

Introduksi Gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM* ke dalam Genom Tanaman Tomat Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*

Ragapadmi Purnamaningsih

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

ABSTRACT

Introduction of *DefH9-iaaM* and *DefH9-RI-iaaM* Gene Into Tomato Genome Using *Agrobacterium tumefaciens*. *Ragapadmi Purnamaningsih*. Plant genetic improvement can be conducted through genetic engineering. Parthenocarpic fruit production could increase fruit production and its qualities. IAA genes were introduced into three tomato cultivars Ratna, Opal and LV 6117 using two construct genes *DefH9-iaaM* and *DefH9-RI-iaaM*. The *iaaM* gene is able to increase auxin biosynthesis in transgenic plant cells and organs because indol-eacetamide, synthesized by the product of the *iaaM* gene, is converted either chemically or enzymatically to indole-3-acetic acid (IAA), while the promotor *DefH9* enable IAA gene expressed specifically in the ovules. The objectives of this experiment was to identify gene introduction into plant genom of three tomato cultivars. The factors tested were two construct of IAA genes (*DefH9-iaaM* or *DefH9-RI-iaaM*), tomato cultivars (Ratna, Opal, and LV 6117) and time of explant inoculation (5, 15, 30 minute). The result showed that the best time inoculation was 5 minute. Otherwise three tomato cultivars response better to *DefH9-RI-iaaM* than *DefH9-iaaM*. The total efficiency of regeneration and total efficiency of transformation of both genes were 25.38% and 20.32%. PCR analysis showed that 10 plant have positive PCR, were 1 plant carried (Opal) *DefH9-iaaM* gene and 9 plant (Ratna, Opal, LV 6117) carried *DefH9-RI-iaaM* gene.

Key words: Transformation, tomato, genetic engineering.

PENDAHULUAN

Perkembangan teknologi rekayasa genetika yang sangat pesat memberikan harapan baru dalam memanipulasi tanaman agar dihasilkan varietas-varietas baru dengan sifat-sifat unggul. Transformasi genetika dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai vektor merupakan salah satu metode yang banyak digunakan karena pola integrasinya yang stabil di dalam tanaman (Dai *et al.* 2001, Tang dan Newton 2003).

Peningkatan produktivitas tanaman dapat dilakukan dengan menginduksi pembentukan buah partenokarpi, yaitu buah yang dihasilkan tanpa melalui pe-

nyerbukan dan pembuahan. Pada beberapa tanaman pembentukan buah partenokarpi dapat terjadi secara alami karena kondisi lingkungan tertentu. Akan tetapi hal tersebut sangat jarang terjadi dan apabila terjadi maka buah yang dihasilkan tidak banyak dan kualitasnya kurang baik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa partenokarpi alami berhubungan dengan akumulasi auksin dan giberelin di dalam ovarium (Mazzucato *et al.* 1998, Ikeda *et al.* 1998, Vivian-Smith dan Koltunow 1999). Hasil penelitian Fos dan Nuez (2000) menunjukkan bahwa pembentukan buah partenokarpi pada tanaman tomat berhubungan dengan adanya protein berukuran 30 kDa yang terdeteksi pada bagian ovarium (bakal buah).

Spena dan Rotino (2001) telah berhasil mengembangkan suatu metode baru agar tanaman mampu menghasilkan buah tanpa terjadi pembuahan melalui rekayasa genetika dengan mengintroduksi gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM*. *DefH9-RI-iaaM* merupakan modifikasi dari gen *DefH9-iaaM* dengan mengganti 53 bp nukleotida pada bagian hulu kodon inisiasi AUG dengan sekuen nukleotida berukuran 87 bp yang berasal dari sekuen intron roll A yang telah dimodifikasi. Perbedaan tersebut menyebabkan kedua gen mempunyai aktivitas yang berbeda. Gen *iaaM* yang diisolasi dari bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi* merupakan penyandi enzim *tryptophan monooxygenase*, yaitu katalisator pembentukan IAA dalam jaringan tanaman, sedangkan promotor *DefH9* diisolasi dari *Anthriscum majus* yang mengarahkan ekspresi gen *iaaM* secara spesifik di dalam ovarium, khususnya pada ovul dan plasenta. Gen tersebut telah diaplikasikan pada beberapa tanaman dan memberikan hasil yang baik. Rotino *et al.* (1997) telah berhasil mengintroduksi gen *DefH9-iaaM* ke dalam tanaman tembakau dan terong. Pada tanaman strawberry dan raspberry, introduksi gen *DefH9-iaaM* dapat meningkatkan hasil sebesar 180% pada strawberry dan 100% pada raspberry (Mezzetti *et al.* 2004). Terong transgenik partenokarpi yang diuji pada musim dingin menunjukkan peningkatan produktivitas sebesar 25% dibandingkan tanaman non transgenik (Donzella *et al.* 2000). Introduksi gen tersebut pada tanaman tomat kultivar UC82 menghasilkan buah tomat dengan per-

sentase larutan padat yang lebih tinggi (Pandolfini *et al.* 2002).

Keberhasilan transformasi genetik ditandai dengan rangkaian gen yang diintroduksi dapat disisipkan ke dalam genom tanaman, diekspresikan dan tetap terpelihara dalam seluruh proses pembelahan sel berikutnya. Pada tahap terakhir, sel atau jaringan yang ditransformasi harus dapat diregenerasikan menjadi suatu tanaman. Fenotipe yang dapat diamati dari suatu genotipe tanaman tertentu merupakan perwujudan dari ekspresi gen.

Tujuan dari penelitian adalah mengintroduksi gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM* ke dalam genom beberapa jenis tomat dengan menggunakan vektor *A. tumefaciens*, serta menyeleksi tanaman transforman dengan menggunakan teknik PCR.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Penelitian dilaksanakan dari bulan Desember 2003 sampai dengan April 2006.

Bahan tanaman yang digunakan dalam percobaan ini adalah benih tomat kultivar Ratna, Opal, dan galur LV 6117. Eksplan yang digunakan untuk transformasi adalah kotiledon yang diisolasi dari benih tomat berumur 10-14 hari setelah dikecambahkan secara *in vitro*.

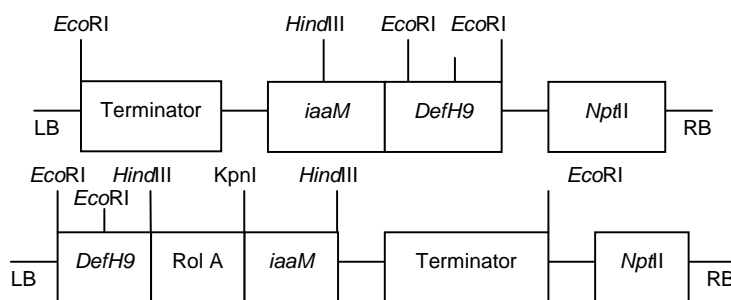
Bahan yang digunakan untuk sterilisasi biji sebelum dikecambahkan adalah benlate, alkohol, cloroks, air steril, dan betadin. Medium untuk perkecambahan biji, yaitu medium Murashige dan Skoog (MS) tanpa zat pengatur tumbuh (MS0). Transformasi gen menggunakan bahan-bahan antara lain *Agrobacterium* strain C.58.GV 3101, medium LB padat dan cair, antibiotik kanamisin, streptomisin, rifampisin, dan sefotaksim, serta acetosyringone.

Persiapan Eksplan dan Kultur *A. tumefaciens*

Proses sterilisasi benih dilakukan dengan terlebih dahulu mencuci benih dengan deterjen. Selanjutnya sterilisasi dilakukan di dalam laminar air flow dengan menggunakan alkohol 70% selama 5 menit, cloroks 30% dan 20% masing-masing selama 5 menit. Setelah itu benih dicuci dengan air steril 3 kali dan direndam dengan benlate selama 5 menit. Benih-benih tomat steril dari setiap varietas dikecambahkan pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh (MS0). Setelah benih tersebut tumbuh, kemudian diisolasi kotiledonnya untuk digunakan sebagai bahan tanaman (eksplan). Vektor yang digunakan dalam transformasi adalah *A. tumefaciens* strain C.58.GV 3101 yang membawa plasmid yang mengandung gen *DefH9-iaaM* atau *DefH9-RI-iaaM* dan gen *nptII*, yaitu gen ketahanan terhadap kanamisin sebagai gen penanda. Bakteri yang mengandung rekombinan plasmid ditumbuhkan pada media LB cair yang ditambahkan 100 mg/l kanamisin, 250 mg/l streptomisin, dan 100 mg/l rifampisin dan digoyang dengan kecepatan 250 rpm, pada suhu 26°C semalam.

Introduksi Gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM* Melalui Vektor *A. tumefaciens*

Pada penelitian ini digunakan dua konstruk gen, yaitu *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM* (Gambar 1). Penelitian awal dilakukan untuk mengetahui waktu terbaik untuk perendaman eksplan dalam larutan bakteri guna menghasilkan tanaman transforman terbanyak. Setiap kotiledon dilukai pada permukaannya untuk mempercepat terjadinya infeksi *A. tumefaciens* pada sel tanaman. Eksplan diprekultur (pre-inkubasi) pada media pertunasan selama 48 jam, selanjutnya diinokulasi dengan *A. tumefaciens*. Inokulasi eksplan dilakukan dengan cara merendam kotiledon dalam media cair MS0 yang mengandung suspensi bakteri masing-masing dengan waktu inokulasi 5, 15, dan 30 menit, lalu dikeringkan dengan kertas filter steril dan ditransfer ke media ko-kultivasi selama 3 hari dalam kondisi



Gambar 1. Konstruksi gen *DefH9-iaaM* (atas) dan *DefH9-RI-iaaM* (bawah).

gelap pada suhu 26°C. Adapun media ko-kultivasi yang digunakan adalah MS + IAA 0,1 mg/l + zeatin 1 mg/l + asetosiringone 20 µM. Jumlah eksplan yang digunakan untuk setiap waktu inokulasi adalah 150 eksplan untuk masing-masing varietas. Selanjutnya eksplan dipindahkan ke media seleksi, yaitu MS + IAA 0,1 mg/l + zeatin 1 mg/l yang ditambahkan kanamisin 75 mg/l sebagai marka seleksi. Eksplan yang bertahan hidup pada media seleksi diasumsikan sebagai putatif transforman. Dari penelitian awal ini dapat diketahui waktu inokulasi terbaik, dan selanjutnya dilakukan transformasi eksplan sesuai dengan prosedur di atas.

Seleksi dan Regenerasi Tanaman Transforman

Eksplan yang tumbuh pada media seleksi diasumsikan sebagai putatif transforman dan setiap 3-4 minggu disubkultur pada media yang sama dengan meningkatkan konsentrasi kanamisin menjadi 100 mg/l sampai muncul tunas.

Untuk mengetahui pengaruh metode regenerasi dan metode transformasi yang digunakan terhadap keberhasilan regenerasi tanaman dan transformasi genetik, maka dihitung efisiensi regenerasi dan efisiensi transformasi. Efisiensi regenerasi didefinisikan sebagai jumlah tunas yang tumbuh dibandingkan dengan jumlah eksplan yang dapat hidup di media seleksi (eksplan resisten) (Maftuchah 2003). Efisiensi transformasi didefinisikan sebagai jumlah tanaman positif PCR dibandingkan dengan jumlah tunas lolos seleksi dengan antibiotik kanamisin (Lee *et al.* 2004). Tanaman transforman selanjutnya dipindahkan ke media induksi perakaran, yaitu MS tanpa zat pengatur tumbuh hingga akar terbentuk.

Analisis Molekuler Tanaman Hasil Transformasi Genetik

DNA genomik total diekstraksi dari tanaman tomat kontrol dan transgenik. Daun digerus dengan menambahkan nitrogen cair. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung Corning 50 ml, ditambah bufer ekstraksi secukupnya dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit pada *waterbath*. Larutan ditambah chisam dengan perbandingan 1 : 1 dan digoyang selama 15 menit. Campuran disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 2 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung yang baru, kemudian ditambahkan etanol absolut dingin. Endapan DNA dicuci dengan etanol 70% dan dikeringkan, kemudian dilarutkan kembali dengan bufer TE.

Analisis molekuler dilakukan dengan menggunakan teknik PCR dengan menggunakan primer spesifik untuk gen *DefH9-iaaM* (*forward dan reverse*). Primer

yang digunakan berukuran 300 bp dengan susunan basa, yaitu 5'ATGTATGACCATTTTAATTCACCCAGT3' dan 5'CTGGGAGGAAAGCGCATCGCAC3'. Reaksi PCR dilakukan dengan total volume reaksi 25 µl yang mengandung 100 ng DNA genomik sebagai cetakan, 10 µM masing-masing dNTPs, 1 unit enzim taq DNA polimerase dalam larutan bufer, dan 0,2 µM dari masing-masing primer. Reaksi amplifikasi dilakukan menurut metode Wang *et al.* (1993) yang dimodifikasi dengan menggunakan mesin PCR MJ research PCT-100. Program PCR terdiri dari inkubasi awal pada 94°C selama 5 menit dilanjutkan dengan 35 siklus pada 94°C selama 1 menit, 65°C selama 1 menit, 72°C selama 2 menit. Siklus terakhir untuk pemanjangan akhir pada 72°C selama 5 menit. Sebanyak 10 µl produk PCR digunakan untuk elektroforesis pada 1% gel agarose. Hasil elektroforesis diamati dan difoto di atas UV transiluminator. Pada penelitian ini dihitung efisiensi regenerasi dan efisiensi transformasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Introduksi Gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM* melalui Vektor *A. tumefaciens*

Transformasi diawali dengan prekulturan eksplan selama 2 hari dalam kondisi terang. Prekultur bertujuan untuk meningkatkan efektivitas transformasi dan mempersiapkan eksplan untuk inokulasi. Salah satu faktor yang diuji untuk mengetahui efisiensi transformasi adalah lamanya waktu inokulasi/perendaman eksplan dalam suspensi bakteri. Hasil pengamatan transformasi kotiledon tomat dengan konstruksi plasmid yang berbeda ditampilkan pada Tabel 1. Transformasi eksplan dengan gen *DefH9-iaaM* dihasilkan 224 (16,6%) eksplan yang mampu beregenerasi membentuk tunas, sedangkan dengan menggunakan gen *DefH9-RI-iaaM* diperoleh 240 (17,8%) eksplan yang dapat beregenerasi membentuk tunas.

Lama perendaman jaringan dalam suspensi bakteri berpengaruh terhadap persentase regenerasi pada kultivar tomat yang berbeda. Semakin lama eksplan direndam dalam suspensi bakteri maka kesempatan bakteri untuk menempel dan menginfeksi eksplan tersebut juga akan semakin lama sehingga peluang untuk transfer T-DNA ke dalam genom tanaman akan lebih tinggi. Pada semua kultivar, semakin lama waktu perendaman, maka persentase regenerasi semakin rendah. Pada kultivar Ratna, perendaman eksplan dalam suspensi bakteri selama 30 menit sangat menurunkan tingkat keberhasilan regenerasi eksplan, sedangkan pada galur LV 6117, waktu perendaman tidak terlalu berpengaruh terhadap rege-

nerasi eksplan, walaupun jumlah eksplan yang dapat beregenerasi tertinggi juga diperoleh pada waktu perendaman 5 menit. Hal ini diperkirakan karena tingkat kepekaan jaringan dari ketiga kultivar tersebut terhadap bakteri yang digunakan berbeda. Ratna merupakan kultivar tomat yang paling rentan dibandingkan kultivar lainnya, terlihat dari jumlah regenerasi yang dihasilkan paling sedikit. Persentase pembentukan tunas yang tinggi pada eksplan yang direndam dalam suspensi bakteri selama 5 menit diduga karena kotiledon tomat sangat rentan terhadap infeksi *A. tumefaciens*.

Dari penelitian ini diketahui bahwa waktu perendaman yang paling baik adalah 5 menit. Perendaman eksplan dalam suspensi bakteri selama 30 menit menurunkan jumlah eksplan yang beregenerasi. Diduga perendaman eksplan selama 30 menit menyebabkan infeksi bakteri terlalu banyak sehingga jaringan tanaman menjadi stres dan tidak dapat tumbuh. Tanaman monokotil lebih sulit diinfeksi oleh *Agrobacterium* sehingga biasanya membutuhkan waktu perendaman yang lebih lama (Siregar 1999). Menurut Siregar (1999), pada tanaman cabai, jumlah spot biru tertinggi hasil uji GUS diperoleh dengan lama perendaman 5 menit. Perlakuan lama inokulasi dari 5 menit menjadi 15 menit menurunkan jumlah spot biru per eksplan pada eksplan hipokotil. Hasil penelitian Lowe *et al.* (1995) pada tanaman ubi jalar, peningkatan waktu inokulasi semakin meningkatkan efisiensi transformasi di mana laju transformasi tertinggi pada petiol ubi jalar diperoleh

dengan merendam jaringan dalam suspensi bakteri selama 60 menit.

Seleksi dan Regenerasi

Setelah dilakukan proses transformasi, tahap selanjutnya adalah menyeleksi eksplan yang dapat beregenerasi pada media seleksi. Pengamatan dilakukan terhadap kemampuan eksplan bertahan hidup pada media seleksi dan beregenerasi membentuk tunas. Jalur regenerasi yang diupayakan adalah melalui jalur organogenesis langsung, yaitu eksplan langsung membentuk tunas, jadi regenerasi tanaman melalui tahap pembentukan kalus dihindarkan. Eksplan yang dapat bertahan hidup pada media seleksi tetap berwarna hijau dan mulai membentuk nodul. Nodul tersebut kemudian membentuk calon tunas. Eksplan yang tidak tahan menjadi berwarna coklat dan mati. Waktu yang diperlukan oleh masing-masing jenis tomat untuk beregenerasi berbeda-beda, berkisar antara 12-24 hari (Tabel 2).

Kecepatan inisiasi tunas pada media seleksi menunjukkan kemampuan tunas mendetoksifikasi kanamisin yang terdapat dalam media. Hal ini merupakan indikasi awal bahwa gen yang diintroduksi terdapat di dalam genom tanaman, walaupun masih harus dibuktikan dengan analisis PCR. Eksplan yang tidak dapat bertahan hidup pada media seleksi sama sekali tidak dapat beregenerasi atau dapat beregenerasi tetapi memperlihatkan pertumbuhan yang tidak baik,

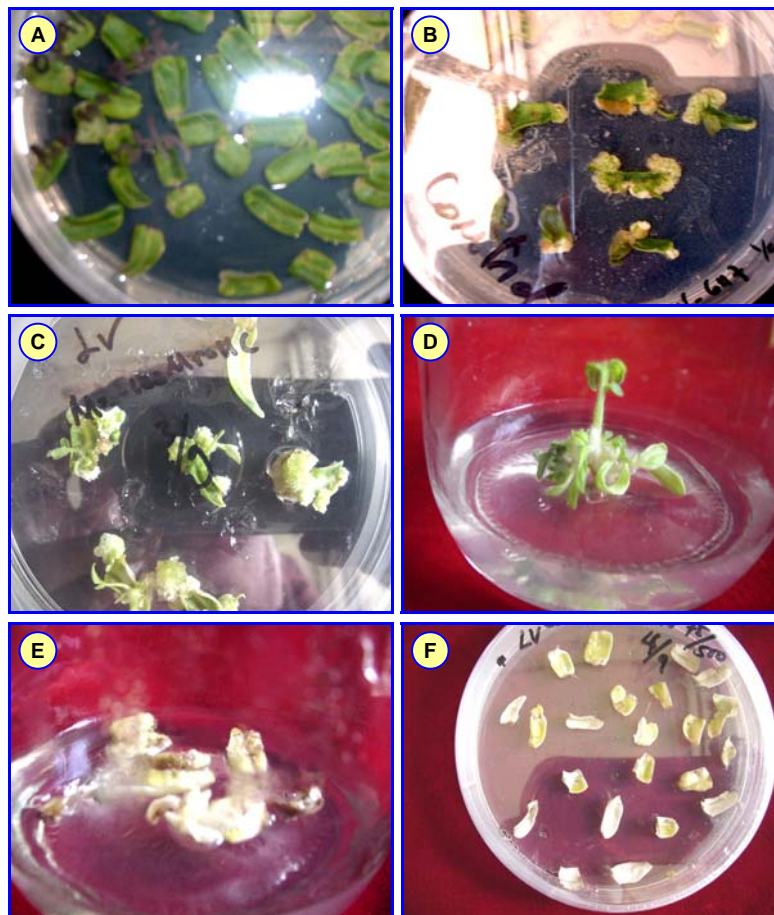
Tabel 1. Persentase eksplan yang dapat beregenerasi dengan waktu inokulasi yang berbeda.

Konstruksi gen	Kultivar	Lama perendaman dalam suspensi bakteri		
		5 menit	15 menit	30 menit
<i>DefH9-iaaM</i>	Ratna	28/150 (20%)	9/150 (6%)	3/150 (2%)
	Opal	49/150 (35%)	30/150 (20%)	15/150 (10%)
	LV6117	37/150 (25%)	30/150 (20%)	23/150 (15%)
	Jumlah	114/450 (25,3%)	69/450 (15,3%)	41/450 (9,1%)
	Total	224/450 (16,6%)		
<i>DefH9-RI-iaaM</i>	Ratna	30/150 (20%)	12/150 (12%)	8/150 (5%)
	Opal	45/150 (30%)	19/150 (13%)	12/150 (9%)
	LV6117	52/150 (35%)	31/150 (20%)	31/150 (20%)
	Jumlah	127/450 (28,2%)	62/450 (13,8%)	51/450 (11,3%)
	Total	240/450 (17,8%)		

Tabel 2. Waktu regenerasi tanaman hasil transformasi genetik pada tiga varietas tomat.

Gen	Waktu regenerasi (hari) pada varietas		
	Ratna	Opal	LV 6117
<i>DefH9-iaaM</i>	21	17	17
<i>DefH9-RI-iaaM</i>	20	15	12
Kontrol	-	-	-

- = tidak dapat beregenerasi, kontrol = tanpa perendaman.



Gambar 2. Pertumbuhan eksplan setelah transformasi: A = eksplan kotiledon setelah prekultur, B = eksplan yang dapat membentuk kalus pada media seleksi, C = pembentukan tunas dari eksplan pada media seleksi, D = tunas yang tumbuh dari eksplan pada media seleksi, E = eksplan yang tidak dapat hidup di media seleksi, F = eksplan yang tidak ditransformasi dan ditumbuhkan pada media seleksi (kontrol).

ukuran daun kecil, pertumbuhan lambat, setelah beberapa kali disubkultur berwarna kekuningan dan akhirnya mati. Tanaman yang tahan tetap berwarna hijau dan batangnya tegar (Gambar 2).

Tomat yang ditransformasi dengan menggunakan gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM* dapat beregenerasi. Persentase eksplan yang beregenerasi dan berkembang menjadi tanaman dewasa berbeda-beda (Tabel 4 dan 5). Eksplan yang dapat beregenerasi tidak semuanya dapat membentuk tunas. Beberapa eksplan tetap membentuk calon tunas, tetapi calon tunas muda tersebut menjadi coklat dan akhirnya mati. Beberapa tunas yang pada awalnya dapat tumbuh dengan baik, setelah disubkultur beberapa kali tidak dapat bertahan hidup dan akhirnya mati. Tanaman yang baik dan normal dilakukan analisis PCR.

Perbedaan respon dari masing-masing jenis tomat terhadap transformasi dengan *A. tumefaciens*

menggunakan konstruksi gen yang berbeda disajikan pada Gambar 3. Respon kultivar dengan menggunakan gen *DefH9-RI-iaaM* lebih baik dibandingkan dengan *DefH9-iaaM*. Eksplan yang diinfeksi dengan gen *DefH9-RI-iaaM* lebih cepat membentuk tunas daripada eksplan yang diinfeksi dengan gen *DefH9-iaaM*. Pada transformasi dengan gen *DefH9-iaaM*, eksplan membentuk nodul yang membelah diri terus menerus dan membentuk kalus yang akhirnya membentuk tunas, walaupun jumlah tunas yang diperoleh lebih sedikit. Hal ini disebabkan sel yang terus menerus membelah, sehingga daya regenerasinya menurun. Sel somatik yang terlalu lama diinkubasi pada media yang mengandung auksin dapat menurun daya regenerasinya.

Kemampuan eksplan beregenerasi setelah transformasi merupakan faktor yang sangat menentukan keberhasilan suatu transformasi. Oleh karena itu, optimasi regenerasi sangat penting dilakukan baik sebelum maupun setelah transformasi.

Beberapa tanaman transforman yang positif PCR dengan gen *DefH9-RI-iaaM* dapat membentuk buah di dalam botol. Setelah buah tersebut masak, ternyata buah tersebut tidak mempunyai biji. Hal ini membuktikan bahwa gen tersebut dapat terekspresi dengan baik.

Analisis Molekuler Tanaman Hasil Transformasi Genetik

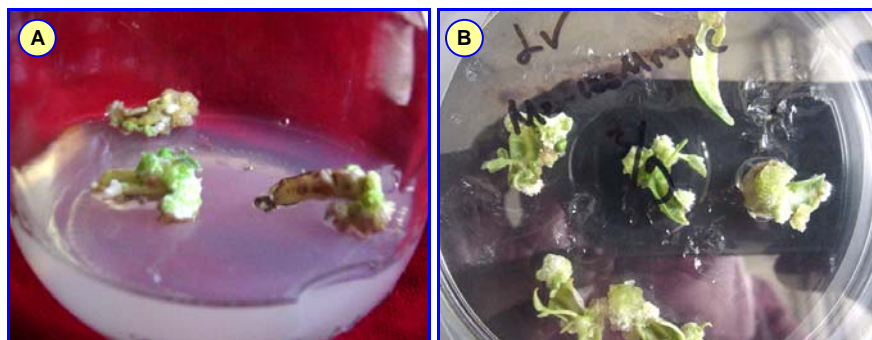
Jumlah tanaman yang diperoleh dari hasil transformasi dengan menggunakan 2 konstruksi gen untuk mendapatkan tanaman tomat transgenik ditampilkan pada Tabel 3.

Setelah dilakukan analisis PCR, dari 40 sampel tanaman yang diuji diperoleh 10 sampel tanaman tomat putatif transgenik dengan ukuran pita DNA 300 bp. Dari ke-10 tanaman tersebut, sembilan tanaman merupakan tanaman hasil transformasi dengan gen *DefH9-RI-iaaM*, yaitu lima tanaman berasal dari varietas Ratna, dua tanaman dari varietas Opal, dan dua tanaman dari

galur LV 6117, sedangkan satu tanaman berasal dari varietas Opal hasil transformasi dengan gen *DefH9-iaaM*.

Efisiensi regenerasi didefinisikan sebagai persentase eksplan yang menghasilkan paling sedikit satu planlet (Maftuchah 2003). Dalam penelitian ini efisiensi regenerasi dihitung berdasarkan jumlah tunas yang dihasilkan dibandingkan dengan jumlah total eksplan tahan di media seleksi. Efisiensi transformasi dihitung berdasarkan jumlah tanaman positif PCR dibandingkan dengan jumlah tunas resisten (Cortina dan Macia 2004, Lee *et al.* 2004). Penggunaan kedua konstruksi gen menghasilkan nilai efisiensi regenerasi yang hampir sama, yaitu 24,5% untuk tanaman hasil transformasi dengan gen *DefH9-iaaM* dan 26,3% untuk tanaman hasil transformasi dengan gen *DefH9-RI-iaaM* (Tabel 4 dan 5).

Tabel 4 dan 5 menunjukkan bahwa tidak semua eksplan yang diberi perlakuan inokulasi dapat bertahan hidup pada media seleksi serta dapat beregene-



Gambar 3. Perbedaan respon pertumbuhan tomat LV 6117 dengan menggunakan konstruksi gen yang berbeda (A) *DefH9-iaaM*, (B) *DefH9-RI-iaaM*.

Tabel 3. Jumlah tanaman positif PCR hasil transformasi genetik.

No. Konstruksi gen	Jumlah tanaman pada media seleksi			Jumlah tanaman positif PCR		
	Ratna	Opal	LV6117	Ratna	Opal	LV6117
1. <i>DefH9-iaaM</i>	2	4	2	0	1	0
2. <i>DefH9-RI-iaaM</i>	11	6	15	5	2	2

Tabel 4. Efisiensi regenerasi dari eksplan yang ditransformasi dengan *A. tumefaciens* menggunakan gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM*.

	<i>DefH9-iaaM</i>			<i>DefH9-RI-iaaM</i>		
	Ratna	Opal	LV6117	Ratna	Opal	LV6117
Jumlah eksplan diinfeksi	600	600	400	600	600	400
Eksplan lolos seleksi	119	127	122	222	377	131
Persentase eksplan lolos seleksi (%)	19,3	21,2	30,5	37	62,8	32,8
Jumlah eksplan beregenerasi	50	83	82	81	153	101
Jumlah tunas <i>in vitro</i>	32	11	47	44	74	78
Efisiensi regenerasi (%)	24,5			26,3		
Total efisiensi regenerasi (%)	25,4					

Tabel 5. Efisiensi transformasi dari dari eksplan yang ditransformasi dengan *A. tumefaciens* menggunakan gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM*.

	<i>DefH9-iaaM</i>			<i>DefH9-RI-iaaM</i>		
	Ratna	Opal	LV6117	Ratna	Opal	LV6117
Jumlah tanaman dewasa PCR+	2	4	2	11	6	15
Efisiensi transformasi (%)	12,5			28,1		
Total efisiensi transformasi (%)	20,3					

rasi membentuk tunas. Hal ini disebabkan karena proses transformasi tersebut mempengaruhi kemampuan regenerasi eksplan. Hasil penelitian Lee *et al.* (2004) menunjukkan bahwa dari 49 kalus yang dapat bertahan hidup pada media seleksi, hanya 11,5% yang dapat membentuk tunas.

Analisis PCR dari DNA 40 tanaman regeneran, diperoleh 10 tanaman positif PCR, sehingga nilai efisiensi transformasinya adalah 12,5% untuk tanaman yang ditransformasi dengan gen *DefH9-iaaM* dan 28,1% untuk tanaman yang ditransformasi dengan gen *DefH9-RI-iaaM*, dengan nilai total efisiensi transformasi 20,3%. Cortina dan Macia (2004) yang melakukan transformasi pada tanaman tomat memperoleh nilai total efisiensi transformasi 12,5%.

KESIMPULAN

Waktu inokulasi *A. tumefaciens* yang paling baik untuk transformasi gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM* pada kultivar tomat adalah 5 menit.

Respon ketiga kultivar tomat terhadap inokulasi *A. tumefaciens* dengan menggunakan plasmid *DefH9-RI-iaaM* lebih baik dibandingkan dengan *DefH9-iaaM*.

Kultivar tomat yang paling banyak menghasilkan regeneran adalah Opal, sedangkan yang paling banyak menghasilkan transforman adalah Ratna.

Sepuluh tanaman positif PCR diperoleh dari hasil transformasi. Satu tanaman (Opal) merupakan hasil transformasi dengan gen *DefH9-iaaM* dan sembilan tanaman (masing-masing lima kultivar Ratna, dua kultivar Opal dan dua galur LV 6117) merupakan hasil transformasi dengan gen *DefH9-RI-iaaM*. Pada percobaan ini diperoleh nilai efisiensi regenerasi sebesar 25,4% dan nilai efisiensi transformasi sebesar 20,3%

DAFTAR PUSTAKA

- Cortina, C. and Culianez-Macia FA. 2004.** Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 76:269-275.
- Dai, S., P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen, R.N. Beachy, and C. Fauquet. 2001.** Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation and particles bombardment. *Mol. Breed.* 7:25-33.
- Donzella, G., A. Spena, and G.L. Rotino. 2000.** Transgenic parthenocarpic eggplants: Superior germplasm for increased winter production. *Mol. Breed.* 6:79-86.
- Fos, M. and F. Nuez. 2000.** Expression of genes associated with natural parthenocarpy in tomato ovaries. *Plant Physiol.* 122:235-238.
- Ikedo, T., H. Yakushiji, M. Oda, A. Taji, and S. Imada. 1999.** Growth dependence of ovaries of fakultatively parthenocarpic eggplant *in vitro* on indole-3-acetic acid content. *Sci. Hort.* 79:143-150.
- Lee, Y.H. 2004.** A new selection method for pepper transformation : callus-mediated shoot formation. *Plant Cell Rep.* 23:50-58.
- Lowe, J.M., M. Herman, D. Mangi, J.H. Dodds, and M.A.W. Hinche. 1994.** The development of Sweet potato (*Ipomea batatas* (L.)) embryogenic cultures from a wide range of African and American genotypes and the use of *Agrobacterium tumefaciens* in the production of transgenic plant. (tidak dipublikasi). 13 hlm.
- Maftuchah. 2003.** Transformasi genetik padi indica dengan gen *cryIA(b)* dan *cryIB* melalui *Agrobacterium tumefaciens* untuk ketahanan terhadap hama penggerak batang. Disertasi Doktor, Institut Pertanian Bogor. 146 hlm.
- Mazzucato, A., A.R. Taddel, and G.P. Soressi. 1998.** The parthenocarpic fruit (*pat*) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development* 125:107-114.
- Mezzetti, B., L. Lundi, T. Pandolfini, and A. Spena. 2004.** The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnology* 4:4.

- Pandolfini, T., G.L. Rotino, S. Camerini, R. Defez, and A. Spena. 2002.** Optimisation of transgene action at the post transcriptional high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC. Biotechnology* 2:1.
- Rotino, G.L., E. Perri, M.Zottini, H. Sommer, and A. Spena. 1997.** Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat. Biotechnol.* 15:1398-1401.
- Siregar, E.B.M. 1999.** Transformasi genetika dan regenerasi tanaman cabai transgenik dengan bantuan *Agrobacterium*. Disertasi Doktor. Institut Pertanian Bogor. 176 hlm.
- Spena, A. and G.L. Rotino. 2001.** Parthenocarpy: State of the Art. *In* Bhojwani, S.S. and W.Y. Soh (*Eds.*). *Current Trends Embryol Angiosperms*. Kluwer Acad. Italia. p. 435-450.
- Tang, W. and R.J. Newton. 2003.** Genetic transformation of conifers and its application in forest biotechnology. *Plant Cell Rep.* 22:1-5.
- Vivian-Smith, A. and A.M. Koltunow. 1999.** Genetic analysis of growth regulator induced parthenocarpy in arabidopsis. *Plant Physiol.* 121:437-452.
- Wang, H., M. Qi, and A.J. Cutler. 1993.** A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic acid. Res.* 21(17): 4153-4154.
-