

## TRANSFER GEN $\beta$ -1,3-GLUCANASE DARI JAMUR *Trichoderma asperillum* PADA KALUS ABACA UNTUK KETAHANAN TERHADAP PENYAKIT LAYU *FUSARIUM*

### *Transfer of $\beta$ -1,3-Glucanase Gene from Trichoderma asperillum Onto Abaca Calli for the Resistance Against Fusarium Wilt Diseases*

RULLY DYAH PURWATI<sup>1)</sup> dan LILIEK SULISTYOWATI<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat  
Jl. Raya Karangploso, Kotak Pos 199, Malang 65152  
e-mail : rdpurwati@gmail.com

<sup>2)</sup> Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang  
Jl. Veteran, Malang 6565145  
e-mail :lsulistiyowati@yahoo.com

Diterima Tgl. 30 - 5- 2011 - Disetujui Tgl. 27 - 2 - 2012

#### ABSTRAK

Kendala utama dalam budidaya tanaman abaka (*Musa textilis* Nee.) adalah penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Foc). Upaya perbaikan sifat ketahanan tanaman abaka melalui persilangan sulit dilakukan karena keragaman genetiknya sempit akibat pola perbanyakan secara vegetatif yang terus-menerus. Transformasi gen ketahanan  $\beta$ -1,3-Glucanase merupakan salah satu alternatif untuk memperbaiki sifat ketahanan tanaman dengan bantuan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Gen  $\beta$ -1,3-Glucanase diisolasi dari jamur endofit *Trichoderma asperillum* yang diketahui antagonis terhadap *Fusarium oxysporum*. Penelitian bertujuan untuk mengintroduksi gen  $\beta$ -1,3 Glucanase pada tanaman abaka, sebagai tahap awal untuk memperoleh tanaman abaka tahan terhadap penyakit layu *Fusarium*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya dan Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat, mulai Juni 2007 sampai dengan Mei 2009. Penelitian terdiri atas tiga tahap sebagai berikut: transfer gen  $\beta$ -1,3-Glucanase pada kalus abaka embriogenik, regenerasi tunas dan planlet abaka transforman, dan konfirmasi planlet abaka transforman yang mengandung gen *Gus* dan  $\beta$ -1,3-Glucanase. Transfer gen dilakukan melalui vektor *A. tumefaciens* strain LBA4404 yang mengandung plasmid pB2GW7 berisi gen-gen  $\beta$ -1,3-Glucanase, *Gus* ( $\beta$ -glucuronidase) sebagai gen pelapor dan *Bar* (*Basta* resistance) sebagai gen penyeleksi. Kalus abaka klon UB-13 embriogenik berukuran 3 x 3 x 3 mm<sup>3</sup> direndam dalam suspensi *A. tumefaciens*, kemudian ditanam pada media kokultivasi selama 2 hari. Setelah kokultivasi, kalus dipindahkan ke media MS cair+Timentin 100 ppm selama 2 minggu. Selanjutnya kalus dipindahkan ke media induksi kalus (MK) yaitu MS + BAP 5 mg/l + Thidiazuron 0,4 mg/l + vitamin C 100 mg/l + Basta 50 ppm + Timentin 100 ppm. Regenerasi tunas dilakukan dengan memindahkan kalus transforman ke media induksi tunas (MT): MS+BAP 0,5 mg/l + vitamin C 100 mg/l dengan penambahan dan tanpa Timentin 100 ppm. Tunas transforman dengan tinggi 2-3 cm dipindahkan ke dalam media induksi akar (MA) : MS + arang aktif 2 g/l dengan penambahan dan tanpa Timentin 50 ppm. Keberadaan gen *Gus* dideteksi dengan reaksi histokimia, dan konfirmasi keberadaan gen  $\beta$ -1,3-Glucanase dilakukan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Dari penelitian berhasil diperoleh 2% kalus transforman yang lolos seleksi Basta. Hasil konfirmasi keberadaan gen *Gus* pada planlet transforman menunjukkan 9 dari 20 (45%) planlet yang diuji, positif mengandung gen *Gus*. Konfirmasi keberadaan gen  $\beta$ -1,3-Glucanase dengan PCR menunjukkan hanya 2 dari 20 planlet transforman, positif mengandung  $\beta$ -

1,3-Glucanase. Pengujian ketahanan dari plantlet transgenik tersebut perlu dilakukan terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Foc).

Kata kunci: *Musa textilis* Nee., transformasi gen,  $\beta$ -1,3-Glucanase, *Agrobacterium tumefaciens*, penyakit, jamur patogen, *Fusarium*

#### ABSTRACT

The main constraint of abaca (*Musa textilis* Nee.) cultivation is infection of wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Foc). The effort to improve abaca resistance through hybridization is still difficult due to narrow genetic variability resulted from continuous vegetative multiplication. Transformation of  $\beta$ -1,3-Glucanase resistance gene is an alternative way to improve character of genetic resistance with help of *Agrobacterium oxysporum*. The research aimed at introducing  $\beta$ -1,3-Glucanase gene to abaca plants prior to obtaining the plants resistance against *Fusarium* wilt diseases. The research was conducted in Biotechnology Laboratory, Faculty of Agriculture Brawijaya University and Tissue Culture Laboratory of Indonesian Tobacco and Fibre Crops Research Institute, from June 2007 to May 2009. This experiment consisted of three steps, namely:  $\beta$ -1,3-Glucanase gene transfer onto abaca embryogenic calli, regeneration of transgene abaca shoots and plantlets, and confirmation of transgene abaca plantlets containing *Gus* and  $\beta$ -1,3-Glucanase genes. Gene transfer was performed using *A. tumefaciens* vector strain LBA4404 with pB2GW7 containing genes of  $\beta$ -1,3-Glucanase and *Gus* ( $\beta$ -glucuronidase) as reporter, and *Bar* (*Basta* resistance) as selector marker. Embryogenic calli of abaca clone UB-13 were soaked in *A. tumefaciens* suspension and then cultured in co-cultivation medium for two days. After co-cultivation, calli were transferred to liquid of MS medium + 100 ppm Timentine for two weeks. Furthermore, the calli were sub-cultured into callus induction medium : MS + 5 mg BAP/l + 0.4 mg Thidiazuron/l + 100 mg vitamin C/l + 50 ppm Basta + 100 ppm Timentine. Shoots regeneration was conducted by transferring transgene calli to shoot induction medium : MS + 0.5 mg/l BAP + 100 mg vitamin C/l with and without addition of 100 ppm Timentine. Transgene shoots with 2-3 cm height were sub-cultured to root induction medium : MS + 2 g active charcoal/l with and without addition of 50 ppm Timentine. Detection of *Gus* gene was conducted using histochemical reaction, while confirmation of  $\beta$ -1,3-Glucanase gene was performed by PCR. This project resulted in 2% transgene calli passing Basta selection. Nine out of 20 plantlets (45%) confirmed the existence of *Gus* gene. PCR results showed that only 2 out of 20 transformed plantlets

positively contained  $\beta$ -1,3-Glucanase gene. The plantlets resistance against *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Foc) needs to be evaluated.

Key words: *Musa textilis* Nee, gene transformation,  $\beta$ -1,3-Glucanase, *Agrobacterium tumefaciens*, plant disease, fungal disease, *Fusarium*

## PENDAHULUAN

Abaka (*Musa textilis* Nee.) merupakan tanaman penghasil serat yang dapat digunakan sebagai bahan baku industri tekstil, kertas berkualitas tinggi (kertas uang, kertas dokumen, kertas cek, kertas filter, pembungkus teh celup), pembungkus kabel dalam laut, dan tali temali (SASTRO-SUPADI, 2006). Pengembangan abaka di Indonesia selama ini kurang diminati oleh masyarakat karena adanya beberapa kendala antara lain pasar belum jelas dan serangan penyakit. Penyakit utama pada abaka adalah layu *Fusarium* yang disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Foc). Kerusakan pertanaman abaka akibat serangan penyakit layu *Fusarium* di Filipina dilaporkan mencapai 5 - 65% (BASTASA dan BALIAD, 2005). Di Indonesia, penyakit ini menyerang tanaman abaka milik perkebunan PT. Bayu Lor, Banyuwangi sekitar 15-20% (TRIMO, 2006, komunikasi pribadi).

Perakitan varietas unggul baru abaka secara konvensional melalui persilangan masih sulit dilakukan. Hal ini karena sempitnya keragaman genetik abaka sebagai akibat perbanyakan secara vegetatif yang terus-menerus. Transformasi merupakan salah satu alternatif untuk memperbaiki sifat tanaman. Transfer gen 'spesifik' untuk mengintroduksi sifat-sifat tertentu ke dalam genom tanaman dapat dilakukan dengan bantuan vektor *Agrobacterium tumefaciens* (LINDSEY dan JONES, 1990). Pada awalnya metode tersebut hanya efektif untuk tanaman dikotil saja, namun saat sekarang telah banyak digunakan untuk tanaman monokotil dengan frekuensi transformasi yang cukup tinggi antara lain pada tanaman padi (LIU *et al.*, 2004), tebu (MANICKAVASAGAM *et al.*, 2004), dan pisang (MAZIAH *et al.*, 2007).

Gen-gen  $\beta$ -1,3-Glucanase dan Chitinase telah diketahui dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap penyakit yang disebabkan oleh jamur patogen. Gen  $\beta$ -1,3-Glucanase dan Chitinase dari *Trichoderma harzianum* dan *T. virens* adalah parasit jamur yang menghasilkan enzim glucanolytic dan chitinolytic (KIM *et al.*, 2000). Gen  $\beta$ -1,3-Glucanase telah banyak digunakan untuk transformasi berbagai jenis tanaman, seperti petunia (ESPOSITO *et al.*, 2000), tembakau (FUNNELL *et al.*, 2004), Brassica (MELANDER *et al.*, 2006), pisang (SREERAMANAN *et al.*, 2006; MAZIAH *et al.*, 2007), dan kentang (ESFAHANI *et al.*, 2010).

Pada penelitian ini digunakan gen  $\beta$ -1,3-Glucanase yang diisolasi dari *T. asperillum* endofit pada batang jeruk. Gen tersebut diinsersikan ke dalam konstruksi plasmid

pB2GW7 bersama dengan gen-gen pelapor (gen *Gus*) dan gen penanda (gen *Bar*), kemudian ditransfer ke *A. tumefaciens*, dan selanjutnya digunakan untuk transformasi tanaman abaka. Tujuan penelitian adalah untuk memperoleh tanaman abaka yang tersisipi gen  $\beta$ -1,3-Glucanase sebagai tahap awal untuk memperoleh tanaman abaka tahan terhadap penyakit jamur (*fungal diseases*) seperti layu *Fusarium*.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat, Malang; dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, mulai bulan Juni 2007 sampai dengan Mei 2009. Penelitian meliputi beberapa tahap yaitu:

### Transfer gen $\beta$ -1,3-Glucanase pada kalus abaka embriogenik melalui *A. tumefaciens*

Vektor *A. tumefaciens* yang digunakan pada transformasi abaka adalah strain LBA4404 yang mengandung plasmid pB2GW7. Plasmid tersebut merupakan suatu konstruksi T-DNA yang berisi gen-gen  $\beta$ -1,3-Glucanase yaitu gen penyandi ketahanan terhadap jamur patogen (*target gene*), *Gus* ( $\beta$ -glucuronidase) adalah gen pelapor (*reporter gene*) dan *Bar* (*Basta resistance*) merupakan gen penyeleksi (*selectable marker gene*), dan dikendalikan dengan *promoter* CaMV35S yang berasal dari *cauliflower mosaic virus*. Kalus yang digunakan pada penelitian ini berasal dari tanaman abaka klon UB-13 yang merupakan hasil eksplorasi dari pulau Sangihe, Sulawesi Utara. Kalus abaka embriogenik dengan ukuran 3x3x3 mm<sup>3</sup> direndam dalam suspensi *A. tumefaciens* selama 15 menit. Untuk meningkatkan infeksi, ditambahkan *aceto-syringone* 100 ppm selama perendaman. Kalus kemudian ditanam pada media MS padat dan diinkubasikan selama 2 hari di ruang gelap dengan suhu 28°C (kokultivasi). Setelah kokultivasi, kalus dipindahkan ke atas kertas saring kemudian diletakkan pada media MS cair dengan penambahan Timentin 100 ppm yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan *Agrobacterium* yang sudah tidak dibutuhkan lagi setelah kokultivasi. Setelah 2 minggu, kalus tersebut dipindahkan ke media induksi kalus (MK) yang terdiri atas media MS, BAP 5 mg/l, Thidiazuron (TDZ) 0,4 mg/l dan vitamin C 100 mg/l. Pada media MK ditambahkan herbisida Basta 50 ppm dan antibiotik Timentin 100 ppm. Herbisida Basta berfungsi sebagai agen penyeleksi karena pada konstruksi T-DNA yang digunakan terdapat gen *Bar* yang menyandi ketahanan terhadap herbisida Basta. Hanya kalus yang telah terinsersi T-DNA (kalus transforman) yang

dapat bertahan hidup pada media tersebut. Penentuan konsentrasi antibiotik Timentin dan herbisida Basta tersebut berdasarkan hasil optimalisasi pada penelitian sebelumnya (SULISTYOWATI *et al.*, 2009). Kalus yang mampu bertahan hidup hingga 4 minggu pada media yang mengandung herbisida Basta, menunjukkan kalus tersebut telah mengalami transformasi.

### Regenerasi tunas dan planlet abaka transforman yang mengandung gen $\beta$ -1,3-Glucanase

Kalus transforman yang mengandung gen  $\beta$ -1,3-Glucanase dipindahkan ke media induksi tunas (MT) yang terdiri atas media MS, BAP 0,5 mg/l, dan vitamin C 100 mg/l. Untuk menghindari pertumbuhan sisa *Agrobacterium* setelah transformasi, kalus transforman disubkultur ke media MT yang mengandung Timentin 100 ppm. Selain itu, kalus transforman juga ditanam pada MT tanpa Timentin untuk mengetahui pengaruh negatif Timentin terhadap regenerasi tunas abaka. Kultur kalus diinkubasikan pada ruang kultur dengan suhu 22 - 25°C dan diberi penyinaran selama 16 jam sampai terbentuk tunas. Tunas transforman dengan tinggi 2-3 cm dipindahkan ke dalam media induksi akar (MA) yang terdiri atas media MS dengan penambahan arang aktif 2 g/l. Seperti pada regenerasi tunas, pada media MA ditambahkan Timentin 50 ppm dan sebagai pembanding digunakan media tanpa Timentin.

### Konfirmasi planlet abaka transforman yang mengandung gen *GUS* dan $\beta$ -1,3-Glucanase

Konfirmasi dilakukan dengan mendeteksi keberadaan gen *Gus* dan gen  $\beta$ -1,3-Glucanase pada jaringan planlet transforman. Keberadaan gen *Gus* (*reporter gen*) dideteksi dengan menggunakan metode reaksi histokimia. Jaringan daun, akar, dan pelepah planlet transforman direndam dalam larutan *X-gluc* (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoronide*) pada suhu 37°C selama 24 jam. Jaringan tersebut kemudian dikeringkan dengan menggunakan *vacuum infiltrate*, selanjutnya dicuci menggunakan ethanol 75 dan 99% pada suhu 4°C. Warna biru pada jaringan menunjukkan bahwa planlet tersebut positif terinsersi gen *Gus*.

Konfirmasi keberadaan gen  $\beta$ -1,3-Glucanase dalam DNA planlet abaka dilakukan dengan analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Bahan untuk isolasi DNA adalah daun dari planlet yang telah mencapai tinggi >6 cm. Sebanyak 0,1 gram daun digunakan untuk isolasi DNA dengan menggunakan CTAB. Kualitas DNA dianalisis dengan teknik elektroforesis, sedangkan kuantitas DNA dianalisis dengan menggunakan *nanodrop spectrophotometer*. Selanjutnya, DNA hasil isolasi ini digunakan sebagai DNA cetakan (*template*) pada PCR.

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan Gene Amp PCR System. Komposisi larutan PCR sebagai berikut: *Go Taq Green Master Mix* 50%, primer *glucF* dan *glucR* masing-masing 10 pmol, dan ditambahkan *nuclease free water* sampai volume akhir 100%. Urutan basa untuk primer *glucF* sebagai berikut: 5'CAC CAT GCT GCC AAA GTT GAA CTT GGT TC3' dan *glucR*: 5'CTA GCA ATA TTG ACA AGC TGT TGG C3'. Amplifikasi reaksi terdiri atas beberapa tahap yaitu: *hot start* pada suhu 95°C selama 5 menit, *denaturation* pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 62°C selama 30 detik, *extention* pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik, *post extention* pada suhu 72°C selama 5 menit. Tahap-tahap tersebut diulang sampai 37 kali (siklus) dan tahap terakhir adalah inkubasi pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil PCR divisualisasi pada gel agarose 1% yang mengandung *etidium bromide* (*EtBr*) 1 µg/µl.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Transfer gen $\beta$ -1,3-Glucanase pada kalus abaka embriogenik melalui *A. tumefaciens*

Kalus abaka klon UB13 yang lolos seleksi pada media yang mengandung herbisida Basta 50 ppm diharapkan telah mengalami transformasi gen (kalus transforman). Pada 16 minggu setelah transformasi, hanya delapan dari 400 (2%) kalus transforman yang masih bertahan hidup pada media seleksi (Tabel 1). Kalus tersebut tetap berwarna putih dan berkembang menjadi putih kehijauan pada media seleksi yang mengandung herbisida Basta, sedangkan kalus yang tidak dapat mempertahankan hidupnya mengalami perubahan warna menjadi cokelat dan mengering (Gambar 1). Rendahnya frekuensi kalus transforman disebabkan adanya aktivitas gen asing yaitu  $\beta$ -1,3-Glucanase. Menurut LIU *et al.* (2004) aktivitas  $\beta$ -1,3-Glucanase yang tinggi dapat menurunkan vigor tanaman. Selain itu, kemungkinan eksplan yang digunakan dalam penelitian ini kurang tepat. Penelitian MANICKAVASAGAM *et al.* (2004) pada tanaman tebu menunjukkan bahwa penggunaan eksplan tunas ketiak (*axillary bud*) lebih baik dibandingkan dengan kalus, dan menghasilkan frekuensi transformasi yang sangat tinggi yaitu 49,6%. Keuntungan lain penggunaan tunas ketiak sebagai eksplan adalah mempercepat regenerasi dan mengurangi terjadinya kimera. Pertumbuhan kalus pada media seleksi sangat lambat karena pengaruh herbisida Basta yang menyebabkan menurunnya daya regenerasi. Herbisida Basta yang berbahan aktif amonium glufosinat merupakan herbisida yang non selektif sehingga dapat mematikan semua jaringan tanaman, termasuk kalus. Hasil ini didukung oleh SHU *et al.* (2005), pada konsentrasi rendah (1 mg/l) Basta menyebabkan pertumbuhan kalus *Leymus chinensis* sangat

Tabel 1. Kalus abaka klon UB13 yang bertahan hidup pada media seleksi sampai dengan 16 minggu setelah transformasi  
 Table 1. The survival calli of abaca UB13 clone on selection medium at 16 weeks after transformation

Perlakuan Treatment	Jumlah kalus Number of callus	% Kalus segar pada minggu ke- Fresh callus percentage at week							
		2	4	6	8	10	12	14	16
Kontrol Control	400	100	80	80	66	29	2	0	0
Transformasi Transformation	400	100	80	56	46	31	22	9	2



Gambar 1. Pertumbuhan kalus abaka setelah transformasi pada media seleksi. Kalus yang tidak tahan berwarna cokelat dan mengering

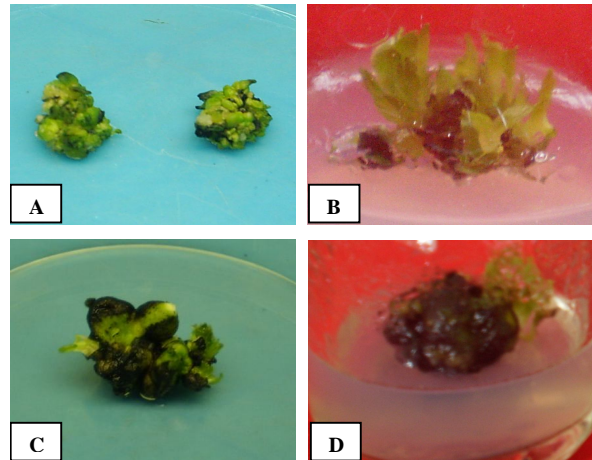
Figure 1. The growth of abaca calli on selection medium. Susceptible calli show brown colour and turn dry

lambat, sedangkan pada konsentrasi 2 mg/l kalus berubah warna menjadi kecokelatan (*brownish*) dan mengalami nekrosis, selanjutnya pada konsentrasi tinggi (5 mg/l) kalus mengalami kematian. Yi *et al.* (2007) juga menyebutkan bahwa herbisida Basta sangat menghambat pertumbuhan kalus ubi jalar yang ditunjukkan dengan perubahan warna kalus menjadi cokelat dan nekrosis.

### Regenerasi tunas dan planlet abaka transforman yang mengandung gen $\beta$ -1,3-Glucanase

Kemampuan eksplan beregenerasi setelah transformasi merupakan faktor yang sangat menentukan keberhasilan suatu proses transformasi. Kalus dengan struktur remah lebih cepat membentuk tunas dibandingkan dengan kalus yang memiliki struktur kompak (Gambar 2). Kalus transforman dengan struktur remah mulai tumbuh dan membentuk mata tunas pada 2 minggu setelah subkultur. Kalus dengan struktur kompak mempunyai pertumbuhan yang relatif lambat. Kondisi ini disebabkan karena diferensiasi sel mengalami hambatan sebagai akibat kurangnya oksigen (WATTIMENA *et al.*, 1992).

Jumlah total tunas yang dihasilkan dari kalus transforman pada media MT dengan dan tanpa Timentin mampu beregenerasi dengan baik pada media tersebut (Tabel 2).



Gambar 2. Pertumbuhan kalus abaka transforman: A. Kalus berbentuk remah, B. Tunas hasil diferensiasi kalus yang remah, C. Kalus berbentuk kompak, D. Tunas hasil diferensiasi kalus yang kompak

Figure 2. The growth of transformed abaca calli: A. Friable calli, B. Shoots resulted from friable calli, C. Compact calli, D. Shoots resulted from compact calli

Delapan kalus transforman dipotong dan diregenerasikan dalam media MT (yang mengandung dan tanpa Timentin), masing-masing terdiri atas empat botol kultur dengan tiga potong kalus per botol. Jumlah tunas yang dihasilkan dari kalus transforman umur 16 msk ke media MT menunjukkan bahwa kalus transforman mampu beregenerasi dengan baik pada media tanpa Timentin, namun sedikit terhambat pada media yang mengandung Timentin (Tabel 2). Pengaruh negatif antibiotik Timentin ditunjukkan pula pada pembesaran tunas (*shoot elongation*). Jumlah tunas dengan tinggi > 2 cm pada 4 bulan setelah subkultur lebih banyak diperoleh pada media MT tanpa Timentin (Gambar 3). Pengaruh negatif antibiotik terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan telah dilaporkan oleh LOHAR *et al.* (2001) yaitu bentuk tidak normal pada daun dan tunas hasil regenerasi pada media yang mengandung antibiotik Gentamycin dan Hygromycin. Penelitian lain menunjukkan bahwa tanaman Poplar yang diberi perlakuan antibiotik Kanamycin mengalami nekrosis dan klorosis pada satu minggu setelah tanam dan mengalami kematian pada dua minggu setelah tanam (CONFALONIERI *et al.*, 2000).

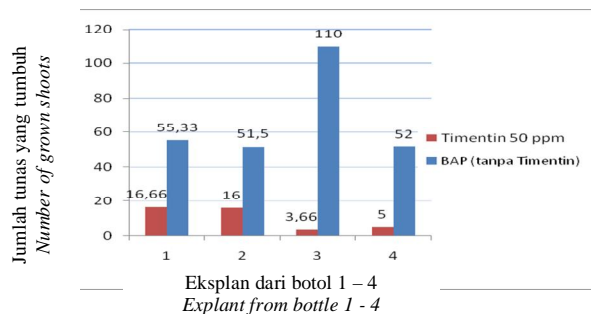
### Konfirmasi Planlet Abaka Transforman yang Mengandung Gen *Gus* dan $\beta$ -1,3-Glucanase

Kemampuan kalus bertahan hidup pada media seleksi tidak menjamin kalus tersebut telah tersisipi oleh gen asing. Oleh karena itu, perlu dikonfirmasi dengan menguji keberadaan gen *Gus* yaitu gen yang berfungsi sebagai pelapor (*reporter gene*). Gen *Gus* melaporkan keberadaan gen  $\beta$ -1,3-Glucanase di dalam sel tanaman karena kedua gen tersebut berada dalam satu plasmid.

Tabel 2. Jumlah tunas transforman abaka pada 16 minggu setelah subkultur ke media MT yang mengandung dan tanpa timentin  
 Table 2. Total number of abaca transformed shoots at 16 weeks after sub-cultured onto MT medium containing or without timentine

Botol ke- Bottle	Jumlah tunas pada media yang mengandung Timentin (cm)				Jumlah tunas pada media tanpa Timentin (cm)			
	<0,5-1	1-2	>2	Jumlah Total	<0,5-1	1-2	>2	Jumlah Total
1	25,30	9,96	16,66	51,92	84,70	33,37	55,33	173,40
2	20,38	17,06	16,00	53,44	65,62	54,94	51,50	172,06
3	0,82	1,45	3,66	5,93	34,52	43,88	110,00	188,40
4	8,30	6,22	5,00	19,52	88,20	65,28	52,00	205,48

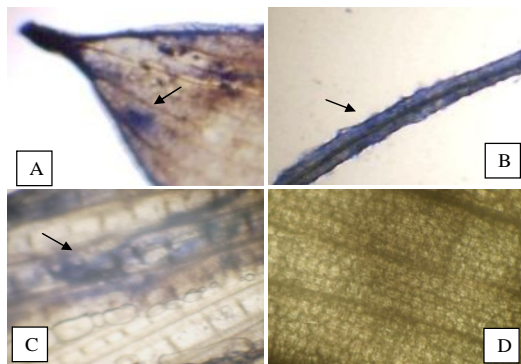
Keterangan: Angka merupakan rata-rata dari tiga kalus pada setiap botol  
 Note : Numbers are average values from tree calli in each bottle



Gambar 3. Rata-rata jumlah tunas dengan tinggi tunas >2 cm yang tumbuh pada 16 minggu setelah subkultur ke media MT dengan penambahan timentin dan tanpa penambahan timentin

Figure 3. Average number of shoots with > 2 cm height at 16 weeks after sub-cultured on MT medium containing timentine and without timentine

Dengan demikian, adanya gen *Gus* dalam jaringan transforman diasumsikan bahwa jaringan tersebut telah tersisipi gen  $\beta$ -1,3-Glucanase. Hasil konfirmasi keberadaan gen *Gus* menunjukkan bahwa gen tersebut diekspresikan pada jaringan daun, akar, dan pelepah yang dapat diidentifikasi dengan adanya spot warna biru (Gambar 4).



Gambar 4. Ekspresi gen *Gus* pada planlet transforman abaka ditunjukkan dengan warna biru (tanda panah). A. Jaringan daun, B. Jaringan akar, C. Jaringan pelepah, dan D. Jaringan daun non-transforman

Figure 4. *Gus* gene expression on abaca transformed plantlets is shown in blue colour (arrows). A. Leaf tissues, B. Root tissues, C. Leafsheath tissues, and D. Untransformed leaf tissues

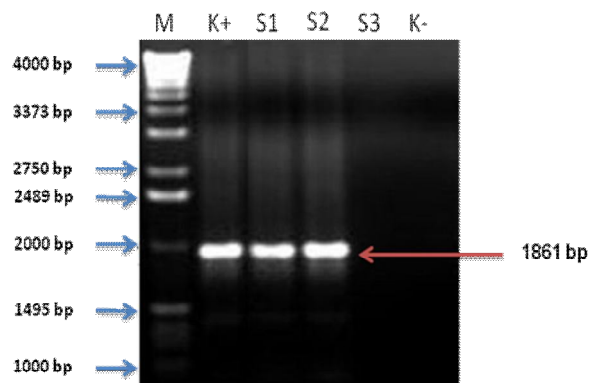
Ekspresi gen *Gus* pada berbagai organ tanaman tersebut disebabkan promoter yang terdapat dalam pB2GW7 adalah CaMV35S. Promoter ini disebut sebagai “constitutive promoter” yang mengarahkan ekspresi gen pada semua bagian tanaman (tidak spesifik) (LINDSEY dan JONES, 1990). Warna biru tersebut timbul sebagai akibat respitasi hidrolisa substrat *X-gluc* (larutan pewarna) oleh enzim  $\beta$ -glucuronidase yang diekspresikan oleh gen *Gus*. Pengujian keberhasilan transfer gen asing ke dalam sel tanaman menggunakan gen *Gus* merupakan metode yang tepat, karena gen *Gus* hanya diekspresikan pada sel tanaman, tidak pada sel bakteri atau mikroorganisme lain (HIEI *et al.*, 1994).

Pada saat penelitian dilaksanakan, hanya 20 planlet transforman yang telah memiliki jumlah daun cukup untuk dikonfirmasi. Hasil konfirmasi menunjukkan ada sembilan planlet yang positif mengekspresikan gen *Gus*. Hal tersebut disebabkan karena insersi gen *Gus* pada kalus abaka bersifat khimera (*chimeric*) yaitu kalus terdiri atas sel-sel yang transforman dan non-transforman. Kemungkinan lain karena kalus abaka mengalami *escape* (terhindar) dari agen seleksi. *Escape* terjadi karena bagian kalus yang bersentuhan dengan media seleksi tidak merata, sehingga terdapat bagian yang tidak bersentuhan dengan media seleksi yang mampu berdiferensiasi membentuk tunas. *Chimeric* dan *escape* sering dijumpai pada transformasi gen berbagai tanaman antara lain pada tanaman krisan (DA SILVA dan FUKAI, 2003) dan pisang (SREERAMANAN *et al.*, 2006; MAZIAH *et al.*, 2007).

Konfirmasi keberadaan gen  $\beta$ -1,3-Glucanase pada planlet transforman dilakukan untuk memperoleh planlet yang benar-benar telah tersisipi gen tersebut. Penggunaan teknik PCR untuk mengkonfirmasi keberadaan gen  $\beta$ -1,3-Glucanase dilakukan untuk 20 planlet yang sudah memiliki jumlah daun cukup untuk isolasi DNA. Kuantitas dan kualitas DNA yang digunakan telah memenuhi persyaratan untuk analisis PCR. Konsentrasi tertinggi 305,60  $\mu$ g/ $\mu$ l dan terendah 31,16  $\mu$ g/ $\mu$ l, sedangkan kemurnian DNA berkisar antara 1,66 hingga 2,66 pada absorbansi 260/280. Dari 20 planlet abaka transforman yang diuji dengan PCR menunjukkan bahwa keberadaan gen  $\beta$ -1,3-Glucanase hanya terdeteksi pada dua planlet. Elektroforesis pada agarose 1% memperlihatkan pita sejajar dengan kontrol positif yang berada pada 1.861 bp (Gambar 5). Meskipun hanya diperoleh dua planlet yang positif tersisipi gen  $\beta$ -1,3-Glucanase, hasil penelitian ini sangat bermanfaat mengingat sulitnya perakitan varietas abaka melalui hibridisasi atau pemuliaan konvensional.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian



Gambar 5. Amplifikasi DNA daun abaka transforman dengan PCR. M : Marker DNA ladder 4 kb, K+: Kontrol positif (DNA *Agrobacterium*), K-: Kontrol negatif (tanpa DNA template), S1-S2: daun transforman, S3: daun non-transforman

Figure 5. DNA amplification of transformed abaca leaves. M: DNA Marker of 4 kb ladder, K+: positive control (*Agrobacterium* DNA), K-: Negative control (without DNA template), S1-S2: transformed leaves, S3: untransformed leaf

Pertanian atas biaya penelitian melalui Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP<sub>3</sub>T) Badan Litbang Pertanian dengan Universitas Brawijaya sesuai dengan Surat Perintah Kerja No. 785/I.1/3/2007 tanggal 4 Maret 2007. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Sdr. Donny Ilman dan Catur Patminingsih yang telah membantu pelaksanaan penelitian tersebut.

## KESIMPULAN

Transfer gen  $\beta$ -1,3-Glucanase pada kalus abaka klon UB 13 untuk perbaikan ketahanan terhadap penyakit layu *Fusarium* dapat dilakukan dengan menggunakan vektor *A. tumefaciens*. Media yang sesuai untuk transformasi abaka adalah media MS dengan penambahan antibiotik Timentin 100 ppm dan herbisida Basta 50 ppm. Frekuensi kalus transforman yang diperoleh sebesar 2% dan telah diregenerasi dan dikonfirmasi dengan pengujian ekspresi gen *Gus* secara histokimia maupun dengan PCR.

## DAFTAR PUSTAKA

- BASTASA, G.N. and A.A. BALIAD. 2005. Biological control of *Fusarium* wilt of abaca (*Fusarium oxysporum*) with *Trichoderma* and yeast. *Philippines J. Crops Sci.* 30: 29-37.
- CONFALONIERI, M., B. BELENGHI, A. BALESTRAZZI, S. NEGRI, G. FACCIOTTO, G. SCHENONE, and M. DELLEDONNE. 2000. Transformation of elite white poplar (*Populus*

*alba* L.) cv. 'Villafranca' and evaluation of herbicide resistance. *Plant Cell Reports.* 19:978-982.

- DA SILVA, J.A.T. and S. FUKAI. 2003. Four gene introduction methods affect the shoot regeneration and localization of transgene expression in greenhouse stem explants and *in vitro* grown chrysanthemum stem thin cell layers. *J. Biotechnol.* 2:114-123.
- ESFAHANI, K., M. MOTALLEBI, M.R. ZAMANI, H.H. SOHI, and E. JOURABCHI. 2010. Transformation of potato (*Solanum tuberosum* cv. Savalan) by *chitinase* and  $\beta$ -1,3-Glucanase genes of mycoparasitic fungi towards improving resistance to *Rhizoctonia solani* AG-3. *Iranian J. Biotechnology.* 8(2):73-81
- ESPOSITO, S., M.G. COLUCCI, L. FRUSCIANTE, E. FILLIPPONE, M. LORITO, and R.A. BRESSAN. 2000. Antifungal transgenes expression in *Petunia hybrida*. *Acta Hort.* 508:157-161.
- FUNNELL, D.L., C.B. LOWRENCE, J.F. PEDERSEN, and C.L. SCHARDL. 2004. Expression of the tobacco  $\beta$ -1,3-Glucanase gene, PR-2d, following induction of SAR with *Peronospora tabacina*. *Physiol. and Mol. Plant Pathol.* 65:285-296.
- HIEI, Y., S. OTHA, T. KOMARI, and T. KUMASHIRO. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6:271-282.
- KIM, D.J., J.M. BAEK, P. URIBE, C.M. KENERLY, and D.R. COOK. 2000. Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from *Trichoderma virens*. *Curr. Genet.* 40: 374-384.
- LINDSEY, K. and M.G.K. JONES. 1990. *Plant Biotechnology in agriculture.* Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 241p.
- LIU, M., Z.X. SUN, J. ZHU, T. XU, G.E. HARMAN, and M. LORITO. 2004. Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. *J. Zhejiang Univ SCI* 5(2):133-136.
- LOHAR, D.P., K. SCHULLER, D.M. BUZAS, P.M. GRESSHOFF, and J. STILLER. 2001. Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker. *J. Exp. Botany.* 52(361): 1697-1702
- MANICKAVASAGAM, M., A. GANAPATHI, V. R. ANBAZHAGAN, B. SUDHAKAR, N. SELVARAJ, A. VASUDEVAN, and S. KASTHURIRENGAN. 2004. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant Cell Rep.* 23:134-143.
- MAZIAH, M., M. SARIAH, and S. SREERAMANAN. 2007. Transgenic banana rastali (AAB) with  $\beta$ -1,3-Glucanase gene for tolerance to *Fusarium* wilt race 1 disease via *Agrobacterium*-mediated transformation system. *Plant Pathol. J.* 6:271-282.

- MELANDER, M., I. KAMNERT, I. HAPSTADIUS, E. LILJEROTH, and T. BRYNGELSSON. 2006. Stability of transgene integration and expression in subsequent generations of doubled haploid oilseed rape transformed with *chitinase* and  $\beta$ -1,3-*glucanase* genes in a double-gene construct. *Plant Cell Rep.* 25: 942–952.
- SASTROSUPADI, A. 2006. Potensi Jatim sebagai penghasil tanaman serat. SINAR TANI. Edisi 12-18 April 2006.
- SHU, Q. Y., G. S. LIU, S. X. XU, X. F. LI, and H. J. LI. 2005. Genetic transformation of *Leymus chinensis* with the PAT gene through microprojectile bombardment to improve resistance to the herbicide Basta. *Plant Cell Rep.* 24:36–44.
- SREERAMANAN, S., M. MAZIAH, N.M. ROSLI, M. SARIAH, and R. XAVIER. 2006. Particle bombardment-mediated co-transformation of *Chitinase* and  $\beta$ -1,3-*Glucanase* genes in banana. *Biotechnology.* 5 (2):203-216.
- SULISTYOWATI, L., R.D. PURWATI, SUHARSONO, dan G. ISKARLIA. 2009. Transformasi gen *Chitinase* dari jamur endofit *Trichoderma asperillum* pada kalus abaka. *Agri vita.* 31(3):205-213.
- WATTIMENA, G.A., L.W. GUNAWAN, N.A. MATJIK., E. SYAMSUDIN, N.M.A. WIENDI, dan A. ERNAWATI. 1992. *Bioteknologi Tanaman.* Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas. IPB. p. 22-24.
- YI, G., Y-M. SHIN, G. CHOE, B. SHIN, Y. S. KIM, and K-M. KIM. 2007. Production of herbicide-resistant sweet potato plants transformed with the bar gene. *Biotechnol Lett.* 29:669–675.