

TRANSFORMASI GEN CHITINASE DAN GLUCANASE UNTUK PENINGKATAN KETAHANAN TANAMAN KEDELAI TERHADAP PENYAKIT CENDAWAN

Istiyono Kirnoprasetyo¹, Liliék Sulistyowati¹,
Wahyu Widoretno¹, dan Suharsono²

¹Universitas Brawijaya Malang, ²Balitkabi Malang

ABSTRAK

Di Indonesia, kedelai dapat diserang oleh berbagai jenis penyakit yang disebabkan oleh berbagai jenis cendawan yang menyerang akar, batang, daun, dan polong. Untuk membentuk varietas tahan penyakit, selain melalui persilangan konvensional dapat dilakukan melalui transformasi gen chitinase dan glucanase sebagai salah satu alternatif membentuk varietas tahan penyakit. Dinding sel sebagian cendawan tersusun dari Chitin dan β -1,3-glucan. Dengan insersi gen chitinase (Chn) dan glucanase (Glu) yang mampu memecah dinding sel, maka penyakit mati dan tidak berkembang.

Serangkaian penelitian telah dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Hama dan Penyakit, dan Laboratorium Kultur Jaringan Jurusan Biologi, Universitas Brawijaya pada tahun 2007–2009. Tujuan penelitian ini untuk membentuk varietas tahan penyakit cendawan melalui transformasi gen Chn dan Glu masing-masing melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* dan menggunakan konstruksi gen Ag440::pB2GW7::cDNA-ChFR dan Ag440::pB2GW7::cDNA-GFR ke dalam kotiledon langsung, kalus kotiledon dan kalus hipokotil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua gen tersebut telah terinsersi ke dalam tanaman kedelai. Hal ini ditunjukkan hasil pengamatan histokimia, imuno-histokimia dan hasil PCR. Kedelai transgenic (tanaman transforman) telah ditemukan, dan uji ketahanan terhadap penyakit-penyakit yang disebabkan oleh cendawan perlu dilakukan.

Kata Kunci: chitinase, glucanase, kedelai transgenik

ABSTRACT

Transformation gen chitinase and glucanase induced resistance of soybean against fungal disease. In Indonesia, soybean is severely infected by number of fungal diseases attacked on root, stem, leaves and pods and cause significantly yield loss. In spite of conventional breeding, to develop disease resistant plant as a component of disease management, genetic transformation has now become an alternative in developing of resistant plant through transformation of chitinase and glucanase gene. Cell wall of most fungus of is composed by Chitin and β -1, 3-glucan. Therefore, insertion of chitinase (Chn) and glucanase (Glu) genes that breakdown the cell wall, the fungus invasion will die. Researches were conducted at the Laboratory of Biotechnology Department of Plant Protection and Laboratory of Tissue Culture of Department of Biology, University of Brawijaya in 2007–2009. The objective of the research is to develop fungal disease resistance through Chn and Glu transformation using vector *Agrobacterium tumefaciens* and gene construct of Ag440::pB2GW7::cDNA-ChFR and Ag440::pB2GW7::cDNA-GFR respectively into cotyledon, cotyledon and hyphocotyl callus. The research showed that these two genes were inserted into soybean as expressed in histochemical, imuno-histochemi-

cal, and PCR analysis. The transgenic soybean (transformant plant) now available and a further test against fungal disease were needed.

Keywords: Chitinase, Glucanase, transgenic soybean

PENDAHULUAN

Semakin berkembangnya teknologi rekombinan DNA memberi peluang bagi pengembangan varietas unggul tahan penyakit melalui rekayasa genetika (Kardin 1989; Santosa 2003; Amirhusin 2004). Rekayasa genetika dapat dilakukan dengan transformasi gen asing ke dalam DNA tanaman target. Transformasi secara langsung dengan menggunakan *particle bombardment*, *elektroporasi protoplas*, *elektroporasi tissue*, Silikon karbida whisker (Sanford 1988; Shilito *et al.* 1985; D'halluin *et al.* 1992; Kaeppeler *et al.* 1990). Metode transformasi genetika secara tidak langsung dilakukan dengan bantuan vektor alami *Agrobacterium* (Pardal 2002). Beberapa hasil penelitian transformasi dengan vektor *A. tumefaciens* pada tanaman kedelai telah dilakukan untuk memperoleh varietas Kariyutaka tahan herbisida (Sato *et al.* 2007); kedelai toleran terhadap Amonium Glufosinat (Marveldani 2007), dan mendapatkan Cultivar kelompok I-IV (deteksi dengan GUS) dengan transformasi melalui kotiledon (Paz *et al.* 2004)

Transformasi dengan mempergunakan gen *Chitinase* (*Chn*) dan *Glucanase* (*Glu*) untuk meningkatkan ketahanan jeruk batang bawah terhadap jamur patogen tular tanah menggunakan gen *Chn* dan *Glu* yang diisolasi dari cendawan endofit tanaman jeruk, jarak pagar dan Abaca (Sulistyowati *et al.* 2007). Keberhasilan transformasi gen *Chn* dan *Glu* pada berbagai jenis tanaman untuk meningkatkan ketahanan terhadap jamur patogen, antara lain tanaman pada tanaman tembakau dan kentang (Lorito *et al.* 1998), pada tanaman apel (Bolar *et al.* 2000), pada tanaman pentunia (Esposito *et al.* 2000), pada tanaman anggur (Kikkert *et al.* 2000), dan pada tanaman brokoli (Mora dan Earle 2001). Pendekatan tersebut dilandasi oleh pemikiran bahwa penyusun utama dinding sel sebagian besar cendawan patogen adalah Chitin dan β -1,3-glucan, sehingga apabila dalam tanaman mengandung gen *Chn* dan *Glu* yang menyandi pembentukan Chitinase dan 1,3 β -Glucanase yang mampu merombak/mendegradasi dinding sel cendawan patogen maka perkembangan invasi penyakit akan dihambat (Harman *et al.* 1993). Selain itu secara alami kedua gen penyandi Glucanase dan Chitinase tersebut dimiliki oleh sejumlah tumbuhan dan organisme (Giannakis *et al.* 1998; Leubner-Metzger *et al.* 1999).

Ekspresi gen *Chn* dan β -Glucan secara bersama-sama dilaporkan dapat meningkatkan ketahanan terhadap jamur patogen lebih baik dibandingkan bila gen-gen tersebut berekspresi secara terpisah. Hal tersebut dibuktikan pada tanaman tembakau yang ditransformasikan gen *Chn* dan β -Glucan dapat lebih tahan terhadap infeksi *Rhizoctonia solani* dibandingkan dengan tanaman yang mengekspresikan salah satu gen saja (Mauch *et al.* 1989; Lorito *et al.* 1998).

Construct gen Chitanase dan Glucanase masing-masing dalam Ag440::pB2GW7::cDNA-ChFR dan Ag440::pB2GW7::cDNA-GFR telah berhasil dilakukan oleh Sulistyowati *et al.* (2007). Berdasarkan temuan kedua construct gen tersebut, maka transformasi ke dalam tanaman kedelai dilakukan untuk

meningkatkan ketahanan kedelai terhadap penyakit yang disebabkan oleh cendawan. Apabila kedua gen tersebut dapat diekspresikan pada tanaman kedelai, maka akan diperoleh tanaman kedelai transgenik yang tahan penyakit cendawan. Tujuan penelitian ini adalah untuk membentuk varietas kedelai tahan penyakit cendawan melalui transformasi gen *Chn* dan *Glu* masing-masing melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* dan menggunakan konstruksi gen Ag440::pB2GW7::cDNA-ChFR dan Ag440::pB2GW7::cDNA-GFR ke dalam kotiledon langsung, kalus kotiledon dan kalus hipokotil.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Hama dan Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian dan Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang pada bulan September 2007 dan sampai pada bulan Juni 2009. Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah kultur *Agrobacterium tumefaciens* (Promoter:Reporter Construct 35S:GUS), gen penyandi Glucanase dan Chitinase dalam construct Ag440::pB2GW7::cDNA-ChFR dan Ag440::pB2GW7::cDNA-GFR), Media Luria Bertani, Media Murasige Skoch (MS), antibiotik Timentin, dan herbisida Basta.

Optimasi Antibiotik dan Herbisida BASTA

Tujuan penelitian ini adalah menentukan konsentrasi Basta dan Timentin yang tepat. Konsentrasi Basta yang diuji adalah 0 ppm, 0,5 ppm; 1,0 ppm; 1,5 ppm dan 2,0 ppm. Sedangkan konsentrasi Timentin yang diuji adalah 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm dan 300 ppm. Materi kalus diperoleh dari bagian kotiledon dan hipokotil dari kedelai varietas Burangrang yang dikecambahkan dalam media agar induksi. Kotiledon dipotong 3 mm² dan hipokotil dipotong sepanjang 4 mm, ditumbuhkan dalam botol (ϕ 6 cm dan tinggi 10 cm) yang berisi media MS 5 cc sebanyak 5 potong/botol. Setelah tumbuh kalus disiapkan untuk perlakuan. Masing-masing perlakuan kalus, diambil sebanyak 0,05g kemudian ditumbuhkan ke dalam botol yang telah berisi media perlakuan yang mengandung Basta dan Timentin masing-masing berisi 5 kalus/botol. Penelitian disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) sebanyak 20 botol untuk setiap perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali.

Transfomasi gen *Chn* dan *Glu*

Transformasi gen dilakukan dengan tiga (3) perlakuan sebagai berikut: gen Chitinase (T1), gen Glucanase (T2), dan gabungan gen Chitinase dan Glucanase (T3). Eksplan yang digunakan dalam transformasi ini berasal dari : kalus hipokotil (E1), kalus Kotiledon (E2), kotiledon (E3), masing-masing terdiri dari 500 botol yang berisi 3 eksplan/botol. Inokulum *Agrobacterium* yang telah mengandung gen *Chn* dan *Glu* masing masing dibiakkan dalam LB cair dalam Shaker waterbath 28 °C selama 4 hari. Panen dilakukan dengan sentrifugasi 5000 rpm selama 15 menit. Pelet diambil dan ditambahkan dengan ddH₂O, lalu masing-masing materi eksplan direndam dalam *construct gen* sesuai dengan perlakuan *Glu*, *Chn* atau Gabungan. Perendaman dilakukan selama 3 menit untuk masing-

masing materi, setelah itu dikeringanginkan. Verifikasi masuknya gen dalam tanaman dilakukan dengan menggunakan metode Histokimia, Imunohistokimia dan PCR.

Optimasi Metode Ko-Kultivasi

Optimasi metode Ko-Kultivasi dimaksudkan untuk menentukan metode yang dapat memberikan hasil transformasi terbanyak. Gen Glu dan gen Chn yang telah ditransformasikan ke dalam tiga materi kalus di atas diperlakukan dalam tiga metode ko-kultivasi. Menggunakan rancangan acak lengkap faktorial (RAL-Faktorial). Faktor pertama adalah materi eksplan: (A) Kalus kotiledon, (B) Kalus hipokotil, (C) Kotiledon. Faktor kedua adalah metode ko-kultivasi; (1) Kertas Saring/jembatan, (2) Media Padat dan (3) Pencucian berkala. Diperoleh 9 kombinasi perlakuan masing masing perlakuan diulang 5 eksplan/botol dan masing-masing perlakuan terdiri dari 20 botol (\varnothing 6 cm dan tinggi 10 cm). Materi eksplan di rendam dalam *Agrobacterium*, kemudian ditiriskan. Setelah cukup kering eksplan diletakkan pada Media Cair dan Media Padat (sesuai perlakuan). Untuk metode pencucian dilakukan pencucian setiap 2 hari sekali dengan Timentin. Setelah 7 hari seluruh perlakuan dipindahkan ke dalam Media Seleksi yang telah diperoleh dari hasil optimasi BASTA dan Timentin.

Dilakukan pengamatan pada semua eksplan yang bertahan hidup di dalam botol kultur. Eksplan yang berhasil menjadi planlet disisihkan untuk persiapan aklimatisasi laboratorium. Aklimatisasi dilakukan pada planlet yang telah berumur sekitar 3 minggu, dan diamati pertumbuhannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi BASTA dan Timentin

Pengaruh perlakuan dengan konsentrasi BASTA 0,5 ppm dan 1,0 ppm tidak berpengaruh terhadap kematian kalus. Sampai dengan konsentrasi 1,0 ppm Basta tidak berpengaruh terhadap kematian kalus, karena 100% kalus dapat tumbuh. Akan tetapi pada konsentrasi Basta 1,5 ppm ketahanan kalus kedelai terhadap herbisida Basta mulai tampak berkurang (Tabel 1). Terlihat dengan nyata penurunan jumlah kalus yang hidup mulai terjadi sejak pengamatan pertama. Pada pengamatan pertama kalus yang hidup mencapai 95% tetapi pada pengamatan ke-5 menjadi 83,3%. Bahkan pada konsentrasi yang lebih tinggi (2,0 ppm) kalus terlihat tidak tahan terhadap Basta, sehingga terjadi kematian. Pada pengamatan pertama jumlah kalus yang hidup berkisar 28,3%, namun pada pengamatan ke-3 semua kalus mati.

Pada tabel tersebut menunjukkan bahwa BASTA pada konsentrasi 2,0 ppm dapat mematikan kalus sebagai akibat dari efek bahan aktif Herbisida non selektif (Glufosinate-Ammonium) yang berspektrum luas. Penggunaan Basta dengan konsentrasi 0,20 ppm adalah konsentrasi yang optimum untuk mematikan kalus tanaman. Seperti diketahui bahwa hebisida BASTA mengandung bahan aktif Glufosinate-Ammonium yang dapat mematikan gulma golongan rerumputan

Tabel 1. Pengaruh BASTA terhadap persentase kalus varietas Burangrang yang hidup.

Konsentrasi BASTA (ppm)	Pengamatan				
	1	2	3	4	5
0,0	100 a	100 a	100a	100 a	100 a
0,5	100 a	100 a	100a	100 a	100 a
1,0	100 a	100 a	100a	100 a	100 a
1,5	95 a	91,7 a	91,7a	85 a	83,3 b
2,0	28,3 b	6,7 b	0 b	0 b	0 c
HSD 5%	3.2	3.0	2.9	2.9	2.8

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada analisis HSD 5%.

dan perdu berdaun lebar dan herbisida ini efektif di lapang sampai dengan 6–7 hari dengan efek residu sampai dengan 30 hari (Anonim 2007).

Pengamatan perkembangan kalus juga dilakukan dengan mengukur berat kalus pada saat panen. Dengan pengamatan tersebut diketahui kualitas laju pertumbuhan dan perkembangan kalus.

Perlakuan BASTA 2,0 ppm berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan kalus yang ditunjukkan dengan berkurangnya berat kalus saat panen dan berat kering. Makin tinggi konsentrasi Basta, pertumbuhan kalus makin berkurang (Tabel 2). Hal ini dapat dirujuk pada pengamatan jumlah kalus yang hidup pada perlakuan BASTA. Pada konsentrasi 2.0 ppm kalus kedelai banyak mengalami kematian awal sehingga jumlah kalus yang mampu tumbuh pada hari ke 4 (pengamatan ke-2) makin berkurang. Akibatnya pada saat panen diperoleh kalus yang sangat rendah, dibandingkan dengan konsentrasi Basta dibawah 2,0 ppm. Sementara itu perlakuan BASTA 1.5 ppm tidak berbeda nyata dengan kontrol.

Tabel 2. Pengaruh Basta terhadap berat panen dan berat kering kalus.

Konsentrasi Basta (ppm)	Berat awal	Berat panen (g)	Berat kering (g)
0,0	0,05	1,168 a	0,053 a
0,5	0,05	0,610 a	0,032 a
1,0	0,05	0,383 a	0,030 a
1,5	0,05	0,263 ab	0,020 a
2,0	0,05	0,060 b	0,007 ab

Keterangan: Huruf yang sama pada kolom menunjukkan tidak beda nyata pada uji HSD 5%.

Menurut George and Sherington (1984) dalam Gunawan (1999) kalus adalah suatu kumpulan sel amorphous yang terbentuk dari sel jaringan yang membelah diri secara terus menerus. Selama pertumbuhan seluruh sel dari tanaman akan menyerap nutrisi dan air, untuk selanjutnya akan dipergunakan untuk melangsungkan kehidupan serta pembelahan dari sel-sel itu sendiri (Dwidjoseputro 1998; Fritz 2002).

Kalus tanaman kedelai yang terpapar BASTA pada konsentrasi mematikan cenderung akan melakukan serapan nutria lebih sedikit. Sebaliknya kalus kedelai

yang memperoleh perlakuan BASTA pada konsentrasi yang dapat ditoleransi akan dapat melakukan penyerapan lebih baik.

Sebaliknya Timentin dengan berbagai konsentrasi tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus, sehingga semua tingkat konsentrasi tidak menyebabkan kematian pada kalus. Hal ini menunjukkan bahwa Timentin tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus, sehingga untuk media seleksi semua konsentrasi 50 ppm dapat dipilih sebagai bahan seleksi.

Metode Optimasi Modifikasi

Rata-rata ketahanan hidup eksplan tertinggi dicapai oleh kombinasi eksplan kotiledon dengan modifikasi metode pencucian, sedangkan rata rata ketahanan hidup terendah dicapai oleh kombinasi perlakuan eksplan kalus hipokotil dengan modifikasi metode media padat (Tabel 4).

Dari penelitian tersebut terdapat interaksi antara perlakuan sumber materi dan modifikasi metode. Interaksi tersebut terjadi pada kedua kegiatan transgene baik dengan glucanase maupun Chitinase.

Dari Tabel 4, terlihat bahwa transformasi gen Chitinase dengan berbagai kombinasi perlakuan, perlakuan eksplan kotiledon dengan modifikasi metode pencucian diperoleh hasil yang lebih tinggi. Sedangkan media padat dengan sumber materi kalus dari hipokotil diperoleh hasil yang lebih rendah.

Transformasi gen Glucanase (Tabel 5) pada berbagai kombinasi perlakuan, perlakuan pencucian dengan sumber materi dari regenerasi kalus hipokotil dan kertas saring dengan sumber materi kalus dari kotiledon diperoleh yang lebih baik. Terdapat satu perlakuan pencucian dengan sumber materi kalus dari kotiledon yang ditransformasikan dengan glucanase lebih baik karena persentase kalus lebih tinggi. Sedangkan yang terendah adalah kombinasi perlakuan media padat dengan sumber materi kalus dari hipokotil dan kertas saring dengan sumber materi kalus dari hipokotil

Tabel 4. Keberhasilan hidup kalus berdasarkan jenis eksplan dan modifikasi metode transformasi gen chitinase

Jenis eksplan	Metode ko-kultivasi	Kalus hidup (%)
Kalus kotiledon	Kertas Saring	33,35
	Media Padat	28,33
	Pencucian	38,33
Kalus hipokotil	Kertas Saring	25,01
	Media Padat	18,33
	Pencucian	28,33
Kotiledon	Kertas Saring	38,33
	Media Padat	31,67
	Pencucian	45,01

Tabel 5. Keberhasilan hidup kalus berdasarkan jenis eksplan dan modifikasi metode pada transformasi gen glucanase.

Jenis Eksplan	Modifikasi Metode	Kalus hidup (%)
Kalus Kotiledon	Kertas Saring	40,00
	Media Padat	35,00
	Pencucian	45,00
Kalus Hipokotil	Kertas Saring	30,01
	Media Padat	25,00
	Pencucian	35,00
Kotiledon	Kertas Saring	45,00
	Media Padat	38,33
	Pencucian	51,77

Bila kita lihat hasil secara keseluruhan, metode pencucian dengan sumber materi kalus regenerasi hipokotil dan kertas saring dengan sumber materi kalus kotiledon maka akan terlihat bahwa yang memperoleh nilai sangat baik. Serta yang memperoleh nilai sempurna adalah metode pencucian dengan sumber kalus dari kotiledon. Sehingga secara garis besar dapat ditarik suatu gambaran bahwa metode yang baik untuk dilakukan adalah metode kertas saring dan metode pencucian, sedangkan materi yang baik adalah yang berasal dari regenerasi kalus dan kotiledon.

Transformasi gen chn dan glu

Dari Tabel 6 dapat dilihat bahwa terjadi kematian pada semua materi eksplan yang di transformasi oleh gen gabungan chitinase dan glucanase secara bersama-sama. Jumlah materi eksplan hidup relatif banyak pada transformasi dengan gen glucanase, sedangkan transformasi dengan gen chitinase meskipun memiliki daya hidup pada materi eksplan akan tetapi tidak sebesar materi yang di transformasi oleh glucanase.

Perbedaan yang sangat nyata ditunjukkan oleh kombinasi perlakuan transformasi gen glucanase pada kotiledon, peringkat berikutnya ditunjukkan oleh perlakuan transformasi gen glucanase pada kalus kotiledon. Sedangkan peringkat terendah yang masih menunjukkan perbedaan adalah perlakuan transformasi gen glucanase pada kalus dan transformasi gen glucanase pada kotiledon, perlakuan selebihnya tidak menunjukkan perbedaan yang nyata

Tabel 6. Pengaruh macam gen yang terinsersi dengan cara transformasi kalus hipokotil, kalus kotiledon dan kotiledon terhadap daya hidup (Live%)

	Gen Chitinase	Gen Glucanase	Gen Gabungan
Kalus Hipokotil	10	45	0
Kalus Kotiledon	15	51,5	0
Kotiledon	45	76,5	0

Dapat dikatakan bahwa daya hidup terbesar dimiliki oleh materi eksplan yang di transformasi dengan gen glucanase, sedangkan metode transformasi

lebih baik mempergunakan transformasi langsung kotiledon. Gabungan kedua gen dalam satu kali transformasi tidak menunjukkan hasil yang baik, semua eksplan mengalami kematian pada akhir pengamatan.

Penurunan jumlah eksplan yang hidup pada setiap kali masa pengamatan (Tabel 7), bahkan sudah dimulai sejak pengamatan pertama (5 hari setelah perlakuan). Pada pengamatan pertama yang terlihat masih hidup 100% adalah semua perlakuan transformasi dengan gen glucanase dan transformasi gen chitinase pada kotiledon. Pada pengamatan kedua (10 hari setelah perlakuan) yang masih bertahan dengan nilai hidup 100% perlakuan transformasi dengan gen glucanase pada kalus kotiledon dan transformasi langsung, sedangkan nilai hidup terendah terlihat pada perlakuan transformasi gen gabungan pada kalus (sebesar 5%) yang diikuti transformasi gen gabungan pada kalus kotiledon (sebesar 10%).

Pengamatan ketiga (15 hari setelah perlakuan) terjadi kematian total pada perlakuan transformasi gen gabungan pada materi eksplan kalus dan kalus kotiledon, sedangkan nilai hidup tertinggi tetap pada transformasi gen glucanase pada transformasi langsung kotiledon (sebesar 95%) meskipun terdapat kematian. Pada pengamatan ke 4 (20 hari setelah perlakuan) terjadi kematian total pada semua perlakuan transformasi dengan gen gabungan. Sedangkan nilai hidup terendah terjadi pada transformasi gen chitinase dengan transformasi kalus (sebesar 15%) dan nilai tertinggi tetap terlihat pada transformasi gen glucanase dengan transformasi langsung pada kotiledon (sebesar 75%).

Pengamatan ke 5 (25 hari setelah perlakuan) terlihat kondisi eksplan lebih stabil terhadap kematian, dimana pada pengamatan-pengamatan sebelumnya cenderung mengalami penurunan nilai yang tajam. Semua perlakuan rata-rata hanya mengalami penurunan nilai hidup sebesar 5%, kecuali perlakuan Transformasi glucanase dengan transformasi langsung kotiledon yang tetap pada nilai hidup sebesar 75%.

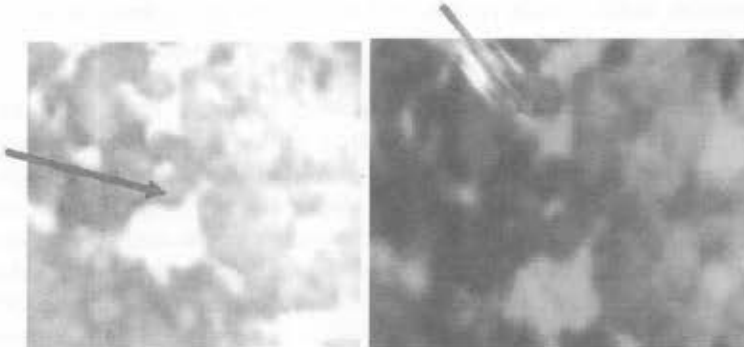
Tabel 7. Pengaruh macam gen yang di transformasi dan materi eksplan terhadap daya hidup dan pertumbuhan eksplan (%)

		Pengamatan ke / 5 hari					
		1	2	3	4	5	6
Transformasi	Chn	75	45	25	15	10	10
Kalus	Glu	100	95	70	50	45	45
Hipokotil	Gab	25	5	0	0	0	0
Transformasi	Chn	80	55	25	20	15	15
Kalus	Glu	100	100	80	60	55	50
Kotiledon	Gab	35	10	0	0	0	0
Transformasi	Chn	100	85	75	50	45	45
Langsung	Glu	100	100	95	75	75	75
Kotiledon	Gab	80	50	10	0	0	0

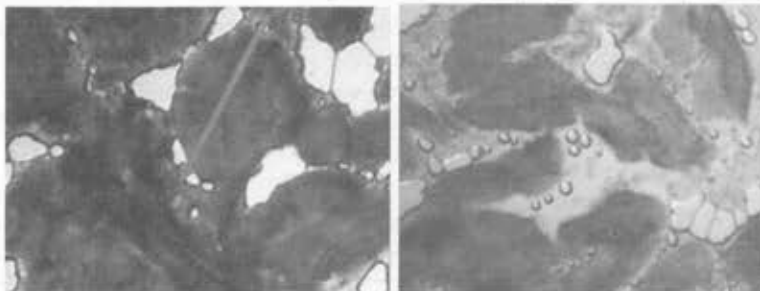
Pengamatan ke 6 atau pengamatan terakhir terlihat bahwa kestabilan nilai hidup rata-rata telah dicapai oleh semua eksplan. Dari nilai yang terlihat dapat

dikatakan bahwa ketahanan hidup eksplan akibat insersi gen lebih baik pada perlakuan transformasi glucanase dan pada transformasi gen gabungan mengalami kematian total. Dari jenis materi transformasi dan nilai hidupnya dapat dikatakan bahwa transformasi langsung dengan kotiledon memiliki kemungkinan hidup yang lebih tinggi dibandingkan dengan transformasi yang lain.

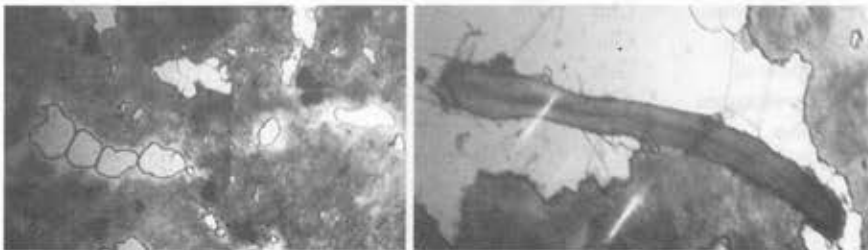
Gambar 5.1 memperlihatkan hasil histokimia kalus yang telah terinsersi oleh gen glucanase dan chitinase, hal tersebut ditunjukkan oleh bagian yang berwarna biru. Sedangkan bagian yang berwarna keputihan adalah bagian dari kumpulan kalus yang tidak terinsersi oleh gen glucanase dan gen chitinase.



Gambar 5.1a. Hasil histokimia gen Glucanase (kiri); gen Chitinase (kanan)



Gambar 5.1b. Histokimia Kalus akar (kiri); Kontrol (kanan)

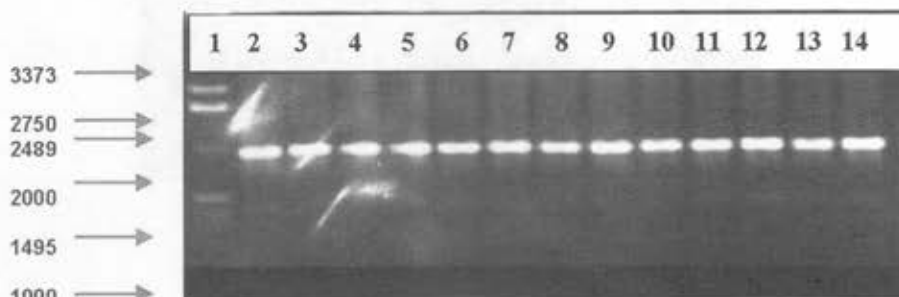


Gambar 5.2. Verifikasi Dengan Imunohistokimia

Gambar di atas memperlihatkan hasil imunohistokimia dengan menggunakan chitinase dari udang, dan menunjukkan bagian pada kalus yang telah

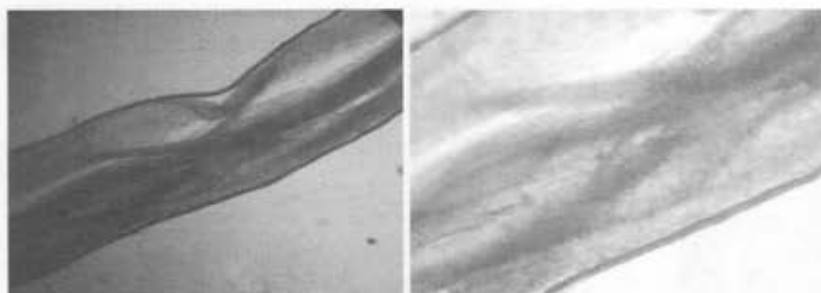
berekspresi terwanai menjadi biru. Sedangkan bagian yang berwarna keputihan adalah bagian dari kumpulan kalus yang tidak terekspresi.

Keberadaan enzim glucanase terlacak sebagai gambar berwarna biru pada akar kedelai (Gambar 5.4), terlihat bahwa dengan pewarnaan tersebut terlacak gen terdapat pada hampir semua bagian, akan tetapi pada sistem imuno histokimia ternyata tidak semuanya terekspresi.



Keterangan: No. 1 = Lamda, No 2s/d11 =Kedelai, No12s/d15=Abaca

Gambar 5.3. Hasil PCR dari Kedelai dan Abaca



Gambar 5.4. Hasil imunohistokimia

Pengamatan Planlet



Keterangan: — = 1 cm — = 5 cm

Gambar 5.5. Pertumbuhan Planlet Dalam Botol

Dari gambar di atas terlihat bahwa hampir semua planlet tumbuh di dalam botol kultur, akan tetapi pada saat tanaman siap diaklimatisasi (berumur 3 minggu setelah terbentuk planlet) terjadi kematian pada sebagian besar tanaman transforman dengan gen *Chn*.

Seminggu setelah dilakukan aklimatisasi semua tanaman transforman dengan gen *Glu* bisa beradaptasi, akan tetapi terjadi kematian pada tanaman transforman dengan gen *Chn*.



— = 5 cm

Gambar 5.6. Aklimatisasi

KESIMPULAN

1. Jenis eksplan yang memiliki respon tinggi terhadap transformasi gen *Chn* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* adalah kotiledon dan kalus.
2. Jenis eksplan yang memiliki responsif tinggi terhadap transformasi gen *Glu* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* adalah kotiledon dan kalus.
3. Semua jenis eksplan memberikan respon negatif terhadap transformasi gen *Chn* dan gen *Glu* dalam satu eksplan.
4. Metode yang paling sesuai dalam penelitian ini adalah modifikasi dengan metode jembatan.

5. Didapatkan planlet transforman dengan gen Glu yang telah terverifikasi menggunakan histokimia, imuno-histokimia dan PCR

DAFTAR PUSTAKA

- Amirhusin, B. 2004. Perakitan Tanaman Transgenik. Jurnal Litbang Pertanian. 23 (1) : 1-6p
- _____, 2007. Non-Selective Herbicide "BASTA". Bayer Crop Science Pty LTD
- Bolar, J.P., Norelli, J.L., Wong, K.H., Hayes, C.K., Harman, G.E and Aldwinkle, H.S., 2001. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increase resistance to apple scab and reduce vigor.
- Dwidjoseputro, D., 1998. Pengantar Fisiologi Tumbuhan. Gramedia. Jakarta
- D'halluin, K., E. Bonne., M. Bossut., M. D. Beuckeller and J. Leemans., 1992. Transgenic Maize Plants by Tissue Electroporation. *Plant Cell*. 4:1495-1505.
- Esposito, S., Colucci, M.G., Frusciante, L., Filippone, E., Lorito, M and Bressan, R. A., 2000. Antifungal transgenes expression in *petunia hybrida*. *Acta hort*. 508, 157-161.
- Fritz W, Went., 2002. *Plants. Life - Time books inc. London*
- Giannakis, C., C. S. Bucheli., K. G. M. Skene., S. P. Robinson and N. S. Scott., 1998. Chitinase and β -1,3-Glucanase in Grapevine Leaves. *Aus. J. Grape Wine Res.* 4:14-22p
- Gunawan, L.W., 1999. Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Laboratorium Kultur Jaringan Tumbuhan. PAU Bioteknologi. Intitut Pertanian Bogor. Dirjen Dikti.
- Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R. M., Di Pietro, A., Peterbauer, C. And Tronsmo, A., 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitinobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*, 83, 313-318
- Kaeppeler, H. F., W. Gu., D. A. Somers., H. W. Rines and A. F. Cockburn., 1990. Silicon carbide-mediated DNA delivery into plants cells. *Plant Cell Reports*. 9:415-418.
- Kikkert, J. R., Ali, G. S., Reisch, B and Reustle, G. M., 2000. Expression of fungal chitinase in *Vitis vinifera* L. `Merlot` and `Chardonnay` plant produced by biolistic transformation. *Acta Hort*. 528, 297-303.
- Kardin, M. K., 1989. Virulensi beberapa Isolat *Phakospora pachyrizi* dari Jawa Barat. Prosiding Lokakarya Penelitian Komoditas dan Studi Khusus. Caringin. Bogor. 373-382p
- Leubner-Metzger, G and F. Meins., 1999. Function and regulation of plant β -1,3-Glucosida (PR2) in Datta SK, Mthukrisnan S (Eds). *Patogenesis-related protein in Plant*. Boca Raton, CRC Press. P. 49-76.
- Lorito, M., Woo, S L., Fernandez, I G., Colucci, G., Harman, G E., Pintor-Toro, J A., Filippone E., Muccifora, S., Lawrence, C B., Zoina, A., Tuzun, S., and Scala, F., 1998. Gene from Mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7860-7865
- Marveldani., Barmawi ,M., Setiawan, K., dan Utomo, S. D., 2007. Pengembangan Kedelai Transgenik Yang Toleran Herbisida Amonium Glufosinat dengan *Agrobacterium*. *Jurn. Akta Agrosia* Vol. 10. No. 1. 49-55p
- Mauch, L. R., Peterbauer, C. K., Payer, K., Jacksits, S., Woo, S. L., Zeilinger, S., Kullnig, C. K., Lorito, M., and Kbicsek, C. P., 1989. Expression of two major chitinase genes of *trichoderma atriviride* and *T harzianum* P1 is triggered by

- different regulatory signals. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 65 (5): 1858–1863p
- Mora, A.A and Early, E. D., 2001. Resistance to *Alternaria brassicicola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. *Mol. Breed.* 8, 1–9.
- Pardal, Saptowo. J., 2002. Perkembangan Penelitian Regenerasi dan Transformasi Pada Tanaman Kedelai. *AgroBio* 5 (2) : 37–44.
- Paz, 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean and recovery of transgenic soybean plants. *Plant Cell Reports* 2005. <http://IowaState/DepAgronomy/PlantTrans>. Updated 10-27-06. Acces on 01-30-09.
- Sanford, J. C., 1988. The Biolistic Process. *Trends in Biotechnology*. 6:299–302
- Santosa, B., 2003. Penyaringan Galur Kedelai Terhadap Penyakit Karat Daun Isolasi Arjasa di Rumah Kaca. *Buletin Plasma Nutfah*. Vol 9. No. 1 th 2003. 26–32p
- Sato, H., Yamada, T., Kita, Y., Ishimoto, M., and Kitamura, K., 2007. Production of Transgenic Plant and Their early seed in Japanese Soybean var Karyutaka. *Plant Biotechnology*. Vol 24: 533–536p.
- Shilito, R. D., M. W. Saul., J. Paszkowski., M. Mueller., and I. Potrykus., 1985. High Efficiency Direct Gene Transfer to Plants. *Bio/Technology*. 3:1099–1103