

Transformasi Genetik Pisang Ambon dengan Gen Kitinase dari Padi

Ragapadmi Purnamaningsih* dan Deden Sukmadjaja

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: raga_padmi@yahoo.com

Diajukan: 13 Juni 2012; Diterima: 11 November 2012

ABSTRACT

Genetic Transformation of Banana cv. Ambon with Chitinase Gene from Rice. Ragapadmi Purnamaningsih and Deden Sukmadjaja. One of the main constraints on the productivity and quality enhancement of banana is wilt diseases caused by *Fusarium oxysporum* (*Foc*). Production decrease by wilt disease was 63.33%. Therefore, an effort to obtain the banana new variety which is tolerant to fusarium was absolutely necessary to be done. Genetic engineering can be used in new variety improvement, especially for production of pest and disease tolerant varieties. Transformation of banana with *chi* gene which expressed chitinase enzyme have been used in obtaining the plant resistant to *Foc*. The goals of the research were to obtain: determine lowest higromisin concentration inhibited nodul growth by tested four concentration of higromisin, determine optimum cocultivation time by tested three times cocultivation, tested asetosiringone added on two times cocultivation, and gen *chi* introduction at banana transforman shoots with PCR. The explants used were nodule induced from pseudostem of banana cv. Ambon kuning. Genetic transformation done by sowing the explants in bacterial suspension 0, 15, 30, and 45 minutes. The effect of asetosiringone (0 and 100 mg/l) on cocultivation medium was observed. The research results showed that the lowest higromisin concentration inhibited nodule growth was 25 mg/l for 5 weeks and the best time for inoculation of nodule were 30 minute. Asetosiringone added on bacterial suspension did not increase transformation efficiency. Chitinase gene transformation using *Agrobacterium tumefaciens* on banana nodules produced 25 noduly ines of putative transformant on selection media and 34 plants transforman identification by PCR.

Keywords: Banana cv. Ambon Kuning, fusarium wilt, genetic engineering, chitinase gene.

ABSTRAK

Transformasi Genetik Pisang Ambon dengan Gen Kitinase dari Padi. Ragapadmi Purnamaningsih dan Deden Sukmadjaja. Serangan penyakit layu oleh *Fusarium oxysporum* merupakan salah satu masalah yang dihadapi dalam usaha peningkatan produktivitas dan mutu hasil pada usahatani tanaman pisang. Layu fusarium dapat menyebabkan penurunan hasil hingga 63,33%. Hingga saat ini belum ditemukan metode yang efektif untuk mengatasi masalah tersebut. Rekayasa genetik merupakan metode yang dapat ditempuh dalam perakitan tanaman yang tahan terhadap

penyakit. Transformasi gen *chi* merupakan salah satu metode untuk memperoleh varietas baru dengan sifat yang diinginkan seperti ketahanan terhadap penyakit. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan konsentrasi higromisin terendah yang mematikan nodul dengan cara menguji empat tingkat konsentrasi, menentukan lama kokultivasi optimum dengan cara menguji tiga waktu, mengetahui pengaruh asetosiringon pada kokultivasi dengan menguji penambahan asetosiringon pada dua waktu kokultivasi berbeda serta menguji keberadaan gen *chi* pada tunas transforman dengan PCR. Eksplan yang digunakan adalah nodul yang diinduksi dari bonggol pisang ambon kuning. Transformasi genetik dilakukan dengan merendam eksplan pada suspensi bakteri selama 0, 15, 30, and 45 menit. Pengaruh asetosiringon terhadap efisiensi transformasi dilakukan dengan menggunakan waktu perendaman terbaik ditambahkan dengan asetosiringon pada konsentrasi 0 dan 100 mg/l. Nodul yang bertahan hidup setelah transformasi dipelihara hingga beregenerasi membentuk tunas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi higromisin terendah yang mematikan nodul adalah 25 mg/l pada umur 5 minggu, sedangkan waktu inokulasi nodul terbaik adalah 30 menit. Penambahan asetosiringon pada suspensi *A. tumefaciens* tidak meningkatkan efisiensi transformasi. Transformasi dengan gen *chi* menghasilkan 25 lini nodul pada media seleksi dan 34 tanaman positif PCR.

Kata kunci: Pisang Ambon Kuning, layu fusarium, transformasi genetik, gen kitinase.

PENDAHULUAN

Pisang merupakan salah satu komoditas buah-buahan yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Luas panen dan produksi pisang menempati posisi pertama dibandingkan dengan total produksi buah-buahan lainnya. Indonesia merupakan salah satu negara pengekspor pisang, akan tetapi volume ekspor pisang semakin lama semakin menurun (BPS, 2004). Salah satu masalah yang dihadapi adalah kehilangan hasil yang cukup tinggi yang disebabkan oleh serangan penyakit yang dapat menyebabkan kematian serta menurunkan mutu produk.

Layu *Fusarium* yang disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* *Schlect f. sp. Cubense* merupakan salah satu penyakit utama pisang yang menghancurkan pertanaman pisang komersial di dunia dan telah menyebar luas di Asia, Amerika (Latin), dan Australia (Cahyana, 2006). Kerusakan pertanaman pisang ter-

sebut disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* ras 4. Hampir semua pisang rentan terhadap penyakit ini dengan intensitas penyakit antara 24,5-49,5% (Eko, 2007). Kerugian hasil yang disebabkan oleh penyakit ini dapat mencapai 63,33%.

Pisang Ambon Kuning merupakan salah satu jenis pisang dengan nilai ekonomis tinggi, akan tetapi sangat rentan terhadap penyakit layu fusarium (Sumardiyono, 2000). Cara yang paling efektif dan efisien untuk mengatasi permasalahan tersebut adalah penggunaan varietas tahan, namun demikian hingga saat ini belum diperoleh varietas pisang ambon kuning yang tahan terhadap penyakit layu fusarium.

Pisang berkembang biak secara vegetatif sehingga persilangan untuk mendapatkan varietas baru tidak dapat dilakukan. Metode transformasi genetik telah banyak dilakukan pada berbagai sifat tanaman dan telah menghasilkan berbagai varietas tanaman dengan sifat-sifat tertentu. Ada tiga faktor yang harus dipenuhi dalam rekayasa genetik, yaitu ketersediaan gen yang diintroduksi, sistem transformasi gen ke dalam genom tanaman target dan sistem regenerasi sel-sel transforman menjadi planlet atau tanaman.

Transformasi genetik pisang telah dilakukan oleh Sreeramanan *et al.* (2006b) menggunakan *A. tumefaciens* strain EHA 101 dan LBA 4404. Hasil yang diperoleh menunjukkan *Agrobacterium tumefaciens* dapat mentransfer T-DNA ke dalam sel pisang dengan efisiensi tinggi. Hasil penelitian Sreeramanan *et al.* (2009) menunjukkan bahwa efisiensi transformasi tertinggi pada transformasi genetik pisang diperoleh dengan menggunakan higromisin 20 mg/l, sedangkan waktu kokultivasi terbaik adalah 3 hari (Subramanyam *et al.*, 2011).

Dengan ditemukannya gen-gen yang berperan di dalam mekanisme pertahanan tanaman terhadap cendawan dan telah berkembangnya teknik rekayasa genetika, maka terbuka peluang untuk merakit kultivar pisang yang tahan terhadap patogen ini. Salah satu gen yang menghasilkan protein antifungal, yaitu gen kitinase (*chi gene*) yang mengekspresikan enzim kitinase (Poly1,4-(N-acetyl- β -D-glucosaminidase) glycanohydrolase). Enzim kitinase pada tanaman merupakan bagian dari sistem pertahanan alami, diproduksi secara konstitutif dalam jumlah sedikit dan akan meningkat secara simultan sebagai respon terhadap stres lingkungan, serangan patogen, luka maupun penuaan (Graham dan Sticlen, 1994). Gen kitinase yang mengekspresikan enzim kitinase dapat menghidrolisis kitin (Poly- β -1,4-N-acetylglucosamine), yaitu suatu polimer penyusun dinding hifa yang utama dari cendawan (Cohen-Kupiec dan Chet, 1998; Datta *et al.*,

2000). Kitin terutama terdapat pada ujung dan septum dari hifa dan bila terhidrolisis akan menyebabkan terjadinya lisis.

Beberapa publikasi hasil penelitian melaporkan bahwa tanaman yang mengekspresikan gen kitinase terbukti mempunyai ketahanan terhadap berbagai cendawan tertentu, antara lain tembakau tahan terhadap cendawan *Rhizoctonia solani* (Jach *et al.*, 1995) dan *Sclerotinia sclerotinum* (Terekawa *et al.*, 1997) dan tanaman padi tahan terhadap *Rhizoctonia solani* (Datta *et al.*, 2000). Penggunaan gen kitinase untuk mendapatkan kapas tahan penyakit layu yang disebabkan oleh *Verticillium dahliae* telah dilakukan oleh Tohidfar *et al.* (2009), sedangkan Seeramanan *et al.*, (2006a) berhasil meningkatkan ketahanan pisang Rastali dengan menggunakan gen kitinase dan glucanase. Selain tanaman, bakteri juga menghasilkan enzim kitinase untuk keperluan hidupnya, yaitu untuk mendapatkan nitrogen dan karbon dari hasil hidrolisis kitin, seperti *Bacillus* sp. HSA,3-1a (Natsir, 2010), *Clostridium paraputrificum* dan *Aeromonas caviae* (Sitrit *et al.*, 1995).

Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan konsentrasi higromisin terendah yang mematenkan nodul dengan cara menguji empat tingkat konsentrasi, menentukan lama kokultivasi optimum dengan cara menguji tiga waktu, mengetahui pengaruh asetosiringon pada kokultivasi dengan menguji penambahan asetosiringon pada dua waktu kokultivasi berbeda serta menguji keberadaan gen *chi* pada tunas transforman dengan PCR.

BAHAN DAN METODE

Persiapan Eksplan

Bahan tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah berupa bonggol anakan dari tanaman pisang Ambon Kuning. Untuk mendapatkan eksplan yang steril, bonggol dari anakan pisang dikupas seludangnya hingga ukuran diameter batang 1-2 cm, kemudian disterilisasi dengan teknik baku yang biasa dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan. Larutan sterilisasi yang digunakan antara lain fungisida, bakterisida, bayclin, alkohol, dan akuades steril. Eksplan bonggol yang mempunyai titik tumbuh dipotong hingga berukuran diameter ± 1 cm dan panjang $\pm 3-5$ cm ditanam pada media inisiasi tunas, yaitu MS + BA 3 mg/l + thidiazuron 0,4 mg/l. Nodul yang terbentuk digunakan sebagai bahan tanaman (eksplan) kegiatan selanjutnya.

Penentuan Higromisin sebagai Penyeleksi Transforman

Plasmid pembawa gen *chi* yang digunakan dalam penelitian ini adalah pCambia 1302 (Gambar 1). Plasmid ini mengandung higromisin sebagai marka seleksi dan telah diinsersikan ke dalam vektor *A. tumefaciens* strain LBA 4404. Untuk mengetahui efektivitas higromisin sebagai agen penyeleksi dalam menghambat pertumbuhan eksplan setelah dilakukan transformasi genetik, maka dilakukan percobaan untuk mengetahui konsentrasi higromisin yang terendah yang dapat menghambat pertumbuhan eksplan. Bahan tanaman yang digunakan adalah nodul yang diperoleh dari kegiatan 1. Percobaan dilakukan dengan menumbuhkan nodul pada media MS mengandung BA 3 mg/l, thidiazuron 0,4 mg/l, dan PVP 100 mg/l dengan beberapa taraf konsentrasi higromisin (0, 15, 25, 35, dan 45 mg/l). Jumlah eksplan yang digunakan untuk masing-masing perlakuan adalah 20 nodul. Kultur diinkubasi selama 6 minggu pada suhu 25°C. Pengamatan dilakukan terhadap persentase nodul yang hidup, serta visual eksplan. Konsentrasi higromisin terendah yang menyebabkan kematian nodul digunakan pada percobaan selanjutnya.

Persiapan Suspensi Bakteri *A. tumefaciens* Strain LBA4404

Bakteri *Agrobacterium* yang membawa konstruksi gen *chi* ditumbuhkan pada media LB padat yang mengandung 100 mg/l kanamisin selama 2 hari sebelum digunakan. Koloni tunggal bakteri diambil dari cawan petri dan ditumbuhkan pada 5 ml media LB cair + 100 mg/l kanamisin. Bakteri diinkubasi pada 28°C dalam keadaan gelap selama satu malam dengan penggoyangan 150 rpm. Kultur bakteri diencerkan dengan media LB cair dengan pengenceran 1 : 3 dan kultur diinkubasi kembali pada kondisi yang sama selama tiga jam hingga konsentrasi 0,6 pada OD 600.

Pengaruh Waktu Perendaman Nodul serta Penggunaan Asetosiringon terhadap Regenerasi Nodul setelah Transformasi

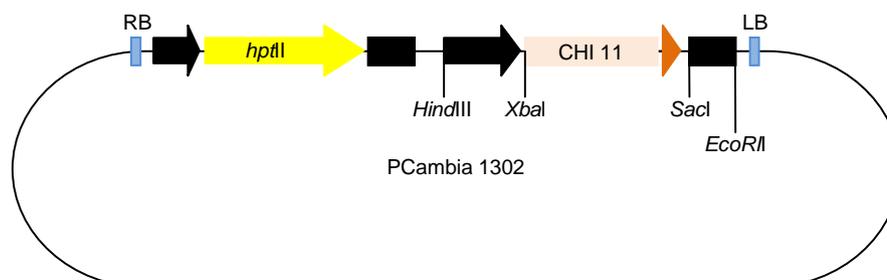
Persiapan nodul dan kokultivasi

Sebelum dilakukan transformasi gen, dilakukan pemindahan nodul pada media baru (prekultur). Jumlah nodul yang digunakan berkisar antara 45-51 nodul untuk masing-masing perlakuan (Tabel 1). Prekultur dilakukan selama 2 hari dengan menggunakan media regenerasi MS + BA3 mg/l + thidiazuron 0,4 mg/l dengan penambahan PVP 100 mg/l. Inokulasi eksplan dilakukan dengan cara merendam eksplan dalam media LB cair yang mengandung suspensi bakteri dengan waktu inokulasi 0,15, 30, dan 45 menit. Kokultivasi dilakukan selama 3 hari dalam kondisi gelap pada suhu 26°C.

Seleksi dan regenerasi eksplan setelah transformasi

Setelah kokultivasi, nodul yang telah diinfeksi ducuci dengan akuades steril yang mengandung cefotaxim 300 mg/l. Higromisin digunakan untuk menyeleksi nodul transforman dengan non transforman. Nodul diletakkan pada kertas steril dan dipindahkan pada media seleksi (MS + BA 3 g/l + thidiazuron 0,4 mg/l + PVP 100 mg/l + sukrosa 30 g/l + phytigel 2,5 g/l dengan penambahan higromisin 25 mg/l (berdasarkan hasil pada kegiatan sebelumnya) dan cefotaxim 300 mg/l. Sebagai kontrol negatif digunakan juga nodul yang tidak ditransformasi. Kultur pada media seleksi diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu 27°C dengan fotoperiodisitas cahaya 16 jam terang/8 jam gelap. Peubah yang diamati adalah persentase nodul yang hidup serta visual nodul.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka dilakukan kembali transformasi gen dengan menggunakan waktu perendaman eksplan terbaik, dikombinasikan dengan penggunaan asetosiringon pada konsentrasi 0 dan 100 mg/l dengan menggunakan metode yang sama. Nodul yang tumbuh di media seleksi diasumsikan sebagai putatif transforman dan setiap 2 bulan disub-



Gambar 1. Peta konstruksi pCambia 1302.

kultur pada media regenerasi sampai muncul tunas. Peubah yang diamati adalah persentase nodul hidup, warna nodul, pertumbuhan nodul, jumlah tunas, dan panjang tunas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Higromisin sebagai Penyeleksi Transforman

Salah satu tahapan penting yang harus dilalui dalam sistem transformasi untuk mendapatkan tanaman transgenik adalah seleksi. Tersedianya metode seleksi sangat diperlukan untuk menyeleksi sel-sel transforman. Seleksi tahap awal yang biasa dilakukan adalah dengan menumbuhkan eksplan hasil transformasi pada medium seleksi yang mengandung antibiotik tertentu sesuai gen yang dibawa dalam vektor. Vektor pCambia 1302 membawa gen *hpt* yang merupakan gen penyandi ketahanan higromisin sehingga seleksi sel-sel transforman dapat dilakukan dengan menggunakan antibiotik tersebut.

Hasil uji sensitivitas nodul pisang terhadap konsentrasi higromisin menunjukkan kematian yang berbeda-beda (Tabel 2). Nodul yang ditanam pada media dengan penambahan higromisin pada konsentrasi 25, 35, dan 45 mg/l mulai mengalami kematian pada minggu kedua setelah perlakuan. Kematian nodul sebesar 100% dicapai pada perlakuan penambahan higromisin 25 mg/l pada minggu ke-5. Pada konsentrasi 15 mg/l, nodul masih dapat melakukan proses proliferasi hingga minggu ke-6, sedangkan pada konsentrasi 35 dan 45 mg/l semua nodul mengering, dan akhirnya mati. Hasil uji sensitivitas nodul digunakan pada saat seleksi eksplan setelah transformasi pada medium seleksi. Berdasarkan hasil tersebut, maka konsentrasi higromisin yang digunakan untuk seleksi eksplan setelah dilakukan transformasi genetik adalah

25 mg/l minimal selama 5 minggu pada medium seleksi. Hasil yang sama diperoleh dari hasil penelitian Sreeramanan *et al.* (2009) yang melakukan transformasi pisang dengan gen *chitinase*. Selanjutnya Subramanyam *et al.* (2011) menggunakan higromisin 30 mg/l untuk menyeleksi pisang cv. Rasthali (AAB) yang ditransformasi dengan *A. tumefaciens* strain EHA 105. Hal yang berbeda dihasilkan pula dari penelitian Tangopo *et al.* (2012) pada tanaman *Andrographis paniculata* (Burm. F) Wallich Ex Ness yang menyatakan bahwa pada higromisin 20 mg/l merupakan konsentrasi optimum, sedangkan pada gandum 50 mg/l (Raja *et al.*, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi antibiotik optimum yang digunakan tergantung kepada jenis tanaman dan strain *A. tumefaciens* yang digunakan.

Pengaruh Waktu Perendaman Nodul serta Penggunaan Asetosiringon terhadap Regenerasi Nodul setelah Transformasi

Respon masing-masing nodul setelah inokulasi dengan *A. tumefaciens* yang mengandung gen kitinase berbeda-beda tergantung kepada waktu inokulasi yang digunakan. Persentase pertumbuhan eksplan setelah inokulasi disajikan pada Tabel 1 dan 3.

Keberhasilan proses transformasi melalui *A. tumefaciens* sangat ditentukan oleh metode yang digunakan, antara lain waktu inokulasi (perendaman eksplan) dalam larutan bakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa waktu inokulasi selama 45 menit menyebabkan kematian tertinggi pada eksplan setelah dilakukan transformasi genetik. Hal ini terlihat dari nodul yang bertahan hidup pada perendaman 45 menit hanya sebesar 35%, sedangkan nodul yang hidup pada waktu inokulasi 15 menit sebesar 76,9% dengan warna hijau. Hal ini menunjukkan bahwa adanya pengaruh waktu inokulasi terhadap daya regenerasi eks-

Tabel 1. Eksplan yang hidup pada media seleksi, umur 6 minggu.

Waktu inokulasi (menit)	Jumlah nodul	Nodul hidup (%)	Visual eksplan
0	50	50 (100)	Hijau
15	51	42 (76,9)	Hijau
30	45	34 (48)	Hijau, kecoklatan
45	45	16 (35)	Coklat/hitam

Tabel 2. Respon nodul pada konsentrasi higromisin berbeda.

Konsentrasi higromisin (mg/l)	Jumlah nodul	Persentase nodul mati pada minggu ke-					
		1	2	3	4	5	6
0	20	0	0	0	0	0	0
15	20	0	0	15	25	65	80
25	20	0	15	75	80	100	100
35	20	0	60	75	100	100	100
45	20	0	50	100	100	100	100

plan. Semakin lama waktu inokulasi eksplan dalam larutan bakteri, menyebabkan tingkat kematian nodul yang semakin tinggi. Eksplan yang direndam selama 45 menit dalam larutan bakteri umumnya berwarna coklat atau hitam yang menunjukkan eksplan mati. Kemungkinan hal ini disebabkan karena inokulasi selama 45 menit menyebabkan infeksi bakteri terlalu banyak sehingga menyebabkan sel/jaringan tanaman menjadi stres dan tidak dapat tumbuh, selain itu terjadi persaingan antara eksplan dan bakteri untuk tumbuh. Pada umumnya semakin lama waktu perendaman, maka eksplan yang tetap hidup akan semakin kecil, namun demikian eksplan yang tetap hidup dan tumbuh biasanya merupakan kandidat transforman. Berdasarkan hasil tersebut, maka selanjutnya transformasi gen dilakukan dengan menggunakan waktu inokulasi 15 dan 30 menit. Respon pertumbuhan nodul setelah transformasi genetik disajikan pada Gambar 2.

Selain ditentukan oleh waktu inokulasi, keberhasilan transformasi genetik juga ditentukan oleh penggunaan asetosiringon. Dari Tabel 3 terlihat bahwa perendaman eksplan dalam larutan bakteri selama 15 menit menghasilkan jumlah eksplan hidup yang lebih banyak dibandingkan dengan perendaman eskplan selama 30 menit. Penambahan asetosiringon nampaknya menurunkan persentase eksplan yang hidup pada media seleksi, di mana perendaman eksplan selama 15 menit tanpa penambahan asetosiringon dalam larutan bakteri menghasilkan jumlah nodul hidup paling banyak, yaitu sebesar 61,20%, sedangkan perendaman nodul selama 30 menit dalam larutan bakteri yang ditambahkan asetosiringon menghasilkan jumlah nodul hidup paling kecil, yaitu sebesar 12,50%. Hal ini berbeda dengan hasil penelitian Budiani *et al.* (2000) yang

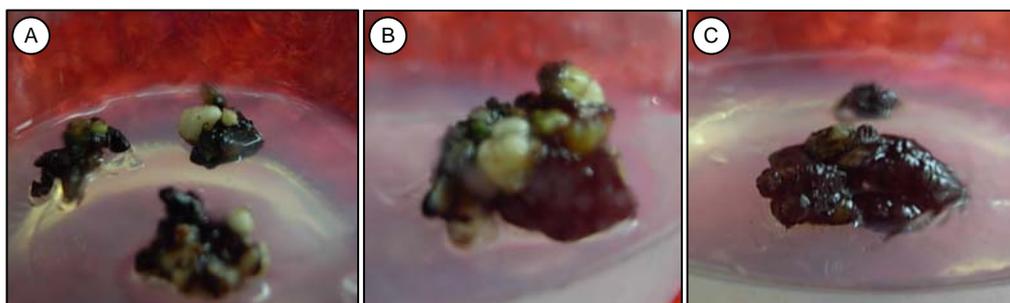
menunjukkan bahwa penambahan asetosiringon 100 mg/l ke dalam larutan bakteri dan media kokultivasi lebih efektif untuk infeksi daun dan kalus kopi (*Coffea arabica*). Hal yang sama dilaporkan oleh Tangopo *et al.* (2012) bahwa penambahan asetosiringon pada tahap infeksi dan kokultivasi dapat meningkatkan efisiensi transformasi pada *A. paniculata*. Selanjutnya Raja *et al.* (2010) menyatakan bahwa transformasi genetik yang dilakukan tanpa penggunaan asetosiringon menurunkan efisiensi transformasi pada kalus gandum.

Asetosiringon merupakan senyawa fenolik yang dihasilkan oleh sel-sel tanaman yang mengalami luka, yang dapat menginduksi transkripsi dari gen-gen vir pada Ti-plasmid *Agrobacterium*. Oleh sebab itu, selain penambahan asetosiringon, eksplan dilukai terlebih dahulu sebelum direndam dalam suspensi bakteri, dengan asumsi akan meningkatkan produksi sinyal fenolik. Asetosiringon merupakan senyawa fenolik yang berfungsi sebagai atraktan bagi bakteri untuk menginfeksi eksplan. Pada penelitian ini tampaknya jumlah bakteri yang menempel pada eksplan akibat kokultivasi selama 3 hari terlalu banyak sehingga menyebabkan kerusakan pada sel atau jaringan eksplan. Menurut Gevin (2000) jumlah bakteri yang terlalu banyak dapat menurunkan jumlah eksplan yang hidup setelah inokulasi.

Nodul yang telah diberi perlakuan transformasi genetik dipindahkan pada media seleksi, yaitu MS + BA 3 mg/l + thidiazuron 0,3 mg/l dengan penambahan higromisin 15 mg/l. Nodul yang tetap hidup pada media seleksi dipindahkan pada media seleksi baru setiap 2 bulan.

Tabel 3. Persentase nodul yang tetap hijau setelah perlakuan inokulasi dengan suspensi *A. tumefaciens*, umur 6 minggu.

Perendaman 15 menit		Perendaman 30 menit	
Tanpa asetosiringon	Dengan asetosiringon	Tanpa asetosiringon	Dengan asetosiringon
61,20%	31,2%	44,30%	12,50%



Gambar 2. Respon nodul setelah transformasi genetik. A = umur 2 minggu setelah transformasi gen, B = umur 4 minggu setelah transformasi gen, C = kontrol, umur 4 minggu.

Respon pertumbuhan nodul dalam menghasilkan tunas pada media seleksi terlihat sangat lambat (Tabel 4), sementara nodul yang tidak diberi perlakuan transformasi genetik (kontrol) pertumbuhannya lebih cepat (Gambar 3). Hal ini disebabkan karena adanya insersi gen pada genom tanaman dapat menyebabkan metabolisme tanaman terganggu, selain itu tanaman memerlukan waktu untuk beradaptasi pada media seleksi.

Dari penelitian ini diperoleh 25 lini nodul yang bertahan hidup pada media seleksi selama 9 bulan,

yaitu 10 lini berasal dari perlakuan perendaman eksplan dalam larutan bakteri selama 15 menit dan 15 lini berasal dari perlakuan perendaman selama 30 menit. Semua lini tersebut diperoleh dari “event” yang berbeda sehingga mempunyai peluang keberhasilan transformasi genetik yang berbeda pula (Tabel 5). Nodul yang tidak dapat bertahan hidup menunjukkan gejala nekrosis pada jaringannya atau eksplan menjadi berwarna coklat dan kering. Dari masing-masing nodul tersebut telah dihasilkan tunas-tunas putatif transforman (Tabel 5).

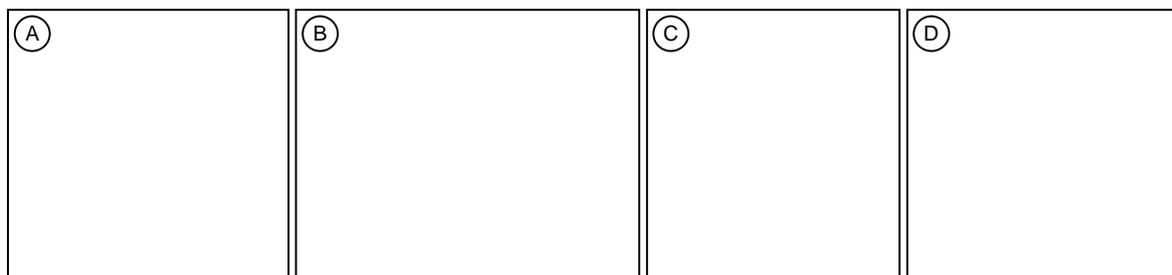
Tabel 4. Pertumbuhan nodul setelah transformasi genetik, umur 5 bulan.

Lama perendaman	Rata-rata pertambahan nodul	Rata-rata jumlah calon tunas yang diperoleh
15 menit (- ase)	6,2	3,0
15 menit (+ ase)	0	0
30 menit (- ase)	7,33	2,67
30 menit (+ ase)	10,6	3,67

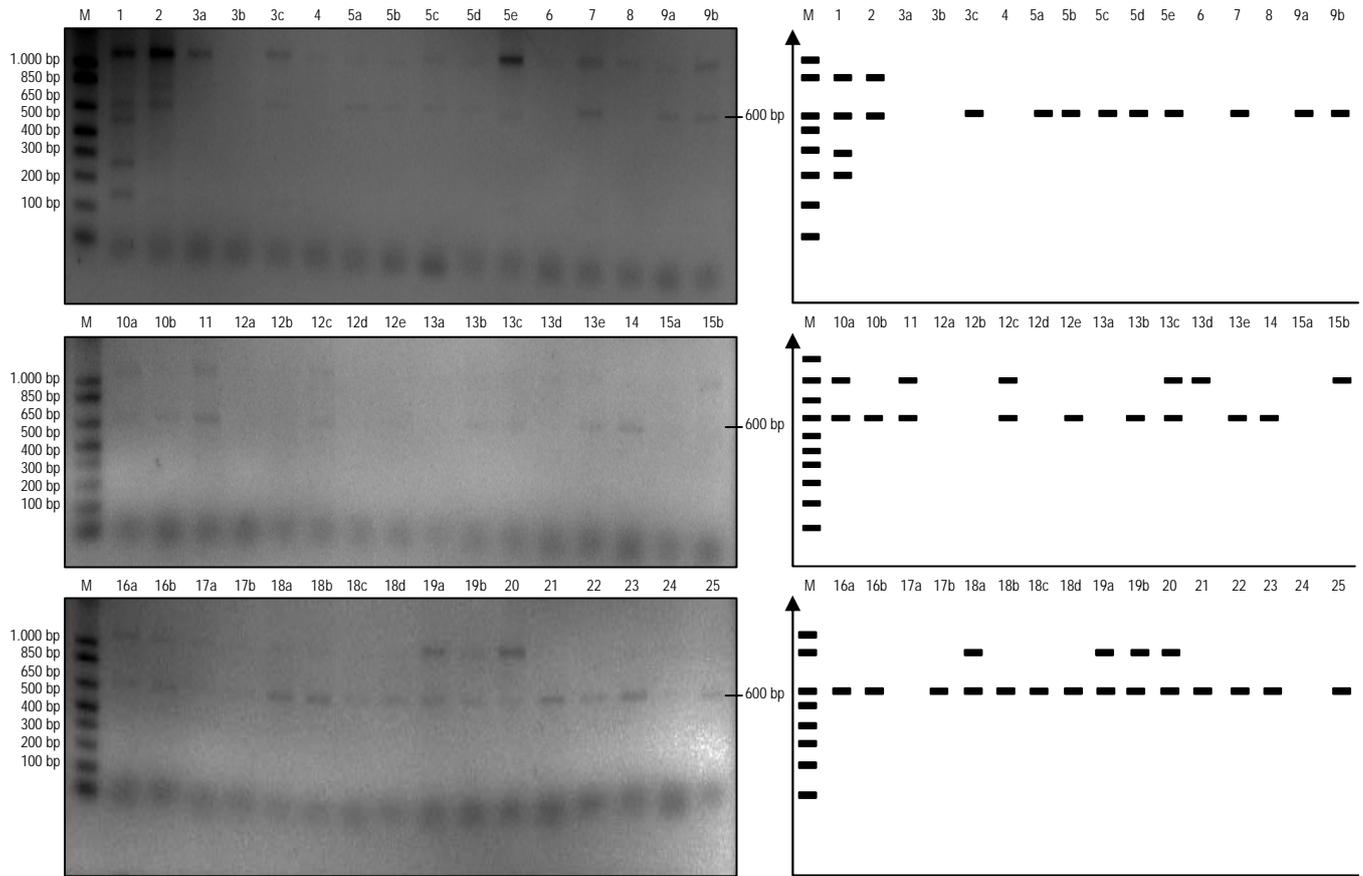
- ase = Tanpa penambahan asetosiringon, + ase = Dengan penambahan asetosiringon.

Tabel 5. Pertumbuhan nodul setelah transformasi genetik di media seleksi, umur 9 bulan.

Nodul	Perlakuan inokulasi	Jumlah tunas	Rata-rata panjang tunas (cm)
1	15 menit	15	0,7
2	15 menit	10	0,3
3	15 menit	23	0,5
4	15 menit	14	0,5
5	15 menit	9	0,3
6	15 menit	12	0,3
7	15 menit	7	0,7
8	15 menit	13	0,3
9	15 menit + asetosiringon 100 mg/l	8	1,0
10	15 menit + asetosiringon 100 mg/l	10	0,8
11	30 menit	24	0,7
12	30 menit	14	0,6
13	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	17	0,8
14	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	8	0,4
15	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	12	0,3
16	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	10	0,3
17	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	3	0,5
18	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	20	0,5
19	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	10	0,5
20	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	4	0,8
21	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	5	0,6
22	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	15	0,8
23	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	13	0,7
24	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	10	0,7
25	30 menit + asetosiringon 100 mg/l	10	0,4



Gambar 3. Respon pertumbuhan beberapa tunas putatif transforman pada media seleksi (A, B, dan C) dan tunas pada media kontrol (D), umur 9 bulan.



Gambar 4. Analisis PCR dari tunas putatif transforman. 1-25 = tunas putatif transforman, M = 1 kb ladder (invitrogen).

Tabel 6. Hasil analisis PCR dari 25 galur transforman.

No.	Galur	Hasil PCR	No.	Galur	Hasil PCR
1.	1	+	25.	13a	-
2.	2	+	26.	13b	+
3.	3a	-	27.	13c	+
4.	3b	-	28.	13d	-
5.	3c	+	29.	13e	+
6.	4	-	30.	14	+
7.	5a	+	31.	15a	-
8.	5b	+	32.	15b	-
9.	5c	+	33.	16a	+
10.	5d	+	34.	16b	+
11.	5e	+	35.	17a	-
12.	6	-	36.	17b	+
13.	7	+	37.	18a	+
14.	8	-	38.	18b	+
15.	9a	+	39.	18c	+
16.	9b	+	40.	18d	+
17.	10a	+	41.	19a	+
18.	10b	+	42.	19b	+
19.	11	+	43.	20	+
20.	12a	-	44.	21a	+
21.	12b	-	45.	22	+
22.	12c	+	46.	23	+
23.	12d	-	47.	24	-
24.	12e	+	48.	25	+

Untuk memastikan insersi gen ke dalam genom tanaman pisang, telah dilakukan uji molekuler dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) menggunakan primer spesifik deteksi gen *chi* dari 25 galur transforman, di mana satu galur terdiri dari satu atau beberapa tanaman (Gambar 4). Pengujian secara molekuler menunjukkan bahwa 34 tanaman positif PCR yang diindikasikan dengan munculnya pita DNA berukuran 600 bp (Tabel 6).

KESIMPULAN

1. Konsentrasi higromisin terendah yang mematikan nodul adalah 25 mg/l pada umur 5 minggu.
2. Waktu inokulasi eksplan terbaik adalah perendaman nodul selama 30 menit.
3. Penambahan asetosiringon pada suspensi *A. tumefaciens* tidak meningkatkan efisiensi transformasi.
4. Telah diperoleh 25 lini nodul pada media seleksi dan 34 tanaman putatif transforman pisang Ambon Kuning berdasarkan analisis PCR.

DAFTAR PUSTAKA

- BPS. 2004. Statistik Indonesia. Statistical Year Book of Indonesia. Badan Statistik. Jakarta, Indonesia. 690 hlm.
- Budiani, A., T. Chaidamsari, Priyono, S. Mawardi, dan Siswanto. 2000. Transformation of coffee arabica using chitinase gene and regeneration of plantlets from transformed zygotic embryos. *Menara Perkebunan* 68(2):1-11.
- Cahyana, D. 2006. Pisang Pasar Swalayan Penyakit. Trubus. Maret. Edisi 436.
- Cohen-Kupiec, R. and I. Chet. 2008. The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. in Biotech.* 9:270-277.
- Datta, K., Z.K. Nicola, N. Baisakh, N. Olivia, and S.K. Datta. 2000. *Agrobacterium*-mediated engineering for sheath blight resistance of indica rice cultivars from different ecosystems. *Theor. Appl. Genet.* 100:832-839.
- Eko, B. 2007. Jamur Endofit Agens Pengendali Hayati. World Press.com.
- Graham, L.S. and M.B. Sticlen. 1994. Plant chitinases. *Cann. J. Bot.* 72:1057-1083.
- Gevin, S B. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Plant Physiol and Plant Mol.r Biol.* 51:223-256.
- Jach, G., B. Gornhardt, J. Mundy, J. Logemann, E. Pinsdorf, R. Leah, J. Schell, and Mass. 1995. Enhance quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression on different barley anti fungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8(1):97-109.
- Natsir, H., A.R. Patong, M. Thenawidjaja, and A. Ahmad. 2010. Production and characterization of chitinase enzymes from Sulili hot spring in South Sulawesi, *Bacillus* sp. HSA, 3-1a. *Indo. J. Chem.* 10(2):263-267.
- Raja, N.I., A. bano, H. Rashid, Z. Chaudary, and N. Ilyas. 2010. Improving *Agrobacterium* mediated transformation protocol for integration of *Xa21* gene in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Botany* 42(5):3613-3631.
- Sitrit, Y. C.E. Vorgias, I. Chet, and A.B. Oppenheim. 1995. Cloning and primary structure of *chiA* gene from *Aeromonas caviae*. *J. Bacteriol.* 177(14):4187-4189.
- Sreeramanan, S., M. Maziah, N.M. Rosli, M. Sariah, and R. Xavier. 2006a. Enhanced tolerance against a fungal pathogen, *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cubense (race 1) in transgenic silk banana. *J. Agric. Res.* 4(1):324-354.
- Sreeramanan, Subramaniam, Mahmood, Maziah, Abdullah, Mohd. Puad, Meon, Sariah, Xavier, and Rathinam. 2006b. Transient expression of *gusA* and *gfp* gene in *Agrobacterium*-mediated banana transformation using single tiny meristematic bud. *J. Plant Sci.* 5(3):468-480.
- Sreeramanan, S., M. Manzhiah, and R. Xavier. 2009. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of banana with rice chitinase gene. *J. Food Agric.* 21(2):18-33.
- Subramanyam, K., K. Subramanyam, K.V. Sailaja, M. Srinivasulu, and K. Lakshmi Devi. 2011. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Rep.* 30(3):437-438.
- Sumardiyono, C. 2000. Imunisasi planlet untuk pengendalian penyakit layu *fusarium* pisang dengan strain bakteri avirulen. Lembaga Penelitian UGM. Yogyakarta.
- Tangopo, A., E. Marwani, dan F.M. Dwivani. 2012. Transformasi dan ekspresi transien gen pelapor *Gusa* pada *Andrographis paniculata* (Burm. F.) Wallich Ex Ness. *J. Bioslogos.* 2(1):10-19.
- Terekawa, N., N. Takaya, H. Horiuchi, and M. Koliike. 1997. A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.* 16:439-443.
- Tohidfar, M., H. Rassouli, A. Haghazari, B. Ghareyazie, and J. Najafi. 2009. Evaluation of stability of chitinase gene in transgenic offspring of cotton (*Gossypium hirsutum*). *Iranian J. Biotechnol.* 7(1):45-50.