

Transformasi Gen Antisens ACC Oksidase pada Pepaya dengan Teknik Penembakan Partikel

Diani Damayanti¹, Sudarsono², Ika Mariska¹, dan M. Herman¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

²Jurusan Agronomi, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor

ABSTRACT

Transformation of ACC Oxidase Antisense Gene in Papaya using the Particle Bombardment Technique. Diani Damayanti, Sudarsono, Ika Mariska, and M. Herman.

Papaya (*Carica papaya* L.) is a climacteric fruit that exhibit a very fast ripening rate. Ethylene controls the ripening event in the papaya fruit. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase gene encodes a specific enzyme for ethylene biosynthesis. The gene had become a target for manipulation to make a gene construct of an antisense ACC oxidase to regenerate transgenic papaya that has a characteristic of delayed ripening. The objective of the experiment is to engineer transgenic papaya that has a delayed ripening characteristic by transforming papaya with the antisense ACC oxidase gene through particle bombardment technique. The immature embryos of papaya variety Burung were used for the explants. Antisense ACC oxidase and reporter (*gus*) genes were co-transformed to papaya calli. Four hundreds eighteen calli were bombarded by the antisense ACC oxidase gene. The transformation experiment resulted 25 putatives transgenic plants out of fifty plants acclimatized in a greenhouse. *Gus* gene expression assay observed at 9 days after bombardment showed that the papaya explants bombarded twice at 9 cm shoot distance had 53.3% transformation rate of *gus* positive and 5.25 blue spots number in average. The results of PCR analysis showed that four out of 25 transgenic putative papaya plants (TR6, TR9, TR20, dan TR24), indicated a positive PCR of the antisense ACC oxidase gene with the amplified fragment DNA size of 800 base pair.

Key words: Papaya, delayed fruit ripening, ACC oxidase antisense gene, transformation.

PENDAHULUAN

Salah satu masalah utama yang mempengaruhi produksi dan kualitas buah pepaya adalah cepatnya buah pepaya menjadi masak sehingga menyulitkan transportasi pada waktu pengiriman buah ke pasar domestik maupun internasional sebagai ekspor buah segar. Perakitan varietas unggul untuk mempertahankan kualitas buah dapat dilakukan dengan pendekatan bioteknologi atau rekayasa genetik melalui teknik kultur jaringan dan transformasi gen.

Teknik rekayasa genetik dapat digunakan sebagai mitra pelengkap teknik pemuliaan yang sudah mantap dan digunakan dengan sukses selama bertahun-tahun (Herman 1996). Produk rekayasa genetik yang berupa tanaman transgenik sudah banyak ditanam dan dipasarkan di berbagai negara (James 2003). Tanaman transgenik yang memiliki sifat baru seperti ketahanan terhadap hama, penyakit maupun meningkatkan kualitas sudah banyak ditanam dan dipasarkan di beberapa negara. Menurut hasil survei James (2004) sejak tahun 1996-2004 telah terjadi peningkatan lebih dari 47 kali lipat areal penanaman tanaman transgenik, yaitu 1,7 juta hektar pada tahun 1996 menjadi 81 juta hektar pada tahun 2004.

Beberapa metode transformasi telah digunakan untuk merakit tanaman transgenik, antara lain metode penembakan partikel dan *Agrobacterium tumefaciens*. Perbaikan sifat pada tanaman pepaya menggunakan teknik penembakan partikel telah banyak diteliti, antara lain toleran logam Al (Fuente *et al.* 1997) dan tahan penyakit virus (Fitch *et al.* 1992, McCandless 1997). Penelitian di Hawaii telah berhasil mendapatkan tanaman pepaya transgenik tahan penyakit *Papaya Ringspot Virus* (PRSV) melalui teknik *coat protein mediated resistance* yang ditransformasikan melalui penembakan partikel pada hipokotil galur 55-1 (Fitch *et al.* 1992) dan diberi nama Rainbow (Lius *et al.* 1997). Pepaya transgenik Rainbow memperlihatkan produksi dan ketahanan yang tinggi terhadap penyakit PRSV dan telah dilepas ke petani pada tahun 1998 (Gonsalves *et al.* 2004). Di Australia, pengujian pepaya transgenik di lapang untuk program pemuliaan tanaman telah menghasilkan galur yang tahan terhadap isolat lokal PRSV (Lines *et al.* 2002). Taiwan telah berhasil merakit tanaman pepaya transgenik dan memperlihatkan potensi hasil dan ketahanan yang tinggi terhadap penyakit PRSV (Bau *et al.* 2003).

Kloning cDNA untuk dibuat menjadi antisens ACC oksidase sebagai gen penunda pemasakan buah telah banyak dilakukan pada buah seperti pisang, mangga, pepaya, alpukat, melon, stroberi, dan belimbing (Balague *et al.* 1993, McGarvey *et al.* 1992). Mason dan Botella (1997) mengidentifikasi dan mengkarakterisasi cDNA *1-aminocyclopropane-1-carboxylate* (ACC)

syntase yang terekspresi selama pemasakan buah pepaya.

Penelitian mengenai tanaman transgenik pepaya dengan menggunakan gen antisens ACC oksidase untuk menunda pemasakan buah juga telah dilakukan di Malaysia menggunakan pepaya kultivar Eksotika (Abubakar *et al.* 2001). Introduksi gen antisens ACC oksidase dilakukan dengan penembakan partikel. Dari hasil analisis PCR telah dihasilkan tanaman transgenik pepaya yang positif mengandung gen antisens ACC oksidase yang diperlihatkan dengan adanya fragmen amplifikasi DNA berukuran 800 pb menggunakan primer *forward* 643A dan *reverse* 643B (Abubakar *et al.* 2001). Penelitian yang sama juga dilakukan di Thailand, dan menghasilkan pepaya transgenik positif mengandung gen antisens ACC oksidase, dan hasil pengujian gas kromatografi menunjukkan bahwa kandungan etilen pada buah pepaya transgenik lebih rendah daripada buah pepaya non transgenik (Burns *et al.* 2003).

Tujuan utama penelitian ini adalah untuk mengintroduksi gen antisens ACC oksidase pada tanaman pepaya. Di samping itu, penelitian ini bertujuan ingin mengetahui pengaruh jumlah tembakan, jenis media, konsentrasi antibiotik dalam menghasilkan planlet yang mengandung gen antisens ACC oksidase.

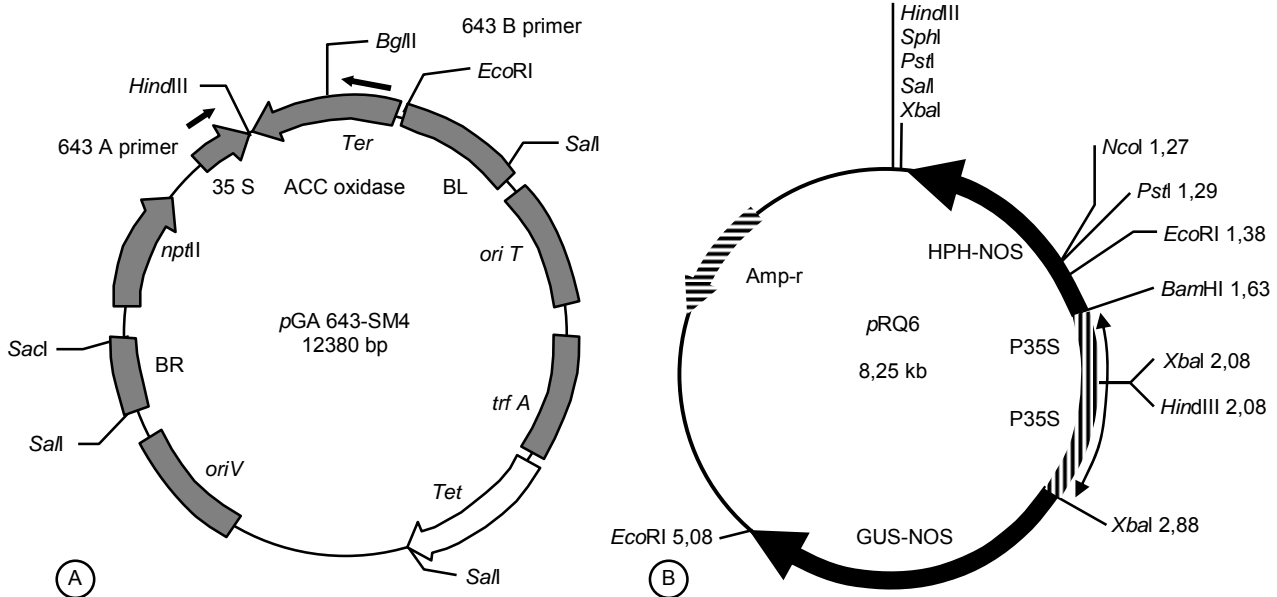
BAHAN DAN METODE

Transformasi tanaman pepaya dilakukan secara ko-transformasi dengan menggunakan DNA plasmid

pGA643-SM4 (mengandung gen antisens ACC oksidase yang dikendalikan oleh promotor 35S, terminator *nos* dan marka seleksi kanamisin) dan plasmid *pRQ6* (mengandung gen seleksi *hptII* dan gen pelapor *gus*) pada kalus pepaya umur 1 bulan. Peta konstruk *pGA643-SM4* dan *pRQ6* dapat dilihat pada Gambar 1.

Embrio zigotik muda diisolasi dengan membelah biji pepaya muda dalam *laminar air flow* dan ditanam pada media induksi kalus, yaitu media dasar MS + 2,4D 10 mg/l + sukrosa 6% + adenin sulfat 143 mg/l + myo inositol 50 mg/l + glutamin 400 mg/l. Pada setiap botol media ditanam 10 embrio zigotik muda. Kultur disimpan di tempat gelap. Kalus embriogenik yang terbentuk disubkultur setiap 2 minggu sebanyak 2 kali.

Kalus embriogenik berumur satu bulan diletakkan di tengah cawan petri yang mengandung media osmotikum (MS + vitamin B5 + manitol 45 g/l + sorbitol 45 g/l) selama 2 jam sebelum dan sesudah penembakan dan ditempatkan di ruang gelap. Penembakan mengikuti protokol dari *gene gun* (Biolistik PDS1000/He) dari Biorad. DNA plasmid *pGA643-SM4* dan *pRQ6* dengan perbandingan 4 : 1 (ko-transformasi) dilekatkan pada partikel emas diameter 1 µm dengan bantuan spermidin dan CaCl₂. Penembakan dilakukan dengan kondisi vakum sebesar 27 Hg, tekanan gas helium sebesar 1.100 psi, jarak tembak 9 cm, dan jumlah tembakan 1 dan 2 kali tiap perlakuan. Dua jam setelah penembakan, kalus dipindahkan ke media pemulihan sel (*recovery*), yaitu medium yang sama yang digunakan untuk induksi kalus tanpa antibiotik dan disimpan di ruang gelap selama 1 minggu.



Gambar 1. Peta plasmid pGA643-SM4 (A) dan plasmid pRQ6 (B).

Pengujian Ekspresi Gen Pelapor *Gus*

Pengujian ekspresi gen *gus* dilakukan berdasarkan metode Jefferson *et al.* (1987) dan pengamatan dilakukan pada kalus umur 3, 6, dan 9 hari setelah penembakan. Sejumlah 30 kalus dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* sesuai dengan masing-masing perlakuan dan ditambahkan larutan *X-gluc* (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucoronide*). Kalus diinkubasi pada temperatur 37°C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah kalus yang mengandung gen *gus* yang ditandai dengan bintik warna biru yang terbentuk pada kalus menggunakan mikroskop.

Regenerasi dan Seleksi Kalus Hasil Penembakan

Pada tahap penelitian ini dilakukan beberapa perlakuan untuk mengetahui media yang terbaik untuk regenerasi kalus yang telah ditembak. Di samping itu, digunakan beberapa variasi konsentrasi antibiotik untuk mengetahui konsentrasi yang terbaik. Media regenerasi yang digunakan diberi perlakuan dengan variasi beberapa vitamin, yaitu P1 (MS + GA₃ 0,5 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + B5 + tanpa vitamin MS), P2 (MS + GA₃ 0,5 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + vitamin MS), dan P3 (MS + GA₃ 0,5 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + vitamin Morel dan Wetmore). Konsentrasi antibiotik yang digunakan terdiri atas 50, 100, dan 150 mg/l. Setiap botol ditanami 5 kalus yang telah ditransformasi dan setiap perlakuan diulang sebanyak 20 kali. Konsentrasi antibiotik 0 mg/l digunakan sebagai kontrol pada kalus yang tidak ditembak. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah eksplan yang mampu membentuk kalus embriogenik dan kalus yang berwarna hijau, pada 4-5 bulan setelah tanam.

Kalus yang terseleksi ditumbuhkan pada kondisi terang dengan intensitas cahaya 800 lux per 16 jam dan temperatur 24°C. Kalus disubkultur setiap 1 bulan sampai kalus berkembang menjadi planlet. Planlet yang terbentuk kemudian dipindahkan ke media perakaran, yaitu media 1/2 MS + *paclobutrazol* 0,5 mg/l. Aklimatisasi planlet yang tumbuh normal dilakukan pada media campuran antara arang sekam dan kompos. Perubahan yang diamati adalah kemampuan membentuk kalus, kemampuan beregenerasi, kemampuan membentuk planlet, dan jumlah tanaman yang berhasil diaklimatisasi.

Analisis *Polymerase Chain Reaction*

Isolasi DNA dari daun pepaya muda, menggunakan metode CTAB yang dilakukan sesuai dengan prosedur dari Dellaporta *et al.* (1983). DNA digunakan untuk menganalisis molekuler tanaman transgenik de-

ngan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Dalam analisis PCR digunakan dua primer spesifik, yaitu *Forward* (643A) (5' ACT GAC GTA AGG GAT GA3') *Reverse* (643B) (5' TAC ATT GCC GTA GAT GA 3').

Reaksi PCR dilakukan dalam total volume 20 µl yang terdiri dari 2 µl 10x bufer PCR + MgCl₂ (Promega), 1 µl primer 643A (15 µM), 1 µl primer 643B (15 µM), 1 µl dNTPmix (10 mM), 0,2 µl Taq DNA *polymerase* (5 U/µl) (Boehringer Mannheim), 1 µl contoh DNA dan 13,8 µl ddH₂O. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan mesin PCR PTC-100 (MJ research, Inc.), dengan siklus suhu yang digunakan terdiri dari inkubasi awal pada 94°C selama 2 menit, pemisahan (*denaturasi*) pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan (*annealing*) pada suhu 52°C selama 1 menit dan pemanjangan primer (*extention*) pada suhu 72°C selama 1 menit, yang diulang sebanyak 25 kali, dilanjutkan dengan suhu 72°C selama 15 menit. Produk PCR dipisahkan pada gel agarose 1% dalam bufer 1x TAE. Elektroforesis dilakukan pada voltase 90 volt selama 45 menit. Pewarnaan gel agarosa dilakukan dalam larutan *ethidium bromide* selama 10 menit. *Destaining* menggunakan akuades selama 10 menit. Hasil separasi difoto dengan bantuan sinar UV untuk dokumentasi. Pada analisis PCR digunakan sebagai kontrol negatif, yaitu DNA sampel daun pepaya yang tidak ditransformasi dengan gen antisens ACC oksidase dan kontrol positif, yaitu plasmid vektor *pGA643-SM4*. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah jumlah tanaman yang mengandung gen antisens ACC oksidase berdasarkan keberadaan pita yang berukuran 800 pb.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Ekspresi Gen Pelapor *Gus*

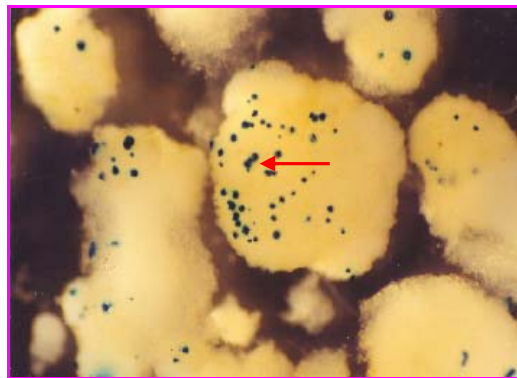
Gen *gus* merupakan penanda yang sangat bermanfaat dalam proses transformasi genetik tanaman karena relatif mudah. Pengujian gen pelapor *gus* ditandai dengan munculnya bintik berwarna biru. Warna biru yang muncul pada sel atau jaringan menunjukkan hasil transformasi positif. Warna biru disebabkan oleh reaksi substrat *X-gluc* (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide*) dengan enzim *-β glucuronidase* menjadi senyawa antara yang setelah melalui reaksi dimerisasi oksidatif membentuk senyawa dikloro-dibromoindigo (CIBr-indigo) yang berwarna biru (Stomp 1992). Salah satu kelemahan prosedur uji *gus* adalah bersifat destruktif sehingga sel yang memberikan hasil positif *gus* akan mati dan tidak dapat diregenerasikan lebih lanjut.

Ekspresi gen pelapor *gus* pada kalus pepaya diamati pada 3, 6, dan 9 hari setelah penembakan (HSP), dengan mengamati terbentuknya bintik biru pa-

da kalus setelah kalus direndam dalam larutan *X-gluc* (Gambar 2). Hasil uji ekspresi gen *gus* menunjukkan bahwa penembakan dua kali, pada jarak tembak 9 cm memberikan persentase paling tinggi terhadap jumlah kalus positif gen *gus* (53,3%) dan jumlah rerata bintik biru per kalus positif gen *gus* (5,25) pada hari ke-9 setelah penembakan (Tabel 1). Pengaruh jumlah tembakan terhadap jumlah kalus positif gen *gus* dan rerata bintik biru per kalus positif terlihat bahwa semakin banyak jumlah tembakan, semakin banyak kalus positif gen *gus* dan semakin banyak rerata bintik biru per kalus. Jumlah bintik biru pada kalus menunjukkan luas daerah yang tertransformasi. Meningkatnya jumlah rerata spot biru per kalus positif gen *gus* sesuai dengan meningkatnya hari pengamatan setelah penembakan. Hal ini disebabkan karena gen *gus* yang ditransformasikan telah terintegrasi di dalam sel dan dapat terpelihara baik selama proses mitosis. Jusuf (2001) menjelaskan proses mitosis, yaitu proses pembelahan sel atau pertumbuhan suatu jaringan, pada saat rangkaian proses G1-S-G2-M akan diulang berkali-kali. Sel baru yang dihasilkan dari suatu mitosis akan mempunyai struktur genetik yang sama dengan sel awal. Dengan demikian gen *gus* yang sudah terintegrasi dalam sel ketika terjadi proses pembelahan sel mitosis akan menghasilkan sel baru yang mempunyai struktur genetik yang identik dengan sel awal, yaitu mengandung gen *gus*.

Transformasi genetik melalui penembakan partikel dipengaruhi oleh faktor biologi (sel atau jaringan

target) dan faktor fisik (alat penembak) (Casas *et al.* 1995). Faktor fisik di antaranya adalah jarak tembak, jumlah tembakan, kombinasi berat dan ukuran partikel emas serta jumlah DNA per tembakan, tekanan gas helium dan temperatur ruang biolistik. Pada penelitian ini dilakukan penembakan dengan jarak tembak 9 cm. Hal ini disebabkan karena semakin jauh jarak tembak semakin luas/lebar penyebaran partikel emas yang dilapisi oleh DNA (*mikroprojektile*). Finer *et al.* (1992) melaporkan optimasi transformasi dengan penembakan partikel menggunakan gen *gus* menghasilkan ekspresi gen *gus* tertinggi, yaitu 1.890 bintik biru dihasilkan pada jarak tembak 17 cm. Evaluasi dari beberapa jarak tembak menunjukkan bahwa jarak tembak yang terlalu dekat dengan eksplan target akan menyebabkan banyak kematian eksplan target. Introduksi gen antisens ACC oksidase ke dalam genom tanaman pepaya melalui penembakan partikel menghasilkan tanaman transgenik yang masih rendah. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya kerusakan sel-sel yang dialami oleh jaringan eksplan ketika dilakukan penembakan oleh partikel emas yang digunakan untuk membawa plasmid. Partikel emas dibantu dengan tekanan dan kecepatan akan menembus dinding sel target dan masuk ke dalam sitoplasma sehingga menyebabkan kerusakan dan kematian eksplan. Akibatnya daya regenerasi sel menurun dan hanya dapat menghasilkan sedikit tanaman transgenik.



Tanda panah menunjukkan warna biru hasil ekspresi gen *gus*.

Gambar 2. Ekspresi gen pelapor *gus* pada kalus pepaya.

Tabel 1. Persentase gen *gus* positif pada kalus pepaya hasil transformasi menggunakan penembakan partikel dengan jarak tembak 9 cm pada 3, 6, dan 9 HSP.

Parameter	Jumlah kalus yang diuji	3 HSP		6 HSP		9 HSP	
		1 kali tembak	2 kali tembak	1 kali tembak	2 kali tembak	1 kali tembak	2 kali tembak
Kalus positif gen <i>gus</i>	30	2 (6,6%)	5 (16,6%)	4 (13,3%)	7 (23,3%)	10 (33,3%)	16 (53,3%)
Rerata bintik biru	30	1	2	2,5	3,3	4	5,25

HSP = hari setelah penembakan.

Regenerasi dan Seleksi Kalus Hasil Penembakan

Seleksi tanaman hasil transformasi merupakan tahapan penting dalam transformasi tanaman. Agen seleksi yang digunakan tergantung dari jenis *selectable marker gene* yang terdapat pada konstruksi gen yang dipakai. Kadar agen seleksi harus cukup untuk mendeteksi jaringan agar dapat memperkecil eksplan yang *escape* (terhindar) dari seleksi. Antibiotik kanamisin dapat digunakan untuk menyeleksi tanaman transgenik. Salah satu bentuk ketahanan eksplan terhadap kanamisin ditandai dengan tumbuhnya eksplan pada media seleksi kanamisin (Bhau dan Wakhlu 1994). Konstruksi plasmid *pGA643-SM4* mengandung marka seleksi *nptII*, yaitu gen ketahanan terhadap kanamisin. Tabel 2 menunjukkan bahwa konsentrasi kanamisin 50, 100, dan 150 mg/l mampu menghambat pertumbuhan kalus, yang terlihat dari penurunan jumlah kalus yang berwarna hijau. Pada konsentrasi kanamisin 150 mg/l, pembentukan kalus embriogenik hanya 1% dan kalus berwarna hijau tidak terbentuk sama. Seleksi kalus yang terbentuk terlihat berwarna coklat hingga hitam yang menunjukkan kalus tersebut terhambat pertumbuhannya dan menuju proses kematian.

Konsentrasi 150 mg/l terbukti dapat sepenuhnya menghambat regenerasi kalus atau dapat mematikan jaringan eksplan. Dengan demikian konsentrasi 150 mg/l akan digunakan untuk menyeleksi kalus hasil transformasi gen antisens ACC oksidase melalui penembakan partikel. Pada proses seleksi kalus hasil transformasi ini maka sel/jaringan yang mengandung gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin akan terus tumbuh beregenerasi menjadi tanaman lengkap, sedangkan sel/jaringan yang tidak tersisipi gen ketahanan tersebut akan, terhambat pertumbuhannya, tidak dapat berkembang lebih lanjut dan mati.

Media regenerasi P3 (MS + GA₃ 0,5 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + vitamin Morel dan Wetmore) merupakan media regenerasi yang terbaik, jika dibandingkan dengan media regenerasi P1 dan P2 (Tabel 2), terlihat pada kontrol (kalus tidak ditransformasi) tanpa antibiotik kanamisin. Pada media P3, kalus berumur 5 bulan setelah tanam dapat beregenerasi membentuk ka-

lus embriogenik 60% dan membentuk kalus berwarna hijau sekitar 40%. Selanjutnya, media regenerasi P3 akan digunakan untuk menyeleksi tanaman transgenik agar kalus dapat tumbuh lebih lanjut menjadi tanaman transgenik.

Keberhasilan introduksi gen ke tanaman ditandai dengan rangkaian gen yang dintroduksikan dapat disisipkan ke dalam genom tanaman, diekspresikan dan tetap terpelihara dalam seluruh proses pembelahan sel berikutnya setelah melalui proses seleksi antibiotik. Pada tahap akhir, sel atau jaringan yang ditransformasi harus dapat diregenerasikan menjadi suatu tanaman. Tabel 3 menyajikan data hasil regenerasi dan seleksi seluruh eksplan hasil transformasi melalui penembakan partikel. Jumlah kalus yang bertahan hidup atau tumbuh pada media seleksi berkurang dari jumlah eksplan awal. Dari 418 kalus embriogenik yang ditembak, menghasilkan efisiensi transformasi 32% lolos seleksi dan selanjutnya menghasilkan 473 planlet yang berwarna hijau. Dari 473 kalus tersebut, 50 planlet yang diaklimatisasi menghasilkan 25 tanaman pepaya putatif transgenik.

Proses regenerasi tanaman sangat berperan penting dalam kegiatan transformasi genetik. Oleh karena itu, optimasi sistem regenerasi tanaman secara kultur *in vitro* sangat diperlukan. Sistem regenerasi tanaman dapat digunakan untuk mendukung transformasi genetika menggunakan gen antisens ACC oksidase untuk menunda pemasakan buah pepaya melalui penembakan partikel, sehingga dapat meningkatkan kemungkinan didapatkannya tanaman transgenik pepaya.

Daya regenerasi perlakuan kontrol (non transformasi) yang dikulturkan pada media regenerasi tanpa agen seleksi kanamisin mampu membentuk kalus embriogenik 2 kali lipat dibandingkan dengan eksplan yang ditransformasi yang dikulturkan pada media regenerasi mengandung agen seleksi kanamisin (Tabel 3). Proses transformasi dengan penembakan partikel bersifat random sehingga ada kemungkinan jaringan tersebut tidak ikut ditransformasi dan tidak mempunyai ketahanan dalam media seleksi antibiotik. Selain itu rendahnya efisiensi regenerasi dari eksplan hasil transformasi menggunakan penembakan partikel ke-

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi kanamisin terhadap persentase kalus beregenerasi dan berwarna hijau.

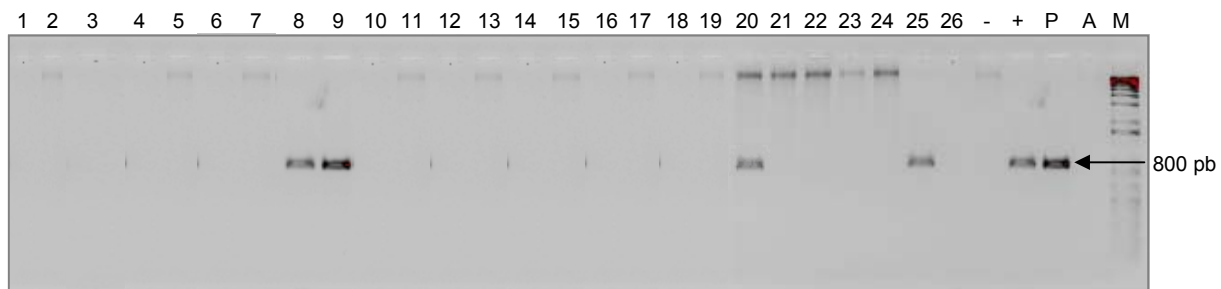
Kanamisin (mg/l)	0*				50				100				150			
	4 BST		5 BST		4 BST		5 BST		4 BST		5 BST		4 BST		5 BST	
Media seleksi	KR (%)	KH (%)	KR (%)	KH (%)	KR (%)	KH (%)	KR (%)	KH (%)	KR (%)	KH (%)	KR (%)	KH (%)	KR (%)	KH (%)	KR (%)	KH (%)
P1	20	14	25	20	2	1	2	1	1	0	1	0	1	0	1	0
P2	36	17	30	27	2	3	2	2	2	1	2	1	1	0	1	0
P3	4	20	60	40	4	5	4	2	2	1	2	1	1	0	1	0

* Kontrol (kalus tidak ditransformasi), BST = bulan setelah tanam, P1 = MS + GA₃ 0,5 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + B5 + tanpa vitamin MS, P2 = MS + GA₃ 0,5 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + vitamin MS, P3 = MS + GA₃ 0,5 mg/l + kinetin 0,1 mg/l + vitamin Morel dan Wetmore, KR = kalus beregenerasi, KH = kalus berwarna hijau. Eksplan awal 100 kalus.

Tabel 3. Daya regenerasi kalus hasil transformasi dengan penembakan partikel pada media seleksi.

Perlakuan	Jumlah kalus	Persentase kalus beregenerasi (%)	Jumlah somatik embrio	Jumlah planlet yang terbentuk	Tanaman hidup setelah aklimatisasi	
					Jumlah	Tanaman hidup (%)
Ditransformasi	418	32	220	473	50	50
Tidak ditransformasi *	100	63	60	189	20	65

* Kalus tidak ditembak dan dikulturkan pada media regenerasi tanpa antibiotik kanamisin.



Gambar 3. Hasil PCR 25 tanaman pepaya putatif transgenik. Kolom 1-25 = transgenik, - = non transgenik, + = kontrol positif (tanaman transgenik), P = plasmid pGA643-SM4, A = air, M = 1 Kb ladder.

mungkinan disebabkan oleh adanya kerusakan dinding sel eksplan akibat tembakan partikel emas (mikroprojektil). Untuk mempercepat proses penyembuhan luka akibat tembakan pada eksplan hasil transformasi biasanya eksplan dipindahkan ke media pemulihan (*recovery*) yang berisi media dasar atau media regenerasi tanpa agen seleksi.

Penyebab lain rendahnya daya regenerasi eksplan hasil transformasi adalah senyawa atau agen seleksi (antibiotik) pada media regenerasi. Sel yang tidak mengandung gen ketahanan terhadap antibiotik akan terseleksi dan mati, sebaliknya sel-sel eksplan yang tertransformasi gen ketahanan terhadap antibiotik akan lolos seleksi dan tumbuh terus membentuk struktur embrio somatik.

Transformasi gen antisens ACC oksidase melalui penembakan partikel telah dilaporkan pada pepaya Dampit dan menghasilkan efisiensi transformasi 16% (14/25) planlet yang mampu bertahan pada media seleksi kanamisin (Makful *et al.* 2004).

Analisis Polymerase Chain Reaction

Konfirmasi integrasi gen antisens ACC oksidase pada tanaman pepaya hasil transformasi dilakukan dengan analisis PCR. Analisis PCR merupakan metode deteksi molekuler yang dapat mengamplifikasi fragmen DNA secara *in vitro*, cepat dan memiliki sensitivitas yang tinggi, dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan transgen di dalam jaringan tanaman putatif transgenik. Analisis PCR menggunakan sepasang primer spesifik 643A dan 643B, untuk mengamplifikasi daerah spesifik dari gen antisens ACC oksidase dan

fragmen yang dihasilkan dari amplifikasi gen tersebut akan mempunyai ukuran 800 pb. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 25 tanaman pepaya putatif transgenik, diperoleh 4 putatif transgenik (kolom 8, 9, 20, dan 25) yang positif mengandung gen antisens ACC oksidase yang ditandai terbentuknya pita DNA berukuran 800 pb (Gambar 3).

KESIMPULAN

1. Jarak tembak 9 cm dan 2 kali penembakan menghasilkan efisiensi transformasi 53,3% kalus positif gen *gus* dengan 5,25 rerata bercak biru pada 9 hari setelah penembakan.
2. Konsentrasi kanamisin 150 mg/l dapat menghambat sepenuhnya regenerasi kalus pepaya atau mematikan jaringan eksplan.
3. Analisis PCR dari 25 tanaman pepaya lolos seleksi dan aklimatisasi dihasilkan 4 tanaman yang positif mengandung gen antisens ACC oksidase dengan ukuran 800 bp.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, U.K., V. Pillai, P. Muda, LP. Fatt, C.Y. Kwok, and H.M. Daud. 2001. Molecular and biochemical characterizations of eskotika papaya plants transformed with antisense ACC oksidase gene. Papaya Biotechnology Network of SEAsia Coordination Meeting, Hanoi, Vietnam. 24-26 October 2001.
- Balague, C., C.F. Watson, A.J. Turner, P. Ruege, S. Picton, J.C. Pech, and D. Gierson. 1993. Isolation of ripening and wound induced cDNA from *Cucumis melon*

- L., encoding a protein with homology to the ethylene-forming-enzyme. *European Journal of Biochemistry* 212:27-34.
- Bhau, B.S. and A.K. Wakhlu. 1994.** Effect of some antibiotic on the *in vitro* morphogenetic response from callus cultures of *Coryphanta elephantides*. *Biologia Pantarum* 44(1):19-24.
- Bau, H.J., Y.H. Cheng, T.A. Yu, J.S. Yang, and S.D. Yeh. 2003.** Broad-spectrum resistant to different geographic strain of Papaya ringspot virus in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology* 93:112-120.
- Burns, P., O. Kumdee, and S. Bandee. 2003.** Progress report of papaya delayed ripening project in Thailand 2003. Papaya Biotechnology Network of SEAsia Coordination Meeting, Bangkok, Thailand. 15-16 December 2003.
- Casas, A.M., R.A. Bressan, and P.M. Hasegawa. 1995.** Cereal transformation through particle bombardment. *Plant Breed. Rev.* 13:231-260.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983.** A plant DNA miniprep preparation version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Droste, A., P.G. Carlo, and B.Z.M. Helena. 2000.** Integrated bombardment and *Agrobacterium tumefaciens* transformation system: An alternative method for soybean transformation. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18:51-59.
- Finer, J.J., P. Vain, M.W. Jones, and M.D. McMullen. 1992.** Development of particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep.* 11:323-328.
- Fitch, M.M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, J.L. Slightom, and J.C. Sanford. 1992.** Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/Technol.* 10:1466-1472.
- Fuente, J.M., V. Ramirez-Rodriguez, J.L. Cabrera-Ponce, and L. Herrera-Estrella. 1997.** Aluminium tolerance in transgenic plant by alteration of citrate synthesis. *Science* 276:5318.
- Gonsalves, D., C. Gonsalves, S. Ferreira, R. Manshardt, M. Fitch, and J. Slightom. 2004.** Transgenic virus resistant papaya: From hope to reality for controlling papaya ringspot virus in Hawaii. Online. APSnet Feature, American Phytopathological Society.
- Herman, M. 1996.** Rekayasa genetik untuk perbaikan tanaman. *Buletin Agrobio* 1(1):24-34.
- James, C. 2003.** Global review of commercialization transgenic crops: 2003. ISAAA Brief No. 33. ISAAA. Ithaca. New York.
- James, C. 2004.** Global review of commercialization transgenic crops: 2003. ISAAA Brief No. 32. ISAAA. Ithaca. New York.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanag, and M.V. Bevan. 1987.** Gus fusion: Glucuronidase as a versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Jusuf, M. 2001.** Genetika I. Struktur dan Ekspresi Gen. Sagung Seto. 300 hlm.
- Lines, R.E., D. Pesley, J.L. Dale, R. Drew, and M.F. Bateson. 2002.** Genetically engineered immunity to papaya ringspot virus in Australian papaya cultivars. *Mol. Breed.* 10:119-129.
- Lius, S., R.M. Manshardt, M.M.M. Fitch, J.C. Slightom, and D. Gonsalves. 1997.** Pathogen-derived resistant provides papaya with effective protection against papaya ringspot virus. *Mol. Breed.* 3:161-168.
- Makful, S. Purnomo, Sunyoto, R. Iswanto, dan T.I.R. Utami. 2004.** Transformasi cDNA gen 1-aminosiklopropan-1-asam karboksilat oksidase untuk penundaan kematangan pada pepaya Dampit dan Sari Rona. *Jurnal Hortikultura* 14(2):76-83.
- Mason, M.G. and J.R. Botella. 1997.** Identification and characterization of two *1-aminocyclopropane-1-carboxylate* (ACC) synthase cDNA expressed during papaya (*Carioca papaya*) fruit ripening. *Plant Physiol.* 24:239-244.
- McCandless, L. 1997.** Genetic engineering performs miracles with plant. *Cornell Focus* 6(1):20-24.
- McGarvey, D.J., R. Sirevag, and R.E. Christoffersen. 1992.** Ripening related gene from avocado fruit. Ethylene inducible expression of the mRNA and polypeptide. *Plant Physiol.* 98:554-559.
- Stomp, A.M. 1992.** Histochemical localization of β -glucuronidase. In Gallagher, S.R. (Ed.). GUS Protocols: Using the GUS gene as a reporter of a gene expression. Academic press. Inc. London. p. 103-113.
-