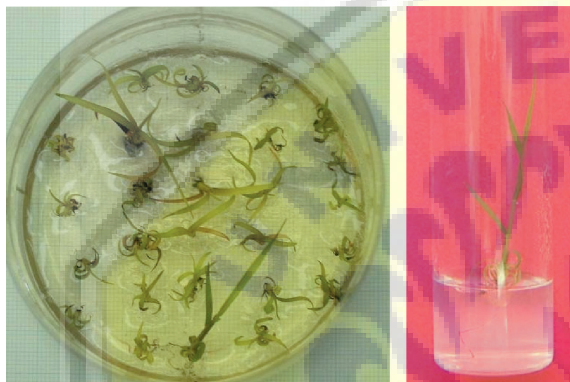
Kultivar	Eksplan	Plasmid	Aktivitas GUS (%) [*]	Jumlah plantlet (%)	Jumlah Putative transformants	Aktivitas GUS (%) ^{**}
NiF4	EC	pBI121	ND	3,1	0	0
		pCL4	54	1,5	0	0
	SC	pBI121	ND	17,8	0	0
		pCL4	61,5	17,5	0	0
NiF9	EC	pBI121	ND	29,4	6	0
		pCL4	73	25,1	2	0
	SC	pBI121	ND	69,6	2	0
		pCL4	85,5	71,4	5	0

Data merupakan rerata dari dua eksperimen terpisah.

^{*} Sesudah ko-kultivasi, ^{**} pada daun *putative transformants*



Gambar 1. Perbedaan level ekspresi gen *gus* yang dikendalikan oleh promotor CaMV35S (pBI121) dan RUBQ2 (pCL4) pada EC dan SC. Noda biru menunjukkan ekspresi gen *gus* (tanda panah). Noda biru yang jelas terlihat pada setiap gerombol kalus dihitung dan datanya ditunjukkan pada Tabel 1. Gambar ini dihasilkan dengan menggunakan *stereoscopic microscopy*.



Gambar 2. Pertumbuhan *putative transformant* dari kultivar Ni9 pada media seleksi untuk pengakaran (kiri) dan sesudah subkultur pada media yang sama sesudah 3 minggu (kanan).

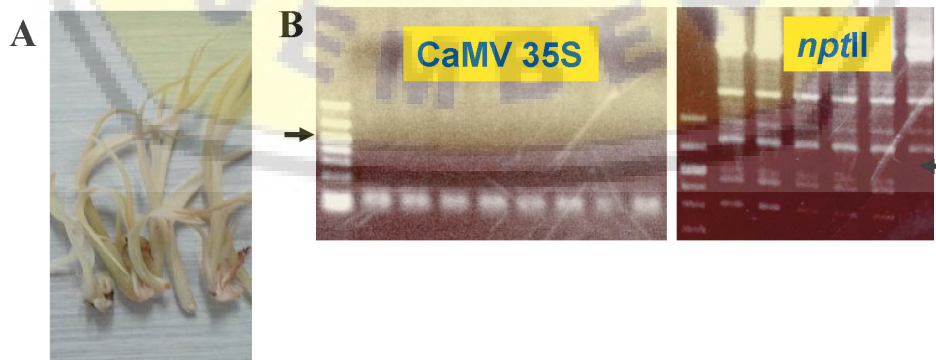
coklat, tetapi kalus yang transforman tumbuh menjadi tanaman. Di antara eksplan yang diuji, SC menunjukkan persentase regenerasi eksplan lebih tinggi dibandingkan EC (Tabel 1). Hal ini menyatakan bahwa pergantian media setiap 2 hari sekali pada SC memberikan tersedianya nutrisi lebih baik dan populasi sel yang meristematik lebih tinggi.

Pada SC dari kultivar Ni9 menghasilkan lebih banyak pertumbuhan planlet dibandingkan dari NiF4. Beberapa planlet Ni9 dapat membentuk akar dan tumbuh pada media seleksi dan dinamakan *putative transformant* (Gambar 2), tapi semua planlet dari NiF4 akhirnya tidak tumbuh dan secara perlahan mati.

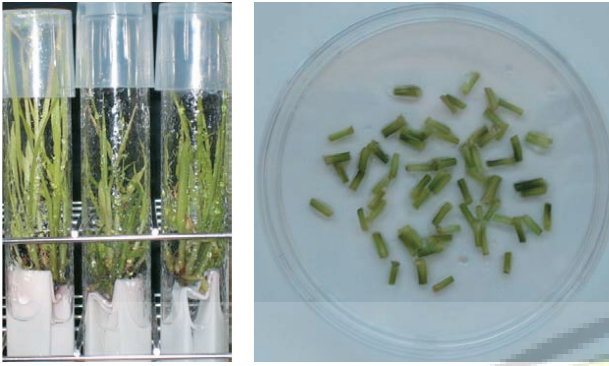
Putative transformant yang dibentuk dengan menginfeksi EC dan SC dari kultivar Ni9 diuji secara histokimia untuk ekspresi gen *gus* (Gambar 3a). Tampak bahwa semua daun yang diuji tidak menunjukkan adanya noda biru pada daun *putative transformant*. Untuk mengkonfirmasi hasil ini, genomik DNA diisolasi dari *putative transformant* dan digunakan untuk amplifikasi PCR dengan primer CaMV 35S dan *nptII*. Adanya band DNA yang sesuai dari CaMV (0,45 kb) dan *nptII* (0,5 kb) tidak terdeteksi dalam analisis PCR (Gambar 3b). Hasil ini menunjukkan bahwa gen yang ditransformasikan tidak dapat berintegrasi dengan genom *putative transformant* sehingga tidak menghasilkan tanaman transgenik.

Transformasi Menggunakan Eksplan Tanaman *In-vitro*

Untuk menghindari terjadinya variasi somaklonal, transformasi dilakukan menggunakan tanaman *in-vitro* dan *multiple shoot*. Tunas samping diisolasi dari batang kultivar BL secara aseptis dan diinokulasikan pada medium untuk menghasilkan *multiple shoot* dan tanaman *in-vitro* (Gambar 4a). Bagian basal dari tanaman *in-vitro* dipotong dan dipisahkan dari tanaman, dan digunakan sebagai jaringan target untuk transformasi (Gambar 4b). Sesudah infeksi dan ko-kultivasi dilakukan analisis ekspresi gen *gus* dengan histokimia pada baik *multiple shoot* maupun tanaman *in-vitro*. Pengamatan histokimia menunjukkan hampir semua tanaman terinfeksi terlihat warna biru yang



Gambar 3. Analisis histokimia ekspresi gen *gus* pada tanaman *putative transformant* Ni9 (A) dan analisis elektroforesis gel agrose (1%) hasil amplifikasi PCR menggunakan primer CaMV 35S dan *nptII* (B). Tidak ada spot biru menunjukkan bahwa ekspresi gen *gus* tidak ditemukan pada analisis histokimia. Demikian pula pita DNA untuk DNA CaMV (0,4 kb) dan *nptII* (0,5 kb) tidak diketemukan pada analisis elektroforesis.



Gambar 4. Perbanyak tanaman *in-vitro* pada media MS padat (kiri) dan bagian basal dari tanaman *in-vitro* yang digunakan untuk transformasi.

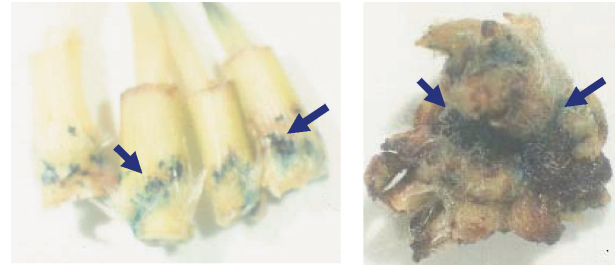
merupakan ekspresi gen GUS pada bagian basal tanaman *in-vitro* maupun *multiple shoot*.

Dalam hal tanaman *in-vitro* mereka dapat tumbuh dan berkembang dengan cepat dalam medium seleksi tetapi kontrol eksplan yang tidak terinfeksi mati (data tidak dipublikasikan). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan eksplan tanaman *in-vitro* maupun *multiple shoot* untuk transformasi memberikan harapan dan memerlukan penelitian lanjutan.

PEMBAHASAN

Tingginya ekspresi gen *gus* yang dikendalikan oleh promoter RUBQ2 pada kalus yang terinfeksi sama dengan hasil yang dilaporkan sebelumnya oleh Liu *et al.* (2003). Akan tetapi berdasarkan uji histokimia, ekspresi gen *gus* tidak ditemukan pada tanaman *putative transforman* yang berasal dari kalus embrionik dan suspensi sel. Tidak adanya transgen pada genom tanaman tersebut telah dikonfirmasi dengan analisis PCR yang menggunakan primer gen CaMV dan *nptII* (Gambar 3b).

Regenerasi secara langsung dari eksplan tanpa melalui fase pengkalusan dapat mengurangi atau meminimalkan perubahan genetik karena adanya variasi somaklonal. Oleh karena itu, penggunaan tanaman *in-vitro* sebagai eksplan untuk transformasi dimaksudkan untuk mengurangi terjadinya variasi somaklonal (Tailor dan Dukie 1993; Manichavasagam *et al.*, 2004), sehingga tulisan ini memunculkan suatu ide transformasi menggunakan *multiple shoot* dan tanaman *in-vitro* pada tebu. Pengamatan histokimia pada *multiple shoot* dan tanaman *in-vitro* yang terinfeksi menunjukkan adanya warna biru yang jelas pada bagian basal tanaman tersebut. Spot warna biru tersebut menunjukkan adanya ekspresi gen *gus* dan keberhasilan transformasi. Walaupun ekspresi gen *gus* belum dapat



Gambar 5. Analisis histokimia ekspresi gen *gus* pada tanaman *in-vitro* dan *multiple shoots*. Bercak (*spot*) warna biru pada bagian pangkal eksplan menunjukkan adanya ekspresi gen *gus* (tanda panah).

dikonfirmasi keberadaannya pada tanaman *in-vitro* yang tumbuh sesudah 5 kali siklus seleksi pada media yang mengandung antibiotik, namun metode transformasi ini perlu dikembangkan.

Manickavasagam *et al.* (2004) melaporkan bahwa transformasi genetik menggunakan tunas samping (*axillary buds*) tanaman tebu menghasilkan efisiensi transformasi tinggi sekitar 50% dan dalam waktu 5 bulan dapat dihasilkan tanaman tebu transforman. Akan tetapi, sumber eksplan yang diambil dari tunas samping tanaman tebu yang ditumbuhkan di lapangan menimbulkan masalah kesulitan dalam sterilisasi eksplan dan sesudah ditumbuhkan pada media secara *in-vitro* lambat pertumbuhannya (*unpublished data*). Oleh karena itu, keberhasilan penggunaan tanaman *in-vitro* sebagai eksplan untuk transformasi diharapkan dapat menghindari permasalahan tersebut. Beberapa perlakuan perlu dikembangkan utamanya untuk meningkatkan pembentukan tunas-tunas baru sesudah ko-kultivasi dengan *Agrobacterium*, seperti penggunaan media dengan kandungan sukrosa tinggi (50 gram per liter). Secara keseluruhan pengembangan metode transformasi menggunakan eksplan tanaman *in-vitro* ini perlu disempurnakan karena lebih sederhana, pertumbuhan eksplan lebih cepat, dan dapat mengurangi risiko variasi somaklonal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Hibah Penelitian Tim Pascasarjana Dirjen Dikti Departemen Pendidikan Nasional Tahun Anggaran 2005–2007.

KEPUSTAKAAN

Arencibia AD, Carmona ER, Tellez P, Chan MT, Yu SM, Trujillo LE, Oramas P, 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp* L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res* 7: 213–222

- Arencibia AD, Carmona ER, Cornide MT, Castiglione S, O'Reilly J, Chine A, Oramas P, Sala F, 1999. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electrophoration. *Transgenic Res* 8: 349–360.
- Chowdhury MKU, Vasil IK, 1992. Stably transformed herbicide resistance callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electrophoration of protoplasts. *Plant Cell Rep* 11: 494–498.
- Enriquez-Obregon GA, Vazquez-Padron RI, Pioto-Samsonov DL, Dela Riva GA, Selman-Housein G, 1998. Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* 206: 20–27.
- Gallo-Meagher M dan Irvine JM, 1996. Herbicide resistant transgenic sugarcane plants containing the *bar* gene. *Crop Sci* 36: 1367–1374.
- Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T, 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol* 14: 745–750.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan NW, 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901–3907
- Lee TSG, 1987. Micropropagation of sugarcane. *Plant Cell Tissue Org Cult* 10: 47–55.
- Liu D, Oard SV, Oard JH, 2003. High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. *Plant Sci* 165: 743–750.
- Manickavasagam M, Ganapathi A, Anbazhagan VR, Sudhakar B, Selvaraj N, Vasudevan A, Kasthuriangan S, 2004. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum species* hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Rep* 23: 134–143.
- Matsuoka M, Arifin S, Terauchi T, Tamura Y, Tanio M, Hayakawa A, Miwa H, 2002. Transformation of sugarcane cell mediated by *Agrobacterium* and subsequent shoot regeneration. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*. 46: 11–12.
- May GD, Afza R, Mason HA, Wiecko A, Novak FJ, Arntzen CJ, 1995. Generations of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology* 13: 486–492.
- Park SH, Pinson SRM, Smith RH, 1996. T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoots apices. *Plant Mol Biol* 32: 1135–1148.
- Raineri DM, Bottino P, Gordon MP, Nester EW, 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *Biotechnology* 8: 33–38.
- Taylor PWJ, Dukie S, 1993. Development of an *in vitro* culture technique for conservation of *Saccharum spp.* hybrids germ-plasm. *Plant Tissue Organ Cult* 34: 217–222.

Reviewer: **Dr. Y. Sriwulan M., MSi.**