

TRANSFORMASI GENETIK *IN PLANTA*: METODE CEPAT MEMPEROLEH PRODUK REKAYASA GENETIKA

Muhammad Burhanuddin Irsyadi^{1*}, Shania Nur Fajrina², Alya Febri Anisa³, Jennifer Goen⁴, Widhi
Dyah Sawitri⁵, Aziz Purwantoro⁶

^{1,5,6} Program Studi Pemuliaan Tanaman, Universitas Gadjah Mada

^{2,3,4,5,6} Departemen Budidaya Pertanian, Universitas Gadjah Mada

*Email: burhanuddin2020@mail.ugm.ac.id

ABSTRAK

Transformasi genetik merupakan teknik menyisipkan gen asing ke dalam genom tanaman target untuk memperoleh tanaman bersifat unggul dan sesuai yang diinginkan. Metode transformasi genetik secara tidak langsung yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* secara *in vitro* membutuhkan waktu lama, biaya mahal, dan perolehan tanaman transforman sedikit. Untuk mengatasi hal tersebut dapat menggunakan metode *in planta*. Berbagai metode transformasi genetik secara *in planta* hingga kini terus dikembangkan. Akan tetapi, metode yang lebih efisien digunakan untuk percepatan perolehan produk rekayasa genetika belum banyak dikaji. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh informasi terkait metode transformasi genetik secara *in planta* yang efisien dan cepat serta faktor yang mempengaruhi efisiensi transformasi. Artikel review ini ditulis menggunakan metode studi literatur dengan mengumpulkan data dari artikel, jurnal, dan informasi di internet yang dianalisis secara deskriptif. Hasil diperoleh bahwa metode *in planta* memiliki keunggulan antara lain lebih simpel, tidak membutuhkan keahlian khusus dan waktu yang dibutuhkan lebih cepat untuk menghasilkan tanaman transforman dibanding *in vitro*. Metode transgenik *in planta* paling simpel yaitu *floral dip* dengan tingkat efisiensi tinggi. Selain itu, metode lainnya yaitu perendaman, vakum infiltrasi, dan injeksi. Keberhasilan transformasi didukung oleh tingkat perkembangan organ target, penambahan sukrosa dan surfaktan serta tingkat kerapatan bakteri. Deteksi tanaman transforman menggunakan seleksi tanaman tahan antibiotik, deteksi molekuler menggunakan metode PCR dan uji ekspresi gen.

Kata Kunci: *Agrobacterium*; *floral dip*; *in planta*; transformasi; transgenik

PENDAHULUAN

Transformasi genetik tanaman merupakan teknik introduksi gen asing yang diinginkan ke dalam genom tanaman target. Teknik ini bertujuan untuk memperoleh tanaman unggul dari tipe liarnya dengan sifat sesuai yang diinginkan [1], [2]. Sifat-sifat unggul antara lain tanaman tahan terhadap hama, penyakit, herbisida, cekaman abiotik, percepatan pembungaan, modifikasi metabolisme tanaman untuk kebutuhan industri farmasi dan pangan. Selain itu, transgenik dimanfaatkan untuk mempelajari fungsi gen dan regulasinya pada perkembangan tanaman [3].

Transgenik termasuk dalam program pemuliaan tanaman untuk menghasilkan keragaman genetik dan perakitan varietas baru [4]. Tanaman transgenik pertama kali dikembangkan pada tahun 1977 yang diawali dengan penemuan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang diketahui berperan sebagai

mediator untuk mentransfer DNA atau gen asing ke dalam tanaman melalui T-DNA. Tanaman transgenik pertama yang berhasil dikembangkan pada tahun 1983 yaitu bunga matahari tersisipi gen dari buncis. Sementara itu, untuk produk rekayasa genetika pertama yang dipasarkan yaitu jagung dan kedelai transgenik pada tahun 1996 di Amerika Serikat. Sejak itu, pengembangan tanaman transgenik terus dilakukan hingga saat ini [5], [6].

Transformasi genetik dapat dilakukan secara langsung atau tidak langsung. Metode secara langsung yaitu tanpa melalui perantara untuk menyisipkan gen target ke dalam genom tanaman. Metode ini dapat menggunakan partikel bombardment. Akan tetapi, hasil yang diperoleh belum maksimal. Selain itu, keterbatasan alat dan biaya yang mahal menjadikan faktor kendala dalam transgenik secara langsung. Untuk itu dapat dilakukan dengan transformasi genetik secara tidak

langsung melalui perantara bakteri *Agrobacterium tumefaciens* [7], [5].

Transformasi genetik secara tidak langsung yang dimediasi oleh *A. tumefaciens* merupakan cara yang paling banyak dilakukan. *A. tumefaciens* merupakan bakteri gram negatif yang mengandung plasmid Ti yang terdiri dari gen penyandi faktor virulensi dan T-DNA. Bakteri ini menyebabkan infeksi tanaman berupa tumor (*crown gall*) melalui bagian yang terbuka untuk mengkolonisasi sel tanaman. Keunggulan dari transformasi genetik ini yaitu lebih ekonomis, sederhana, memiliki efisiensi transformasi tinggi, jumlah salinan gen sedikit yang masuk ke dalam genom tanaman dan dapat mentransfer gen asing yang berukuran besar [7].

Transformasi genetik tidak langsung banyak dilakukan secara *in vitro*. Efisiensi tanaman transgenik menggunakan metode ini masih rendah [8]. Selain itu, transformasi genetik secara *in vitro* sulit dilakukan dan membutuhkan keahlian khusus [9]. Maka dari itu, dibutuhkan metode transformasi genetik yang simpel, mudah dilakukan dan waktu yang cepat untuk memperoleh tanaman transforman. Untuk itu, alternatifnya dapat menggunakan metode transformasi genetik secara *in planta* yang lebih simple dan cepat untuk memperoleh tanaman transforman [10].

Hingga kini, metode transformasi genetik *in planta* terus dikembangkan dengan menggunakan berbagai metode dan jenis target transforman untuk memperoleh produk rekayasa genetika (PRG). Masing-masing metode memiliki kelebihan dan kekurangan yang berbeda. Pemilihan metode yang tepat dapat memperoleh efisiensi tanaman transforman tinggi dengan waktu yang singkat.

Informasi terkait transformasi genetik *in planta* di Indonesia masih sulit diperoleh. Oleh karena itu, artikel review ini bertujuan untuk mengetahui berbagai metode transformasi genetik *in planta* yang efisien, faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan dan seleksi tanaman transforman.

METODE PENELITIAN

Artikel review ini ditulis menggunakan metode studi literatur dengan mengumpulkan data yang bersumber dari jurnal, buku dan informasi di internet. Data tersebut kemudian dianalisis secara deskriptif dan disusun secara ilmiah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini diperoleh bahwa perolehan tanaman transgenik secara *in planta* dapat diuraikan pada perbandingan percepatan waktu memperoleh tanaman transgenik, berbagai macam metode *in planta* yang simpel dan tahap seleksi tanaman transforman.

Perbandingan *In vitro* dengan *In planta*

In vitro merupakan metode perbanyak tanaman di dalam botol dengan lingkungan terkendali dan dalam kondisi aseptis [11], [12]. Perolehan efisiensi tanaman transforman menggunakan metode *in vitro* masih rendah. Hal ini dikarenakan eksplan yang diinfeksi tidak tumbuh dengan baik akibat terkontaminasi dan *browning* [8], [13]. Kontaminasi dapat disebabkan oleh bakteri atau cendawan yang masih terbawa pada awal sterilisasi eksplan atau *A. tumefaciens* masih terbawa saat seleksi menggunakan cefotaxim yang kurang sempurna [14], [15]. Kelemahan lainnya yaitu organogenesis dan morfogenesis tanaman membutuhkan waktu yang lama, biaya yang mahal dan membutuhkan keahlian khusus.

Transformasi genetik secara *in vitro* membutuhkan tahapan yang panjang. Pertama yaitu inisiasi atau inokulasi merupakan tahap perbanyak eksplan yang akan digunakan sebagai organ target transformasi. Ini berupa kalus, protoplas, tunas ataupun organ lainnya yang diperoleh secara *in vitro* yang membutuhkan waktu 1-2 bulan. Tahap kedua yaitu infeksi untuk mentransfer T-DNA melalui *Agrobacterium* dan dilanjutkan tahap ko-kultivasi dengan penambahan *asetosiringone* untuk mengoptimalkan infeksi. Tahapan ini membutuhkan waktu kurang lebih 3 hari. Setelah itu, dilanjutkan tahap *resting* dengan menambahkan *cefotaxime* untuk menonaktifkan atau menghilangkan *Agrobacterium* yang masih tersisa pada eksplan. Pada tahapan ini dapat dilakukan sampai 3 kali hingga eksplan steril dari bakteri. Setelah itu dilakukan seleksi eksplan pada media yang ditambah genetik. Seleksi eksplan dilakukan 3-5 kali. Tahap selanjutnya yaitu tahap pertumbuhan hingga membentuk tunas untuk dilakukan. Tahap terakhir yaitu aklimatisasi untuk memperoleh tanaman kandidat transforman [16], [17]. Aklimatisasi dilakukan dengan memperhatikan faktor lingkungan untuk mengurangi tingkat

kematian planlet yang mengakibatkan kehilangan tanaman [12]. Perolehan tanaman transgenik secara *in vitro* dibutuhkan waktu 5-6 bulan [18].

Transformasi genetik *in planta* merupakan metode transformasi tanpa melalui kultur jaringan dalam proses infeksi. Proses penginfeksian dilakukan langsung pada target organ tanaman di lapangan. Berbagai macam organ target transgenik *in planta* telah dikembangkan menggunakan biji, kecambah, tunas, pucuk, bunga dan buah. Metode ini memiliki keunggulan yaitu perolehan tanaman transforman lebih tinggi dibanding dengan metode *in vitro*, tanpa memerlukan kondisi steril, waktu yang dibutuhkan lebih cepat, mudah dilakukan, biaya terjangkau dan tanpa perubahan variasi somaklonal [8], [19], [20].

Metode *in planta* pertama kali dikembangkan oleh Feldmann dan Marks pada tahun 1987 [10]. Tahapan dalam transgenik *in planta* hanya meliputi proses infeksi dan seleksi tanaman. Tahapan yang singkat dapat memangkas waktu dengan membutuhkan waktu 1-2 bulan untuk memperoleh tanaman transforman [21].

Berbagai Metode Transgenik *In planta*

1. *Floral dip*

Floral dip merupakan salah satu metode transformasi genetik *in planta* dengan mencelupkan bunga sebagai organ target ke dalam suspensi *Agrobacterium*. Ini merupakan metode yang simpel dan mudah dilakukan tanpa memerlukan keahlian khusus. Waktu untuk proses infeksi hanya dibutuhkan antara 5-60 detik. Setelah infeksi, bunga disungkup untuk menjaga kelembaban, menghindari penguapan suspensi dan mengoptimalkan proses infeksi bakteri ke dalam jaringan bunga [22], [23].

Umur bunga berpengaruh terhadap keberhasilan transformasi. Kondisi kuncup bunga efektif digunakan sebagai organ target insersi [24]. Tingkat kepadatan bakteri, penambahan surfaktan, sukrosa dan tingkat perkembangan bunga merupakan faktor yang mempengaruhi terhadap keberhasilan transformasi *floral dip* [15]. Silwet L-77 merupakan surfaktan yang memiliki fitotoksisitas yang rendah serta dapat menurunkan tegangan permukaan dan meningkatkan penetrasi bakteri ke dalam jaringan tanaman. Sedangkan sukrosa sebagai sumber karbon dan energi untuk pertumbuhan

Agrobacterium [21], [25]. Metode ini lebih efektif digunakan pada tanaman sereal atau yang menghasilkan biji langsung tanpa menunggu proses pematangan buah [21]. Selain itu, *floral dip* merupakan metode transformasi genetik paling simpel dengan tingkat efisiensi tinggi [21], [24].

Transgenik secara *floral dip* telah dilakukan pada tanaman padi (*Oryza sativa*) [26], jagung (*Zea mays*) [9], *Arabidopsis thaliana* [22], [23], [27], lobak (*Raphanus sativus* L.) [28], flax (*Linum usitatissimum*) [29], tomat (*Solanum lycopersicum*) [24] dan bunga kosmos (*Cosmos sulphureus* Cav.) [15], [21]. Tingkat efisiensi tanaman transforman dapat dilihat pada Tabel 1.

2. Metode Perendaman

Perendaman merupakan salah satu metode transformasi genetik *in planta* yang mudah dan simpel untuk dilakukan. Bahan atau target jaringan yang digunakan dapat berupa biji, pucuk, batang atau umbi tanaman [8]. Proses infeksi dilakukan dengan merendam organ target dalam suspensi *A. tumefaciens* selama beberapa waktu. Waktu insersi yang dibutuhkan lebih lama dibanding metode lainnya antara 1 hingga 24 jam [15], [30].

Penggunaan organ lunak dan meristemik seperti bibit atau pucuk tanaman merupakan organ target yang efektif karena lebih mudah terinsersi daripada organ yang memiliki lapisan keras seperti biji. Selain itu, waktu transformasi ke organ tanaman lebih cepat dibandingkan dengan biji. Hal ini karena jaringan biji yang lebih keras, sehingga dibutuhkan waktu lebih lama untuk proses infeksi bakteri [15], [31].

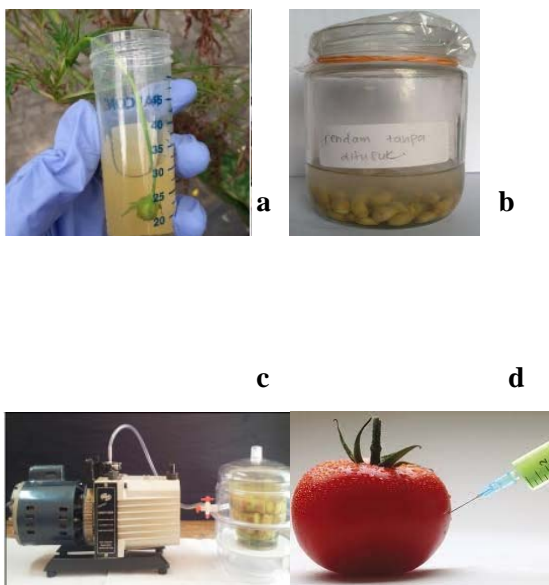
Metode transgenik perendaman telah dilaporkan pada bibit anggur bali *Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavalley selama 2 jam infeksi [30], bibit jeruk (*Citrus maxima*) selama 25 menit [19], biji *A. thaliana* [10] dan biji kosmos (*C. sulphureus* Cav.) [15] dan biji jeruk (*Citrus nobilis* L.) [31]. Persentase efisiensi dapat dilihat pada Tabel 1.

3. Metode Vakum Infiltrasi

Vakum infiltrasi merupakan salah satu metode transformasi *in planta* dengan menyerap udara di dalam tabung dengan tekanan tertentu. Hal ini diharapkan *Agrobacterium* dapat terinsersi lebih dalam ke jaringan tanaman. Penggunaan metode vakum infiltrasi pertama kali dilakukan oleh Bechtold,

dkk tahun 1993 pada *A. thaliana* [32]. Metode ini dibutuhkan tabung dan pompa untuk proses penyerapan udara dalam tabung. Hal ini dapat menggunakan vakum desikator yang disambungkan pada pompa vakum (*Indian high vacuum pumps*, India) Gambar 1c.

Perolehan tingkat efisiensi pada metode ini lebih tinggi dibanding dengan metode perendaman. Akan tetapi, ketersediaan alat dan harga yang mahal menjadi kelemahannya [33], membutuhkan perlakuan khusus dan kurang efisien [22]. Perlakuan tingkat tekanan dan durasi memberikan hasil yang berbeda pada setiap jenis tanaman. Peningkatan tekanan berbanding terbalik dengan durasi infeksi. Hasil penelitian pada tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) efektif pada tekanan 250-750 mmHg selama 1-4 menit [33]. Labu ular (*Tricosanthes cucumerina* L.) pada tekanan 750 mmHg selama 3 menit [2], *A. thaliana* [32] dan *Setaria viridis* [34]. Tingkat efisiensi dapat dilihat pada Tabel 1.

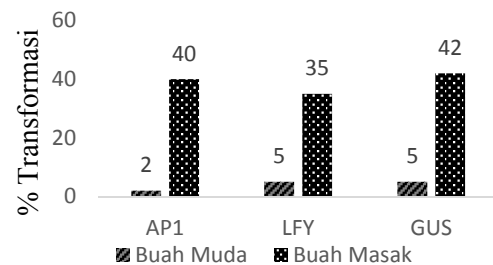


Gambar 1. Proses Transformasi Genetik *In Planta* a) Floral dip Pada Bunga Kosmos [15], b) Perendaman Biji Jeruk [31], c) Vakum Infiltrasi Pada Ruas Batang Tebu [33], d) Injeksi Pada Buah Tomat [35]

4. Metode injeksi

Injeksi merupakan metode transformasi genetik dengan memasukkan suspensi *A. tumefaciens* ke dalam jaringan tanaman target dengan penyuntikan (Gambar 1d). metode ini bertujuan untuk memaksimalkan tingkat infeksi *Agrobacterium* dalam jaringan tanaman. Metode ini pertama kali dilaporkan oleh Yasmeen, dkk pada tahun 2009 [24].

A. tumefaciens masuk ke dalam jaringan buah dapat meningkatkan infeksi pada biji buah. Tingkat kematangan buah berpengaruh terhadap hasil efisiensi transformasi (Gambar 2). Buah masak menjadi organ target yang tepat dibanding yang masih mentah. Hal ini dikarenakan buah yang telah masak memiliki sel besar dan dinding sel telah mengalami perombakan struktural enzimatik. Perombakan tersebut mengakibatkan pelunakan dinding sel, sedangkan pada buah mentah belum mengalami perombakan dan masih bertekstur keras [36]. Metode injeksi telah dilaporkan pada buah tomat (*S. lycopersicum*) [24], jeruk (*Citrus maxima*) [36] dan padi *O. sativa* [37]. Tingkat efisiensi dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 2. Pengaruh Tingkat Kemasakan Buah Terhadap Efisiensi Transformasi Genetik Injeksi Buah Tomat Pasa Deteksi Gen *API*, *LFY*, dan *GUS* [24]

Tabel 1. Tingkat Efisiensi Pada Berbagai Metode Transformasi Genetik *In Planta*

Metode	Kultivar	% Efisiensi	ref
Floral dip	<i>A. thaliana</i>	0,47	[22]
Floral dip	<i>A. thaliana</i>	1	[23]
Floral dip	<i>A. thaliana</i>	1	[27]
Floral dip	<i>R. sativus</i> L.	0,05	[28]
Floral dip	<i>S. lycopersicum</i> L.	23	[24]
Floral dip	<i>C. sulphureus</i> Cav.	55,56	[15]
Floral dip	<i>C. sulphureus</i> Cav.	60	[21]
Floral dip	<i>O. sativa</i>	12,7	[26]
Floral dip	L. <i>usitatissimum</i>	50	[29]
Floral dip	<i>Z. mays</i>	3,3	[9]
Perendaman	<i>C. maxima</i>	20,41	[19]
Perendaman	<i>C. nobilis</i> L.	16,7	[31]
Perendaman	<i>V. vinifera</i> L.	0,2	[30]
Perendaman	<i>C. sulphureus</i> Cav.	0	[15]
Perendaman	<i>A. thaliana</i>	0,32	[10]
Vakum infiltrasi	<i>A. thaliana</i>	0,56	[22]
Vakum infiltrasi	<i>S. officinarum</i> L.	29,6	[33]
Vakum infiltrasi	<i>Setaria viridis</i>	0,6	[34]
Vakum infiltrasi	<i>T. cucumerina</i> L.	19,6	[2]
Injeksi	<i>O. sativa</i>	40	[37]
Injeksi	<i>S. lycopersicum</i>	42	[24]
Injeksi	<i>C. maxima</i>	5	[36]

Faktor Yang Berpengaruh Terhadap Keberhasilan Transformasi *In planta*

1. Perkembangan Organ Tanaman

Tahap perkembangan organ tanaman, umur jaringan serta bagian organ tanaman berbeda-beda dari setiap jenis tanaman berpengaruh terhadap keberhasilan transformasi genetik *in planta*. Jaringan meristemik menjadi jaringan ideal yang digunakan dalam transformasi genetik *in planta* seperti jaringan induk, jaringan matang dan jaringan baru tumbuh atau embrio yang setelah dibuahi. Jaringan tanaman muda dapat meningkatkan proses insersi bakteri kedalam jaringan tanaman [33], [38], [39].

Perbedaan tahap perkembangan bunga berpengaruh terhadap hasil transformasi pada *floral dip*. Kondisi kuncup bunga dengan panjang tangkai 2-10 cm mau mekar menunjukkan persentase transformasi paling tinggi dibanding dengan yang lebih kecil (1-5 cm) dan bunga mekar [22]. Tingkat umur bunga sebelum polinasi meningkatkan hasil transformasi 11% dibanding setelah polinasi pada *floral dip* tomat [24]. Selain itu, ukuran bunga flax *Linum usitatissimum* 2 mm, 5 mm dan 10mm efektif digunakan untuk transformasi *floral dip* [29]. Ruas batang tebu *S. officinarum* L. umur 6 bulan untuk transformasi secara vakum infiltrasi [33] dan tongkol jagung muda ukuran 5-10 cm untuk transformasi genetik *floral dip* [9].

2. Penambahan Sukrosa

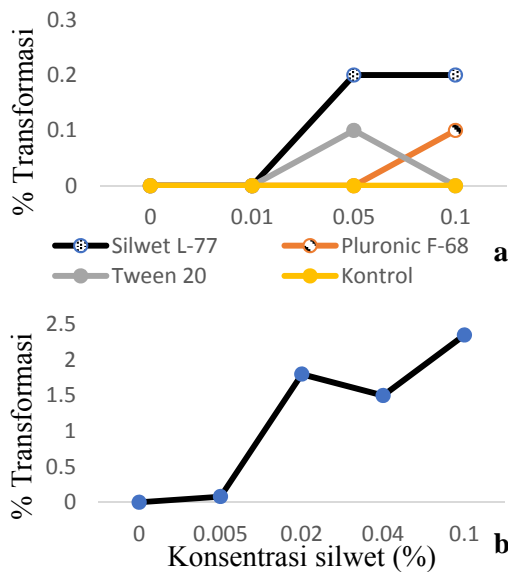
Sukrosa merupakan gula disakarida yang terdiri dari dua monosakarida yaitu glukosa dan fruktosa. Sumber sukrosa berasal dari tebu, bit, nira dan jelly [40]. Sukrosa berfungsi sebagai sumber energi dan penambahan nutrisi tambahan untuk pertumbuhan bakteri [41], [42]. Maka, sukrosa menjadi salah satu faktor penting untuk transformasi genetik.

Jenis gula seperti sukrosa dan glukosa dapat digunakan sebagai sumber energi dalam perbanyakan *A. tumefaciens*. Tetapi jenis sukrosa yang paling sering digunakan karena lebih kompleks dibanding glukosa. Konsentrasi 5% sukrosa umum digunakan dalam perbanyakan *A. tumefaciens* dan transformasi genetik. Hal ini telah dilaporkan pada transformasi *in planta* pada tebu [33], *A. thaliana* [22], [23], [43], lobak *Raphanus sativus* L. [28], labu ular *Tricosanthes cucumerina* L. [2], bunga *Cosmos sulphureus* Cav [15], [21]. Padi *Oryza sativa* [26], flax *Linum usitatissimum* [29], bunga *Setaria viridis* [34] dan jagung *Zea mays* [9].

3. Penambahan Surfaktan

Surfaktan atau *surface active agent* merupakan senyawa yang dapat menurunkan tegangan antara dua permukaan cairan, gas atau benda padat. Surfaktan sebagai deterjen non ionik dapat membuka pori-pori permukaan jaringan tanaman. Selain itu, surfaktan berperan sebagai antraktan untuk menarik bakteri masuk ke jaringan tanaman. Ini juga berpengaruh terhadap perubahan pH suspensi *A. tumefaciens* dengan standar pH 5,2 untuk mengoptimalisasi

transfer T-DNA dari bakteri ke genom tanaman. Surfaktan menjadi salah satu komponen penting yang mempengaruhi keberhasilan transformasi [28].



Gambar 3. Pengaruh Konsentrasi Silwet Terhadap Efisiensi Transformasi a) Tanaman Lobak [28] b) Tanaman *A. thaliana* [22]

Jenis surfaktan yang umum digunakan antara lain Silwet L-77, Tween-20 dan Pluronic-F68. Silwet L-77 sering digunakan dalam transformasi genetik karena lebih mengurangi tegangan permukaan daripada jenis surfaktan lainnya. Selain itu, kandungan fitotoksitas yang rendah dapat membantu lebih banyak bakteri yang masuk kedalam jaringan tanaman yang relatif sulit diakses. Surfaktan jenis Pluronic-F68 digunakan dalam transformasi genetik karena dapat meningkatkan efisiensi dengan penurunan tegangan membran plasma yang menembus ke sel tanaman dan mempermudah masuknya *Agrobacterium* ke dalam jaringan tanaman. Penggunaan konsentrasi surfaktan tinggi dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan tanaman [22], [25], [28]. Konsentrasi 0,05-0,1% silwet L-77 efektif digunakan dalam transgenik *in planta* [15], [21], [22], [29] (Gambar 3).

4. Tingkat Kepadatan Bakteri

Tingkat kepadatan bakteri atau densitas menunjukkan jumlah bakteri pada suatu kekeruhan media. Kepadatan ini dapat diukur langsung menggunakan spektrofotometri dengan mengukur nilai *optikal density* (OD) dengan panjang gelombang 600 nm (OD_{600}). Pertumbuhan bakteri pada fase log dengan

$OD_{600} = 0,4-0,8$ efektif digunakan untuk transgenik *in planta*. Absorbansi bakteri dengan $OD_{600}=0,8$ sering digunakan dalam proses transformasi genetik. Hal ini telah dilaporkan dalam transformasi *A. thaliana* [22], [23], bunga lobak *Raphanus sativus* L. [28] dan bunga *Cosmos sulphureus* Cav. [15], [21].

Seleksi dan Deteksi Tanaman Transforman

1. Seleksi Tanaman Transforman

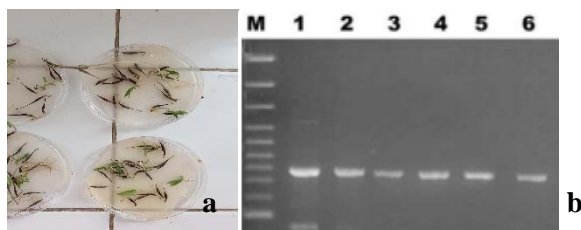
Seleksi tanaman putatif transforman bertujuan untuk mempercepat perolehan tanaman kandidat transgenik dari keseluruhan tanaman kandidat yang tumbuh tanpa menunggu lama. Seleksi tanaman transgenik dapat menggunakan media seleksi seperti kertas saring, kapas, dan kertas pada saat perbanyak tanaman dengan menambahkan antibiotik (Gambar 4a). Penambahan jenis antibiotik disesuaikan dengan gen penanda ketahanan antibiotik yang terdapat pada T-DNA seperti *nptII*, *hpt* dan *hyg*. Tanaman yang tumbuh pada media seleksi tersebut tahan terhadap antibiotik yang dinyatakan sebagai tanaman putatif transforman. Konsentrasi antibiotik juga menyesuaikan dengan petunjuk pada jenis plasmid yang digunakan antara 10-50 ppm [44]. Antibiotik dapat ditambahkan pada berbagai jenis media baik secara *in vitro* seperti media basal, *Murashige and Skoog*, NDM dan lainnya maupun *in vivo* seperti pada kertas saring, kapas dan kasa [20], [28].

2. Deteksi Molekuler

Deteksi molekuler digunakan untuk mengkonfirmasi introduksi T-DNA kedalam genom tanaman melalui deteksi gen penanda menggunakan mesin PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR merupakan suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) serta terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda pada setiap siklusnya. Prinsip teknik PCR yaitu memperbanyak bagian spesifik dengan enzim DNA polimerase yang diinisiasi oleh pelekatan primer dengan menghubungkan deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) dalam reaksi termal. Bahan yang dibutuhkan untuk reaksi PCR yaitu: DNA *polymerase*, Deoksiribonukleotida terifosfat (dNTPs) yang biasanya telah tersedia dalam PCR mix, DNA *template*, sepasang primer *forward* dan *reverse* dan buffer [45].

Gen target yang akan diamplifikasi disesuaikan dengan gen pada T-DNA.

Beberapa gen target yang umum digunakan untuk deteksi gen dalam PCR yaitu *nptII* sebagai ketahanan genetik kanamisin, *hpt* untuk ketahanan genetik hygromisin serta β -*Glucuronidase* (*gus A*) dan *gfp* sebagai gen reporter ekspresi [2], [9], [19]. Hasil PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel *agarose* menggunakan elektroforasi. Gel selanjutnya divisualisasikan pada UV transilluminator atau sinar UV [21] (Gambar 4b)

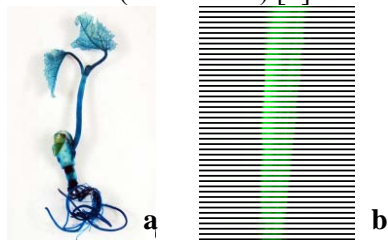


Gambar 4. a) Seleksi Benih Kosmos Transgenik Pada Kertas Saring a) Hasil Amplifikasi Gen *nptII* Pada Tanaman Tomat dengan Pita Berukuran 550 bp [24]

3. Uji Ekspresi Gen

Uji visualisasi gen dilakukan untuk menguji ekspresi gen yang dapat terlihat secara langsung menggunakan perlakuan khusus tanpa melalui PCR. Pengujian ini dapat dilakukan pada gen reporter seperti gen *gus A* menggunakan uji histokimia dan gen *gfp* menggunakan mikroskop *fluorescence* atau sinar UV. Uji histokimia pewarnaan gen *gus A* dapat menggunakan organ berupa akar, batang, daun dan kecambah berwarna biru (Gambar 5a) [2].

Uji visualisasi gen *gfp* pada tanaman hasil transformasi dapat menggunakan berbagai organ tanaman yang terekspresi secara langsung. Uji visualisasi gen *gfp* menggunakan mikroskop *fluorescence*. Apabila tanaman positif transforman akan berpendar warna hijau, apabila tidak akan *autofluorescence* berwarna merah (Gambar 5b) [9].



Gambar 5. Uji Ekspresi Gen Penanda a) Uji Histokimia Gen *Gus* Pada Kecambah Labu Ular [2], b) Uji

Ekspresi Gen *Gfp* Pada Tongkol Jagung [9].

KESIMPULAN

Perolehan tanaman transgenik lebih cepat melalui transformasi genetik *in planta* dengan berbagai macam metode seperti perendaman, vakum infiltrasi injeksi dan *floral dip* sebagai metode paling efisien. Faktor yang berpengaruh yaitu tingkat perkembangan organ, penambahan sukrosa, surfaktan dan tingkat kepadatan bakteri. Seleksi tanaman transforman melalui seleksi ketahanan antibiotik, deteksi molekuler dan ekspresi gen.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] A. Wahyudi, A. Purwantoro, E. Sulistyanyingsih, R. Hara, and R. Motohashi, "transformasi gen *ilp* (increasing level of polyploidy) pada tomat 'micro-tom,'" in *Seminar Nasional Sains & Teknologi V, Lembaga Penelitian Universitas Lampung*, Lampung, 2013, pp. 288–298.
- [2] K. Subramanyam, A. Chinnathambi, R. M. Thaneswari, A. A. S. Ganapathi, M. Manickavasagam, and A. Ganapathi, "Highly efficient *Agrobacterium*-mediated *in planta* genetik transformation of snake gourd (*Tricosanthes cucumerina* L.)," *Plant Cell Tiss Organ Cult*, vol. 123, pp. 133–142, 2015, doi: 10.1007/s11240-01508214.
- [3] I. A. M. Nugraheni, "fungsi ganda green fluorescent protein (*gfp*) pada sistem transformasi gen dengan mediator *Agrobacterium* pada tanaman anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.: Sebagai gen pelapor dan penambah nilai estetika tanaman," [Skripsi], Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2007.
- [4] A. R. V. Keshavareddy, G., Kumar, and V. S. Ramu, "Methods of plant transformation- A review," *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.*, vol. 7, no. 7, pp. 2656–2669, 2018.
- [5] M. K. Sateesh, "Bioethics and Biosafety," in *IK International Pvt*, 2013, p. 456.
- [6] K. L. Hefferon, *Biopharmaceuticals in Plants: Toward the Next Century of Medicine*. CRC Press, 2009.
- [7] D. Silalahi, I. G. P. Wirawan, and M. Sritamin, "Transformasi Genetik Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) dengan Gen *acvB* Menggunakan Vektor

- Agrobacterium tumefaciens*,” *Agrotrop J. Agric. Sci.*, vol. 11, no. 1, p. 63, 2021, doi: 10.24843/ajoas.2021.v11.i01.p07.
- [8] M. I. Chumakov and E. M. Moiseeva, “Technologies of *Agrobacterium* plant transformation *In planta*,” *Appl. Biochem. Microbiol.*, vol. 48, pp. 657–666, 2012.
- [9] M. Guiqin, N. Chang, K. Xiang, Y. Sheng, Z. Zhang, and G. Pan, “Genetik Transformation of Maize Female Inflorescence Following *Floral dip* Method Mediated by *Agrobacterium*,” *Biotechnology*, vol. 11, no. 3, pp. 178–183, 2012, doi: 10.3923/biotech.2012.178.183.
- [10] K. A. Feldmann and M. David Marks, “*Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: A non-tissue culture approach,” *MGG Mol. Gen. Genet.*, vol. 208, pp. 1–9, 1987, doi: 10.1007/BF00330414.
- [11] E. Handayani, M. B. Irsyadi, R. L. M. N. Alawiyah, and I. Aris, “Effect of Explants Sterilization and Plant Growth Regulators on Embryo Culture of Kepel (*Stelechocarpus burahol*),” *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 985, no. 012016, 2022, doi: 10.1088/1755-1315/985/1/012016.
- [12] M. B. Irsyadi, “Factors That Effect of the Optimal Plantlet Growth from Tissue Culture on the Acclimatization Stage,” in *Proceeding International Conference on Science and Engineering*, UIN Sunan Kalijaga, Yogyakarta 23 October, 2021, pp. 100–104.
- [13] E. Handayani, M. B. Irsyadi, I. Aris, R. L. M. N. Alawiyah, N. Kusumaningtyas, F. Permatasari, I. A. Rineksane, “Optimasi sterilisasi endosperma kepel (*Stelechocarpus burahol* [BI] Hook f. & Th) secara *in vitro*,” *Bio-EduJurnal Pendidik. Biol.*, vol. 6, no. 2, pp. 113–121, 2021, doi: 10.32938/jbe.v6i2.1179.
- [14] M. L. Jakhar, R. Verma, and D. Dixit, “Effect of antioxidant on *in vitro* degree of browning and culture establishment of Guggul (*Commiphora wightii* (Arnott): A valuable dessert medicinal plant. 5: 250–254.” *J. Pharmacogn. Phytochem.*, vol. SP 5, pp. 250–254, 2019.
- [15] N. C. Fatumi, “pengembangan metode transformasi genetik secara *in planta* pada tanaman kosmos (*Cosmos sulphureus* Cav.)” [Skripsi] Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2020.
- [16] D. S. Pudja, “Optimasi metode transformasi genetik melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman kosmos (*Cosmos sulphureus* Cav.)” [Skripsi], Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2021.
- [17] R. Dwiyani, H. Yuswanti, ixora sartika Mercuriani, and E. Semiarti, “Transformasi gen pembungaan melalui *Agrobacterium tumefaciens* secara *in vitro* pada tanaman anggrek *Vanda tricolor*,” *Agrotrop*, vol. 6, no. 1, pp. 83–89, 2016.
- [18] Mohammad irham Fauzi, F. Yelli, A. Edy, and setyo dwi Utomo, “Regenerasi *in vitro* empat varietas kedelai (*Glycine max* L.) melalui organogenesis menggunakan eksplan biji yang diimbibisi dan dikedambahkan,” *J. Agrotek Trop.*, vol. 2, no. 2, 2014.
- [19] Y. Zhang, D. Zhang, Y. Zhong, X. Chang, M. Hu, and C. Cheng, “A simple and efficient *in planta* transformation method for pommelo (*Citrus maxima*) using *Agrobacterium tumefaciens*,” *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 214, pp. 174–179, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.033>.
- [20] M. I. Chumakov, N. A. Rozhok, V. A. Velikov, V. S. Tyrnov, and I. V. Volokhina, “*Agrobacterium*-mediated *in planta* transformation of maize via pistil filaments,” *Russ. J. Genet.*, vol. 42, no. 8, pp. 893–897, 2006, doi: 10.1134/S1022795406080072.
- [21] M. B. Irsyadi, “Penyisipan gen SoSPS1 secara *floral dip* melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman kosmos (*Cosmos sulphureus* Cav.)” [Tesis], Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 2022.
- [22] J. S. Clough and A. F. Bent, “*Floral dip* a simplified method for *Agrobacterium*-mediated.pdf,” *Plant J.*, vol. 16, no. 6, pp. 735–743, 1998.
- [23] X. Zhang, R. Henriques, S.-S. Lin, Q.-W. Niu, and N.-H. Chua, “*Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the *floral dip* method,” *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 2, pp. 641–646, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.97.
- [24] A. Yasmeen *et al.*, “*In planta* transformation of tomato,” *Plant Mol. Biol. Report.*, vol. 27, no. 1, pp. 20–28,

- 2009, doi: 10.1007/s11105-008-0044-5.
- [25] M. Whalen, R. Innes, A. Bent, and B. Staskawicz, "Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis thaliana* and a bacterial gene determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean," *Plant Cell*, vol. 3, pp. 49–59, 1991.
- [26] Rod-In, W. Sujipuli, and K. Ratanasut, "The floral-dip method for rice (*Oryza sativa*) transformation," *J. Agric. Technol.*, vol. 10, no. 2, pp. 467–474, 2014.
- [27] A. Bent, *Arabidopsis thaliana Floral Dip Transformation Method*, vol. 343. Humana Press, 2006.
- [28] I. S. Curtis and H. G. Nam, "Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. longipinnatus Bailey) by floral-dip method - Plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency," *Transgenic Res.*, vol. 10, pp. 363–371, 2001, doi: 10.1023/A:1016600517293.
- [29] N. K. Bastaki and C. A. Cullis, "Floral-dip transformation of flax (*Linum usitatissimum*) to generate transgenic progenies with a high transformation rate," *J. Vis. Exp.*, no. 94, pp. 1–10, 2014, doi: 10.3791/52189.
- [30] I. G. A. I. Mertawan, R. Dwiyantri, and H. Yuswanti, "Transformasi Gen SoSPS1 Melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavalle) Secara *In planta*," *Agrotrop*, vol. 8, no. 1, pp. 93–102, 2018.
- [31] N. P. A. E. O. Suputri, R. Dwiyani, I. A. P. Darmawanti, and B. Sugiharto, "*Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED *IN PLANTA* TRANSFORMATION METHOD FOR THE SoSPS1 GENE IN CITRUS PLANTS (*Citrus nobilis* L.)," *Int. J. Biosci. Biotechnol.*, vol. 7, no. 1, pp. 31–44, 2019, doi: 10.24843/IJBB.2019.v07.i01.p04.
- [32] N. Bechtold, J. Ellis, and G. Pelletier, "*In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants," *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.*, vol. 316, pp. 1194–1199, 1993.
- [33] S. Mayavan, K. Subramanyam, B. Jaganath, D. Sathish, M. Manickavasagam, and A. Ganapathi, "*Agrobacterium*-mediated *in planta* genetik transformation of sugarcane setts," *Plant Cell Rep.*, vol. 34, no. 10, pp. 1835–1848, 2015, doi: 10.1007/s00299-015-1831-8.
- [34] P. K. Martins *et al.*, "Setaria viridis floral-dip: A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation method," *Biotechnol. Reports*, vol. 6, pp. 61–63, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.02.006>.
- [35] D. Weinland, "Genetically Modified Food: A Clockwork Tomato," 2014. <https://english.ckgsb.edu.cn/knowledges/genetically-modified-food-clockwork-tomato/>.
- [36] M. Ahmad and B. Mirza, "An efficient protocol for transient transformation of intact fruit and transgene expression in Citrus," *Plant Mol Bio Rep*, vol. 23, p. 419, 2005.
- [37] P. Supartana, T. Shimizu, H. Shioiri, M. Nogawa, M. Nozue, and M. Kojima, "Development of simple and efficient *in planta* transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 100, no. 4, pp. 391–397, 2005, doi: <https://doi.org/10.1263/jbb.100.391>.
- [38] C. Desfeux, S. J. Clough, and A. F. Bent, "Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method," *Plant Physiol*, vol. 123, pp. 895–904, 2000.
- [39] F. J. I. Solís, P. Mlejnek, K. Studená, and S. Procházka, "Application of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation in *Chenopodium rubrum* L.," *Plant, Soil Environ.*, vol. 49, no. 6, pp. 255–260, 2003, doi: 10.17221/4122-pse.
- [40] D. Maryana, "pengaruh penambahan sukrosa terhadap jumlah bakteri dan keasaman whey fermentasi dengan menggunakan kombinasi *Lactobacillus plantarum* DAN *Lactobacillus acidophilus*," [Skripsi], Universitas Hasanuddin, Makasar, 2014.
- [41] S. Rizal, A. S. Suharyono, and J. R. Amelia, "the effect of addition of sucrose solution on the antibacterial activities of green grass jelly extract sinbiotic beverages during storage in cold temperature," *AGRIC J. Ilmu Pertan.*, vol. 31, no. 1, pp. 53–66, 2019.
- [42] J. Syam, "efek penambahan gula pasir terhadap mutu organoleptik dan bakteri

- total ikan bandeng chanos chanos Forsskal,” [Skripsi] Universitas Hasanuddin, Makasar, 2018.
- [43] A. M. Davis, A. Hall, A. J. Millar, C. Darrah, and S. J. Davis, “Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*,” *Plant Methods*, vol. 5, no. 3, pp. 1–7, 2009, doi: 10.1186/1746-4811-5-3.
- [44] M. N. Isda, “Optimization of Concentration Kanamycin in the soybean explants (*Glycine max* L.) to transformation TcPIN gene,” Prosiding SEMIRATA PTN Wilayah Barat, 11-13 Mei, Medan, 2012.
- [45] P. D. Yustinadewi, P. S. Yustiantara, and I. Narayani, “Mdr-1 Gene 1199 Variant Primer Design Techniques in Pediatric Patient Buffy Coat Samples With Lla,” *Metamorf. J. Biol. Sci.*, vol. 5, no. 1, pp. 105–111, 2018, doi: 10.24843/metamorfosa.2018.v05.i01.p16.