

Transformasi Genetik Kedelai dengan Gen *Proteinase Inhibitor II* Menggunakan Teknik Penembakan Partikel

Saptowo J. Pardal¹, G.A. Wattimena², Hajrial Aswidinnoor², dan M. Herman¹

¹ Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jalan Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

² Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor

ABSTRACT

Genetic Transformation of Soybean Using the *Proteinase Inhibitor II* Gene by the Particle Bombardment Technique. Saptowo J. Pardal, G.A. Wattimena, H. Aswidinnoor, and M. Herman. An experiment was conducted at the Molecular Biology and Genetic Engineering Laboratory of BB-Biogen, Bogor with an objective to obtain transgenic soybean plants containing the *proteinase inhibitor II* (*pinII*) gene. The experiment consisted of three steps, i.e., optimization of the soybean transformation technique using the *gus* gene; transformation of soybean using the *pinII* gene, and molecular analysis of the transformed soybean plants. Two type of explants (young embryo and cotyledon) were bombarded with *pRQ6* plasmid containing the *gus* gene with the following treatment: Helium gas pressure (1100 psi and 1300 psi), shoot distance (5 and 7 cm), and number of bombardment (1x and 2x). The result of *gus* assay indicated that the best bombardment was done on young cotyledon explants with 1100 psi Helium pressure, shoot distance 5 cm, and 1x bombardment. Transformation of the soybean explant using the *pinII* gene (inside the *pTWA* plasmid) was conducted using the best bombardment treatment from the first activity. Two plants from c.v. Willis (WP₁, WP₂) and three plants from c.v. Tidar (TP₁, TP₂, TP₃) were recovered from regeneration and selection of the transformed explants. Molecular analysis of the regenerated plants using the PCR technique showed that only WP₂ contained the *pinII* gene. This plant was fertile and will be used for further evaluation.

Key words: Soybean transformation; *pinII* gene; particle bombardment technique

PENDAHULUAN

Penggerek polong (*Etiella zinckenella* Treitschke) merupakan hama penting kedelai yang masih sulit dikendalikan hingga saat ini (Marwoto *et al.* 1991; Nurdin *et al.* 1995). Pengendalian secara kimiawi yang selama ini dilakukan belum memberikan hasil yang memuaskan dan kurang ramah lingkungan akibat residu yang ditimbulkannya (Nurdin *et al.* 1995). Penggunaan varietas kedelai tahan hama penggerek polong merupakan alternatif pengendalian hama yang lebih murah, efektif, dan

aman terhadap lingkungan, namun menghadapi kendala dengan belum ditemukannya sumber gen ketahanan (Tengkano *et al.* 1985; Nurdin 1984).

Gen *proteinase inhibitor* (*pin*) merupakan gen pengkode senyawa anti nutrisi yang dapat menghambat kerja enzim proteolitik (*proteinase*) di dalam perut serangga (Ryan 1990). *Serine proteinase inhibitors* (*trypsin* dan *kimotrypsin inhibitor*) telah menunjukkan keefektifannya menghambat perkembangan larva beberapa jenis Lepidoptera, di antaranya *Ostrinia nubilalis* (Steffens *et al.* 1978), *Manduca sexta* (Shukle dan Murdock 1983), *Heliothus zea* dan *Spodoptera exigua* (Broadway dan Duffey 1986) dan juga *Helicoverpa armigera* (Johnston *et al.* 1993). Contoh keberhasilan penggunaan gen *proteinase inhibitor* untuk transformasi genetik tanaman antara lain padi oleh Xu *et al.* (1996) dan ubi jalar oleh Newell *et al.* (1995) (dengan gen *trypsin inhibitor cowpea*). Kemudian Johnson *et al.* (1990) menggunakan gen *proteinase inhibitor I* dan *II* pada tanaman tembakau.

Penembakan partikel memungkinkan introduksi DNA asing ke dalam sel atau jaringan hidup secara langsung tanpa harus menumbuhkan sel atau jaringan tersebut terlebih dahulu, sehingga evaluasi ekspresi transien konstruksi gen dapat langsung dilakukan pada jaringan tersebut setelah penembakan (Casas *et al.* 1995). Transformasi genetik melalui penembakan partikel dengan gen pelapor (*reporter gene*) telah dilaporkan pada tanaman pepaya (Fitch *et al.* 1990), padi (Christou *et al.* 1991), rumput (Zhong *et al.* 1991), sorgum (Casas *et al.* 1993), barley (Ritala *et al.* 1994) dan bit gula (Bower *et al.* 1996).

Pada penelitian ini telah dilakukan transformasi genetik tanaman kedelai dengan gen *pinII* menggunakan teknik penembakan partikel untuk mendapatkan tanaman kedelai transforman yang mengandung gen *cryIAb*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian terdiri atas tiga tahap, yaitu (1) optimasi transformasi kedelai dengan gen *gus*, (2) transformasi kedelai dengan gen *pinII*, dan (3) analisis

molekuler tanaman kedelai hasil transformasi. Dua varietas kedelai, yaitu Wilis dan Tidar telah digunakan dalam penelitian transformasi genetik ini.

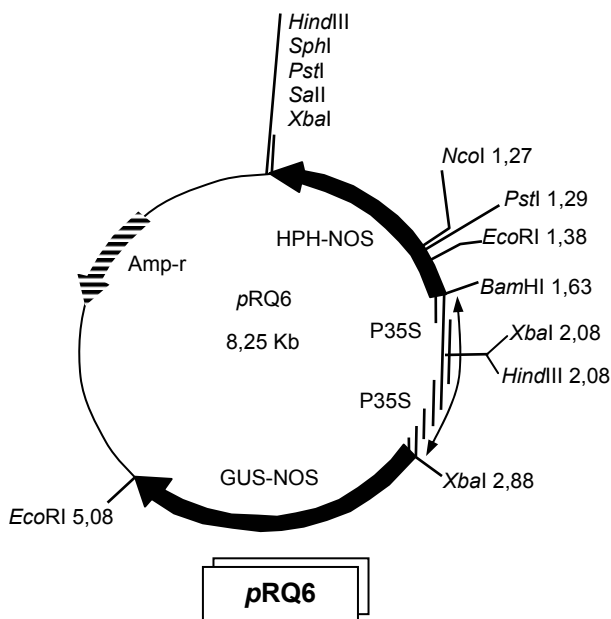
Optimasi Transformasi Kedelai dengan Gen *Gus*

Eksplan kotiledon dan embrio muda kedelai Wilis diisolasi dari polong muda kedelai umur 14-15 hari setelah bunga mekar (*anthesis*). Eksplan selanjutnya diletakkan secara terpisah pada medium osmotikum (MS + vitamin B5 + manitol 45 g/l + sorbitol 45 g/l) yang telah diberi tanda lingkaran penembakan. Setelah 4 jam perlakuan pre-osmotikum, eksplan ditembak dengan plasmid *pRQ6* yang membawa gen *gus* (Gambar 1). Penembakan mengikuti prosedur Klein *et al.* (1988) menggunakan mesin penembak *Biolistic PDS 1000/He* dari Biorad. Perlakuan penem-

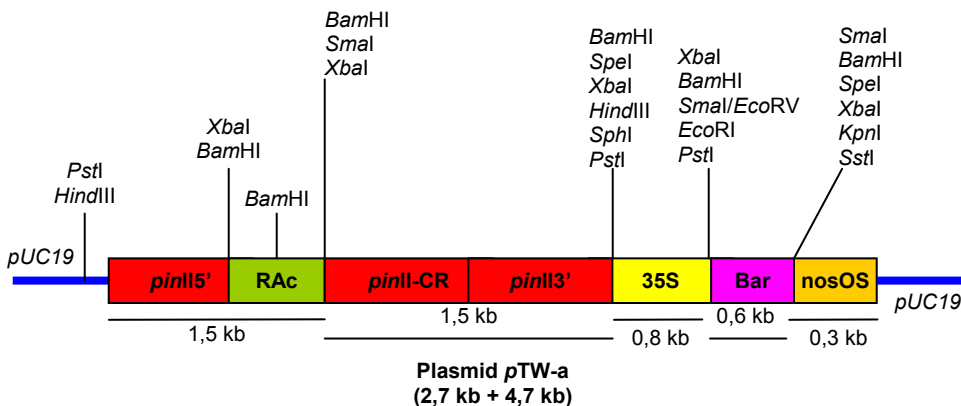
bakan meliputi tekanan gas He (1100 *psi* dan 1300 *psi*), jarak tembak 5 dan 7 cm, dan jumlah tembakan 1 dan 2 kali dengan 30 eksplan untuk setiap petri perlakuan. Eksplan yang telah ditembak dibiarkan pada media osmotikum yang sama selama 12 jam. Selanjutnya eksplan diuji *gus* mengikuti prosedur dari Jefferson (1987).

Transformasi Kedelai dengan Gen *pinII*

Eksplan kotiledon muda yang telah diisolasi dari polong muda diatur di dalam tanda lingkaran tembak pada media osmotikum. Setelah 4 jam perlakuan pre-osmotikum eksplan ditembak dengan plasmid *pTWa* yang membawa gen *pinII* dan gen *bar* (Gambar 2). Kotiledon yang telah ditembak dibiarkan pada medium osmotikum selama 12 jam untuk perlakuan



Gambar 1. Peta plasmid *pRQ6* yang membawa gen *gus* dan *hph*.



Gambar 2. Peta plasmid *pTWa* yang membawa gen *pinII* dan gen *bar*.

post-osmotikum. Selanjutnya kotiledon dipindahkan ke medium penyembuhan sel (*recovery*), yaitu medium I₁ (Pardal *et al.* 1997) yang terdiri dari medium MS + vitamin B5 + NAA 10 mg/l + L-glutamin 30 mg/l + L-asparagin 30 mg/l + sukrosa 5 mg/l atau medium MS + vitamin B5 tanpa hormon. Kultur disimpan di ruang kultur gelap selama 1 minggu.

Eksplan kotiledon muda dipindahkan ke medium seleksi I, yaitu medium I₁ ditambah 3 mg/l herbisida Basta^R (untuk seleksi gen *bar*). Empat sampai enam minggu kemudian, eksplan yang tumbuh di media seleksi dan mengalami embriogenesis dipindahkan ke medium seleksi II, yaitu medium I_{1.1} (medium I₁ dengan kadar NAA 1 mg/l) ditambah 3 mg/l Basta. Selanjutnya embrio somatik yang dihasilkan dipisahkan dari eksplan kotiledon, lalu dikembalikan pada medium G₀ (MS + vitamin B5 + GA₃ 0,1 mg/l). Planlet hasil perkecambahan dipindahkan ke medium ½ MS + vitamin B5 + IBA 1 mg/l untuk inisiasi perakaran yang lebih baik selama 2-3 minggu. Kemudian planlet segera diaklimatisasikan ke media tanah.

Analisis Molekuler Tanaman Kedelai Hasil Transformasi

Analisis secara molekuler dimaksudkan untuk mengetahui keberhasilan proses transfer gen *pinII* pada tanaman kedelai hasil transformasi. Daun tanaman kedelai hasil transformasi (R₀) diisolasi DNA total menggunakan prosedur *miniprep* dari ICI Seeds Co. (Listanto *et al.* 1996). Selanjutnya 4 µl sampel DNA dimasukkan ke dalam tabung PCR 0,5 ml. Kemudian ditambah dengan 2,5 µl 10x bufer PCR (Promega), 2 µl campuran dNTPs (2,5 mM setiap dNTP, Promega), 1 µl masing-masing primer untuk *pinII*, 10,33 µl ddH₂O dan 0,175 µl *Taq polymerase* (total volume 25 µl). Selanjutnya sampel di PCR dengan program, yaitu

inisiasi denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit (tahap 1), denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit (tahap 2), *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit (tahap 3), pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit (tahap 4). Tahap 2-4 diulang sebanyak 35 siklus, dan tahap 5 adalah inkubasi pada suhu 72°C selama 5 menit.

Kemudian masing-masing sampel hasil PCR diambil 21 µl untuk dicek di agarosa gel 1% bersamaan dengan sampel DNA tanaman kontrol dan DNA standar. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan UV dan difoto dengan film polaroid. Data berupa pita-pita DNA dianalisis berdasarkan ada tidaknya DNA *pin II* sebesar 600 bp (pasang basa).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Transformasi Kedelai dengan Gen *Gus*

Data persentase *gus* positif pada eksplan embrio dan kotiledon muda kedelai varietas Wilis hasil transformasi melalui penembakan partikel dengan plasmid *pRQ6* yang mengandung gen *gus* disajikan pada Tabel 1 dan 2. Kedua jenis eksplan kompeten untuk transformasi dengan gen *gus*. Eksplan embrio muda memberikan persentase *gus* positif yang lebih baik daripada kotiledon muda. Namun bercak (spot) biru banyak terletak pada bagian jaringan kotiledon yang ikut terpotong, bukan pada mata tunas (apikal), sehingga apa-bila tunas diregenerasikan kemungkinan tidak membawa gen *gus*.

Pada percobaan ini tekanan gas He yang terbaik untuk penembakan partikel adalah 1100 *psi*. Tekanan gas 1300 *psi* kemungkinan terlalu tinggi, sehingga partikel emas menembus melewati jaringan eksplan dan partikel menyebar lebih luas dan jatuh di luar lingkaran tembak. Jumlah tembakan dua kali memberikan persentase bercak biru lebih banyak

Tabel 1. Persentase *gus* positif pada eksplan embrio muda kedelai Wilis hasil transformasi dengan penembakan partikel.

Tekanan gas He	Jumlah eksplan	Jarak tembak 5 cm		Jarak tembak 7 cm	
		1 kali tembakan	2 kali tembakan	1 kali tembakan	2 kali tembakan
1100 <i>psi</i>	30	16 (53,3%)	25 (83,3%)	12 (40%)	17 (56,7%)
1300 <i>psi</i>	30	14 (46,7%)	24 (80%)	10 (33,3%)	16 (53,3%)

Tabel 2. Persentase *gus* positif pada eksplan kotiledon muda kedelai Wilis hasil transformasi dengan penembakan partikel.

Tekanan gas He	Jumlah eksplan	Jarak tembak 5 cm		Jarak tembak 7 cm	
		1 kali tembakan	2 kali tembakan	1 kali tembakan	2 kali tembakan
1100 <i>psi</i>	30	13 (43,3%)	20 (66,7%)	9 (30%)	15 (50%)
1300 <i>psi</i>	30	11 (36,7%)	19 (63,3%)	8 (26,7%)	12 (40%)

daripada satu ka-li, walaupun satu kali tembakan juga sudah menghasilkan bercak biru yang cukup baik. Jarak tembak 5 cm menghasilkan bercak biru yang lebih baik dari jarak 7 cm. Hal ini dapat dijelaskan bahwa semakin jauh jarak tembak akan memperlebar bidang sebaran partikel dan mengurangi kecepatan partikel emas, sehingga persentase partikel mengenai target/eksplan menjadi kecil.

Seperti ditunjukkan pada penelitian ini, transformasi kedelai dengan gen reporter *gus* melalui penembakan partikel memberikan hasil yang cukup baik. Hal ini ditunjukkan dengan adanya hasil uji *gus* yang positif pada semua perlakuan penembakan yang digunakan, baik pada eksplan embrio maupun kotiledon muda (Tabel 1 dan 2). Eksplan embrio muda memberikan persentase *gus* positif yang lebih tinggi daripada kotiledon muda. Namun, spot biru yang terjadi pada embrio muda terletak pada bagian bekas potongan kotiledon dan sedikit pada ujung calon akar, bukan pada bagian calon tunas/apikal (Gambar 3). Hal ini kurang diharapkan, karena menurut *Finer et al.* (1996) untuk keberhasilan dan efisiensi transformasi, DNA harus diintroduksi ke dalam sel-sel yang kompeten untuk diregenerasikan menjadi tanaman, tetapi pada beberapa pengalaman sangat sulit untuk menargetkan DNA pada sel-sel yang kompeten tersebut.

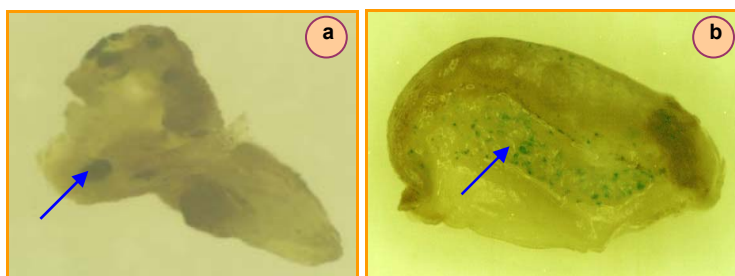
Keberhasilan transformasi genetika melalui penembakan partikel dipengaruhi oleh faktor biologi (sel atau jaringan target) dan faktor fisik (alat penembak) (*Casas et al.* 1995). Faktor fisik di antaranya adalah jarak tembak, jumlah tembakan, kombinasi berat, dan ukuran partikel emas, jumlah DNA per tembakan, tekanan gas He dan temperatur ruang biolistik diduga juga mempengaruhi keberhasilan proses transfer gen. Pada penelitian ini ditunjukkan bahwa jarak tembak 5 cm lebih baik daripada 7 cm. Hal ini dapat dipahami karena semakin jauh jarak tembak semakin kecil kecepatan partikel dan semakin luas/lebar sebaran partikel emas (*microprojectile*), sehingga semakin kecil persentase mengenai target. Demikian juga dengan

jumlah tembakan, semakin banyak tembakan akan semakin memperbesar kemungkinan mengenai target. Namun perlu diingat bahwa semakin banyak tembakan juga akan memperbesar kerusakan sel atau jaringan target oleh partikel emas, sehingga kemungkinan kematian sel-sel target akan semakin besar pula.

Hal ini juga terjadi pada hasil penelitian ini, dimana pada perlakuan tembakan dua kali menghasilkan *gus* positif lebih banyak daripada satu kali tembakan (Tabel 1 dan 2). Namun demikian, dengan memper-timbangkan tingkat kerusakan sel target akibat dua kali tembakan dan dihubungkan dengan daya regenerasi-sinya, maka untuk transformasi selanjutnya lebih disarankan menggunakan satu kali tembakan. Selain lebih memperkecil tingkat kerusakan sel-sel target, hal ini juga akan menghemat biaya yang digunakan (mengingat harga emas dan perlengkapan untuk penembakan sangat mahal). Dari hasil tersebut, maka penelitian transformasi kedelai selanjutnya disarankan menggunakan eksplan kotiledon muda sebagai target transformasi, karena diharapkan embrio somatik dapat tumbuh dari sel-sel kotiledon yang telah tertransformasi dan kompeten untuk beregenerasi.

Selain jarak dan jumlah tembakan, ukuran partikel emas juga cukup penting diperhatikan. Semakin besar ukuran partikel tentunya akan memperbesar kerusakan pada dinding sel-sel target yang ditembus. Namun sebaliknya, apabila ukuran partikel semakin kecil juga akan memperkecil kemampuan untuk menembus dinding sel dan semakin mudah menyebar (berdispersi), sehingga efisiensi mengenai target semakin kecil. Untuk itu, pada penelitian ini digunakan kombinasi dua ukuran partikel besar dan kecil, yaitu 1 dan 1,6 μm agar efektif dan efisien dalam penembakan sel target.

Faktor lain yang juga menentukan keberhasilan penembakan adalah besarnya tekanan gas helium. Tekanan gas ini sangat penting di dalam menghantarkan partikel yang telah diselubungi plasmid/DNA menu-



Gambar 3. Foto hasil uji *gus* pada eksplan kedelai hasil transformasi. a dan b = spot biru pada eksplan embrio dan kotiledon muda hasil transformasi melalui penembakan partikel.

ju jaringan target. Besarnya tekanan akan berhubungan dengan jarak tembak dan ukuran partikel, sehingga ketiga faktor ini harus dicari yang sesuai untuk jenis target yang akan digunakan. Pada penelitian ini dico-bakan dua macam tekanan gas helium, yaitu 1100 dan 1300 *psi*. Dari Tabel 1 dan 2 ditunjukkan bahwa tekanan gas helium 1100 *psi* lebih baik daripada 1300 *psi*. Hal ini membuktikan bahwa semakin besar tekanan gas ternyata tidak memberikan hasil transformasi yang baik. Kemungkinan, semakin besar tekanan gas akan mempercepat laju partikel emas dan oleh kawat penyepit (*stopping screen*) akan didispersikan lebih luas semburannya, sehingga partikel banyak jatuh di luar bidang/lingkaran tembak (tidak mengenai jaringan target).

Transformasi Kedelai dengan Gen *PinII*

Tabel 3 dan 4 menyajikan data hasil regenerasi dan seleksi eksplan kotiledon muda kedelai hasil transformasi I dan II menggunakan teknik penembakan partikel pada media seleksi yang mengandung Basta 3 mg/l. Pada transformasi I, sebanyak 134 eksplan kotiledon muda Wilis yang ditembak hanya menghasilkan 46 embrio somatik (34,3%) dan embrio ini hanya berkembang menjadi 1 tanaman dan diberi kode WP₁ (Tabel 3). Sedangkan pada Tidar, dari 456 eksplan yang ditembak menghasilkan 150 embrio somatik (32,9%). Tetapi embrio tersebut hanya mampu berkembang menjadi 3 tanaman regenerasi (TP₁, TP₂, TP₃). Pada transformasi II, dari 1140 eksplan kotiledon muda kedelai Wilis dihasilkan 59 embrio somatik (5,2%). Embrio ini hanya berkembang menjadi 4

planlet dan 1 tanaman dan diberi kode WP₂ (Tabel 4). Tanaman ini selanjutnya dipelihara hingga dewasa dan bijinya dikeringkan untuk pengujian lebih lanjut.

Pada varietas Tidar, transformasi I sebanyak 456 eksplan yang ditembak menghasilkan 150 (3,3%) embrio somatik, namun akhirnya hanya diperoleh 3 tanaman (0,7%) yang diberi kode TP₁, TP₂, dan TP₃. Kemudian, pada transformasi II sebanyak 1307 eksplan yang ditembak menghasilkan 174 embrio somatik (13,3%). Dari embrio tersebut dapat dihasilkan 11 planlet tetapi semuanya gagal diaklimatisasi, sehingga tidak satupun tanaman dapat dihasilkan (0%). Kegagalan proses aklimatisasi sangat merugikan, karena kemungkinan di antara kesebelas planlet tersebut ada yang telah tersisipi gen *pinII* mengingat planlet tersebut berasal dari embrio somatik yang telah lolos di media seleksi Basta 3 mg/l. Sebetulnya metode aklimatisasi yang digunakan merupakan metode terbaik hasil percobaan sebelumnya pada planlet bukan hasil transformasi, namun ternyata metode ini kurang berhasil diterapkan pada planlet kedelai hasil transformasi.

Pemilihan eksplan sebagai jaringan target dalam transformasi merupakan salah satu faktor penting, karena akan berpengaruh terhadap keberhasilan proses transformasi (Hiei *et al.* 1994). Christou dan Cabe (1992) mengatakan bahwa eksplan yang dibutuhkan sebagai target transformasi melalui penembakan partikel sebaiknya yang bersifat embriogenik, karena aktivitas pembelahan selnya sangat tinggi/aktif sehingga diharapkan sel tersebut dapat bertahan hidup setelah mengalami tekanan selama proses

Tabel 3. Hasil regenerasi dan seleksi tanaman dari eksplan kotiledon muda kedelai Wilis dan Tidar hasil penembakan tahap I dengan plasmid *pTW-a* yang mengandung gen *pinII* dan *bar*.

Varietas	Jumlah eksplan	Jumlah embrio somatik	Jumlah planlet	Jumlah tanaman	Kode tanaman
Wilis transformasi	134	46 (34,3%)	2 (1,5%)	1 (0,8%)	WP ₁
Wilis non transformasi + Basta 3 mg/l	30	1 (3,3%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Wilis non transformasi tanpa Basta	30	50 (166,6%)	30 (100%)	10 (33,3%)	WPO ₁₋₁₀
Tidar transformasi	456	150 (3,3%)	3 (0,7%)	3 (0,7%)	TP _{1-TP₃}
Tidar non transformasi + Basta 3 mg/l	30	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Tidar non transformasi tanpa Basta	30	65 (216,7%)	46 (153,3%)	15 (50%)	TPO ₁₋₁₅

Tabel 4. Regenerasi dan seleksi tanaman dari eksplan kotiledon muda kedelai Wilis dan Tidar hasil penembakan tahap II dengan plasmid *pTW-a* yang mengandung gen *pinII* dan gen *bar*.

Varietas	Jumlah eksplan	Jumlah embrio somatik	Jumlah planlet	Jumlah tanaman	Kode tanaman
Wilis transformasi	1140	59 (5,2%)	4 (0,4%)	1 (0,1%)	WP ₂
Wilis non transformasi + Basta 3 mg/l	200	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Wilis non transformasi tanpa Basta	200	105 (52,5%)	54 (27%)	18 (9%)	WPO ₁₁₋₂₈
Tidar transformasi	1307	174 (13,3%)	11 (0,8%)	0 (0%)	-
Tidar non transformasi + Basta 3 mg/l	200	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
Tidar non transformasi tanpa Basta	200	146 (73%)	72 (36%)	20 (10%)	TPO ₁₆₋₃₅

penembakan. Hasil penelitian Sato *et al.* (1993) menunjukkan bahwa jaringan embriogenik kedelai lebih responsif dibandingkan tunas meristematis terhadap penembakan partikel. Hal ini dibuktikan dengan berhasilnya regenerasi jaringan embriogenik kedelai menjadi tanaman. Pada tanaman kedelai transformasi dengan metode penembakan partikel menggunakan eksplan embriogenik telah banyak dilakukan, misalnya Christou dan Swain (1990), Finer dan Mc Mullen (1991), dan Sato *et al.* (1993).

Eksplan kotiledon muda kedelai yang digunakan dalam penelitian transformasi ternyata menunjukkan respon regenerasi yang tidak begitu memuaskan, di mana dari sekian banyak eksplan yang ditembak dengan gen *pinII* hanya sebagian kecil yang dapat bertahan hidup dan mengalami embriogenesis di media seleksi I maupun II (Tabel 3 dan 4). Rendahnya daya regenerasi dari eksplan hasil transformasi penembakan ini kemungkinan besar disebabkan oleh adanya kerusakan dinding sel eksplan akibat tembakan partikel emas (*microprojectile*). Pada umumnya sel tanaman dapat memperbaiki kerusakan akibat tembakan partikel, namun pada beberapa kondisi penembakan dapat pula mengakibatkan terjadinya kematian sel target yang disebut *collateral damage*. Dengan menggunakan makroprojektil dan piringan penyeting (*stopping screen*), kecepatan partikel yang cukup untuk transfer gen kadang-kadang menyebabkan kerusakan pada jaringan target akibat terjadinya fragmentasi makroprojektil, semburan udara dan mungkin juga kejutan suara. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya areal kerusakan/kematian sel (*zone death*) yang berbatasan dengan area di mana frekuensi ekspresi sementara tinggi (Klein *et al.* 1988). Pada kultur fenomena ini ditunjukkan dengan adanya perubahan warna eksplan dari kuning kehijauan menjadi putih pucat dan akhirnya menjadi kering/mati.

Untuk mempercepat proses penyembuhan luka akibat tembakan eksplan hasil transformasi biasanya dipindahkan ke media penyembuhan yang berisi media dasar tanpa hormon atau media regenerasi tanpa senyawa/agen penyeleksi. Perlakuan media osmotikum tinggi sebelum dan sesudah penembakan juga sering digunakan untuk membantu atau mengkondisikan sel-sel eksplan sehingga mudah ditembus partikel dan aman untuk penembakan (sedikit kerusakan). Osmotikum akan mengurangi volume vacuola dan tekanan turgor (Birch dan Bower 1994). Tekanan turgor yang rendah dapat meningkatkan kemampuan sel untuk bertahan hidup setelah penembakan (Birch dan Franks 1991; Sanford *et al.* 1993; Klein 1995). Pengaruh kerusakan akibat tembakan pada jaringan

target terhadap daya regenerasi eksplan transforman dapat dilihat dari hasil transformasi kedelai pada penelitian ini. Eksplan yang tidak ditembak dan langsung diregenerasikan pada media regenerasi, ternyata memberikan persentase embrio somatik yang cukup tinggi (Tabel 3 dan 4).

Penyebab lain rendahnya daya regenerasi eksplan transforman adalah adanya senyawa/agen penyeleksi (antibiotik/herbisida) pada media regenerasi. Sel yang tidak mengandung gen ketahanan terhadap antibiotik/herbisida tentunya akan terseleksi dan mati, sebaliknya sel eksplan yang telah tertransformasi gen ketahanan terhadap antibiotik/herbisida akan lolos seleksi dan tumbuh terus membentuk embrio somatik. Dari hasil regenerasi dan seleksi eksplan kotiledon muda kedelai hasil transformasi dengan plasmid *pTW-a* yang membawa gen *pinII* dan gen seleksi *bar* (untuk herbisida Basta) pada media regenerasi yang diberi Basta 3 mg/l diperoleh data bahwa persentase embrio somatik yang dihasilkan sangat kecil. Hal ini menunjukkan adanya proses seleksi terhadap sel-sel eksplan. Sebaliknya pada eksplan kontrol (non transformasi) yang ditumbuhkan pada media regenerasi yang mengandung Basta 3 mg/l ternyata hampir semua eksplan mati (terseleksi). Namun eksplan yang ditumbuhkan pada media regenerasi saja (tanpa Basta), ternyata dapat tumbuh baik dan menghasilkan embrio somatik yang banyak. Artinya bahwa kadar Basta 3 mg/l sudah cukup efektif untuk menyeleksi sel-sel transforman.

Persentase tingkat keberhasilan transformasi kedelai menggunakan metode penembakan partikel sangat kecil. Pada penelitian pertama transformasi kedelai, Christou *et al.* (1988) bahkan belum berhasil memperoleh tanaman transforman. Pada penelitian ini berhasil diperoleh beberapa embrio somatik transforman, namun pada perkembangan selanjutnya, embrio berkembang menjadi planlet/tanaman. Hal ini disebabkan oleh respon eksplan kedelai yang sangat rendah terhadap manipulasi kultur *in vitro* (Finer *et al.* 1996).

Secara umum, hasil transformasi menunjukkan bahwa varietas Tidar lebih baik daripada Wilis dalam membentuk embrio somatik, walaupun embrio yang terbentuk berukuran kecil-kecil (Gambar 4b), sehingga pada tahap pendewasaan banyak mengalami kegagalan menjadi planlet. Kemungkinan juga karena embrio tersebut terhambat pertumbuhannya oleh Basta, sehingga tidak mampu tumbuh menjadi planlet (embrio tidak mengandung gen *bar*). Sebaliknya, dari eksplan kotiledon muda varietas Wilis hanya diperoleh embrio somatik sedikit sekali, tetapi

bentuknya normal (Gambar 4d), sehingga dapat dikecambahkan menjadi planlet dan berhasil diaklimatisasikan dengan baik menjadi tanaman (Gambar 5c). Pada kontrol negatif, yaitu eksplan yang tidak ditransformasi dan ditumbuhkan pada media regenerasi tanpa seleksi, embrio somatik tumbuh dengan baik dan sebagian besar menjadi planlet dan tanaman.

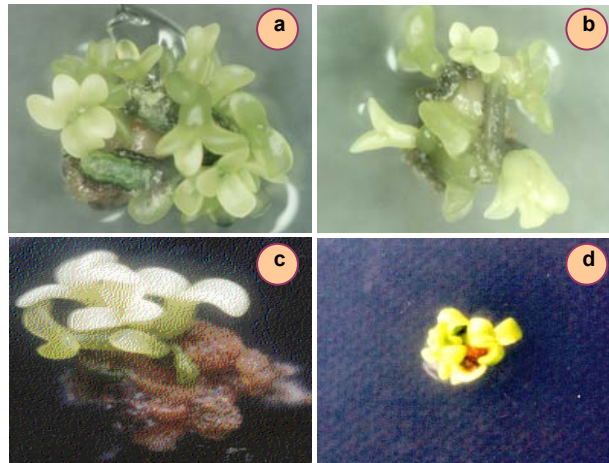
Planlet hasil perkecambahan pada media G₀, selanjutnya dipindahkan ke media perakaran untuk menginduksi pembentukan sistem perakaran yang sempurna (Gambar 5a). Planlet ini kemudian dikeluarkan dari tabung kultur untuk proses aklimatisasi pada media tanah dalam pot kecil (Gambar 5b). Setelah tanaman tumbuh dengan baik di pot, tanaman dipindahkan ke pot yang lebih besar dan dipelihara di rumah kaca terbatas (FUT) hingga dewasa (Gambar 5c).

Aklimatisasi merupakan tahapan yang paling kritis dan sulit dalam proses regenerasi tanaman secara *in vitro*. Tahapan ini memerlukan pengalaman dan

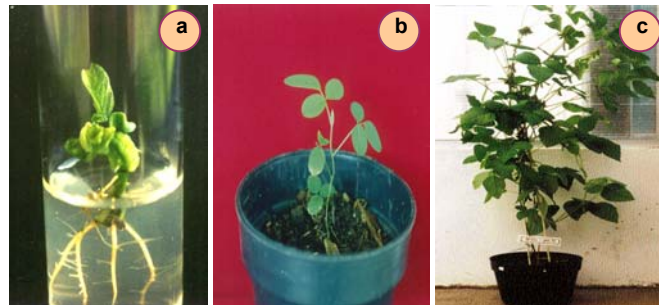
pe-nanganan yang cukup hati-hati, karena aklimatisasi adalah mengadaptasikan planlet hasil kultur *in vitro* ke media tanah di ruangan terbuka. Aklimatisasi planlet kedelai hasil regenerasi *in vitro* telah dicoba dengan beberapa metode dan metode aklimatisasi yang cukup baik adalah secara hidroponik. Namun demikian, pada kenyataannya proses aklimatisasi planlet hasil transformasi pada penelitian ini banyak yang mati setelah diaklimatisasi (Tabel 4). Kematian planlet kemungkinan disebabkan oleh kondisi planlet yang kurang vigor (jumlah akar sedikit dan kecil). Kemungkinan lain adalah kondisi tanah dalam pot yang kurang baik (terlalu kering/basah). Satu planlet kedelai hasil transformasi yang dapat diaklimatisasikan dengan baik pada percobaan ini, karena planlet memiliki akar yang banyak dan besar/kuat (Gambar 5a).

Analisis Molekuler Tanaman Kedelai Hasil Transformasi

Sebanyak dua tanaman kedelai R₀ dari eksplan



Gambar 4. Pertumbuhan embrio somatik dari eksplan kotiledon muda kedelai varietas Wilis dan Tidar hasil transformasi menggunakan teknik penembakan partikel pada media seleksi yang mengandung Basta 3 mg/l. a = eksplan kontrol varietas Tidar, b = eksplan varietas Tidar transforman, c = eksplan kontrol varietas Wilis, d = eksplan varietas Wilis transforman.



Gambar 5. Hasil perkecambahan embrio somatik dan aklimatisasi tanaman kedelai varietas Wilis hasil transformasi Penembakan. a = planlet hasil perkecambahan, b = aklimatisasi di pot, c = tanaman kedelai varietas Wilis (WP₂) di rumah kaca terbatas (FUT).



Gambar 6. Hasil PCR sampel DNA tanaman kedelai R₀ hasil tranformasi dengan gen *pinII* menggunakan teknik penembakan partikel. M = 1kb; 1 = air; 2-4 = TP₁, TP₂, TP₃; 5-6 = WP₁ dan WP₂; 7 = Tidar non transformasi; 8 = Wilis non transformasi; 9 = gen *pinII* (600 bp).

varietas Wilis (WP₁ dan WP₂) dan tiga tanaman dari eksplan varietas Tidar (TP₁-TP₃) telah dihasilkan dari transformasi melalui penembakan partikel. Kelima tanaman tersebut selanjutnya diambil daunnya untuk diisolasi DNA dan dideteksi gen *pinII* dengan teknik PCR. Hasil PCR menunjukkan bahwa hanya satu sampel tanaman yang menghasilkan pita DNA berukuran 600 bp (pasang basa), yaitu dari tanaman WP₂, sedangkan pada sampel lainnya negatif (Gambar 6). Hal ini berarti dari lima tanaman kedelai hasil transformasi hanya satu tanaman yang mengandung gen *pinII*. Meskipun kelima tanaman ini lolos dari medium seleksi yang mengandung herbisida Basta 3 mg/l, kemungkinan besar empat tanaman yang negatif terhindar (*escaped*) dari seleksi Basta. Hal ini dapat terjadi karena pada seleksi menggunakan medium padat, sehingga tidak semua bagian eksplan bersentuhan langsung dengan media. Embrio somatik yang tumbuh dari bagian yang tidak menempel pada media seleksi masih dapat tumbuh terus menjadi tanaman utuh tanpa mengalami seleksi.

KESIMPULAN

1. Transformasi tanaman kedelai dengan gen *pinII* berhasil dilakukan menggunakan teknik Penembakan Partikel pada varietas Wilis, sehingga diperoleh satu tanaman transforman WP₂ yang mengandung gen *pinII*.
2. Teknik transformasi yang digunakan adalah penembakan partikel dengan gen *pinII* yang dibawa oleh *Agrobacterium tumefaciens* dengan plasmid *pTWA* dengan tekanan gas He 1100 psi, jarak tembak 5 cm dan dua kali penembakan pada eksplan kotiledon muda kedelai.

DAFTAR PUSTAKA

- Birch, R.G. and T. Frank. 1991.** Development and optimization of microprojectile system for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:453-496.
- Birch, R.G. and R. Bower. 1994.** Principles of gene transfer using particle bombardment. *In* Sun-Yang, N. and P. Christou (Eds.). *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer.* Oxford Univ. Press. New York.
- Bower, R., A.R. Elliot, B.A.M. Potier, and R.G. Birch. 1996.** High-efficiency, microprojectile-mediated cotransformation of sugarcane, using visible or selectable markers. *Mol. Breed.* 2:239-249.
- Broadway, R.M. and S.S. Duffey. 1986.** The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 32:673-680.
- Casas, A.M., A.K. Konowiz, U.B. Zehr, D.T. Tomes, J.D. Axtell, L.G. Butier, R.A. Bressan, and P.M. Hasegawa. 1993.** Transgenic sorghum plant via microprojectile bombardment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:11212-11216.
- Casas, A.M., R.A. Bressan, and P.M. Hasegawa. 1995.** Cereal transformation through particle bombardment. *In* Janick, J. (Ed.). *Plant Breeding Rev.* John Willey and Sons Inc.
- Christou, P., D.E. Mc Cabe, and W.F. Swain. 1988.** Stable transformation of soybean calus by DNA-coated gold particles. *Plant Physiol.* 87:671-674.
- Christou, P. and W.F. Swain. 1990.** Cotransformation frequencies of foreign genes in soybean cell cultures. *Theor. App. Genet.* 79:337-341.
- Christou, P., T.L. Ford, and M. Kofron. 1991.** Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous

- DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technol.* 9: 957-962.
- Christou, P. and D.E. Mc. Cabe. 1992.** Prediction of germ-line transformation events in chimeric Ro transgenic soybean plantlets using tissue-specific expression patterns. *Plant J.* 2:283-290.
- Finer, J.J. and M.D. Mc Mullen. 1991.** Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 27: 175-182.
- Finer, J.J., T.S. Cheng, and D.P.S. Verma. 1996.** Soybean Transformation: Technologies and progress. *In Verma, D.P.S. and R.C. Shoemaker (Eds.). Soybean: Genetics, Molecular Biology and Biotechnology. Biotechnology in Agriculture No. 14. CAB International.*
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari, and T. Kumashiro. 1994.** Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA. *J. Plant* 6(2):271-282.
- Jefferson, R.A. 1987.** Assaying chimeric genes in plants: The *gus* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405.
- Johnson, R., J. Narvaez, Ang, and C.A. Ryan. 1990.** Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defence against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 86: 9871-9875.
- Johnston, K.A. J.A. Gatehouse and J.H. Anstee. 1993.** Effect of soybean proteinase inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol.* 39:657-664.
- Klein, T.M., M. Fromm, A. Weissinger, D. Tomes, S. Scahaa, M. Sletten, and J. Sanford. 1988.** Transformation of maize cells using high velocity microprojectile. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:4305-4309.
- Klein, T. 1995.** Biolistic transformation system. *In Potrykus, I and G. Spangenberg (Eds.). Gene Transfer to Plants. Springer Lab manual, USA. p. 115-117.*
- Larocque, A.M. dan J.G. Houseman. 1990.** Effect of ingested soybean, ovomucoid and corn protease inhibitors on digestive processes of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *J. Insect. Physiol.* 36:691-697.
- Listanto, E., S.J. Pardal, and K. Wang. 1996.** A simple method of DNA isolation from transgenic maize plant for polymerase chain reaction. *Indones. J. Agric. Biotechnol.* (1)1:33-38.
- Marwoto, E., Wahyuni, dan K.E. Neering. 1991.** Pengelolaan pestisida dalam penengendalian hama kedelai secara terpadu. Monograf Balittan Malang No. 7. Balai Penelitian Tanaman Pangan Malang. 38 hal.
- Newell, C.A., J.M. Lowe, A. Merryweather, L.M. Rooke, and W.D.O. Hamilton. 1995.** Transformation of sweet potato (*Ipomea batatas* [L.] Lam.) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. *Plant Sci.* 107:215-227.

- Nurdin, F. 1984.** Efficacy of insecticides against pod borers (*Etiella* spp.) on soybean. Seminar at SARIF, Sukarami-Sumatera Barat. 10 p.
- Nurdin, F., F. Artati, dan Atman. 1995.** Hama penggerek polong kedelai (*Etiella* spp.). Biologi, serangan dan pengendaliannya. Buletin Teknik Sukarami 8:9-18.
- Pardal, S.J., D.R. Untari, A. Sisharmini, D. Rijadi, dan M. Herman. 1997.** Regenerasi kedelai secara *in vitro*. Prosiding Seminar Perhimpunan Bioteknologi Pertanian Indonesia. hlm. 27-38.
- Ritala, A., K. Aspregen, U. Kurten, M.S. Martilla, L. Mannonen, R. Hannus, V. Kauppinen, T.H. Teeri, and T.M. Enari. 1994.** Fertile transgenic barley by particle bombardment of immature embryos. Plant Mol. Biol. 24:315-317.
- Ryan, C.A. 1990.** Proteinaseinhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 28:425-449.
- Sanford, J.C., F.D. Smith, and J.A. Russell. 1993.** Optimizing the biolistic process during different biological applications. Methods Enzymol. 217:483-509.
- Sato, S., C. Newell, K. Kolacz, L. Tredo, J.J. Finer and M. Hinchee. 1993.** Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. Plant Cell Rep. 12:408-413.
- Shukle, R.H. and L. Murdock. 1983.** Lipoxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybean: effects on larvae growth of *Manduca sexta* (*Eleusine coracae* Geartu). Environ. Entomol. 12:787-791.
- Steffens, R., F.R. Fox, and Kassell. 1978.** Effect of trypsin inhibitors on growth and metamorphosisof corn borer larvae, *Ostrinia nubilalis* (Hubner). J. Agric. Food Chem. 26:170-174.
- Tengkano, W. and M. Suhardjan. 1985.** Jenis hama utama pada berbagai fase pertumbuhan tanaman kedelai. Dalam. Somaatmadja, S., M. Ismunadji, Sumarno, M. Syam, S.O. Manurung, dan Yuswadi (Eds.). Kedelai. Puslitbangtan, Badan Litbang Pertanian.
- Xu, D., Q. Xue, D. Mc Elroy, Y. Mawal, V.A. Hilder, and R. Wu. 1996.** Constitutive expression of cowpea trypsin inhibitor gene, *CpTi*, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. Mol. Breed. 2:167-173.
-