

# Transformasi cDNA Gen 1-Aminociklopropan-1-Asam Karboksilat Oksidase untuk Penundaan Kematangan Buah Pepaya Dampit dan Sarirona

Makful<sup>1)</sup>, S. Purnomo<sup>1)</sup>, Sunyoto<sup>1)</sup>, R. Iswanto<sup>2)</sup>, dan T. I. R. Utami<sup>3)</sup>

1) Balai Penelitian Tanaman Buah, Jl. Raya Solok-Aripan Km.8 Solok, Sumatera Barat 27301

2) Universitas Jenderal Soedirman, Jl. Dr. Soeparno, Karangwungkal, Purwokerto 53123

3) Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar No. 3 Bogor

Naskah diterima tanggal 29 September 2003 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 16 Januari 2004

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Januari 2002 sampai Februari 2003, bertujuan untuk mendapatkan kalus transforman gen 1-aminociklopropan-1-asam karboksilat oksidase yang mampu hidup dan dapat berdiferensiasi, wahana untuk membuat pepaya transgenik tahan simpan, telah dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor. Mutu buah pepaya salah satunya ditentukan oleh kesegaran buah saat dikonsumsi. Proses pemasakan buah pepaya berlangsung sangat cepat, hal ini menyulitkan dalam transportasi pepaya, terutama untuk menjangkau tempat yang jauh. Proses pemasakan buah dikontrol oleh meningkatnya konsentrasi hormon etilen yang disintesis dari 1-aminociklopropan-1-asam karboksilat. Produksi etilen dapat ditekan dengan memblok jalur biosintesis etilen. Mekanismenya adalah membuat *antisens* gen regulator biosintesis etilen. Transformasi pepaya varietas dampit dan sarirona dilakukan menggunakan bombardemen partikel. Rancangan percobaan adalah deskriptif kuantitatif dengan rancangan acak lengkap. Sumber eksplan pepaya berupa embrio zigotik yang digunakan untuk optimasi taraf kematian terhadap kanamisin, uji *gus* menggunakan plasmid pRQ6 (gen *gus*, *NPH*, promotor 35S, dan terminator NOS) dan introduksi gen interes dalam plasmid pGA643 SM4 (gen *antisens* 1-aminociklopropan-1-asam karboksilat oksidase, *NPT II*, promotor 35S, dan terminator NOS) pada media seleksi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua eksplan pepaya optimal pada kanamisin 150 mg/l, di mana pada konsentrasi ini eksplan mati seluruhnya. Pengujian *gus* terbanyak pada varietas sarirona 25% (25 spot biru) jarak 9 cm, sedangkan varietas dampit 10% (9 spot biru) jarak 5 cm. Spot biru menandakan gen yang disisipi telah terintegrasi pada gen tanaman. Efisiensi gen *antisens ACC* oksidase pada media seleksi kanamisin 150 mg/l menunjukkan 16% (14 embrio kotiledon) pada varietas dampit, sedangkan varietas sarirona tidak tumbuh. Tumbuhnya transforman pada media seleksi menunjukkan eksplan tersebut sudah tersisipi pGA643 SM4 yang mengandung gen tahan terhadap kanamisin (gen *NPT II*).

Kata kunci: *Carica papaya*; 1-aminociklopropan-1-asam karboksilat oksidase; Transformasi gen; Penundaan kematangan

**ABSTRACT.** Makful, S. Purnomo, Sunyoto, R. Iswanto, and T. I. R. Utami. 2004. Transformation of cDNA ACC oxidase gene for delay ripening on papaya dampit and sarirona. This research was conducted from January 2002 to February 2003. The aim of this research was to find out transformed callus by aminocyclopropane carboxylic acid (ACC) oxidase gene, there are viable and be able to differentiation, the means to develop papaya transgenic for delay ripening. The research was conducted at the Laboratory of Molecular Biology of Research Institute for Biotechnology and Agricultural Genetic Resources, Bogor. One of papaya quality was determined by fruit freshness. The process of papaya maturity was very fast. This problem made difficult for happened papaya transportation. The process of maturity was controlled by increasing concentration of ethylene hormone and it was synthesized from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. One of effort pressed ethylene production was long distance blocking ethylene biosynthesis pathway. Mechanism of blocking ethylene biosynthesis pathway was made antisens of gene regulator. The transformation of papaya dampit and sarirona variety have been derived by bombardment particle. The experimental design was descriptive quantitative with randomized complete design. The zygotic embryo as explant source were used for optimizing kanamycin levels, *gus* assay with pRQ6 plasmid (*gus* gene, *NPH*, 35S promoter, and NOS terminator) and introduction interest gene with pGA643 SM4 plasmid (*antisens ACC* oxidase gene, *NPT II*, 35S promoter, NOS terminator) on the selective medium. The results indicated the optimizing of both papaya on 150 mg/l kanamycin. This concentration made all explant of results. *Gus* assay preference of sarirona 25% (25 blue spot) in distance 9 cm and dampit 10% (9 blue spot) in distance 5 cm. Efficiency of *antisens ACC* oxidase gene on selective medium containing 150 mg/l kanamycin indicated 16% (14 cotyledone embryo) in dampit but in sarirona was not growth. Transforman growth on selective medium indicated pGA643 SM4 have inserted to zygotic embryo because plasmid containing selection gene of kanamycin (*NPT II* gene).

Keywords: *Carica papaya*; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase; Gene transfer; Ripening retardation

Proses pemasakan pepaya berlangsung sangat cepat (Damayanti & Sofiari 2000; Hoang *et al.* 2000). Panen pepaya umumnya dilakukan

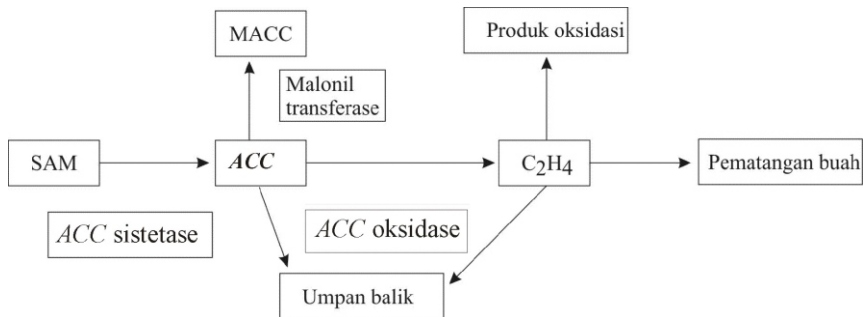
ketika 25% dari buah yang ada sudah berwarna kuning dan 5 hari setelah panen buah pepaya akan matang dalam penyimpanan. Hal ini akan

menyulitkan transportasi buah pepaya, terutama untuk diekspor.

Proses pemasakan buah dikontrol oleh peningkatan konsentrasi hormon etilen (Penarrubia *et al.* 1992) dan disintesis dari 1-aminosiklopropan-1-asam karboksilat (*ACC*) (Klee *et al.* 1991). Senyawa *ACC* diketahui hanya terlibat dalam jalur sintesis etilen (Klee *et al.* 1991). Salah satu usaha untuk menekan produksi etilen adalah dengan memblokir jalur biosintesis etilen dengan cara membuat *antisens* gen regulator biosintesis etilen.

Pemblokiran jalur biosintesis etilen dimungkinkan melalui teknik *antisens* gen yang memproduksi hormon etilen. Pemblokiran jalur biosintesis etilen secara nyata dapat memperpanjang proses pemasakan pada buah-buahan klimakterik, contoh pada tomat, umur simpannya menjadi  $\pm$  6 minggu (Klee *et al.* 1991). Teknik *antisens* terbukti efektif menurunkan produk biosintesis, melalui mekanisme pemblokiran mRNA gen regulator biosintesis target (Kramer *et al.* 1990; Schuch 1991; Bakar *et al.* 2000).

Jalur sintesis dan metabolisme etilen (Penarrubia *et al.* 1992), adalah sebagai berikut.



**Bagan jalur sintesis dan metabolisme etilen (Flowchart of ethylene synthesize and metabolism )**

SAM : S-adenosilmetionin, *ACC*: 1-aminosiklopropan-1-asam karboksilat, *MACC*: Malonil *ACC*;  $C_2H_4$ , etilen.

Enzim kunci dalam proses biosintesis etilen adalah 1-aminosiklopropan-1-asam karboksilat sintetase (*ACC* sintetase) dan (*ACC* oksidase). 1-aminosiklopropan-1-asam karboksilat oksidase mengkatalisis oksidasi terakhir dari *ACC* menjadi etilen (Penarrubia *et al.* 1992; Hoang *et al.* 2000; Perez 2000). Etilen meregulasi jalur biosintesisnya sendiri dan pada proses pemasakan umpan baliknya positif (Penarrubia *et al.* 1992).

Penelitian bertujuan untuk mendapatkan kalus transforman gen *ACC* oksidase yang *viable* dan dapat berdiferensiasi, sebagai wahana untuk membuat tanaman pepaya transgenik tahan simpan.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian Bogor, dari bulan Januari 2002 sampai Februari 2003. Pada penelitian ini digunakan metode deskriptif kuantitatif dengan rancangan acak lengkap. Deskriptif kuantitatif digunakan untuk mencari perlakuan terbaik (Mize & Chun 1988). Penelitian ini terdiri dari tiga tahap percobaan.

**Percobaan pertama.** Optimasi antibiotik kanamisin pada eksplan pratransformasi. Eksplan pepaya yang digunakan adalah embrio varietas dampit dan sarirona. Eksplan disterilisasi menggunakan alkohol 70% selama 10 menit, klorox 20% selama 10 menit, dan dicuci tiga kali dengan akuades steril. Bakal buah yang mengandung embrio dikupas hingga tinggal bagian embrionya. Embrio diambil satu

persatu dengan pinset dan dikulturkan. Kultur diletakkan dalam ruangan gelap selama satu minggu kemudian dipindah ke ruangan bercahaya. Eksplan embrio somatik yang tumbuh dipindahkan ke media seleksi yang mengandung kanamisin 0, 50, 100, 150, dan 200 mg/ml, tiap perlakuan sebanyak 20 eksplan. Pengamatan dilakukan pada jumlah eksplan embrio somatik yang mati setelah 1 bulan masa kultur. Hal ini dilakukan untuk menentukan taraf kematian eksplan tertinggi pada konsentrasi kanamisin terendah.

Sebelum dilakukan penembakan, eksplan embrio somatik diinduksi ke media osmotikum (mannitol & sorbitol). Eksplan dikultur 2 jam pada media osmotikum sebelum dan sesudah penembakan. Kemudian eksplan dipindah ke media induksi kalus, yang terdiri dari media MS (Murashige & Skoog) 0,5 ppm 2,4D, 1 ppm BAP, 160 mg/l AdS (adenin hemisulfat), 30 g/l sukrosa, dan 3% fitagel (Sunnyoto *et al.* 2002). Pembuatan media seleksi dengan menambahkan kanamisin pada media induksi kalus.

**Percobaan kedua.** Optimasi jarak tembak transformasi gen *gus* pada eksplan pepaya. Perlakuan jarak tembak yang digunakan 5, 7, dan 9 cm, tiap perlakuan sebanyak 20 eksplan. Perlakuan terbaik akan digunakan pada tahap selanjutnya. Eksplan ditransformasi menggunakan partikel bombardemen biorad PSD 1000-He. Partikel emas diameter 1,6  $\mu$ m digunakan sebagai mikroproyektil. Pembuatan mikroproyektil mengikuti prosedur standar Sanford *et al.* (1993) yang dimodifikasi dengan isopropanol selama penyiapan mikrokarier dan pelapisan DNA (Sawant *et al.* 2000). Penyiapan mikroproyektil, menambahkan suspensi emas dengan 5  $\mu$ l plasmid DNA, 50  $\mu$ l 12,5 M  $\text{CaCl}_2$ , 20  $\mu$ l 10,1 M spermidin. Jarak target eksplan dari unit filter yang mengandung partikel emas berlapis DNA adalah 5, 7, dan 9 cm. Penembakan dilakukan pada vakum 27 mm Hg dan tekanan 1.100 Psi.

**Percobaan ketiga.** Respons embrio terhadap perlakuan penyisipan gen *antisens ACC* oksidase. Eksplan embrio somatik ditembak dengan mikroproyektil pada jarak yang terbaik hasil percobaan tahap kedua. Seleksi dilakukan pada kadar antibiotik kanamisin yang diperoleh pada percobaan tahap pertama. Tahap ini untuk melihat efektivitas transformasi. Transformasi dilakukan secara bersama-sama antara gen reporter (pRQ6) dan gen target (pGA643 SM4). Pengujian *gus* dilakukan pada eksplan transforman setelah penembakan dengan gen *gus* (pRQ6). Transforman diinkubasi pada larutan 5-bromo-4-kloro-3-indolil -D-glukuronidase (*X-glu*c) sepanjang malam pada 37°C. Ekspresi transien diuji 2 hari setelah penembakan berdasarkan kenampakan spot biru pada transforman. Seleksi dilakukan pada transforman setelah penembakan dengan gen *antisens ACC* oksidase (pGA643 SM4). Pemindahan transforman ke media seleksi dikerjakan setelah

2 hari di media induksi kalus. Pengamatan dilakukan pada eksplan transforman selama 1 bulan.

Peubah yang diamati meliputi :

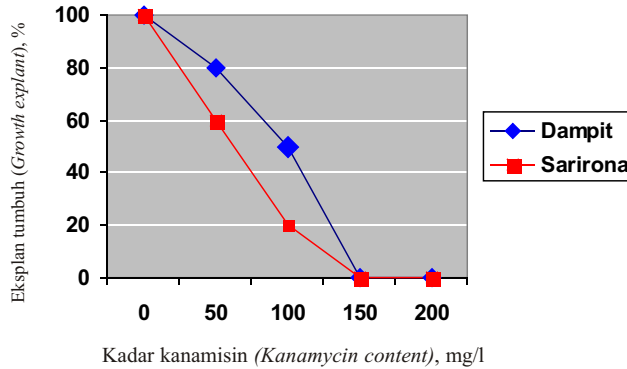
- (1) Jumlah respons kalus pada media seleksi pratransformasi. Jumlah eksplan yang tumbuh pratransformasi pada media seleksi dihitung tiap cawan petri. Hal ini, menunjukkan optimasi taraf kematian pada media seleksi.
- (2) Spot biru *transien gus*. Spot biru merupakan indikator terjadinya integrasi gen target pada sel eksplan. Transforman diamati di bawah mikroskop dan dihitung banyaknya spot biru yang ada pada tiap kalus transforman.
- (3) Jumlah embrio transforman pada media seleksi. Jumlah eksplan transforman yang tumbuh pada media seleksi menunjukkan efektivitas transformasi. Jumlah eksplan transforman yang tumbuh pasca-transformasi dihitung dan dibandingkan dengan eksplan yang tidak tumbuh/mati.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Optimasi kadar antibiotik kanamisin

Hasil pengujian menunjukkan bahwa pertumbuhan eksplan dari kedua varietas pada perlakuan kontrol (tanpa kanamisin) tumbuh normal (Gambar 1). Pada perlakuan kanamisin 50 dan 100 mg/l, pertumbuhan eksplan terhambat (Gambar 2B dan 2C), sedangkan pada perlakuan kanamisin 150 dan 200 mg/l eksplan tidak tumbuh (Gambar 2D dan 2E), warna eksplan berubah menjadi putih dan kekuningan (Gambar 2D). Penambahan kanamisin pada media MS menyebabkan penghambatan pertumbuhan eksplan.

Hasil pengamatan visual terhadap pertumbuhan eksplan menunjukkan bahwa varietas dampit relatif lebih tahan terhadap perlakuan kadar kanamisin daripada varietas sarirona. Persentase tumbuh eksplan masih tinggi pada 50 mg/l kanamisin. Gambar 2C menunjukkan bahwa walaupun ukuran eksplan dampit dan sarirona pada perlakuan kanamisin 100 mg/l relatif sama, tetapi warna eksplan sarirona berubah menjadi putih dan kekuningan. Bhau & Wakhlu (2001) mengatakan bahwa kanamisin dalam medium seleksi dapat menghalangi hijaunya kloroplas kalus, bahkan



**Gambar 1.** Grafik pertumbuhan eksplan embrio zigotik pepaya menurut kadar kanamisin dalam media MS (*Graphic of explant growth of papaya zygotic embryo according to kanamycin concentration in MS media*).

dapat meningkatkan pigmen antosianin yang terkandung dalam kalus. Walaupun demikian kandungan kanamisin 100 mg/l belum dapat mematikan seluruh eksplan.

Nasir (2002) menjelaskan bahwa untuk seleksi transformasi harus menggunakan kadar antibiotik terendah yang menghasilkan tekanan seleksi optimal. Berdasarkan hal tersebut maka optimasi taraf kematian kalus varietas dampit dan sarirona terjadi pada perlakuan kadar kanamisin 150 mg/l. Kadar antibiotika tersebut sudah menyebabkan eksplan mati seluruhnya (Gambar 2D). Pada kadar yang sama telah digunakan sebelumnya pada transformasi pepaya oleh Fitch *et al.* (1990) dan Mahon *et al.* (1996). Kesamaan kadar optimasi disebabkan beberapa varietas eksplan pepaya mempunyai kepekaan yang sama terhadap kanamisin.

#### Aktivitas antibiotik kanamisin pada eksplan

Kanamisin termasuk anggota antibiotik dari famili aminoglikosida (Wae 2001). Antibiotik ini

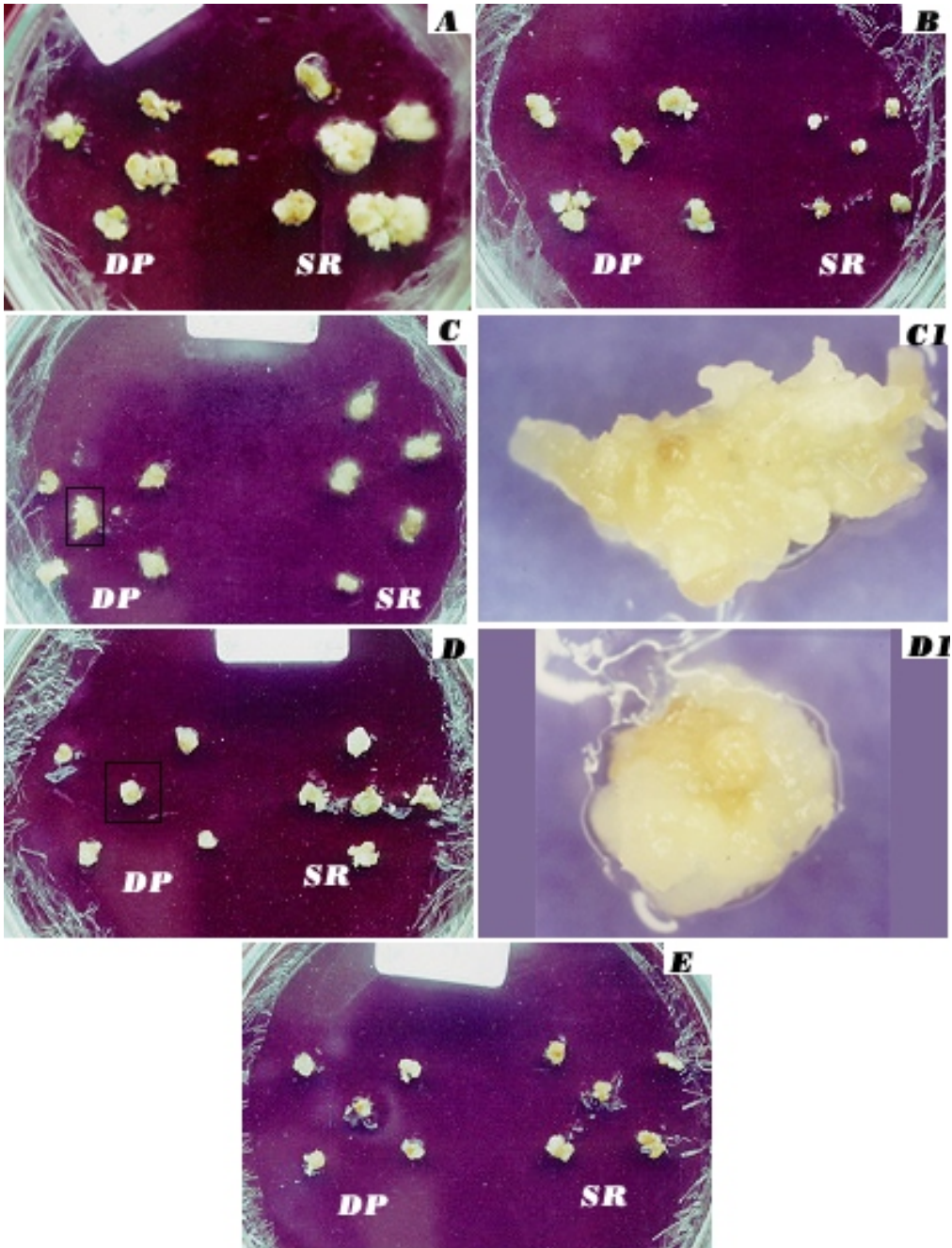
merupakan agensia seleksi yang bersifat toksik bagi tanaman. Akibatnya nampak bahwa induksi embrio pada media yang mengandung kanamisin mengalami hambatan pertumbuhan (Gambar 2).

Sifat toksik kanamisin berawal dengan cara mengganggu fungsi ribosom (Bhau & Wakhlu 2001). Interaksi kanamisin dengan ribosom bersifat spesifik, yaitu di tempat pelekatan guanosin. Akibatnya, rRNA mengalami adaptasi karena adanya tekanan dari antibiotik kanamisin. Gangguan pada guanosin berpengaruh pada pengenalan kodon-antikodon (Ahsen *et al.* 1991). Peristiwa ini menyebabkan kesalahan translasi dan mengganggu sintesis protein.

Keracunan kanamisin terjadi jika eksplan diinkubasi pada konsentrasi kanamisin yang tinggi dan dalam waktu yang lama. Setiap varietas memungkinkan berbeda kadar ketahanannya tergantung kepekaannya secara genetik. Berdasarkan hasil pengamatan, kanamisin dapat digunakan untuk menyeleksi tanaman transgenik (Bhau & Wakhlu 2001).

**Tabel 1.** Ekspresi *gus* pada eksplan embrio zigot pepaya menggunakan plasmid pRQ6 (*Gus expression in explant of papaya zygotic embryo with pRQ6 plasmid*)

Varietas (Variety)	Jarak tembak (Distance of target), cm	Jumlah eksplan yang ditembak (Number of explant was shot)	Jumlah eksplan <i>gus</i> positif (Number of positive <i>gus</i> explant)	Persentase (Percentage)	Jumlah spot (Number of spot)
Sarirona	5	20	1	5	1
	7	20	2	10	15
	9	20	5	25	25
Dampit	5	20	2	10	9
	7	20	2	10	3
	9	20	1	5	1



**Gambar 2.** 2A. Kalus setelah 1 bulan perlakuan 0 mg/ml kanamicin (*Callus was treated by 0 mg/ml Kanamycin after one month*). 2B. Kalus setelah 1 bulan perlakuan 50 mg/ml kanamicin (*Callus was treated by 50 mg/ml Kanamycin after one month*). 2C. Kalus setelah 1 bulan perlakuan 100 mg/ml kanamicin (*Callus was treated by 100 mg/ml Kanamycin after one month*). 2D. Kalus setelah 1 bulan perlakuan 150 mg/ml kanamicin (*Callus was treated by 150 mg/ml Kanamycin after one month*). 2E. Kalus setelah 1 bulan perlakuan 200 mg/ml kanamicin (*Callus was treated by 200 mg/ml Kanamycin after one month*).

**Tabel 2.** Efisiensi transformasi *imature* embrio dengan pGA643SM4 pada media seleksi yang mengandung kanamisin (*Transformation efficiency of embryo immature with pGA643SM4 in kanamycin selection media*)

Varietas (Variety)	Jumlah kalus yang ditembak (Number of callus was shoted)	Jumlah transforman yang tumbuh (Number of growth transformant)	Jumlah kotiledon embrio yang terbentuk (Number of embryo cotyledon was created)	Persentase (Percentage)
Sarirona	51	0	0	0
Dampit	87	25	14	16

### Ekspresi *transien gus* pada tahap awal transformasi

Pengamatan ekspresi *transien gus* pada eksplan yang telah diinkubasi pada larutan *X-gluc* 37°C, menunjukkan bahwa tidak terdapat ekspresi *gus* pada eksplan pepaya (varietas dampit & sarirona) kontrol. Hal ini dibuktikan oleh tidak adanya spot biru pada jaringan. Ekspresi *gus* positif telah diperoleh pada semua eksplan varietas dampit dan sarirona yang mendapat semua perlakuan bombardemen, walaupun dalam persentase yang rendah (Tabel 1).

Ekspresi *gus* positif terbanyak pada varietas sarirona pada jarak jelajah 9 cm (25%). Sedangkan varietas dampit pada jarak jelajah 5 dan 7 cm sebanyak 10%, dengan jumlah eksplan yang ditembak 20. Sudarmonowati *et al.* (1997) mengatakan bahwa jumlah spot biru pada eksplan menandakan adanya aktivitas gen *gus* lebih banyak. Oleh karena itu, varietas dampit optimal pada jarak jelajah 5 cm, sedangkan varietas sarirona optimal pada jarak jelajah 9 cm.

-glukuronidase (*gus*) mempunyai beberapa sifat yang mempermudah seleksi transforman. Enzim ini sangat stabil dan akan toleran terhadap beberapa detergen, menyebabkan variasi kondisi ionik yang luas. Enzim ini tidak mempunyai persyaratan khusus dan dapat diuji dengan pH yang luas. Arimura *et al.* (1998) mengatakan proses ekspresi *transien gus* terjadi pada level transkripsi yang dibantu sebuah promotor. Promotor 35S (CaMV 35S) dapat digunakan secara luas pada tanaman dikotil maupun monokotil (Hagio 1998). Pendeteksian secara kualitatif ekspresi *gus* dapat dilakukan menggunakan substrat *X-gluc* yang memproduksi warna biru. Warna ini menandakan hasil reaksi enzimatis *gus* pada sel tanaman. Oleh karena itu, ekspresi *gus* positif hanya mungkin terjadi bila sudah terintegrasi pada sel tanaman (Slamet-Loedin *et al.* 1997; Siswanto *et al.* 1997; Droste *et al.* 2000).

Integrasi gen pada varietas dampit dan sarirona terjadi pada optimasi jarak jelajah yang berbeda. Perbedaan tersebut terjadi karena *transien gus* dipengaruhi oleh banyak faktor. Kondisi jaringan target mempunyai peranan yang besar dalam ekspresi *gus*. Kandungan klorofil atau ketebalan dinding sel tanaman dapat menyebabkan perbedaan ekspresi *gus* (Sudarmonowati *et al.* 1997). Pada jenis tanaman tertentu kandungan klorofil sangat tinggi sehingga sulit dihilangkan dan dinding selnya sulit dilunakkan. Akibatnya gen yang ditembakkan sulit menembus dan tidak dapat masuk ke dalam sel tanaman. Di lain pihak, kepekaan sel menjadi pembatas dalam optimasi transformasi, karena beberapa kondisi penembakan menyebabkan terjadinya kematian sel pada jaringan target (Birch & Bower 1994).

Vain *et al.* (1993) menyatakan bahwa jarak jelajah, tekanan gas, dan jaringan target merupakan parameter optimasi yang relatif interaktif. Tekanan yang tinggi tidak dapat digunakan pada jarak yang dekat. Birch & Bower (1994) menambahkan bahwa parameter kevakuman juga sebagai faktor penentu optimasi. Kevakuman diperlukan untuk mempertahankan kecepatan partikel yang harus menjelajah pada jarak tertentu. Hal ini penting untuk meminimalkan kerusakan jaringan. Vakum yang lebih besar dari 27 mm Hg sangat efektif untuk mempertahankan kecepatan dari partikel yang berukuran 1  $\mu$ m (Birch & Bower 1994). Namun Hagio (1998) merekomendasikan penggunaan 1,6  $\mu$ m pada tanaman tingkat tinggi.

### Pertumbuhan embrio setelah penembakan

Penembakan untuk menyisipkan gen interes ke dalam sel tanaman, dilakukan terhadap plantlet varietas dampit dan sarirona, masing-masing menggunakan jarak tembak 5 dan 9 cm. Dua hari setelah penembakan eksplan dipindah ke media seleksi yang mengandung kanamisin 150 mg/ml.

Pertumbuhan kalus mulai tampak sejak 1 minggu setelah penembakan. Respons embrio dalam media seleksi setelah 4 minggu sejak penembakan tertera pada Tabel 2. Beberapa transforman varietas dampit mempunyai ketahanan terhadap kanamisin. Frekuensi transforman yang berkembang sebesar 16%. Sedangkan varietas sarirona tidak mampu tumbuh pada media seleksi. Hal ini dimungkinkan perbedaan genotip menghasilkan respons yang berbeda, hanya varietas dampit saja yang mampu tumbuh berhasil tersisipi gen interes. Karena penyisipan plasmid pGA643 SM4 mengandung neomisin fosfotransferase (npt) yang berfungsi sebagai marka seleksi terhadap antibiotik kanamisin.

Salah satu bentuk ketahanan terhadap kanamisin ditandai dengan tumbuhnya embrio pada media seleksi (Bhau & Wakhlou 2001). Pertumbuhan transforman pada media seleksi sama dibanding dengan nontransforman pada media nonseleksi. Bhau & Wakhlou (2001), mengatakan bahwa kandungan protein transforman pada media yang mengandung kanamisin lebih tinggi daripada media kontrol. Hal ini dikarenakan antibiotik meningkatkan kandungan air pada kalus sehingga memungkinkan aktifnya sintesis protein dan metabolisme secara umum. Bagaimanapun penerapan tekanan seleksi merupakan hal penting untuk membatasi jumlah sel-sel nontransforman untuk dapat bertahan hidup dengan sel-sel yang di transformasi.

Peningkatan pertumbuhan transforman varietas sarirona tidak tampak pada media seleksi. Salah satu faktor yang mempengaruhi antara lain adalah ukuran plasmid yang disisipkan. Ada indikasi bahwa plasmid yang ukurannya lebih besar (>10 Kbp) mungkin akan lebih terfragmentasi selama penembakan, sehingga terjadi laju ekspresi yang rendah (Birch & Bower 1994). Faktor lainnya adalah kepekaan. Birch & Bower (1994), mengatakan ada beberapa jaringan tanaman yang sensitif terhadap perlakuan vakum. Kondisi hampa udara (vakum) pada saat proses bombardemen secara kritical berpengaruh dan bersifat sebagai faktor penyeleksi terhadap regenerasi transforman yang stabil tanpa adanya peringatan apapun dari terjadinya gangguan sel atau penurunan frekuensi ekspresi sementara. Jaringan target

yang dapat diandalkan (*reliable*) dan dipersiapkan di bawah kondisi yang diubah-ubah mungkin akan menjadi tidak terandal. Khususnya bila menunjukkan berkurangnya aktivitas metabolik sel atau meningkatnya kerusakan selama penembakan.

Pada varietas dampit ada indikasi bahwa pada target yang diandalkan terjadi laju transformasi yang baik. Namun, pendeteksian lebih lanjut masih diperlukan untuk membuktikan terintegrasinya gen interes, yaitu melalui deteksi DNA dengan *polymerase chain reaction (PCR)*. Besar kemungkinan gen interes tidak tersisipkan pada sel tanaman. Oleh karena itu, proses optimasi menjadi penting untuk meningkatkan efektivitas transformasi, yang akhirnya dapat merakit transforman yang stabil.

## KESIMPULAN

1. Penggunaan kanamisin sebagai antibiotik seleksi sangat cocok dan dapat direkomendasikan. Kanamisin dapat dilarutkan, stabil, tidak terpengaruh pH dan komponen media, serta tidak mahal. Optimasi taraf kematian eksplan pepaya varietas dampit dan sarirona pada kanamisin 150 mg/l.
2. Ekspresi *gus* positif terdapat pada semua jarak jelajah dari jaringan target. Optimasi jarak jelajah pada varietas dampit adalah 5 cm, sedangkan pada varietas sarirona adalah 9 cm. Perbedaan kepekaan eksplan menjadi penentu ekspresi gen *gus*.
3. Nilai efisiensi transformasi gen *antisens ACC* oksidase varietas dampit pada media seleksi adalah 16%, sedangkan pada varietas sarirona adalah nol (tidak ada pertumbuhan). Transforman yang tersisipi mampu tumbuh pada media seleksi seperti nontransforman pada media nonseleksi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Pimpinan PAATP yang telah berkenan mengalokasikan dana bagi penelitian ini dan kepada Dr. I. Djatnika, Dr. Sugiono Moelyopawiro, Dr. M. Herman, Dr. Sutrisno atas ijin pelaksanaan penelitian dan bimbingannya selama penelitian berlangsung. Ucapan terima

kasih juga disampaikan kepada Dr. Ika Mariska, Dr. Eri Sofiari, dan Dra. Diani Damayanti atas diskusi dan sarannya.

## PUSTAKA

- Ahsen, U. Von, J. Davies, and R. Schroeder. 1991. Antibiotic inhibition of group I ribozyme function. *Nature*. 353:368–370.
- Arimura, G.I., H. Banjo, I. Kohei, P. Keng-Hock, T. Misa, and M. Hiromichi. 1998. Expression of the –Glucuronidase Gene Introduced into Intact Leaves Attached to *Arabidopsis thaliana* Plants by Particle Gun. *Plant Biotechnol.* 15(2):109–111.
- Bakar, U. K. A., V. Pillai, O.C. Ang, C.Y. Kwok, H.M. Daud, and L.P. Fatt. 2000. ISAAA Papaya Biotechnology Network of South East Asia: Status of PRSV resistant and delayed ripening papaya research in MARDI. In: *Papaya Biotechnology Network of South East Asia*. Technical and Coordination Meeting. May 15-16, 2000. Century Park Hotel. Bangkok. Thailand.
- Bhau, B. S. and A. K. Wakhlu. 2001. Effect of Some Antibiotics on the in vitro morphogenetic response from callus cultures of *Coryphantha elephantidens*. *Biologia Plantarum*. 44(1):19–24.
- Birch, R.G. and R. Bower. 1994. Principles of gene transfer using particle bombardment. In: *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*. Sun Yang, N. and P. Christou (eds), pp. 3-37, Oxford University Press, New York.
- Damayanti, D. and E. Sofiari. 2000. cDNA cloning and construction of coat protein PRSV and delayed ripening gene from Indonesian papaya. In: *Papaya biotechnology network of South East Asia*. Technical and coordination meeting. May 15-16, 2000. Century Park Hotel. Bangkok. Thailand.
- Droste, A., P. Glancarolo, and B.Z. Maria Helena. 2000. Integrated bombardment and agrobacterium transformation system: an alternative method for soybean transformation. *Plant Molecular Biol Reporter*. 18:51–59.
- Fitch, M.M.M., R.M. Manshardt, D. Gonsalves, and J.L. Slightom. 1990. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment. *Plant Cell Report*. 9 (4):189–194 ( Abstr. ).
- Hagio, T. 1998. Optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation. *JARQ*. 32:239–247.
- Hoang, N. H., U. K. A. Bakar, N.V. Hai, and L.T. Binh. 2000. Cloning of antisens ACC oksidase gene from vietnamese papaya fruit. In: *Papaya biotechnology network of South East Asia*. Technical and coordination meeting. May 15-16, 2000. Century Park Hotel. Bangkok. Thailand.
- Klee, H. J., M.B. Hayford, K.A. Kretzmer, G.F. Barry, and G.M. Kishore. 1991. Control of ethylene synthesis by expressions of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *The Plant Cell*. 3:1187-1193.
- Kramer, M., R.A. Sanders, R.E. Sheehy, M. Melis, M. Kuehn, and W.R. Hiatt. 1990. Field evaluation of tomatoes with reduced polygalacturonase by antisens RNA. *Hort. Biotech.* 347-355.
- Mahon, R.E., M.F. Bateson, D.A. Chamberlian, C.M. Higgins, R.A. Drew, and J.L. Dak. 1996. Transformation of an australian variety of *carica papaya* using microprojectile bombardment. *Australian Plant Physiol.* 23(6):679–685.
- Mice, C.W. and Y.W. Chun. 1988. Analysing treatment means in plant tissue culture reseach. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 13:201–217.
- Nasir, M. 2002. Bioteknologi molekuler teknik rekayasa genetik tanaman. PT Citra Aditya Bakti. Malang.
- Penarrubia, L., M. Aguilar, L. Margossian, and R.L. Fischer. 1992. An antisens gene stimulates ethylene hormone production during tomato fruit ripening. *The Plant Cell*. 4:681-687.
- Perez, M. T. M. 2000. Cloning of antisens ACC oksidase gene from papaya philippine cultivar “davao solo” for delayed ripening. In: *Papaya biotechnology network of South East Asia*. Technical and coordination meeting. May 15-16, 2000. Century Park Hotel. Bangkok. Thailand.
- Sanford, J. C., F. D. Smith, and J. A. Russell. 1993. Optimizing the biolistic proses for different biological applications. *Methods Enzymol.* 217:483–510.
- Sawant, V. Samir, P.K. Singh and R. Tuli. 2000. Pretreatment of microprojectiles to improve the delivery of DNA in plant transformation. *BioTechniques*. 29:246–248.
- Schuch, W. 1991. The manipulation of plant gene expression using antisens RNA. In: Dennis, E. S. and Lewellyn, D. J. L. (Ed.). *Molecular approaches to crop improvement*. Springer-Vcolag Wien. New York
- Siswanto, A. Budiani, T. Chaidamsari, dan A. Darussamin, 1997. Ekspresi transien gus pada tahap awal transformasi genetik tanaman kopi melalui *agrobacterium tumifaciens*. *Prosiding seminar perhimpunan bioteknologi pertanian indonesia*. Surabaya 12 – 14 Maret 1997. hlm. 149-157
- Slamet-Loedin, I.H., W. Rahayu, H. Sondang, dan J.L. Wibowo. 1997. Penggunaan dua strain *agrobacterium tumefaciens* super virulen untuk ko-kultivasi tanaman padi kultivar cisadane dan rojolele. *Prosiding seminar perhimpunan bioteknologi pertanian Indonesia*. Surabaya 12–14 Maret 1997
- Sudarmonowati, E., Y. Andayani, dan I.H. Slamet-Loedin. 1997. Studi genetik transformasi pada dua genotipe ubi kayu indonesia. *Prosiding seminar perhimpunan bioteknologi pertanian Indonesia*. Surabaya 12–14 Maret 1997. hlm. 193–201.
- Sunyoto, S. Purnomo, R. Triatminingsih dan D. Djatmiadi. 2002. Regenerasi kalus embrio pepaya secara *In Vitro*. *J. Hort.* 12(2):71–80.
- Vain, P., N. Keen, J. Murillo, C. Rathus, C. Nemes, and J. Finan, 1993. Development of particle inflow gun. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 33:237–246.
- Wae, W. H. 2001. Kanamycin still used and cross-reacts with new antibiotics. *ISIS News* no. 9 / 10.