

Optimasi Sistem Transformasi Gen Xiloglukanase pada *Eucalyptus pellita* F. Muell Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*

N. Sri Hartati¹, Andriyani Puspitaningrum², Nita Etikawati², Enny Sudarmonowati¹

¹Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, ²Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Sebelas Maret

email: nsri001@lipi.go.id

Abstract. *Eucalyptus pellita* is a type of woody plant that is widely used as raw materials of pulp and paper so that the need for wood from this type of plant is increasing. Improvements in wood quality such as cellulose deposition and increased growth rates are needed to support the supply of raw materials for the pulp and paper industry. One technology to change the composition of wood is the modification of plant cell walls through the transformation of xyloglucanase gene which in other plants such as *populus alba* and *Acacia mangium* have been shown to increase cellulose deposition and spur growth. The purpose of this study was to obtain an efficient xyloglucanase transformation method in *E. pellita* using *Agrobacterium tumefaciens*. Sprouts *E. pellita* 006 and 06A with different ages of 8 and 15 days are used as plant material for transformation. The sonication treatment of the sprouts prior to the transformation was also applied to determine the effect on transformation efficiency. Transformation is done by soaking the seeds that have been through the treatment of sonication and without sonication on the suspension of *Agrobacterium* carrying plasmid pAa XEG300 and subsequently grown on the selection medium. Sprouts *E. pellita* 006 aged 15 days without sonication treatment showed the highest percentage of regeneration in the selection media that is equal to 72%. Gene integration testing through DNA amplification with specific primers showed a ribbon of xyloglucanase with a size of 709 bp.

Key words : *Eucalyptus pellita*, xiloglukanase, genetic transformation, sonication



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2017 by author and Universitas Negeri Padang.

1. Pendahuluan

Kayu dari berbagai jenis tanaman kehutanan merupakan bahan baku yang paling banyak digunakan dalam industri kertas dan *pulp*, yang merupakan salah satu industri besar dunia. Salah satu penyumbang bahan baku utama pembuatan kertas pada sebagian industri kertas dunia dan juga di Indonesia adalah kayu dari golongan *Eucalyptus*, karena kayu jenis ini memiliki kadar selulosa dan hemiselulosa yang relatif tinggi (Ruiz *et al.*, 2005). Kayu dari tanaman *E. pellita* memiliki keunggulan sebagai bahan baku pembuatan *pulp* dan kertas seperti halnya kayu dari golongan *Eucalyptus* lainnya (Irwanto, 2006). Kandungan selulosa mencapai 53,9% dan kandungan ligninnya berkisar 27,2%. Pada usia 5 tahun *E. pellita* mampu menghasilkan kayu yang mengandung selulosa untuk *pulp* sebesar 263 kg *pulp*/m³. Hal ini menyebabkan angka permintaan kayu *E. pellita* semakin meningkat. Oleh karena itu, diperlukan suatu cara peningkatan kualitas kayu tanaman tersebut dimana salah satu kriteria kualitas kayu untuk bahan baku industri *pulp* adalah kayu dengan kandungan selulosa yang tinggi.

Berdasarkan penelitian Park *et al.* (2004) pada *Populus alba* dan Hartati (2011) pada *Acacia mangium*, deposisi selulosa pada xilem sekunder terbukti dapat dipacu oleh

overekspresi xiloglukanase. Xiloglukanase merupakan enzim yang berperan dalam proses elongasi sel, dimana xiloglukanase mampu memutus rantai xiloglukan atau melepaskan interkalasi xiloglukan yang mengikat mikrofibril selulosa. Degradasi xiloglukan oleh xiloglukanase memberikan kontribusi untuk terjadinya perenggangan sel dan memacu elongasi. Hal Peningkatan deposisi selulosa pada xilem sekunder yang disebabkan oleh overekspresi dimungkinkan terjadi karena proses deposisi selulosa dibatasi oleh interkalasi xiloglukan, sehingga relaksasi ikatan xiloglukan akibat xiloglukanase menyebabkan percepatan biosintesis dan deposisi selulosa (Park *et al.*, 2004).

Peningkatan kualitas tanaman dapat dilakukan secara konvensional melalui persilangan maupun dengan bioteknologi melalui rekayasa genetika (Nasir, 2002). Transformasi genetik tanaman adalah suatu proses memindahkan gen asing ke dalam tanaman dan gen tersebut dapat menampilkan sifat pada tanaman yang ditransformasi tersebut (Wattimena, 1992). Metode transformasi yang sering digunakan pada sel tanaman adalah transformasi tidak langsung dengan vektor *Agrobacterium*. Salah satu faktor penting yang mempengaruhi efisiensi transformasi menggunakan *A. tumefaciens* adalah efisiensi interaksi antara *A. tumefaciens* dengan jaringan tanaman yang dapat ditingkatkan dengan proses sonikasi yang dikenal dengan metode SAAT (*Sonication-Assisted Agrobacterium-mediated Transformation*) (Pathak & Hamzah, 2008).

Perbaikan sifat pada tanaman *Eucalyptus* telah banyak diteliti terutama perbaikan sifat secara konvensional, perbanyakkan melalui teknik kultur jaringan dan pembentukan embrio somatik. Teknik transformasi genetik juga telah diterapkan pada beberapa species *Eucalyptus* (Fernando *et al.*, 2016;). Metode SAAT juga telah diterapkan dalam teknik transformasi *Eucalyptus* (Labate *et al.*, 2007). Penelitian terhadap *E. pellita* baru telah dilakukan meliputi dengan penelitian dasar tentang analisis ekologi tanaman (Irwanto, 2006), pembuatan varietas baru *E. pellita* yaitu EP05 oleh Pusat Penelitian dan Pengembangan PT Arara Abadi, EP 006 dan 06A oleh PT Sinar Mas, sedangkan perbaikan sifat *E. pellita* melalui transformasi genetik belum pernah dipublikasikan. Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh metoda transformasi gen xiloglukanase yang efisien pada *E. pellita* menggunakan *A. tumefaciens*.

2. Bahan dan Metode

Bahan tanaman. Bahan tanaman yang digunakan adalah biji *E. pellita* varietas 006 dan 06A. Biji yang telah disterilisasi kemudian direndam dalam akuades steril selama 24 jam untuk memberikan kondisi yang sesuai bagi biji untuk memulai proses imbibisi yang merupakan tahap awal yang terpenting dalam proses perkecambahan. Biji kemudian ditanam pada media perkecambahan dan diinkubasi pada suhu 25-28°C selama 8 dan 15 hari. Transformasi genetik dilakukan terhadap eksplan berupa kecambah yang berumur 8 dan 15 hari, masing-masing kelompok diberi perlakuan sonikasi dan non sonikasi. Jumlah eksplan yang dipakai pada tiap kelompok perlakuan adalah 25 eksplan.

Persiapan suspensi *A. Tumefaciens*. *Agrobacterium* yang membawa plasmid pAaXEG 300 pembawa gen target xiloglukanase dikultur pada media LB padat yang mengandung antibiotik kanamisin 50 mg/ml dan streptomisin 250 mg/ml. Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 2 hari. Koloni tunggal dikulturkan pada media yB cair yang mengandung kanamisin 50 mg/ml dan kemudian diinkubasi pada *incubator shaker* pada 150 rpm dan suhu 28°C selama 16-18 jam. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm pada suhu 20°C selama 5 menit. Pelet yang diperoleh dicuci dengan menggunakan akuades steril dan kemudian diresuspensi dengan akuades steril hingga volume mencapai 20 ml.

Transformasi. Setelah berumur 8 dan 15 hari, kecambah *E. pellita* dipindah secara aseptik ke dalam media MS cair yang mengandung suspensi *A. tumefaciens* dan asetosiringon 3 mg/ml. Eksplan kemudian dibagi dalam dua kelompok perlakuan yaitu sonikasi (S) dan tanpa sonikasi (NS). Sonikasi dilakukan menggunakan Branson Sonifier 8200 selama 1 menit (Trick and Finer, 1997). Proses transformasi dilakukan dengan merendam eksplan dalam suspensi bakteri *A. Tumefaciens* strain LBA 4404 yang membawa plasmid pAaXEG300/pBE2113/GUS (Kyoto University) dengan nilai OD600=1 dan

mengandung 3 µg/ml asetosiringon selama 15 menit, selanjutnya diletakan di atas kertas *Saring* No.1 steril. Eksplan selanjutnya dikokultivasi pada media MS0 selama 24 jam dalam keadaan gelap pada suhu 28°C (Labate *et al.*, 2007). Eksplan kemudian dicuci dengan 200 mg/l cefotaksim selama 10 menit dan ditanam pada media MS0 + 100mg/l cefotaksim selama 15 hari untuk menyelesaikan seluruh proses perkecambahannya. Kemudian eksplan dipotong bagian hipokotilnya dan kotiledon ditanam ke media seleksi yaitu M1 + 25 mg/l kanamisin + 50 mg/l cefotaksim selama 30 hari (15 hari pada kondisi gelap dilanjutkan 15 hari dalam kondisi terang).

Seleksi dan induksi tunas. Eksplan yang telah dikokultivasi dicuci dengan akuades steril yang mengandung 200 mg/l cefotaksim dan dikeringkan di atas kertas saring. Eksplan kemudian ditanam pada media media MS0 + 100mg/l cefotaksim selama 15 hari pada suhu 28°C dan pada keadaan gelap. Selanjutnya eksplan dipotong hipokotilnya dan dipindah ke media seleksi. Media seleksi yang digunakan adalah media M1 (MS + 0,465 mg/l NAA + 0,5 mg/l TDZ) (Labate *et al.*, (2007) yang mengandung 25 mg/l kanamisin dan 50 mg/l cefotaksim. Eksplan diinkubasi selama 30 hari pada suhu 28°C, 15 hari pertama pada keadaan gelap dan 15 hari kedua pada keadaan dengan terang. Kemudian dipindah ke media MM (MS+ 0,2 mg/l BAP + 10mg/l NAA) yang mengandung 25 mg/l kanamisin dan 25 mg/l cefotaksim. Inkubasi dilakukan pada suhu 28°C selama 30 hari (Labate *et al.*, 2007).

Uji integrasi gen dengan PCR menggunakan primer spesifik

Proses ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan Doyle and Doyle (1987), yang memodifikasi metode ekstraksi CTAB (*Cetyltrimetilammonium bromide*). Sekuen primer yang digunakan adalah 5'-GCTGCCAGTCTAGAGCGCCGCAGCGAC-3' (primer *forward*) dan 3'-CAACGCACCTGGCGCCCGGACTGCCCTC-5' (primer *reverse*) yang disusun berdasarkan sekuen *AaXEG Aspergillus aculeatus* (AY160774). Kondisi PCR yang digunakan adalah denaturasi awal (*hot start*) dilakukan pada suhu 95°C selama 60 detik. Denaturasi untuk siklus dilakukan pada suhu 95°C selama 30 detik, kemudian diikuti dengan *annealing* pada suhu 56°C selama 45 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 60 detik. Siklus ini diulang untuk 30 kali dan diikuti dengan elongasi akhir dengan suhu 72°C selama 7 menit (Warseno, 2008).

Analisis Data

Analisis hasil transformasi dilakukan dengan perhitungan nilai efisiensi transformasi dan efisiensi regenerasi. Persamaan yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$\text{Efisiensi transformasi: } \frac{KR}{KK} \times 100\% \quad \text{Efisiensi regenerasi : } \frac{KG}{KR} \times 100\%$$

KR : jumlah eksplan yang bertahan pada medium seleksi

KK : jumlah eksplan yang dikokultivasi

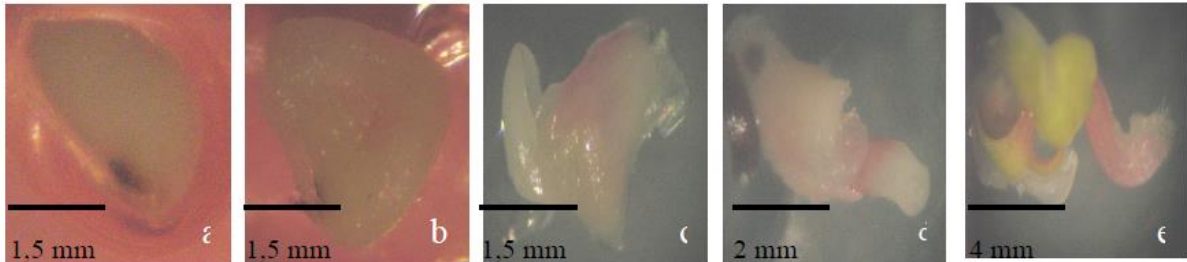
KG : jumlah eksplan yang beregenerasi pada medium seleksi (Hiei *et al.*, 1994)

3. Hasil dan Pembahasan

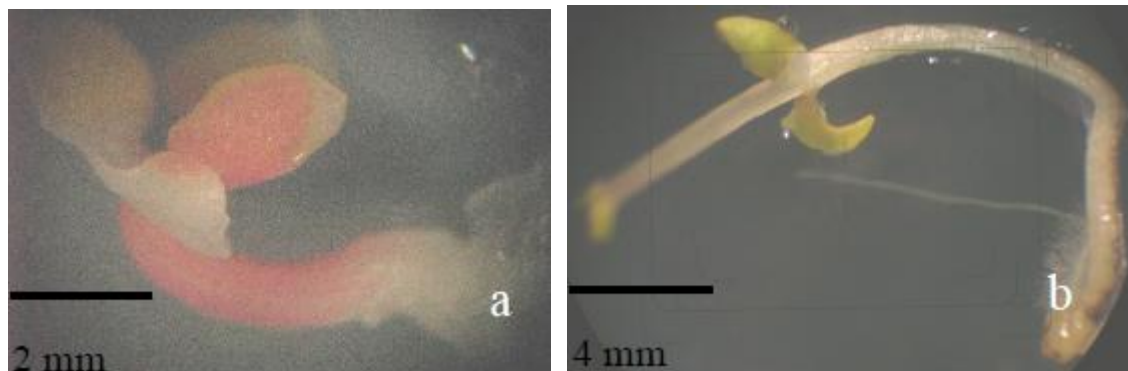
3.1. Persiapan bahan tanaman untuk transformasi

Selama masa inkubasi, terjadi perubahan morfologi biji yang menandakan dimulainya proses perkecambahan yaitu perubahan ukuran biji yang semakin membesar menunjukkan terjadinya proses imbibisi, dan terbukanya kulit biji. Proses perkecambahan diakhiri dengan keluarnya radikula, dan diikuti dengan pertumbuhan embrio sampai kotiledon keluar dari kulit biji (Gambar 1). Transformasi genetik pada *E. pellita* dilakukan berdasarkan penelitian Labate *et al.* (2007) yang telah melakukan terhadap tiga spesies yang berbeda dari *Eucalyptus* yaitu *E. grandis*, *E. urophylla*, dan *ucalyptus* hasil persilangan dari keduanya. Keberhasilan proses transformasi genetik pada tanaman menggunakan *Agrobacterium* menurut Opabade (2006) dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu genotip tanaman, jenis dan umur eksplan, strain bakteri, densitas *Agrobacterium*, waktu inokulasi, agen penginduksi *vir-gen*, eliminasi *Agrobacterium* setelah kokultivasi, dan kerusakan jaringan akibat proses

transformasi. Pada penelitian ini dipakai dua jenis varietas *E. pellita* yaitu varietas 006 dan 06A. Eksplan yang sebaiknya dipakai sebagai target transformasi adalah eksplan yang sel-selnya bersifat meristematis. Sel meristematis diantara terdapat pada kecambah, dimana pada fase kecambah sel-selnya aktif membelah untuk melakukan pertumbuhan. Berdasarkan penelitian Labate *et al* (2007), umur kecambah yang menghasilkan efisiensi transformasi tertinggi berdasarkan *GUS-assay* adalah kecambah dengan umur 8 dan 15 hari, sehingga pada penelitian ini dilakukan transformasi genetik pada *E. pellita* menggunakan kecambah dengan umur 8 dan 15 hari (Gambar 2).



Gambar 1. Tahapan perkecambahan *E. pellita* a. biji setelah sterilisasi, b. Biji yang mengalami imbibisi, c. kulit biji membuka, d. radikula keluar, e. biji yang telah selesai berkecambah.

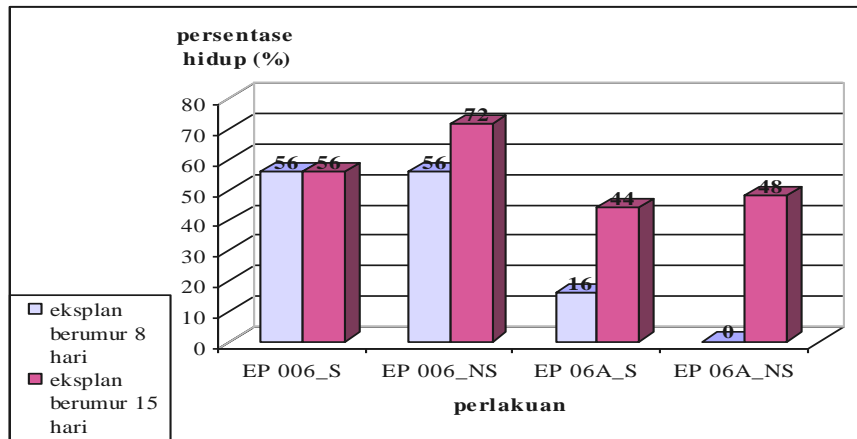


Gambar 2. Eksplan yang digunakan untuk transformasi: a. Eksplan berumur 8 hari, b. Eksplan berumur 15 hari.

3.2. Transformasi dan regenerasi tanaman

Eksplan yang ditransformasi akan terseleksi pada media seleksi (M1 + 25mg/l kanamisin + 50 mg/l cefotaksim dan MM + 25 mg/l kanamisin +25 mg/l cefotaksim) selama 8 minggu. Pengamatan yang dilakukan selama tahap seleksi adalah penghitungan persentase eksplan yang bertahan hidup dalam media seleksi dan eksplan yang mengalami nekrosis. Pengamatan pertumbuhan eksplan *putative* transgenik meliputi panjang tunas terminal dan aksiler serta jumlah tunas majemuk yang terbentuk tiap eksplan.

Berdasarkan pengamatan, eksplan pada seluruh perlakuan mengalami penurunan persentase bertahan hidup pada minggu ke-4 dan terus menurun hingga minggu ke-10. Hal ini menunjukkan terjadinya proses seleksi terhadap eksplan oleh kanamisin yang dipakai sebagai agen penyeleksi eksplan *putative* transgenik. Eksplan yang memiliki kemampuan bertahan hidup paling tinggi adalah eksplan *E. pellita* varietas 006 yang ditransformasi pada umur 15 hari tanpa sonikasi, yaitu sebesar 72% (Tabel 1). Eksplan kemampuan bertahan hidup pada media seleksi paling rendah adalah eksplan *E. pellita* varietas 06A yang ditransformasi pada umur 8 hari dengan tanpa sonikasi, dengan persentase hidup sebesar 0% (Gambar 3).



Gambar 3. Persentase hidup eksplan *putative* transgenik pada pengamatan minggu ke-10.

Berdasarkan pengamatan pada minggu ke-10 tampak bahwa perlakuan sonikasi baik pada eksplan *E. pellita* varietas 006 dan 06A maupun eksplan berumur 8 dan 15 hari, menunjukkan nilai persentase hidup yang lebih rendah dari pada tanpa sonikasi. Hal ini mungkin karena proses sonikasi yang menyebabkan terbentuknya celah mikro pada jaringan tanaman mampu menimbulkan kerusakan mekanik jaringan dan makro molekul (Trick and Finner, 1997). Kerusakan jaringan inilah yang kemungkinan menyebabkan eksplan tidak mampu bertahan hidup pada media seleksi. Variasi umur yang dipakai pada penelitian ini pun memberikan hasil yang berbeda terhadap persentase hidup eksplan transforman. Eksplan yang ditransformasi pada umur 15 hari memberikan persentase hidup yang lebih tinggi daripada umur 8 hari. Hal ini kemungkinan karena sel-sel pada eksplan yang berumur 15 hari lebih mampu merespon keberadaan T-DNA di dalam sel sehingga memudahkan proses integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman. Eksplan yang mampu bertahan hidup dan mengalami pertumbuhan selama berada di media seleksi menunjukkan indikasi awal terjadinya integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman yang ditransformasi. Di dalam T-DNA yang ditransfer ke tanaman terdapat gen resisten terhadap antibiotik kanamisin (*npt II*) sehingga eksplan yang memiliki gen ini mampu bertahan hidup dalam media yang mengandung kanamisin.

Efisiensi transfer T-DNA yang dimediasi oleh *Agrobacterium* tidak hanya tergantung pada keberhasilan pengenalan dan kolonisasi *Agrobacterium* dengan sel tanaman tetapi juga dipengaruhi oleh respon tanaman terhadap infeksi *Agrobacterium*. Sel tanaman memiliki kemampuan untuk mengenali serangan patogen dan aktifitas sinyal pertahanan yang mengawali respon hipersensitif nekrosis. Kematian sel tanaman (nekrosis) merupakan salah satu faktor utama yang mampu menurunkan efisiensi transformasi (Kuta and Tripathi, 2005). Kasus nekrosis pada penelitian ini mulai terjadi setelah pengamatan minggu ke-2.

Menurut Opabade (2006), keberhasilan proses transformasi genetik pada tanaman tidak hanya dipengaruhi oleh faktor dari tanaman sebagai target transformasi saja, tetapi juga dipengaruhi oleh faktor dari *Agrobacterium* sebagai agen pembawa gen yang akan diintegrasikan. *A. tumefaciens* strain LBA4404 mempunyai tingkat virulensi yang rendah, memberikan keberhasilan dan tingkat transgen tereksresi yang cukup tinggi bila dibandingkan dengan strain yang lain. Faktor lain dari *Agrobacterium* yang juga mempengaruhi keberhasilan transformasi adalah densitas dan waktu inokulasi. Kedua faktor ini saling berhubungan satu sama lain, dimana densitas yang tinggi harus diimbangi dengan waktu inokulasi yang singkat sedangkan densitas rendah harus diikuti dengan waktu inokulasi yang lama. Menurut Kuta and Tripathi (2005), waktu inokulasi optimum untuk *Agrobacterium* dengan OD600= 0,7 - 1 adalah 10-15 menit, sedangkan untuk OD600= 0,3 - 0,6 waktu yang optimum adalah 15-30 menit. Bahkan untuk tanaman berkayu, OD600= 0,4 - 0,6 waktu optimum inokulasinya adalah 24-48 jam (Keigo *et al.*, 2003). Densitas *Agrobacterium* yang terlalu tinggi ataupun waktu inokulasi yang terlalu lama dapat

menyebabkan *overgrowth*, nekrosis pada jaringan target, dan menurunkan tingkat keberhasilan transformasi. Karena hal tersebut diatas maka pada penelitian ini dipakai *A. tumefaciens* strain LBA4404 dengan OD600= 1 dan waktu inokulasi selama 15 menit.

Selama perendaman dalam suspensi *Agrobacterium*, terjadi proses pengenalan dan perlekatan *Agrobacterium* ke sel target yang merupakan syarat mutlak untuk transfer DNA menggunakan *Agrobacterium* (Sheng & Chitovsky, 1996). Dalam hal ini sonikasi mampu meningkatkan interaksi antara *Agrobacterium* dengan berbagai jaringan tanaman. Energi yang dihasilkan dari proses sonikasi mampu membentuk celah mikro di permukaan jaringan tanaman (Trick and Finner, 1997). Celah mikro juga menginduksi keluarnya komponen fenolik tanaman yang mampu mengaktifasi *vir-gen* yaitu asetosiringon. Proses sonikasi pada penelitian ini dilakukan selama 1 menit karena proses sonikasi memiliki kelemahan yaitu waktu sonikasi yang terlalu lama dapat menyebabkan kerusakan jaringan (Trick and Finner, 1997) yang akan menurunkan tingkat keberhasilan transformasi.

Efisiensi transformasi dan regenerasi merupakan parameter yang digunakan untuk mengetahui tingkat keberhasilan transformasi genetik pada tanaman. Pada penelitian ini, nilai efisiensi transformasi diperoleh dengan membandingkan antara jumlah eksplan yang bertahan hidup pada media seleksi dengan jumlah eksplan yang dikokultivasi. Sedangkan nilai efisiensi regenerasi diperoleh dengan membandingkan jumlah eksplan yang mampu beregenerasi membentuk tunas baru dengan jumlah eksplan yang mampu bertahan hidup pada media seleksi.

Nilai efisiensi regenerasi tertinggi dimiliki oleh eksplan *E. pellita* varietas 006 yang ditransformasi pada umur 8 hari dengan metode sonikasi, yaitu 78,6%. Sedangkan nilai efisiensi regenerasi terendah dimiliki oleh eksplan *E. Pellita* varietas 06A yang ditransformasi pada umur 8 hari dengan metode non sonikasi, yaitu 0% (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar eksplan *putative* transgenik pada *E. pellita* varietas 006 yang ditransformasi pada umur 8 hari dengan metode sonikasi mampu beregenerasi membentuk tunas baru.

Efisiensi regenerasi menggambarkan kemampuan eksplan *putative* transgenik beregenerasi membentuk tunas. Kemampuan regenerasi eksplan *putative* transgenik karena pengaruh zat pengatur tumbuh (ZPT) yang dipakai dalam media seleksi. Induksi pembentukan tunas, pada penelitian ini dipakai 2 jenis ZPT yaitu golongan auksin (NAA) dan golongan sitokinin (TDZ dan BAP). Efisiensi regenerasi yang cukup tinggi diperoleh pada penelitian ini, namun masih terdapat beberapa eksplan yang terhambat regenerasinya (Gambar 5). Hal tersebut mungkin disebabkan karena pengaruh penggunaan antibiotik yang dipakai pada media seleksi yaitu kanamisin dan cefotaksim. Beberapa penelitian transformasi genetik yang menggunakan antibiotik sebagai agen seleksi dan agen pengeliminasi, melaporkan tingkat pertumbuhan dan daya regenerasi eksplan *putative* transgenik yang rendah, bila dibandingkan dengan kontrol sebagai akibat dari pemakaian antibiotik dalam media seleksi (da Silva, 2001).

Tabel 1. Efisiensi transformasi dan regenerasi *E. pellita* pada berbagai perlakuan pada pengamatan minggu ke-10

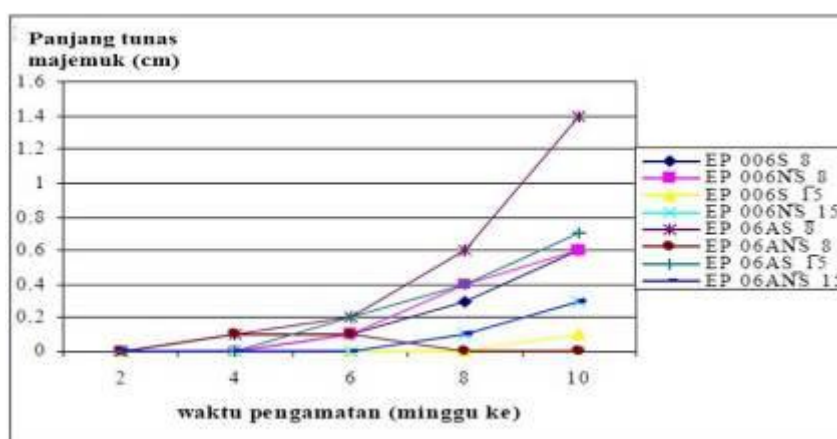
Kode sampel	Umur kecambah (hari)	Perlakuan sampel	Efisiensi Transformasi (%)	Efisiensi Regenerasi (%)
EP 006_8	8	Sonikasi	56	78,60
		Tanpa Sonikasi	56	35,70
EP 006_15	15	Sonikasi	56	7,10
		Non Sonikasi	72	38,90
EP 06A_8	8	Sonikasi	16	75
		Non Sonikasi	0	0
EP 06A_15	15	Sonikasi	44	36,40
		Non Sonikasi	48	50

Perlakuan sonikasi baik untuk umur 8 hari maupun 15 hari pada kedua varietas, memberikan tingkat nekrosis yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan perlakuan non sonikasi. Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan sonikasi memberi pengaruh terhadap kondisi eksplan yang ditransformasi, dimana dalam proses sonikasi terjadi proses pembentukan celah mikro yang mempermudah *Agrobacterium* untuk masuk sampai lapisan dalam jaringan. Jaringan tanaman yang terbuka terhadap *Agrobacterium* menurut Kuta and Tripathi (2005) memacu nekrosis dan kematian sel. Selain itu, proses pembentukan celah menurut Trick and Finner (1997) mampu menyebabkan kerusakan mekanik jaringan dan makromolekul.

Pembentukan tunas baru merupakan hasil dari respon eksplan terhadap ZPT yang terdapat pada media seleksi. Kemampuan untuk merespon ZPT berbeda-beda pada tiap individu. Eksplan *E. pellita* varietas 06A memberikan respon yang diharapkan, lebih baik daripada eksplan varietas 006. Hal ini ditunjukkan dengan dengan rata-rata jumlah dan panjang tunas aksiler yang terbentuk pada eksplan varietas 06A lebih tinggi daripada eksplan varietas 006 (Tabel 2). Respon yang berbeda diberikan oleh eksplan varietas 006, dimana eksplan varietas ini cenderung memperpanjang tunas terminalnya sebagai bentuk respon terhadap ZPT yang terdapat pada media seleksi (Gambar 4).

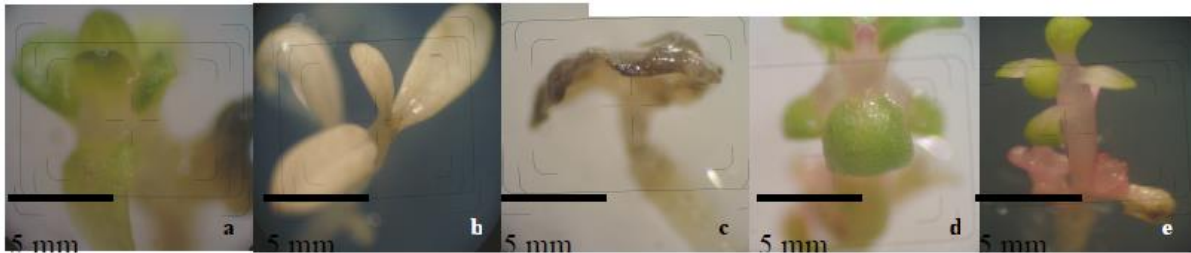
Tabel 2. Kondisi eksplan *putative* transgenik di media seleksi pada minggu ke 10

Varietas	Umur eksplan (hari)	Perlakuan	Jumlah tunas majemuk	Panjang tunas terminal	Panjang tunas majemuk
Control	8	-	15±0.30	2.0±1.17	2.5±0.12
EP006	8	Sonikasi	1.3±0.45	2.1±1.84	0.6±0.28
		Tanpa sonikasi	0.5±0.31	0.7±0.69	0.6±0.13
	15	Sonikasi	0.7±0.03	1.2±0.63	0.1±0.05
		Tanpa sonikasi	1±0.40	1.3±0.62	0.3±0.18
EP 06A	8	Sonikasi	2.3±0.49	1.2±0.23	1.4±0.90
		Tanpa sonikasi	0	0	0
	15	Sonikasi	1.3±0.48	2.1±0.87	0.5±0.22
		Tanpa sonikasi	0.7±0.07	1.8±0.41	0.30±0.36

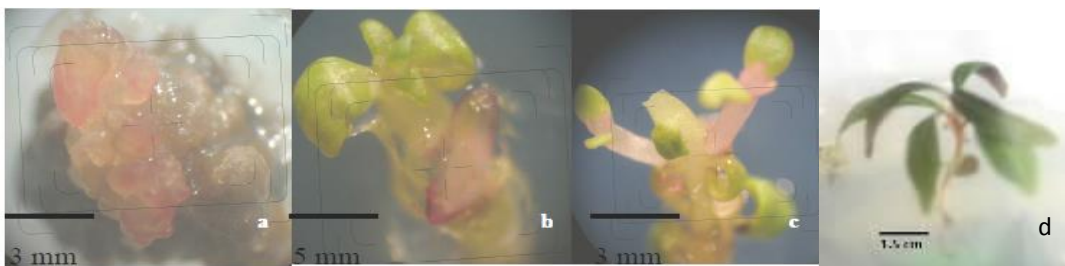


Gambar 4. Pertumbuhan tunas majemuk *putative* transgenik selama 10 minggu pengamatan

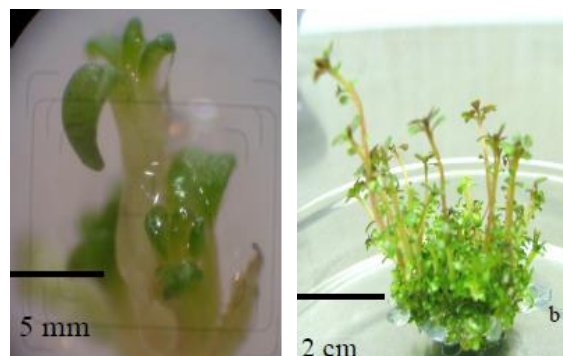
Selama pengamatan tampak bahwa semua eksplan yang ditransformasi masih tampak hijau segar sampai pengamatan minggu ke-2 setelah transformasi. Perubahan morfologi antara eksplan *putative* transgenik dan kontrol mulai tampak pada minggu ke-4 setelah transformasi, dimana eksplan kontrol tidak mengalami pertumbuhan baik pemanjangan tunas terminal maupun pembentukan tunas aksiler. Keadaan ini diikuti dengan terjadinya klorosis sehingga daun menjadi putih (albino) sampai pada akhirnya menjadi coklat, layu dan mati (Gambar 5). Hal ini tampak berbeda dengan eksplan *putative* transgenik yang daunnya tetap berwarna hijau segar, mengalami pemanjangan tunas terminal dan membentuk tunas majemuk (Gambar 6 dan 7).



Gambar 5. Kondisi eksplan hasil transformasi pada media seleksi. a-c: eksplan kontrol (tidak ditransformasi) yang menunjukkan pertumbuhan terhambat (a), mengalami klorosis (b), layu dan mati (c); d-e : eksplan *putative* transgenik yang menunjukkan pertumbuhan baik (d) dan membentuk tunas baru (e).



Gambar 6. Perkembangan eksplan *putative* transgenik pada media seleksi. a. terjadi pembengkakan jaringan dan pembentukan kalus di buku kotiledon, b. terbentuk calon tunas yang berwarna kemerahan, c. tunas baru berwarna hijau, d. Tunas umur 4 bulan

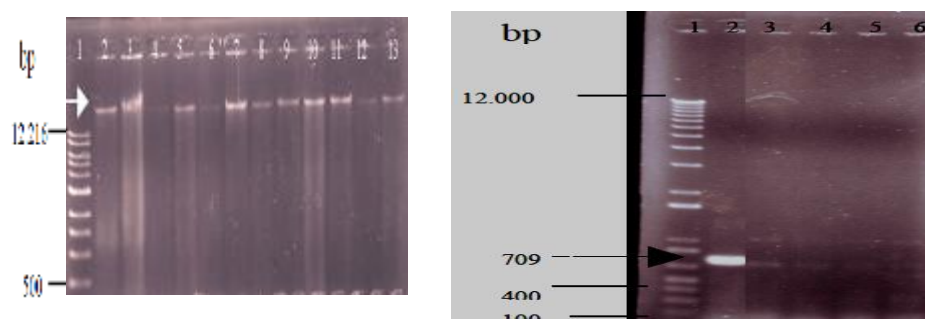


Gambar 7. Pertumbuhan eksplan *putative* transgenik (a) pada media seleksi dan kontrol positif (b)

3.3. Uji integrasi gen

Kriteria kesuksesan transformasi genetik pada tanaman adalah terintegrasi dan terekspresinya gen yang diintroduksi serta tetap terpeliharanya gen tersebut selama regenerasi tanaman (Siswanto dkk., 2003). Analisis integrasi gen bertujuan untuk mengetahui keberhasilan proses transformasi genetik gen xiloglukanase pada eksplan *E. pellita*. Tahap pertama pada proses analisis integrasi gen adalah isolasi DNA genom dari eksplan. Hal ini merupakan tahap penting karena DNA genom hasil isolasi inilah yang akan dipakai sebagai DNA *template* pada proses PCR menggunakan primer spesifik.

Hasil isolasi DNA yang tampak pada Gambar 8a. menunjukkan adanya pita DNA yang diisolasi dari genom *E. pellita*. Proses PCR dilakukan menggunakan primer spesifik untuk gen xiloglukanase (Park *et al.*, 2004). Berdasarkan visualisasi hasil PCR (Gambar 8a), pita DNA berukuran 709 bp. Pita DNA yang tampak tersebut memiliki ukuran yang sama dengan kontrol positif PCR yaitu gen xiloglukanase yang terdapat pada plasmid pAa XEG 300. Adanya sampel yang memiliki pita DNA berukuran 709 bp, menunjukkan transformasi *E. pellita* dengan gen xiloglukanase telah berhasil.



Gambar 8. Hasil uji integrasi gen dengan primer spesifik. a. Isolasi DNA genom. b. Hasil PCR, 1. Marker/ 1kb Plus DNA ladder 2. Plasmid pAa XEG 300, 3-4. *E. pellita* 006 (ditransformasi pada umur 15 hari) dengan sonikasi 5-6. *E. pellita* 006 (ditransformasi pada umur 15 hari tanpa perlakuan sonikasi).

4. Kesimpulan

Perlakuan yang memberikan efisiensi transformasi tertinggi yaitu 72 % adalah eksplan *E. pellita* varietas 006 yang ditransformasi pada umur 15 hari tanpa sonikasi sedangkan efisiensi transformasi terendah dimiliki oleh eksplan *E. pellita* varietas 06A yang ditransformasi pada umur 8 hari tanpa sonikasi, yaitu 0%. Efisiensi regenerasi tertinggi dimiliki oleh eksplan *E. pellita* varietas 006 yang ditransformasi pada umur 8 hari dengan metode sonikasi, yaitu 78,6%. Sedangkan nilai efisiensi regenerasi terendah dimiliki oleh eksplan *E. Pellita* varietas 06A yang ditransformasi pada umur 8 hari dengan metode non sonikasi, yaitu 0%. Analisis PCR dengan primer spesifik untuk gen xiloglukanase menunjukkan adanya integrasi gen. Berdasarkan hasil yang diperoleh, proses sonikasi tidak meningkatkan efisiensi transformasi. Namun demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui durasi waktu sonikasi dan waktu inokulasi yang optimum untuk transformasi genetik terhadap *E. Pellita* menggunakan vector *A. tumefaciens*.

Ucapan terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Prof. Takahisa Hayashi (Kyoto University) untuk kerjasama penelitian transgenesis tanaman kehutanan.

Daftar Pustaka

- Da Silva, J. A. T., and S. Fukai. 2001. The impact of Carbenisilin, Cefotaxime, and Vacomycin on Chrisantemum and Tobbaco TCL Morphogenesis and Agrobacterium Growth. *J. Appl. Hort.* 3: 3-12.
- Hartati S, Sudarmonowati E, Kaku T, Ikegaya H, Kaida R, Baba K, Hayashi T. 2011. Overexpression of xyloglucanase (AaXEG2) accelerates heteroblastic development in mangium leaves. *J Wood Sci* (2011) 57:463–469
- Irwanto. 2006. *Penilaian Kesehatan Tegakan Jati (Tectona grandis) dan Eukaliptus (Eucalyptus pellita) pada Kawasan Hutan Wanagama I*. <http://www.geocities.com/> [4 September 2007].
- Keigo, D., T. Kawazu, and K. Kondo. 2003. Process For Transformation of Mature Trees of Eucalyptus Plants. <http://www.wipo.int> [20 Februari 2008].
- Kuta, D.D., and L. Tripathi. 2005. Review: Agrobacterium induced hypersensitive Necrotic Reaction in plant Cell : A Resistance Response Against Agrobacterium-mediated DNA Transfer. *African J. of Biotech.* 4 : 752-757.
- Labate, T., M.T. Labate, C.A Gonzales, and R. Esteban. 2007. Method for Genetic Transformation of Woody Trees. <http://www.wipo.int> [20 Februari 2008]
- Opabade, J. T. 2006. Review: Agrobacterium-mediated Transformation of Plants : Emerging Factor that Influence Efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review.* 1: 12-20.
- Park, Y.W., B. Kei'ichi, F. Yuzo, L. Ikuho, S. Kazuhiko, A. Motoh, and H. Takahisha. 2004. Enhancement of Growth and Cellulose Accumulation by Overexpression of Xyloglucanase in Poplar. *FEBS letters* 564 (2004):183- 187.
- Pathak, M. R., and R. Y. Hamzah. 2008. An effective Methode of Sonicationassisted Agrobacterium-mediated Transformation of Chick peas. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.*
- Ruiz, R.M., P.A.R. Hilda, L.R. Josa, M.C. Vactor, E. Guitarez, and S.C. Jaime. 2005. Clonal Micropropagation *in vitro* of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Ra ximhai Journal*. <http://www.uaim.edu.mx/>[5 September 2007].
- Sheng, J., and V. Citovsky. 1996. Agrobacterium-Plant Cell DNA Transport : Have Virulence Protein will Travel?. *The Plant Cell.* 8: 1699-1710.
- Siswanto, A., T. Budiani, Caidansari, dan A. Darussamin. 1997. Ekspresi Gen Transien GUS pada Tahap Awal Transformasi Genetik pada Tanaman kopi melalui Agrobacterium tumefaciens. *Prosiding Seminar Perhimpunna Bioteknologi Pertanian Indonesia*. Surabaya. 149-157.
- Trick, H. N., and J. J. Finner.1997. SAAT : Sonication- assisted Agrobacteriummediated Transformation. *Transgenic Research.* 6:329-336.
- Warseno, T. 2008. Transformasi Gen Xiloglukanase pada Beberapa Eksplan Sengon (*Paraserianthes falcataria* L. Nielsen) Melalui *Agrobacterium tumefaciens*. *Skripsi*. Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Wattimena , G.A.1992. *Bioteknologi Tanaman*. PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Fernando S., Goodger J., Saucedo S., Guteres A., Johnson A., Woodrow I. 2016. Plant regeneration through indirect organogenesis and genetic transformation of *Eucalyptus polybractea* R.T. Baker. *Industrial Crops and Products*. Volume 86 73-78