

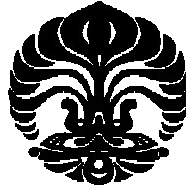
UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI DAN VALIDASI UJI HIGROMISIN PADA
TANAMAN PISANG (*Musa acuminata* Colla [AA]) KULTIVAR
LAMPUNG HASIL TRANSFORMASI MENGGUNAKAN GEN
hpt (*HYGROMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE*)**

SKRIPSI

**PUTRI SANDY PANGESTU
0706264192**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**



UNIVERSITAS INDONESIA

**OPTIMASI DAN VALIDASI UJI HIGROMISIN PADA
TANAMAN PISANG (*Musa acuminata* Colla [AA]) KULTIVAR
LAMPUNG HASIL TRANSFORMASI MENGGUNAKAN GEN
hpt (*HYGROMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE*)**

SKRIPSI


Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains

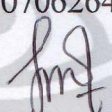
**PUTRI SANDY PANGESTU
0706264192**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
DEPARTEMEN BIOLOGI
DEPOK
JULI 2011**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri, dan
semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.



Nama : Putri Sandy Pangestu
NPM : 0706264192
Tanda Tangan : 
Tanggal : 7 Juli 2011

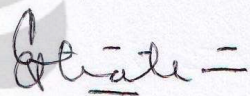
HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Putri Sandy Pangestu
NPM : 0706264192
Program Studi : S1 Biologi
Judul Skripsi : Optimasi dan Validasi Uji Higromisin pada Tanaman Pisang (*Musa acuminata* Colla [AA]) Kultivar Lampung Hasil Transformasi menggunakan Gen *hpt* (*hygromycin phosphotransferase*)

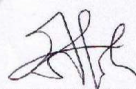
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi S1 Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI


Pembimbing I : Dr. Amy Estiati

()

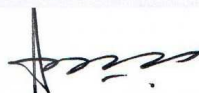
Pembimbing II : Dr. Andi Salamah

()

Penguji I : Dra. Dian Hendrayanti, M.Sc.

()

Penguji II : Dr. Anom Bowolaksono

()

Ditetapkan di : Depok
Tanggal : 7 Juli 2011

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan hanya kepada Allah SWT atas semua nikmat, rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini. Shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Nabi Muhammad SAW, Sang Rahmat bagi semesta alam. Penulisan skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains Departemen Biologi pada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Begitu banyak bantuan moril dan material serta bimbingan dari berbagai pihak yang tidak dapat diungkapkan hanya dengan kata-kata. Walau demikian, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. Ami Estiati dan Dr. Andi Salamah selaku Pembimbing I dan II yang telah membimbing dan membantu penulis dalam penelitian dan penulisan skripsi ini. Terima kasih atas segala bimbingan, doa, dukungan, perhatian, semangat, dan saran sehingga penulis dapat menuntaskan skripsi ini.
2. Dra. Dian Hendrayanti, M.Sc., Dr. Anom Bowolaksono, Dra. Lestari Rahayu, M.Sc. dan Dr. Abinawanto selaku Penguji, serta Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. selaku Ketua Sidang, atas segala saran dan perbaikan-perbaikan, dukungan, dan doa yang diberikan kepada penulis untuk pembuatan dan perbaikan skripsi ini.
3. Dr. Wellyzar Sjamsuridzal, M.Sc selaku Pembimbing Akademis atas segala kasih sayang dan saran-saran, serta semangat yang selalu diberikan.
4. Dr. Anom Bowolaksono, M.Sc. selaku Koordinator Seminar, Dr.rer.nat. Mufti P. Patria, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi FMIPA UI, Dra. Nining Betawati Prihantini, M.Sc. selaku Sekretaris Departemen, Dra. Titi Soedjiarti, S.U. selaku Koordinator Pendidikan, dan segenap staf pengajar atas ilmu pengetahuan yang telah diberikan kepada penulis selama berada di Biologi. Tak lupa penulis ucapkan terima kasih kepada Dr. Nisyawati, Dr. Upi Chairunnisa, Mega Atria, M.Si, dan Dimas Haryo Perdana. Terima kasih

pula kepada Mbak Asri, Ibu Ida, dan seluruh karyawan Departemen Biologi FMIPA UI, atas segala bantuan yang telah diberikan.

5. Kepala Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. Terima kasih kepada Dr. Satya Nugroho selaku kepala Lab. Biologi Molekular kel. Padi, Ibu Ida, Ibu Enung, Pak Agus, Pak Dadang, Pak Nana, Mbak Ade, Mbak Wi, Mbak Yeni, Mbak Carla, Mbak Eva, Mbak Yuli, Mbak Vincent, Mbak Icha, Uni Fat, Mbak Angki, Mbak Lidya, Mbak Eva, Teh Siti, Mbak Desti, Ika, Stela, Mas Eman, Mas Jun dan Mas Iril, atas bantuan dalam mendapatkan data, ilmu, dan dukungan yang sangatlah besar.
6. Keluarga tercinta, Papa dan Mama atas kasih sayang, cinta, dukungan, semangat, nasihat, dan doa yang selalu diberikan kepada penulis. Untuk Agung, Inuk, Pram, dan Mbak ipah atas keceriaan dan perhatian, serta doa yang telah diberikan dan seluruh keluarga di Palembang atas segala bantuan, semangat, dan doa yang telah diberikan kepada penulis.
7. Sahabat terbaik Naba, Gitaw, Tewe, Pepep, Merry, Tiara, Uthie, Bibil, Fika, , Ade, Iik, Arty, Niar, Ine, Karno, Wahyu, Bayu, Eja, Kymbod, Piko, Januar, Ekal, Doni, Akam, CT HIMBIO 09, CT BEM FMIPA UI 10, COMATA UI, CANOPY, SIGMA B UI dan seluruh teman-teman di Laboratorium Genetika Biologi UI, serta *all* BLOSSOM 07. Terima kasih juga buat Iqbal 06, K Rani 06, K Rika 06, K Prety 06, Ninit 09, CECEBOK 09, Fajar 09, Papaw 09, Heru 09, *all* Biosentris 08 dan Zygomorphic 09.
8. Sahabat Tercinta Ika Puspitasari, Fitri Nuzululhayati, Suci Sekar Dini dan Ayi Awaluddin atas dukungan, bantuan, keceriaan, doa, dan semangat yang telah diberikan kepada penulis.

Akhir kata, penulis memohon maaf jika terdapat kesalahan dan kekhilafan. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi para perkembangan ilmu pengetahuan.

Juli 2011

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Putri Sandy Pangestu
NPM : 0706264192
Program Studi : Biologi S1 Reguler
Departemen : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

“Optimasi dan Validasi Uji Higromisin pada Tanaman Pisang (*Musa acuminata* Colla [AA]) Kultivar Lampung Hasil Transformasi menggunakan Gen *hpt* (*Hygromycin Phosphotransferase*)”

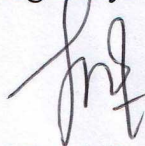
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan karya ilmiah saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Depok

Pada tanggal : 7 Juli 2011

Yang menyatakan



Putri Sandy Pangestu

ABSTRAK

Nama : Putri Sandy Pangestu
Program Studi : S1 Biologi
Judul : Optimasi dan Validasi Uji Higromisin pada Tanaman Pisang (*Musa acuminata* Colla [AA]) Kultivar Lampung Hasil Transformasi Menggunakan Gen *hpt* (*Hygromycin Phosphotransferase*)

Penelitian untuk mengetahui konsentrasi higromisin optimum untuk seleksi tanaman hasil transformasi telah dilakukan. Optimasi menggunakan higromisin 30 ppm dengan waktu seleksi 3 minggu dan 50 ppm dengan waktu seleksi 2 minggu menunjukkan bahwa semua tunas dapat bertahan hidup pada medium seleksi. Analisis PCR, uji histokimia GUS dan uji higromisin pada daun tanaman sebagai uji validasi menunjukkan bahwa tidak semua tanaman yang bertahan hidup pada medium seleksi menunjukkan keberadaan gen *hpt* dalam tanaman dan mengekspresikannya. Hasil kolerasi ketiga uji validasi menunjukkan konsentrasi higromisin 50 ppm memberikan persentase kepercayaan seleksi tanaman lebih baik (61,61%) dibandingkan konsentrasi 30 ppm (33,33%). Penggunaan konsentrasi 50 ppm dengan waktu seleksi lebih dari dua minggu dapat digunakan untuk meminimalkan lolosnya tanaman nontransgenik.

Kata kunci : gen *hpt*, *Musa acuminata* Colla [AA], PCR, transformasi, uji higromisin, uji histokimia GUS.
xiii + 76 hlm : 22 gambar; 5 tabel
Daftar Referensi : 60 (1989--2011)

ABSTRACT

Name : Putri Sandy Pangestu
Study Program : S1 Biology
Title : Optimization and Validation Hygromycin Test on Banana (*Musa acuminata* Colla [AA]) Cultivar Lampung Resulted from Transformation Using *hpt* (*Hygromycin Phosphotransferase*) Gene

Study to determine the optimum concentration of hygromycin for plant selection resulted from transformation has been done. Optimization using hygromycin at 30 ppm for 3 weeks and 50 ppm for 2 weeks showed that all plants can survive on hygromycin selection medium. PCR analysis, GUS histochemical assay and hygromycin assay in plant leaves as a validation test proved that not all survival plants showed the presence of *hpt* gene in the plant genome and expressed. Hygromycin concentration at 50 ppm gave better reliability of plant selection (61,61 %) than concentration at 30 ppm. The use of hygromycin concentration at 50 ppm with duration more than 2 weeks should be done to minimize non-transgenic plants escape.

Keywords : *hpt* gene, hygromycin assay, GUS histochemical assay, *Musa acuminata* Colla [AA], PCR, transformation.
xiii + 76 pages : 22 pictures; 5 tables
Bibliography : 60 (1989--2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Tanaman Pisang Kultivar Lampung (<i>Musa acuminata</i> Colla (AA))....	4
2.1.1 Taksonomi Tanaman Pisang Kultivar Lampung.....	4
2.1.2 Kultivar Tanaman Pisang.....	5
2.1.3 Karakteristik Morfologi Tanaman Pisang Kultivar Lampung....	6
2.2 Produksi Tanaman Pisang Transgenik melalui Proses Transformasi...	9
2.2.1 Tanaman Transgenik.....	9
2.2.2 Teknik Transformasi Tanaman <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
2.2.2.1 Syarat-syarat Transformasi melalui <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
2.2.3 Transformasi melalui <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pada Tanaman Pisang.....	12
2.3 Seleksi Tanaman Transgenik.....	12
2.3.1 Jenis-jenis Seleksi Tanaman Transgenik.....	12
2.3.2 Seleksi Resistensi terhadap Antibiotik.....	13
2.3.2.1 Resistensi terhadap Antibiotik Higromisin.....	14
2.3.2.1.1 Gen <i>Hygromycin Phosphotransferase (hpt)</i> ...	14
2.3.2.1.2 Antibiotik Higromisin.....	15
2.4 Regenerasi melalui Kultur Jaringan.....	16
2.4.1 Mikropropagasi.....	16
2.4.1.1 Kultur Tunas Pucuk (<i>Shoot Tip Culture</i>).....	17
2.5 Uji Validasi.....	18
2.5.1 Isolasi DNA tanaman.....	18
2.5.2 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	19
2.5.3 Elektroforesis.....	21
2.5.4 Uji Histokimia GUS.....	21
2.5.5 Uji Higromisin pada Daun Tanaman.....	22

3. METODE PENELITIAN	23
3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian	23
3.2 Sampel	23
3.3 Bahan	23
3.3.1 Primer.....	23
3.3.2 Larutan, <i>Buffer</i> , dan Bahan Kimia.....	23
3.4 Peralatan.....	24
3.5 Cara Kerja	25
3.5.1 Kultur Tanaman Pisang Hasil Transformasi Menggunakan metode Kultur Tunas Pucuk.....	25
3.4.1.1 Inisiasi Tunas.....	25
3.4.1.1.1 Penanaman <i>Corm</i>	25
3.4.1.1.2 Pemindahan Eksplan dari Cawan Petri ke Botol Gelas.....	26
3.4.1.2 Perbanyak Tunas	
3.4.1.2.1 Penanaman Tunas.....	26
3.4.1.2.2 Subkultur Tunas.....	26
3.5.2 Uji Higromisin.....	27
3.5.2.1 Rancangan Penelitian.....	27
3.5.2.2 Pemulihan Tunas dan Aklimatisasi.....	28
3.5.3 Uji Validasi.....	29
3.5.3.1 Isolasi DNA Tanaman Pisang.....	29
3.5.3.3.1 Persiapan Eksplan.....	29
3.5.3.3.2 Isolasi DNA.....	29
3.5.3.2 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) dan Elektroforesis	30
3.5.3.2.1 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	30
3.5.3.2.2 Elektroforesis Gel	31
3.5.3.2.2.1 Persiapan Aparatus Elektroforesis	31
3.5.3.2.2.2 <i>Loading</i> Sampel dan <i>Running</i> Elektroforesis.....	31
3.5.3.2.2.3 Dokumentasi Gel.....	32
3.5.3.3 Uji Histokimia GUS.....	32
3.5.3.4 Uji Higromisin pada Daun Tanaman.....	32
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
4.1 Kultur Tanaman Pisang Hasil Transformasi Menggunakan metode Kultur Tunas Pucuk.....	33
4.2 Uji Higromisin.....	35
4.3 Uji Validasi.....	42
4.3.1 Isolasi DNA.....	42
4.3.2 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) dan Elektroforesis.....	43
4.3.3 Uji Histokimia GUS.....	44
4.3.4 Uji Higromisin pada Daun Tanaman.....	47
4.3.5 Korelasi Hasil Uji Validasi.....	49
5. KESIMPULAN DAN SARAN	55
5.1 Kesimpulan	55
5.2 Saran	55



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.2(1).	Jalur perkembangan tanaman pisang yang dapat dimakan.....	6
Gambar 2.1.2(2).	Karakter pembeda tanaman pisang genom A dan B.....	7
Gambar 2.1.3.	Karakteristik tanaman pisang (<i>M. acuminata</i> Colla) kultivar lampung.....	9
Gambar 2.2.2.	Induksi tumor pada tanaman oleh <i>A. tumefaciens</i>	11
Gambar 2.3.2.	Seleksi tanaman menggunakan antibiotik.....	14
Gambar 2.3.2.1.1.	Peta gen <i>hygromycin phosphotransferase</i>	15
Gambar 2.3.2.1.2.	Antibiotik higromisin.....	16
Gambar 2.4.1.1.	Tunas pucuk tanaman.....	17
Gambar 2.5.2.	Suhu proses PCR.....	20
Gambar 2.5.4.	Pembentukan CIBr-indigo.....	22
Gambar 4.1.	Kultur tunas pucuk tanaman pisang transgenik.....	34
Gambar 4.2(1).	Tunas tanaman pisang transgenik pada medium seleksi selama 1 minggu.....	36
Gambar 4.2(2).	Tunas tanaman pisang transgenik pada medium seleksi selama 2 minggu.....	37
Gambar 4.2(3).	Tunas tanaman pisang transgenik pada medium seleksi selama 3 minggu.....	38
Gambar 4.2(7).	Kontaminasi pada tunas tanaman pisang kultivar lampung transgenik.....	40
Gambar 4.2(8).	Hasil aklimatisasi tunas tanaman pisang kultivar lampung transgenik hasil uji higromisin.....	41
Gambar 4.3.1.	Hasil Elektroforesis DNA tanaman pisang kultivar lampung.....	43
Gambar 4.3.2.	Hasil uji histokimia GUS pada tanaman hasil uji higromisin.....	45
Gambar 4.3.3.	Hasil uji higromisin pada daun tanaman.....	48

DAFTAR TABEL

Tabel 3.5.3.4.1(1). Komponen-komponen reaksi PCR.....	30
Tabel 3.5.3.4.1(2). Program PCR.....	31
Tabel 4.3.6(1). Hasil uji higromisin pada medium seleksi dengan konsentrasi 30 ppm dan uji validasinya (uji histokimia GUS, uji higromisin pada daun tanaman, PCR).....	50
Tabel 4.3.6(2). Hasil uji higromisin pada medium seleksi dengan konsentrasi 50 ppm dan uji validasinya (uji histokimia GUS, uji higromisin pada daun tanaman, PCR).....	51
Tabel 4.3.6(3). Hasil perhitungan nilai kepercayaan seleksi (<i>reliability of selection</i>).....	52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Penelitian.....	62
Lampiran 2. Stok Pembuatan Media.....	63
Lampiran 3. Komposisi <i>Buffer</i> Isolasi DNA.....	67
Lampiran 4. Komposisi Bahan Kimia dan Cara Pembuatan Larutan, <i>Buffer</i> , dan Medium yang digunakan	69

BAB 1 PENDAHULUAN

Tanaman pisang merupakan salah satu tanaman penting di negara tropis dan subtropis, termasuk Indonesia. Tanaman pisang terutama buahnya, disukai dan banyak dimanfaatkan oleh masyarakat Indonesia. Hal tersebut disebabkan oleh kelebihan yang dimiliki buah pisang, yaitu mudah diperoleh dengan harga murah, dan umumnya dapat langsung dikonsumsi tanpa perlu diolah. Selain itu juga, buah pisang memiliki kandungan gizi yang cukup tinggi (Kumar *dkk.* 2007: 534; Suyanti & Supriyadi 2008: 15).

Ketersediaan tanaman pisang untuk memenuhi kebutuhan masyarakat Indonesia telah cukup terpenuhi. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya fakta bahwa Indonesia merupakan salah satu negara yang memproduksi tanaman pisang sebanyak 6,20 % dari total produksi dunia dan 50 % dari produksi di daerah Asia (Suyanti & Supriyadi 2008: 8). Namun, ketersediaan tanaman pisang yang telah tercukupi belum diimbangi dengan kualitas tanaman yang cukup baik. Kualitas tanaman tersebut terkait dengan ketahanan terhadap kekeringan, hama penyakit, dan lain-lain. Permasalahan kualitas tanaman pisang tersebut dapat diatasi dengan cara perbaikan sifat tanaman (Kumar *dkk.* 2007: 534).

Upaya perbaikan sifat pada berbagai jenis kultivar pisang dapat diupayakan secara konvensional dan rekayasa genetik. Perbaikan sifat tanaman secara konvensional secara nyata telah memberikan hasil yang baik, namun masih terdapat kendala yang harus diatasi, yaitu siklus hidup tanaman pisang lama, buah tidak menghasilkan benih dan benih buah bersifat steril. Ketiga kendala tersebut dapat ditanggulangi dengan melakukan perbaikan sifat tanaman melalui rekayasa genetik. Salah satunya dengan melakukan transformasi gen pada tanaman pisang (Kumar *dkk.* 2007: 535).

Transformasi gen pada tanaman pisang dapat dicapai melalui transformasi secara langsung (elektroporasi, prosedur *microprojectile bombardment*) maupun tidak langsung (penggunaan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*). Transformasi melalui *Agrobacterium* secara luas telah digunakan untuk peningkatan kualitas tanaman pisang, karena transformasi tersebut memiliki efisiensi tinggi dengan

biaya rendah dan dapat mentransfer fragmen DNA yang sangat besar melalui proses pemulihan yang minimal (Yonghong *dkk.* 2006: 80--81).

Transformasi tanaman pisang yang diperantarai *Agrobacterium tumefaciens* memiliki beberapa syarat penting, salah satunya adalah uji seleksi tanaman yang telah ditransformasikan dengan menggunakan antibiotik sebagai agen seleksi (Newbury 2003: 107). Kegunaan seleksi tersebut pada proses transformasi adalah untuk mengetahui tingkat keberhasilan transformasi (Sreeramanan *dkk.* 2006: 189). Antibiotik yang diketahui sebagai agen seleksi yang paling potensial yang dapat digunakan pada transformasi tanaman pisang adalah higromisin. Higromisin dengan konsentrasi rendah diketahui mampu menghambat pertumbuhan dan membunuh tanaman pisang nontransgenik. Penghambatan pertumbuhan tersebut dapat terlihat jelas dari fenotip eksplan pada kultur tanaman pisang (Sreeramanan *dkk.* 2006: 193).

Optimasi konsentrasi agen seleksi perlu dilakukan pada seleksi tanaman hasil transformasi. Optimasi tersebut bertujuan untuk menentukan konsentrasi agen seleksi optimal yang dibutuhkan untuk membunuh seluruh tanaman yang tidak berhasil ditransformasi (Sreeramanan *dkk.* 2006: 189--190). Penggunaan agen seleksi yang optimal dapat membuat proses transformasi menjadi lebih ekonomis (Newbury 2003: 107)

Penelitian mengenai transformasi dan proses optimasi pada tanaman pisang telah banyak dilakukan. Salah satu contohnya adalah transformasi pisang rasthali (AAB) menggunakan gen *hpt* (*hygromycin phosphotransferase*). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa higromisin merupakan agen seleksi yang paling potensial untuk transformasi tanaman pisang dan konsentrasi yang paling efektif untuk membunuh tanaman yang tidak berhasil ditransformasikan adalah 50 ppm (Maziah *dkk.* 2007: 505; Sreeramanan *dkk.* 2009: 28).

Penelitian mengenai transformasi dan optimasi uji higromisin untuk transformasi tanaman pisang (*Musa acuminata* Colla [AA]) kultivar lampung dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* menggunakan gen *hpt* telah dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari enam konsentrasi higromisin yang digunakan (0, 20, 30, 40, 50 dan 60 ppm) berdasarkan hasil seleksi pada media kultur dan uji statistik menunjukkan konsentrasi 30 ppm

selama 3 minggu dan 50 ppm selama 2 minggu merupakan konsentrasi yang paling baik untuk digunakan pada uji higromisin. Hasil tersebut belum divalidasi sehingga belum diketahuinya konsentrasi yang paling tepat untuk digunakan pada uji seleksi tanaman pisang hasil transformasi. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk menentukan konsentrasi yang paling tepat untuk digunakan pada uji higromisin. Penentuan konsentrasi tersebut dapat dilakukan dengan cara melakukan optimasi seleksi lanjutan menggunakan antibiotik higromisin dengan dua konsentrasi yang paling potensial dan uji validasi pada tanaman hasil seleksi menggunakan analisis PCR yang didukung dengan uji histokimia GUS dan uji higromisin pada daun tanaman (Maziah *dkk.* 2007: 505; Mulyaningsih *dkk.* 2010: 64).

Penelitian bertujuan untuk mengetahui konsentrasi higromisin yang paling tepat untuk digunakan pada uji higromisin tanaman hasil transformasi dan mengetahui keberadaan gen *hpt* dalam genom tanaman serta ekspresinya. Hipotesis penelitian yang diajukan adalah konsentrasi 50 ppm yang digunakan pada optimasi seleksi higromisin merupakan konsentrasi yang paling tepat untuk digunakan pada uji seleksi tanaman pisang kultivar lampung hasil transformasi. Penelitian merupakan tahap awal untuk pembuatan *edible vaccine* dengan melakukan transformasi gen *HBsAg* pada tanaman pisang kultivar lampung menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Pisang Kultivar Lampung (*Musa acuminata* Colla [AA])

Tanaman pisang merupakan tanaman herba yang berasal dari Asia Tenggara dan telah menyebar luas ke seluruh dunia. Tanaman pisang pun diketahui menjadi tanaman penting di negara tropis dan subtropis. Tanaman pisang terdiri atas berbagai jenis kultivar. Sebagian besar kultivar pisang yang dibudidayakan pada umumnya tidak memiliki biji (*parthenocarpy*) sehingga perkembangbiakannya dilakukan secara vegetatif (Suyanti & Supriyadi 2008:15; Surono & Himawan 2010: 3).

2.1.1 Taksonomi Tanaman Pisang Kultivar Lampung

Nama marga *Musa* berasal dari nama arab “*banan*” yang berarti “jari” dan diaplikasikan sebagai penghormatan terhadap ilmuwan fisika Antonius Musa yang diberikan oleh kaisar pertama Romawi Octavius Augustus. Marga “*Musa*” tersebut pertama kali dipublikasi secara ilmiah oleh C. Linnaeus pada tahun 1753 dalam buku “*Spesies Plantarum, The origin of Modern Botanical Nomenclature*”. Tanaman yang berasal dari genus tersebut yang dipublikasikan oleh Linnaeus tersebut adalah *Musa paradisiaca* Linn dan selanjutnya Linnaeus mempublikasikan jenis pisang lain pada tahun 1759 dalam buku” *Systema Naturae*”, yaitu *Musa sapientum* (Valmayor dkk. 2000: 2).

Tanaman pisang kultivar lampung berdasarkan taksonominya dapat diklasifikasikan, sebagai berikut :

Kerajaan	:	Plantae
Divisi	:	Spermatophyta
Sub Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Liliopsida
Bangsa	:	Zingiberales

Suku : Musaceae
Marga : *Musa*
Jenis : *Musa acuminata* Colla (AA)

(USDA 2011: 3; Plantlist 2010: 1)

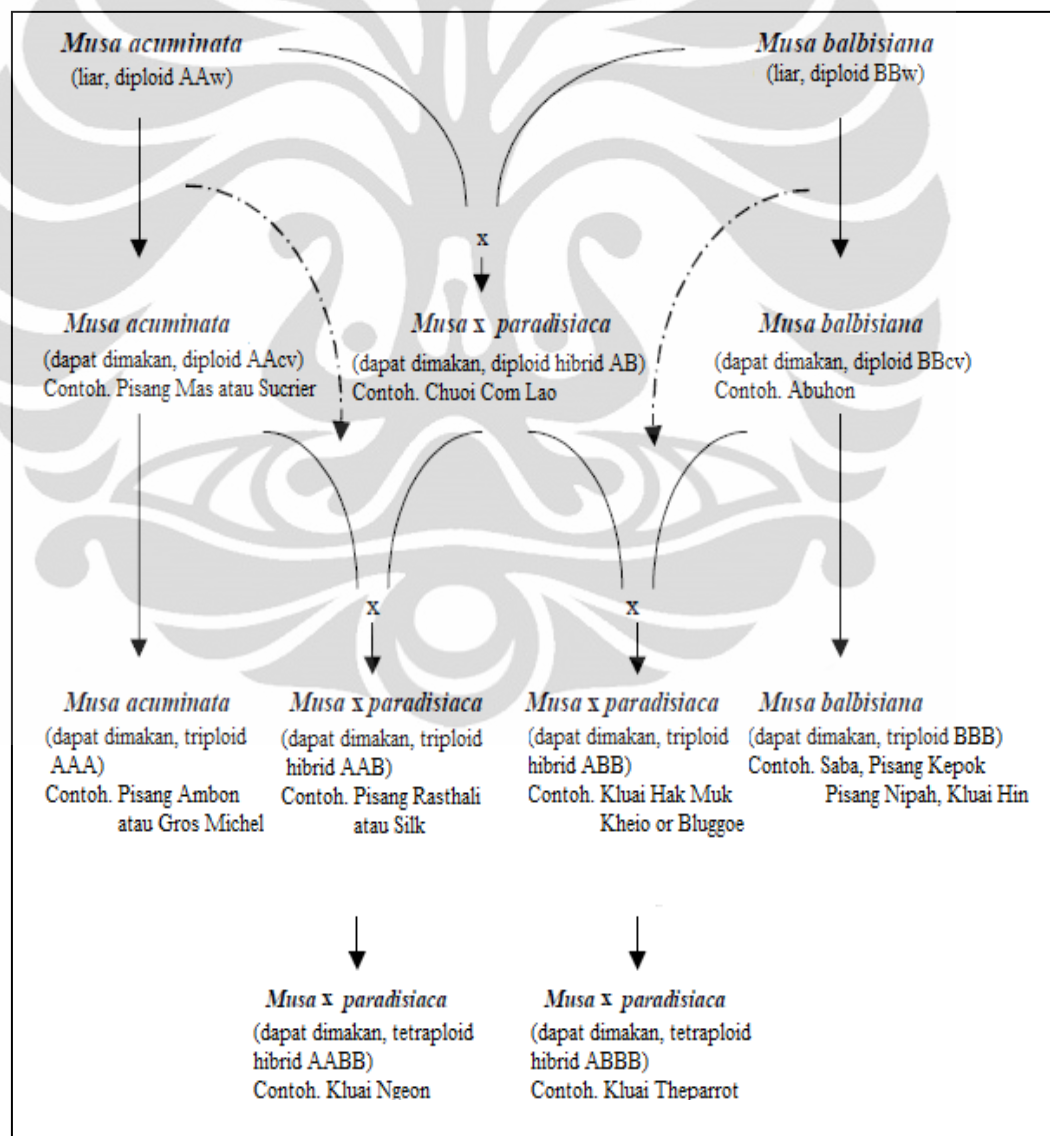
2.1.2 Kultivar Tanaman Pisang

Tanaman pisang berdasarkan taksonominya termasuk ke dalam kelompok *Eumusa*. Kelompok tersebut merupakan kelompok terbesar dalam marga *Musa* dan memiliki persebaran geografis yang luas. Kultivar pisang dari kelompok tersebut paling banyak berasal dari dua spesies diploid (liar), yaitu *Musa acuminata* (genom AA) dan *Musa balbisiana* (genom BB) (Gambar 2.1.2(1)). Kultivar yang berasal dari kelompok genom AA memiliki karakteristik yang berbeda dari genom BB. Karakteristik tersebut dapat dilihat pada bagian upih batang semu, susunan ovul, bentuk bunga, dan braktea (Gambar 2.1.2(2)). Kultivar tanaman pisang yang dapat dimakan diklasifikasikan berdasarkan kontribusi relatif dari kedua spesies tersebut. Kultivar tanaman pisang tersebut terdiri dari kelompok genom AA, BB, AB, AAA, AAB, ABB, BBB, AABB, dan ABBB (Valmayor *dkk.* 2000: 4--6; Arvanitoyannis *dkk.* 2008: 1872).

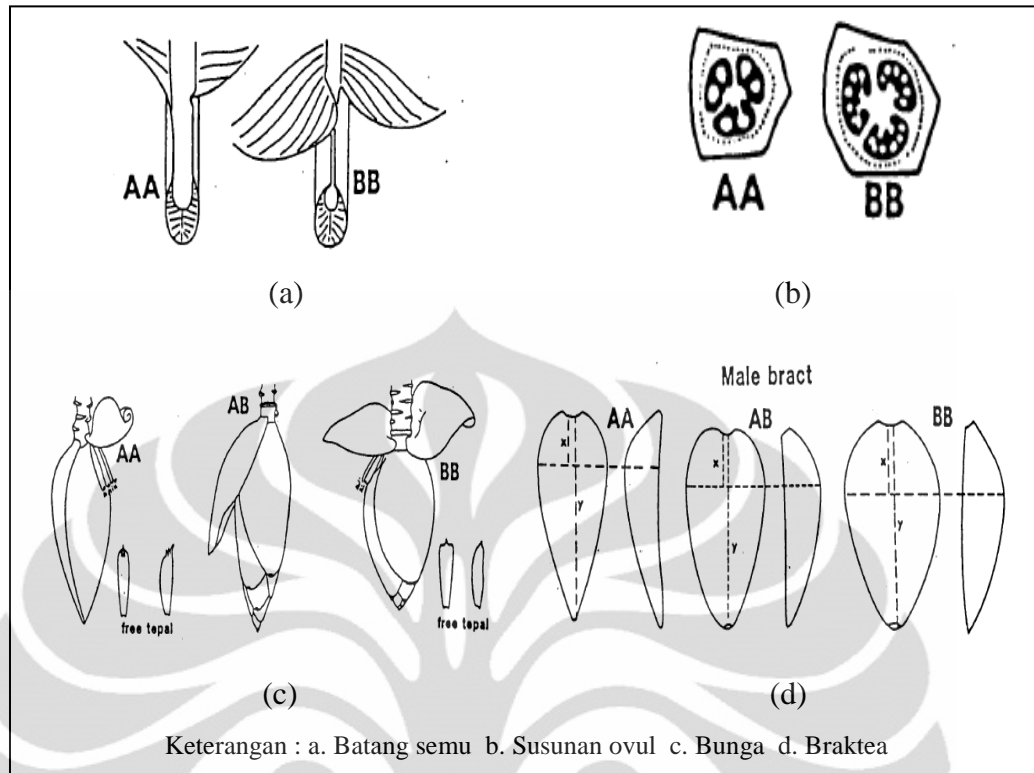
Tanaman pisang kultivar lampung merupakan salah satu tanaman pisang dalam kelompok genom AA yang berasal dari spesies liar tanaman pisang *Musa acuminata*. Filipina merupakan negara asal tanaman pisang tersebut. Tanaman pisang kultivar lampung memiliki keunggulan, yaitu produksi buah yang banyak dalam satu tandan, buah dapat dinikmati secara langsung setelah masak dengan rasa yang sangat manis, serta penampilan menarik, dan diketahui memiliki nilai etnobotani untuk penyembuhan penyakit kuning. Keunggulan tersebut membuat kultivar lampung banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia (Valmayor *dkk.* 2000: 4; Suyanti & Supriyadi 2008: 34).

2.1.3 Karakteristik Morfologi Tanaman Pisang Kultivar Lampung

Karakteristik umum tanaman pisang dapat dilihat dari akar hingga buah tanaman tersebut. Pohon tanaman pisang berakar rimpang dan tidak mempunyai akar tunggang yang berpangkal pada umbi batang. Akar tersebut tumbuh menuju ke bawah tanah sampai kedalaman 75--150 cm, sedangkan akar yang berada di samping umbi batang tumbuh ke samping atau mendatar hingga mencapai 4--5 cm. Akar terbanyak berada di bagian bawah tanah (Suyanti & Supriyadi 2008: 23).



Gambar 2.1.2(1). Jalur perkembangan tanaman pisang yang dapat dimakan.
[Sumber: Modifikasi dari Valmayor *dkk.* 2000: 4.]



Gambar 2.1.2(2). Karakter pembeda tanaman pisang genom A dan B
[Sumber: Valmayor *dkk.* 2000: 7.]

Batang tanaman pisang terletak di dalam tanah, yaitu berupa umbi batang. Titik tumbuh terdapat pada bagian atas umbi batang. Bagian yang tumbuh tegak di atas tanah merupakan batang semu. Batang semu terbentuk dari pelepah daun yang berukuran panjang yang saling menutupi dengan kuat dan kompak sehingga tanaman pisang dapat berdiri tegak (Gambar 2.1.3). Tinggi batang semu berkisar 3,5 m--7,5 m bergantung dari jenis kultivar pisang (Suyanti & Supriyadi 2008: 24).

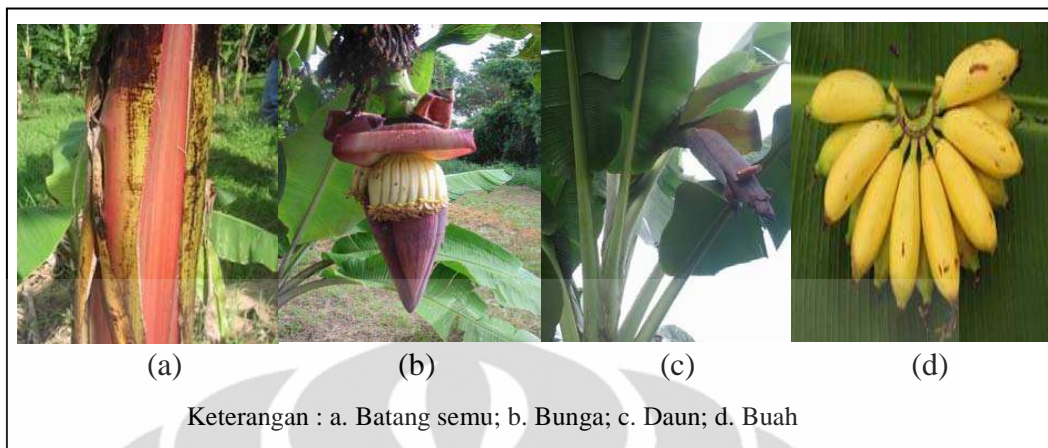
Helaian daun tanaman pisang berbentuk bulat yang memanjang (Gambar 3.1.3). Letak daun tersebar pada bagian daun yang masih kuncup. Daun diperkuat oleh tangkai daun yang panjangnya antara 30--40 cm. Daun tersebut juga tidak memiliki tulang daun sehingga daun pisang mudah sekali terkoyak oleh hembusan angin (Suyanti & Supriyadi 2008: 24).

Bunga tanaman pisang sering disebut jantung pisang karena bentuknya menyerupai jantung dan dalam satu tandan, terdiri dari banyak bunga (*inflorescencia*) (Gambar 2.1.3). Bunga tanaman pisang merupakan bunga banci dan bunga berumah satu (*monoceus*). Hal tersebut menunjukkan bunga pisang

memiliki alat kelamin jantan berupa benang sari (*stamen*) dan alat kelamin betina berupa putik (*pistillum*) yang terdapat pada satu bunga di pohon yang sama. Daun penumpu bunga (*bracthea*) biasanya berjejal rapat dan tersusun secara spiral. Daun tersebut berwarna merah tua, berkilin, dan mudah rontok, serta berukuran panjang 10--25 cm (Gambar 2.1.3). Bunga pisang memiliki lima tenda bunga (*perigonium*) yang berwarna putih susu dan melekat sampai tinggi dengan panjang 6--7 cm. Benang sari pisang berjumlah lima buah dan putiknya berjumlah satu buah. Bakal buah pada putik berbentuk persegi dan terletak di bawah perhiasan bunga (*epigin*) (Arvanitoyannis *dkk.* 2008: 1871; Suyanti & Supriyadi 2008: 24).

Buah tanaman pisang terbentuk setelah bakal buah mengalami pematangan dan berupa satu kesatuan bakal buah yang disebut sisir. Sisir pertama akan terbentuk dan terus memanjang, kemudian akan terbentuk sisir kedua dan seterusnya. Buah tersebut umumnya berbentuk lonjong dan berisi padat, berkulit buah kuning hingga kuning kecoklatan, daging buahnya berwarna putih dan pada umumnya, tidak memiliki biji (*parthenocarpy*). Ukuran, warna kulit, jumlah persisir dan karakteristik lainnya pada umumnya, bergantung pada tiap-tiap kultivar tanaman pisang (Arvanitoyannis *dkk.* 2008: 1871; Suyanti & Supriyadi 2008: 23).

Tanaman pisang kultivar lampung merupakan salah satu tanaman pisang memiliki ukuran yang kecil dibandingkan dengan kultivar lainnya. Tandannya terdiri atas 6--8 sisir dengan berat persisir sekitar 940 g. Jumlah tiap sisirnya berkisar antara 18--20 buah dengan berat tiap buah 50 g dan panjang buahnya 9 cm dengan lingkar buah 10,5 cm. Morfologi buah tanaman pisang tersebut mirip dengan kultivar mas. Perbedaannya terletak pada ujung buahnya yang lebih lancip dibandingkan kultivar mas. Warna kulit buah akan berwarna kuning penuh apabila telah masak (Gambar 2.1.3). Daging buah berwarna putih kemerahan, rasanya sangat manis dan aromanya kuat (Suyanti & Supriyadi 2008: 39).



Gambar 2.1.3. Karakteristik tanaman pisang kultivar lampung
[Sumber: Cruz *dkk.* 2007: 48--50.]

2.2 Produksi Tanaman Pisang Transgenik melalui proses Transformasi

2.2.1 Tanaman Transgenik

Tanaman transgenik dapat didefinisikan sebagai tanaman dengan kandungan gen asing yang diintroduksi menggunakan metode fisik atau biologis tertentu (Finer & Dhillon 2008: 246). *Deoxyribonucleid acid* (DNA) introduksi atau transgen biasanya telah diketahui dengan baik dan dimanipulasi secara tepat di laboratorium sebelum diintroduksi ke sel target. Gen yang ditransfer ke dalam genom suatu tanaman untuk membentuk tanaman transgenik bisa berasal dari spesies lain seperti bakteri, virus, atau tanaman lain. Tanaman transgenik telah dikembangkan sejak tahun 1983 dan 120 jenis tanaman telah berhasil di transformasikan (Newbury 2003: 83).

2.2.2 Teknik Transformasi Tanaman melalui *Agrobacterium tumefaciens*

Transformasi tanaman merupakan suatu teknik perbaikan sifat tanaman dengan cara mengintroduksi gen asing ke dalam tanaman tersebut (Siregar 2002: 2--3). Proses transformasi tanaman dapat dicapai melalui transformasi secara langsung (elektroporasi, prosedur *microprojectile bombardment*) maupun tidak langsung (penggunaan bakteri *Agrobacterium*). Transformasi langsung

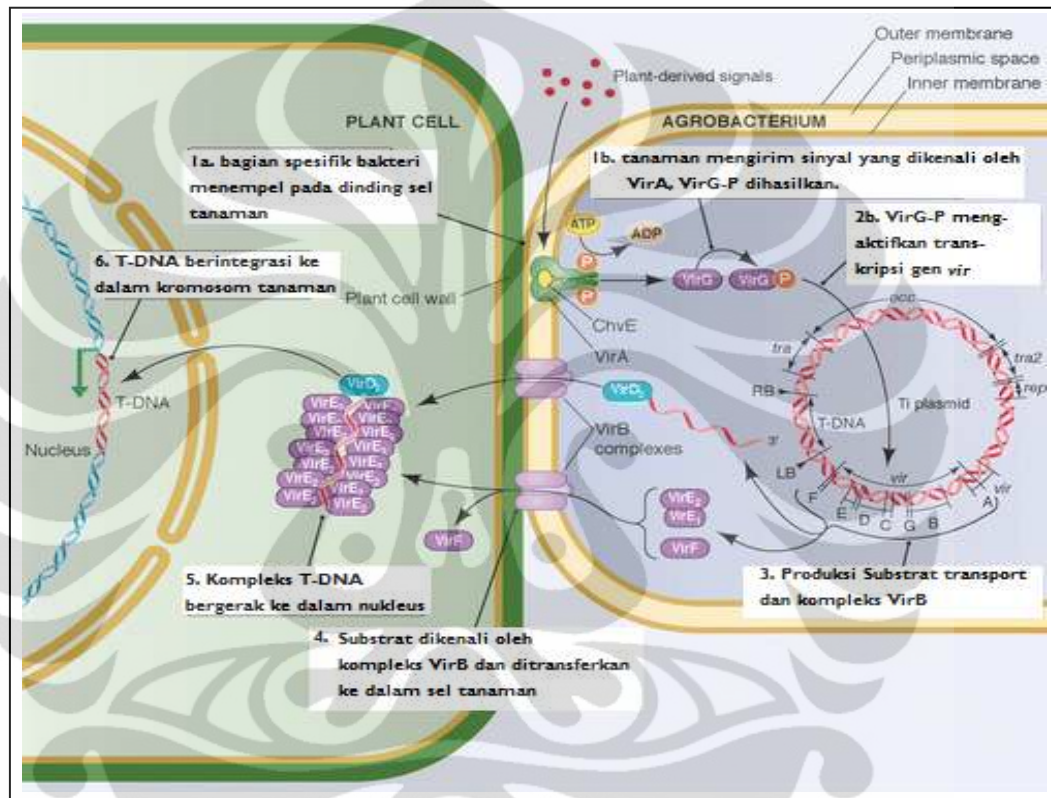
dilakukan tanpa bantuan vektor, sedangkan transformasi tidak langsung dilakukan dengan bantuan vektor biologis. Transformasi menggunakan vektor biologis dapat dilakukan dengan menggunakan bakteri, salah satunya *Agrobacterium tumefaciens* (Newbury 2003: 86; Finer & Dhilon 2008: 246).

Agrobacterium tumefaciens merupakan bakteri patogen yang terdapat di dalam tanah. Bakteri tersebut secara natural memiliki kemampuan untuk menginfeksi luka pada tanaman dikotil hingga menyebabkan terbentuknya tumor *crown gall*. *Agrobacterium tumefaciens* melalui berbagai penelitian diketahui memiliki kemampuan untuk mentransferkan fragmen DNA ke dalam sel tanaman yang diinfeksi. Fragmen DNA yang ditransferkan disebut DNA transfer (T-DNA). DNA tersebut akan ditransfer ke dalam plasmid ekstrakromosomal yang disebut plasmid Ti (*tumor inducing*). T-DNA selanjutnya akan ditransferkan dari *Agrobacterium tumefaciens* ke dalam inti sel tanaman dan berintegrasi ke dalam genom tanaman (Riva dkk. 1999: 1; Newbury 2003: 86--87).

Mekanisme yang mengintegrasikan daerah T-DNA dari plasmid Ti ke dalam genom tanaman diperantarai oleh gen yang terdapat pada daerah virulensi (*vir*) dari plasmid Ti. Gen *vir* diaktivasi oleh molekul sinyal spesifik yang dihasilkan oleh sel-sel tumbuhan yang terluka. Proses pengaktifasian tersebut dikontrol oleh gen-gen *vir*, yaitu *virA* dan *virG*. Respon terhadap molekul sinyal pengaktifasi ditunjukkan dengan putusya untai ganda T-DNA yang disebabkan endonuklease yang diproduksi oleh gen *virD*. Pembentukan pilus untuk transfer ke dalam genom tanaman dikontrol oleh gen pada operon *virB* (Gambar 2.2.2) (Primose dkk. 2001: 227). *Agrobacterium tumefaciens* merupakan patogen tanaman, oleh sebab itu plasmid Ti pada bakteri tersebut telah dihilangkan virulensinya (*disarmed*), sehingga sel tanaman yang ditransformasi oleh *Agrobacterium tumefaciens* mampu beregenerasi sebagai tanaman sehat hasil rekayasa genetik (Riva dkk. 1999: 1; Finer & Dhilon 2008: 275).

Transformasi melalui *Agrobacterium* menawarkan beberapa keuntungan di atas metode transfer gen secara langsung. Keuntungan tersebut adalah proses transformasi yang lebih simpel, biaya yang lebih murah, dan memungkinkan untuk mentransfer hanya satu atau sedikit kopi dari fragmen DNA yang mengandung gen yang penting dengan efisiensi tinggi. Transformasi melalui *Agrobacterium*

disamping memiliki keuntungan juga memiliki kekurangan, yaitu dibutuhkannya optimasi pada dua sistem biologi, yaitu sistem transfer plasmid yang telah terintegrasi dengan T-DNA ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* dan sistem transfer *Agrobacterium tumefaciens* ke dalam tanaman (Newbury 2003: 87; Yonghong *dkk.* 2006: 80--81)



Gambar 2.2.2. Mekanisme transformasi *A. tumefaciens*
[Sumber: Modifikasi dari McCullen & Binns 2006: 118.]

2.2.2.1 Syarat- syarat Transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens*

Produksi tanaman transgenik melalui transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* memerlukan empat syarat utama. Syarat-syarat tersebut, antara lain vektor yang cocok, adanya penanda seleksi, teknik yang efisien untuk transformasi dan regenerasi tanaman. Bila salah satu syarat tidak terpenuhi akan menyebabkan kegagalan pada produksi tanaman transgenik. Hal tersebut disebabkan oleh syarat-syarat tersebut menentukan ada tidaknya tanaman yang berhasil ditransformasikan (Newbury 2003: 84).

2.2.3 Transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Pisang

Protokol transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman pisang dibagi menjadi tiga kelompok. Kelompok tersebut dibagi berdasarkan tipe eksplan yang digunakan sebagai material awal, yaitu suspensi sel embriogenik (ECS), jaringan meristem (meristem apikal dan jaringan *corm*), lapisan sel tipis (MCS). Suspensi sel embriogenik merupakan material eksplan yang paling sering digunakan pada transformasi pisang (Yonghong *dkk.* 2006: 81).

Protokol transformasi menggunakan jaringan meristem diketahui memiliki kelebihan dan kelemahan dibandingkan protokol transformasi lainnya. Kelebihan penggunaan jaringan meristem (meristem apikal dan jaringan *corm*) tersebut antara lain, tanaman homogen yang dapat dihasilkan dalam waktu singkat melalui proses kultur jaringan. Hal tersebut menyebabkan protokol transformasi menggunakan jaringan meristem dapat dijadikan prosedur transformasi yang cepat pada tanaman pisang (Yonghong *dkk.* 2006: 81). Kelemahan penggunaan jaringan meristem sebagai eksplan adalah besarnya kemungkinan muncul tanaman kimera. Hal tersebut disebabkan kemungkinan hanya satu sel pada bagian jaringan meristem yang menerima T-DNA asing pada proses transformasi (May *dkk.* 1995: 487).

2.3 Seleksi Tanaman Transgenik

Kesuksesan transformasi tanaman bergantung pada keefektifan sistem seleksi sel yang telah ditransformasikan. Sistem seleksi tersebut berguna untuk mengetahui tingkat keberhasilan transformasi. Tingkat keberhasilan dapat dilihat dari adanya tanaman yang berhasil ditransformasikan (positif mengandung gen asing) melalui metode transformasi yang digunakan (Newbury 2003: 107).

2.3.1 Jenis-Jenis Seleksi Tanaman Transgenik

Sistem seleksi transformasi dapat dicapai melalui dua metode, yaitu seleksi negatif dan seleksi positif. Seleksi negatif dilakukan dengan menggunakan agen

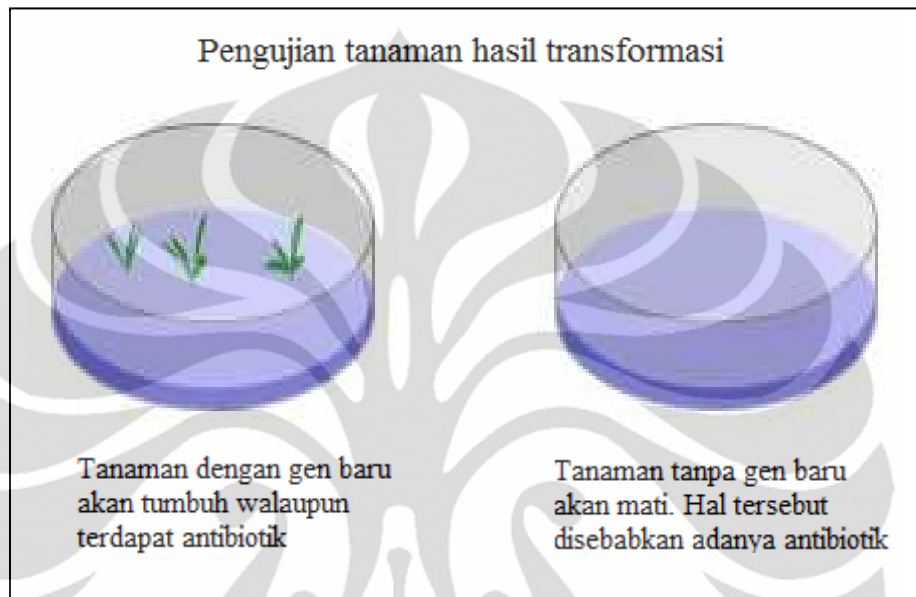
seleksi yang dapat membunuh atau menghambat secara penuh pertumbuhan sel yang tidak berhasil ditransformasikan. Agen seleksi tersebut bekerja dengan kombinasi adanya gen penanda seleksi yang diekspresikan pada tanaman yang berhasil ditransformasikan sehingga dapat menghasilkan tanaman yang resistan terhadap agen seleksi. Agen seleksi pada metode seleksi negatif dapat berupa antibiotik, herbisida, dan asam amino pada tingkat toksik. Seleksi positif dapat dilakukan dengan menggunakan agen seleksi yang dapat menghambat pertumbuhan sel yang tidak berhasil ditransformasikan namun tidak membuatnya mati. Contohnya penggunaan sitokinin aktif dan penggunaan sumber karbon spesifik, seperti manosa sebagai agen seleksi (Sreeramanan *dkk.* 2006: 193).

Optimasi atau penentuan konsentrasi minimal agen seleksi yang dibutuhkan untuk membunuh sel yang tidak berhasil ditransformasikan secara maksimal. Proses optimasi penting untuk pelaksanaan sistem seleksi yang efektif. Optimasi tersebut penting dilakukan karena konsentrasi agen seleksi yang terlalu rendah dapat memungkinkan adanya tanaman kimera yang lolos seleksi, sedangkan konsentrasi agen yang terlalu tinggi dapat menyebabkan terhambatnya tanaman transgenik yang disebabkan resistensi yang dihasilkan oleh tanaman tersebut lebih rendah dibandingkan konsentrasi yang digunakan. Keuntungan lain yang didapatkan dari proses optimasi adalah agen seleksi yang cocok dapat diidentifikasi dan penggunaan konsentrasi minimum yang ditentukan dapat membuat sistem transformasi lebih ekonomis. Hal tersebut terkait dengan penggunaan agen seleksi yang biayanya mencapai hampir setengah dari biaya transformasi (Sreeramanan *dkk.* 2006: 193).

2.3.2 Seleksi resistensi terhadap antibiotik.

Antibiotik merupakan agen seleksi yang paling banyak digunakan untuk metode uji seleksi. Penggunaan antibiotik tersebut terkait dengan adanya gen penanda seleksi yang ditransformasikan pada tanaman (Gambar 2.3.2). Gen tersebut digunakan untuk mengetahui kemampuan tanaman untuk ditransformasikan dan mendapatkan kembali transforman setelah proses transformasi. Gen penanda seleksi yang digunakan untuk uji seleksi tanaman

pada umumnya, antara lain gen *neomycin phosphotransferase (nptII)* (kanamicin, neomicin, genetisin), *streptomycin phosphotransferase (spt)* (streptomisin atau spektinomisin), *hygromycin phosphotransferase (hpt)* (higromisin) dan *bialaphos resistance (bar)* (bialaphos) (Guerinaeu 1995: 10--14; Pua & Davey 2007: 107).

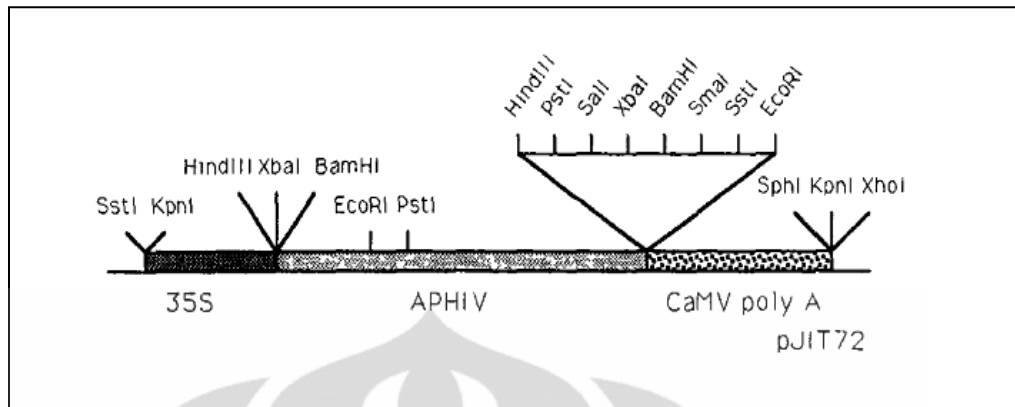


Gambar 2.3.2. Seleksi tanaman menggunakan antibiotik
[Sumber: Modifikasi dari Parsley 2009: 4.]

2.3.2.1 Resistensi terhadap antibiotik higromisin

2.3.2.1.1 Gen *hygromycin phosphotransferase (hpt)*

Gen *hpt* merupakan gen yang menimbulkan sifat resistan terhadap antibiotik higromisin. Gen tersebut diisolasi dari bakteri *E.coli* atau *Streptomyces hygrosopicus*. Promoter CaMV 35S merupakan promotor yang meregulasi gen *hpt* (Gambar 2.3.2.1.1). Transformasi gen tersebut telah berhasil dilakukan pada berbagai jenis tanaman, contohnya tembakau, kacang, jagung, dan pisang. (Guerinaeu 1995: 11--12).



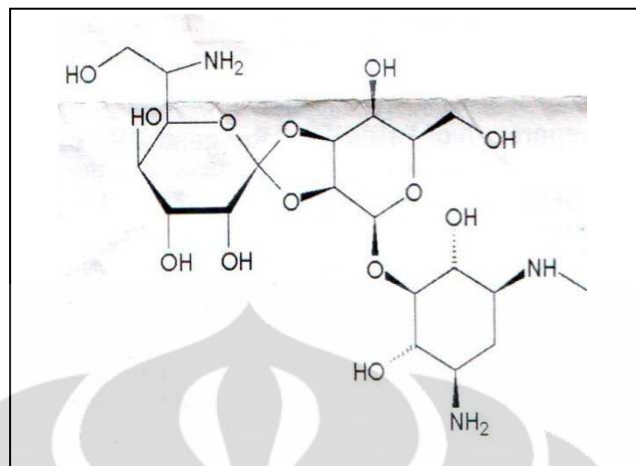
Gambar 2.3.2.1.1. Peta Gen *hygromycin phosphotransferase (hpt)*
[Sumber: Guerinaeu 1995: 11.]

2.3.2.1.2 Antibiotik higromisin

Higromisin ($C_{20}H_{37}N_3O_{13}$) merupakan salah satu agen seleksi potensial yang dapat digunakan pada transformasi tanaman (Gambar 2.3.2.1.2). Antibiotik tersebut digunakan untuk seleksi tanaman transgenik yang mengandung gen *hpt*. Higromisin diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat proses translasi sintesis protein (Lin *dkk.* 1995: 47).

Keberadaan gen *hpt* pada tanaman transgenik dapat membuat tanaman tersebut menjadi resisten terhadap antibiotik higromisin. Hal tersebut disebabkan oleh kemampuan gen tersebut untuk menghasilkan enzim higromisin fosfotransferase yang akan mendetoksifikasi gugus aminosiklitol dan mengkatalis fosforilasi gugus hidroksil pada antibiotik higromisin. Higromisin selanjutnya akan menjadi tidak aktif dan bersifat racun bagi tanaman (Mulyaningsih *dkk.* 2010: 64).

Penggunaan higromisin diketahui sebagai agen seleksi paling potensial yang dapat digunakan pada transformasi pisang. Hal tersebut dikarenakan higromisin mampu menghambat pertumbuhan tanaman pisang nontransgenik pada konsentrasi rendah dan penghambatan pertumbuhan tersebut dapat diketahui dengan jelas dari fenotip eksplan pada kultur tanaman pisang. Seleksi menggunakan higromisin juga diketahui tidak memerlukan waktu yang lama, yaitu sekitar 4--6 minggu (Sreeramanan *dkk.* 2006: 193).



Gambar 2.3.2.1.2. Antibiotik Higromisin
[Sumber: Roche 2006: 1.]

2.4 Regenerasi melalui kultur jaringan

Kultur jaringan adalah istilah umum yang ditujukan pada proses penumbuhan berbagai bagian tanaman yang meliputi batang, daun, akar, bunga, kalus, sel, protoplas, dan embrio pada medium yang mengandung zat hara yang sesuai secara *in vitro* (Bhojwani & Razdan 1996: 1). Bagian tersebut yang diistilahkan sebagai eksplan. Eksplan tersebut diisolasi dari kondisi *in vivo* dan dikultur pada medium buatan yang steril sehingga dapat beregenerasi dan berdiferensiasi menjadi tanaman lengkap. Kultur jaringan memiliki peranan yang sangat penting untuk mendapatkan hasil-hasil yang tidak mungkin dicapai oleh regenerasi secara konvensional dan regenerasi hasil transformasi (Zulkarnain 2009: 8--9).

2.4.1 Mikropropogasi

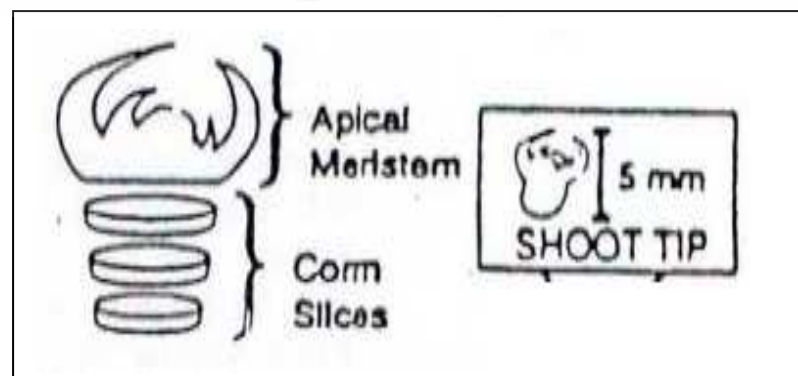
Mikropropagasi merupakan suatu aplikasi teknik kultur jaringan yang bertujuan untuk memperbanyak tanaman. Mikropropagasi pada umumnya dilakukan dengan menggunakan eksplan berupa mata tunas, nodus tunggal dan tunas pucuk tumbuhan. Eksplan tersebut akan dikultur dengan mengarahkan pertumbuhan dan perkembangan selanjutnya ke arah penggandaan dan regenerasi tumbuhan menjadi tanaman lengkap. Teknik mikropropagasi menawarkan

keuntungan untuk proses regenerasi tumbuhan, yaitu mendapatkan tumbuhan yang homogen dalam jumlah banyak dan waktu yang singkat (Zulkarnain 2009: 45).

2.4.1.1 Kultur tunas pucuk (*shoot tip culture*)

Kultur meristem merupakan tipe dasar teknik mikropropagasi tumbuhan yang paling banyak digunakan. Kultur tersebut menggunakan eksplan berupa tunas pucuk berukuran 100--500 μm yang mengandung kubah meristem apikal dan 1--3 daun primordia (Gambar 2.4.1.1). Ukuran eksplan yang digunakan disesuaikan dengan spesies yang dijadikan objek dan tujuan kultur. Ukuran eksplan yang besar (5--10 mm) pada umumnya digunakan untuk propagasi yang cepat, sedangkan ukuran eksplan yang kecil digunakan untuk menghilangkan virus atau bakteri (Zulkarnain 2009: 79).

Kultur tunas pucuk dapat digunakan pada perbanyakan tanaman pisang. Kultur tersebut menawarkan keuntungan untuk mengatasi permasalahan perbanyakan pisang secara konvensional yang membutuhkan waktu yang lama. Kultur tunas pucuk tanaman pisang pada umumnya dilakukan menggunakan tunas pucuk berukuran 3 x 5 mm yang terdiri atas kubah meristem apikal yang ditutupi beberapa daun primordia dan lapisan tipis jaringan *corm* (Gambar 2.4.1.1). Tunas pucuk tersebut berasal dari bonggol tanaman pisang berukuran 40--100 cm (Talengera *dkk.* 1994: 18; Strosse & Panis 2004: 1).



Gambar 2.4.1.1. Tunas pucuk tanaman Pisang
[Sumber: May *dkk.* 1995: 278.]

Kultur tunas pucuk pada tanaman pisang dapat dilakukan melalui tiga tahapan, yaitu inisiasi tunas, multiplikasi tunas, dan regenerasi tanaman. Ketiga tahapan tersebut keberhasilkannya dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu ukuran eksplan, media, zat pengatur tumbuh dan lingkungan. Eksplan yang berukuran 3--10 mm digunakan untuk propagasi yang cepat pada tanaman pisang (Strosse & Panis: 2004).

Media yang umum digunakan pada kultur tunas pucuk tanaman pisang adalah media Murashige-Skoog (MS) yang ditambahkan dengan vitamin, sumber mineral, karbon, zat pengatur tumbuh dan agar. Zat pengatur tumbuh yang paling umum digunakan pada kultur tunas tanaman pisang adalah auksin dan sitokinin. Auksin digunakan untuk merangsang pemanjangan sel-sel pucuk, pembelahan sel dan pembentukan akar adventif, sedangkan sitokinin digunakan untuk memicu multiplikasi tunas. Tingkat multiplikasi bergantung pada konsentrasi sitokinin dan genotipe tanaman yang digunakan. *Indole-3-acetic acid* (IAA) merupakan jenis auksin yang paling banyak digunakan pada kultur jaringan dan disintesis secara alami. *Benziladenin* (BA atau BAP) merupakan jenis sitokinin yang paling banyak digunakan pada kultur jaringan dan disintesis secara buatan (Strosse & Panis 2004: 2; Zulkarnain 2009: 99).

2.5. Uji validasi

2.5.1 Isolasi DNA tanaman

Isolasi DNA tanaman adalah teknik yang dilakukan untuk memisahkan DNA dengan komponen lain yang terdapat pada sel tanaman. Terdapat tiga syarat dasar dalam suatu proses isolasi, yaitu: (1) pengisolasian asam nukleat dari sel sampel, (2) pemisahan asam nukleat dari komponen sel lainnya, dan (3) pemulihan dan pemurnian DNA (Nicholl 2002: 34--35). DNA yang berkualitas tinggi dan benar-benar murni didapatkan dari teknik isolasi yang tepat dan efisien. Teknik pengisolasian DNA yang tepat bergantung pada spesies tanaman yang digunakan (Khanuja 1999: 1; Yuwono 2005: 32).

Isolasi DNA dari daun muda tanaman merupakan isolasi yang paling banyak dilakukan. Hal tersebut terkait dengan kandungan polisakarida dan polifenol yang jumlahnya lebih sedikit pada daun muda tanaman. Polisakarida dan polifenol merupakan senyawa yang dapat menghambat proses pengisolasian DNA. Metode isolasi DNA yang dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan adanya polifenol dan polisakarida adalah metode CTAB yang dikembangkan oleh Doyle & Doyle tahun 1987. Metode tersebut menggunakan *cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) yang dapat mengikat polisakarida sehingga dapat dihilangkan dan β -*mercaptoetanol* yang dapat mencegah oksidasi protein dan menghilangkan senyawa tanin dan polifenol yang dapat menghambat isolasi tanaman (Shangkar 2010: 84; Clarke 2002: 1).

2.5.2 Polymerase chain reaction

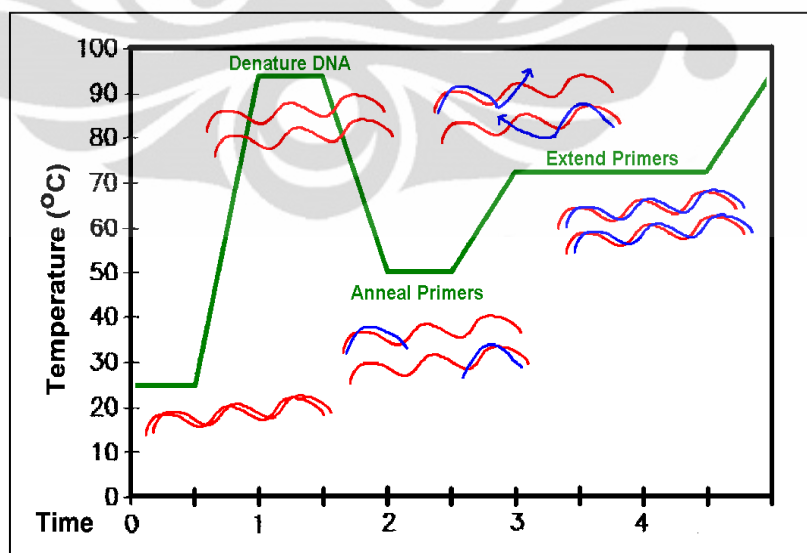
Polymerase chain reaction (PCR) adalah suatu proses pembentukan cetakan DNA secara berulang kali dengan menggunakan prosedur tertentu. Prinsip dasar dari teknik PCR merupakan adanya enzim DNA *polymerase* yang digunakan untuk membuat cetakan dari segmen DNA yang diinginkan. Teknik PCR dapat digunakan untuk mendeteksi hasil dari proses transformasi, penyakit yang dapat menginfeksi, variasi dan mutasi dari gen, dan mengetahui kekerabatan spesies (Wolfe 1993: 127).

Teknik PCR menggunakan tujuh komponen. Komponen-komponen tersebut antara lain DNA *template*, PCR *buffer*, dNTP, *primer*, kation divalen, *Tag DNA polymerase*, dan akuabides. Setiap komponen memiliki fungsi yang penting dalam proses PCR (Leonard *dkk.* 1994: 116--126).

Siklus PCR terdiri atas tiga tahap, yaitu denaturasi, *annealing* (pelekatan), dan polimerisasi (pemanjangan primer sehingga membentuk rantai DNA yang diinginkan). Satu siklus PCR menghasilkan dua molekul, dua siklus menghasilkan empat molekul, tiga siklus menghasilkan delapan molekul, dan seterusnya. Molekul-molekul yang dihasilkan salah satu diantaranya merupakan DNA target. Hasil dari 30 siklus PCR adalah 2^{30} atau lebih dari satu milyar salinan rantai DNA (Russell 1994: 306).

Tahap denaturasi dilakukan pada suhu $\pm 94^{\circ}\text{C}$ untuk memisahkan kedua untai DNA dan menghentikan semua reaksi enzimatik. Untai DNA yang telah terpisah tersebut akan menjadi cetakan bagi primer. Tahap *annealing* merupakan tahap pelekatan primer. Primer adalah oligonukleotida sintetik yang melekat pada sekuens pada sisi segmen yang akan diamplifikasi. Primer berfungsi sebagai pengapit daerah spesifik pada DNA yang akan diperbanyak serta menginisiasi replikasi DNA. Tahap polimerisasi merupakan pemanjangan primer menggunakan DNA untai tunggal sebagai cetakan. Proses pemanjangan dilakukan dengan menambahkan DNA *polimerase* ke campuran reaksi. Suhu dinaikkan menjadi $\pm 72^{\circ}\text{C}$ agar terjadi sintesis untai baru oleh enzim DNA polimerase *Taq* yang dimulai pada tiap primer (Gambar 2.5.2) (Klug & Cummings 1994: 291 & 403).

Hasil dari proses PCR berupa segmen DNA spesifik dengan panjang tertentu dalam jumlah banyak. Hasil tersebut dapat diperiksa dengan melakukan elektroforesis dengan menggunakan gel agarosa. Proses elektroforesis akan menunjukkan adanya migrasi fragmen DNA berdasarkan ukuran molekulnya. Hasil dari proses PCR yang telah dielektroforesis dapat diamati di bawah sinar ultraviolet (Old & Primose 2003: 13).



Gambar 2.5.2. Suhu proses PCR
[Sumber: Carr 2010: 1.]

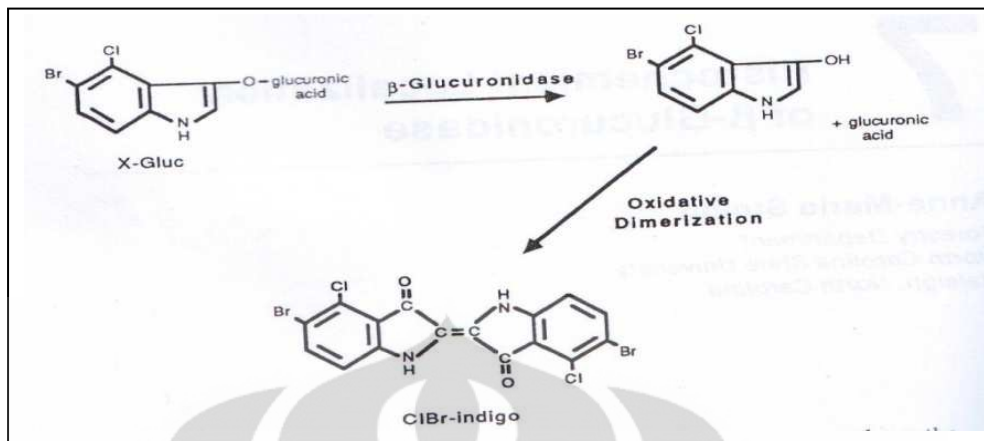
2.5.3 Elektroforesis

Elektroforesis adalah suatu metode yang digunakan untuk memisahkan molekul-molekul organik berdasarkan berat molekulnya. Elektroforesis dilakukan untuk memvisualisasikan hasil dari proses PCR (Fairbanks & Andersen 1999: 278). Komponen-komponen dalam proses elektroforesis gel antara lain apparatus elektroforesis, alat dokumentasi (*GelDoc*), *running buffer*, *loading buffer*, etidium bromida, DNA *marker*, sample DNA hasil PCR, dan matriks gel. Apparatus elektroforesis merupakan seperangkat alat yang digunakan untuk membuat perangkat elektroforesis. Apparatus elektroforesis terdiri atas *comb*, *tray*, dan *chamber* (Davis *dkk.* 1994: 154--157).

2.5.4 Uji Histokimia GUS

Uji Histokimia GUS merupakan salah satu metode yang dapat dilakukan untuk mengetahui ekspresi gen *gus* (β -*glucuronidase*) yang telah ditransformasikan pada tanaman. Gen *gus* adalah gen reporter yang menunjukkan adanya keberadaan gen asing pada tanaman setelah dilakukan transformasi. Hal tersebut menyebabkan gen *gus* dapat digunakan sebagai alat untuk menganalisis ekspresi gen pada tanaman hasil transformasi. Ekspresi gen *gus* (β -*glucuronidase*) tersebut diatur oleh sekuens promotor yang digabungkan dengan gen *gus* dalam satu plasmid. Plasmid tersebut selanjutnya dapat ditransferkan ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* atau secara langsung dapat dimasukkan dalam genom tanaman melalui *particle bombardment*. Gen *gus* secara alami dapat isolasi dari bakteri *E. coli* (Martin *dkk.* 1992: 23; Wilson *dkk.* 1992: 7).

Uji Histokimia GUS dilakukan dengan menggunakan substrat berupa larutan *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide* (*X-glu*c). Larutan tersebut dapat secara cepat mendeteksi adanya gen asing pada konsentrasi pewarnaan histokimia yang rendah dan menghasilkan produk akhir yang tidak mudah hilang dan larut berupa spot biru. Spot biru tersebut merupakan *dichloro dibromo indigo* (CIBr-indigo) yang berada tepat pada sel tanaman yang mengalami aktivitas enzim (Gambar 2.5.4) (Stomp 1992: 103--104).



Gambar 2.5.4. Pembentukan CIBr-indigo
[Sumber: Stomp 1992: 104.]

2.5.2 Uji Higromisin pada daun tanaman

Uji ketahanan terhadap higromisin pada daun tanaman transgenik merupakan salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan gen *hpt* dan ekspresinya. Tanaman transgenik yang mengekspresikan gen *hpt* tidak akan menunjukkan gejala nekrotik pada uji tersebut. Hal tersebut disebabkan oleh adanya aktivitas enzim *hygromycin phosphotransferase* yang menghambat kerja antibiotik higromisin. Menurut Bashir *dkk.* (2004) Antibiotik tersebut bekerja dengan cara menghambat sintesis protein pada tahap translokasi (Mulyaningsih 2010: 64).

BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekular Kelompok Padi, Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor mulai dari bulan Oktober 2010 hingga Mei 2011.

3.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah tunas tanaman pisang (*Musa acuminata* Colla (AA)) kultivar lampung transgenik yang mengandung gen *hpt*. Tunas tersebut berusia minimal 3 minggu setelah subkultur dan berukuran minimal 3 mm.

3.3 Bahan

3.3.1 Primer

Primer-primer yang digunakan adalah sepasang primer *hpt* spesifik, yaitu Primer *hpt Forward* 5'- GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG -3' dan primer *hpt Reverse* 5'- GCATCTCCCGCCGTGCAC -3' [1st Base].

3.3.2 Larutan, *buffer*, dan bahan kimia

Bahan-bahan yang digunakan adalah ammonium nitrat (NH_4NO_3) [Duchefa Biochemies], kalium nitrat (KNO_3) [Duchefa Biochemies], magnesium sulfat heptahidrat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) [Duchefa Biochemies], monopotassium fosfat (KH_2PO_4) [Duchefa Biochemies], kalsium klorida dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [Merck], potassium iodide (KI) [Duchefa Biochemies], asam borik (H_3BO_3) [Duchefa Biochemies], magnesium sulfat ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) [Duchefa Biochemies], *zinc sulfat*

Heptahidrat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) [Duchefa Biochemies], sodium molibdenum oksida dihidrat ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [Sigma chemical Co.], cupri sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) [Duchefa Biochemies], kalsium klorida Heksahidrit ($\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) [Duchefa Biochemies], asam nikotinat [Caisson], asam piridoksin [Sigma], *thiamine HCl* [Duchefa], glisin [Caisson], NaFe EDTA [Duchefa Biochemies], *myoinositol* [Caisson], *Bentyl Amino Purine* (BAP) [Duchefa Biochemies], *Indole-3-acetic acid* (IAA) [Duchefa Biochemies], *Cefotaxime* [OBG Dexa], *Polyvinylpyrrolidone* [Merck], Sukrosa [Merck], gelzan agar [Sigma], higromisin B [ROCHE], tris-Cl pH 8 [Merck], EDTA [Merck], NaCl [Merck], CTAB [Merck], sorbitol [Merck], *sarkocyl* [Merck], *mercaptoetanol* [Merck], *chloroform isoamil* [Merck], isopropanol [Merck], etanol 70 % [Merck], tris-EDTA [Merck], nitrogen cair, *nuclease-free water* [Fermentas], *Dream tag Polymerase* [Fermentas], *fremented agarose* [Fermentas], TBE 0,5x [Merck], marker DNA Lambda *HindIII* [Fermentas], dye [Fermentas], EtBr [Merck], MgCl_2 [Merck], dH_2O [Fermentas], X-gluc [OBG Dexa], Potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) [Duchefa Biochemies], NA-EDTA [Duchefa Biochemies], Triton-X [Duchefa Biochemies], $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [Duchefa Biochemies], $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Duchefa Biochemies], air steril, Desinfektan [*Bayclin & Typol*], akuades steril, spiritus, sarung tangan [SENSI gloves]; masker [Pro-mask], *plastic seal*, dan kotak plastik.

3.4 Peralatan

Mikropipet berbagai ukuran 10 μl , 20 μl , 200 μl , dan 1000 μl [GILSON]; tips mikropipet ukuran 10 μl [Extra Gene], 200 μl [Biobasic Inc], dan 1000 μl [Kartell]; sentrifugator [Hettrich Zentifugen]; spin [TOMY Capsulefuge pmc 850]; microwave [Panasonic]; *autoclave* [Everlight TA-630]; perangkat elektroforesis [Midicell mc 350 ELECTROFORESIS GEL SYSTEM]; mesin PCR [Biometra]; timbangan elektrik [Precisa]; *Stirer; hot plate magnetic stirer* [Cimarec; Thermodyne]; lemari pendingin [SANYO, TOSHIBA]; *freezer* -20°C [GEA]; *ice maker* [Heroeus Instrument]; *laminar air flow* [ESCO; Mascotte]; GelDoc [Biorad]; monitor; Printer; *sterile syringe filter* [Gema Medica]; tabung

nitrogen cair 13 kg [*Cryo one inc*], rak tabung [Nalgene]; pisau; pinset; tabung spiritus; termos; gunting; batang penggerus; inkubator; Oven 60 °C [Heroeus Instrument]; cawan petri [pyrex]; *tube* ukuran 1,5 ml dan 250 µl [Extra Gene]; pipet volumetrik ukuran 5 ml [Assistent], 10 ml, 25 ml, 50 ml [Pyrex]; botol gelas; pH-meter [Martini Instrument]; Labu Erlenmeyer ukuran 250 ml [Pyrex]; botol bertutup ukuran 250 ml, 500 ml, 1000 ml [Schott Duran]; gelas ukur ukuran 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, dan 1000 ml [Vit Lab]; cawan petri [Pyrex], tabung sorval, botol hibridisasi, keranjang plastik [Miami]; spidol marker [Artline70] dan berbagai alat tulis.

3.5 Cara Kerja

Skema cara kerja dapat dilihat di lampiran 1.

3.5.1 Kultur Tanaman Pisang Hasil Transformasi Menggunakan Metode Kultur Tunas Pucuk

Kultur tunas pucuk dilakukan berdasarkan modifikasi Strosse & Panis (2004: 1--3). Tahapan kultur terdiri atas inisiasi tunas dan perbanyakan tunas. Pemulihan tunas dan aklimatisasi dilakukan setelah proses uji higromisin dilakukan.

3.5.1.1 Inisiasi tunas

3.5.1.1.1 Penanaman *corm*

Tanaman pisang transgenik (mengandung gen *hpt*) hasil kultur disiapkan. Tanaman pisang dipotong hingga didapatkan bagian tunas pucuknya. Bagian tunas pucuk kemudian dipotong menjadi 6--7 irisan. Bagian tersebut selanjutnya ditanam pada media 20B (MS + 20 mg/l BAP) (Lampiran 4) untuk proses pengkulturan. Media yang telah berisi irisan tunas pucuk direkatkan menggunakan *plastic seal* dan diberi keterangan (kode dan tanggal pembuatan).

Cawan petri disimpan di ruang kultur selama 4--6 minggu, pertumbuhan dan perkembangan tunas diamati. Eksplan yang mengalami kontaminasi dapat dicuci menggunakan desinfektan [Bayclin] 50 %, 30 %, 10% dan air steril.

3.5.1.1.2 Pemindahan eksplan dari cawan petri ke botol gelas

Eksplan berupa tunas yang terdapat di media lama disiapkan. Media baru berupa media 5B (MS + 5 mg/l BAP) (Lampiran 4) yang terdapat di botol gelas disiapkan. Tunas dipindahkan dari media lama ke media baru menggunakan pinset. Tunas yang terdapat di media dalam botol maksimal berjumlah empat tunas. Media yang telah berisi tunas direkatkan menggunakan *plastic seal* dan diberi keterangan (kode dan tanggal pembuatan). Media disimpan di ruang kultur hingga didapatkan tunas yang cukup ukurannya untuk diperbanyak (minimal 1 cm), pertumbuhan dan perkembangan tunas diamati.

3.5.1.2 Perbanyak tunas

3.5.1.2.1 Penanaman tunas

Eksplan berupa tunas yang terdapat di media lama (5B) disiapkan. Media baru berupa media 2B + IAA (MS + 2 mg/l BAP + 0,175 mg/l IAA) (Lampiran 4) yang terdapat di botol gelas disiapkan. Tunas dipindahkan dari media lama ke media baru menggunakan pinset. Tunas yang terdapat di media dalam botol maksimal berjumlah 2 tunas. Media yang telah berisi tunas direkatkan menggunakan *plastic seal* dan diberi keterangan (kode dan tanggal pembuatan). Media disimpan di ruang kultur hingga didapatkan tunas dalam jumlah banyak (minimal 3 tunas), pertumbuhan dan perkembangan tunas diamati.

3.5.1.2.2 Subkultur tunas

Tunas yang didapat dari hasil perbanyak disiapkan. Tunas dipisahkan dari kumpulan tunas menggunakan pisau. Tunas tunggal selanjutnya ditanam

pada media 2B + IAA dengan menggunakan pinset. Tunas yang terdapat di media dalam botol maksimal berjumlah 2 tunas. Media yang telah berisi tunas direkatkan menggunakan *plastic seal* dan diberi keterangan (kode + tanggal pembuatan). Media disimpan di ruang kultur hingga didapatkan tunas dalam jumlah banyak kembali (minimal 3 tunas), pertumbuhan dan perkembangan tunas diamati. Eksplan yang mengalami kontaminasi dapat dicuci menggunakan desinfektan [Bayclin] 50 %, 30 %, 10% dan air steril.

3.5.2 Uji Higromisin

Uji dilakukan berdasarkan modifikasi dari metode Sreeramanan *dkk.* (2006: 189--197). Tahapan dilakukan dengan menggunakan eksplan berupa tunas (tinggi minimal 3 mm) tanaman pisang transgenik yang terdapat di media (2B + IAA). Media baru berupa media 2B + IAA + higromisin dengan konsentrasi 30 ppm dan 50 ppm yang terdapat di botol gelas disiapkan. Tunas tersebut dipindahkan dari media lama ke media seleksi menggunakan pinset. Tunas yang terdapat di media dalam botol berjumlah satu tunas. Media yang telah berisi tunas direkatkan menggunakan *plastic seal* dan diberi keterangan (kode + tanggal pembuatan). Media disimpan di ruang kultur selama 3 minggu untuk konsentrasi higromisin 30 ppm dan 2 minggu untuk konsentrasi higromisin 50 ppm, pertumbuhan dan perkembangan diamati. Tanaman yang telah diseleksi selanjutnya ditanam dalam medium MS tanpa hormon untuk pemulihan dan selanjutnya dapat di aklimatisasi.

3.5.2.1 Rancangan penelitian

Penelitian bersifat eksperimental yang terdiri atas 3 perlakuan dan 6 ulangan untuk perlakuan konsentrasi higromisin 0 ppm, 18 ulangan untuk perlakuan konsentrasi higromisin 30 ppm dan 50 ppm. Perlakuan yang digunakan berupa 3 variasi konsentrasi medium yang ditambahkan ke dalam medium 2B + IAA. Semua perlakuan yang dimaksud yaitu:

1. MS+ 2B + IAA adalah medium MS dengan penambahan 2 mg/l, BAP dan 0,175 mg/l IAA.

2. MS + 2B + IAA+ 30 ppm adalah medium medium MS dengan penambahan 2 mg/l BAP, 0,175 mg/l IAA dan 30 mg/l antibiotik higromisin selama 3 minggu.
3. MS + 2B + IAA+ 50 ppm adalah medium medium MS dengan penambahan 2 mg/l BAP, 0,175 mg/l IAA dan 50 mg/l antibiotik higromisin selama 2 minggu.

Hasil seleksi dihitung berdasarkan persentase jumlah tanaman yang berhasil lolos (*reliable of selection*) (Aoki *dkk.* 2002: 238--243). Tanaman pisang kultivar lampung yang dianggap lolos seleksi adalah tanaman yang memiliki daun tetap berwarna hijau, mengalami pertumbuhan dan dapat tumbuh dengan baik pada proses pemulihan.

3.5.2.2 Pemulihan tunas dan aklimatisasi

Eksplan berupa tunas yang telah diseleksi pada medium dengan penambahan higromisin disiapkan. Media baru berupa media MS0 (MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh) yang terdapat di botol gelas disiapkan. Tunas dipindahkan dari media lama ke media baru menggunakan pinset. Tunas yang terdapat di media dalam botol maksimal berjumlah 2 tunas. Media yang telah berisi tunas direkatkan menggunakan *plastic seal* dan diberi keterangan (kode dan tanggal pembuatan). Media selanjutnya disimpan di ruang kultur hingga tunas cukup besar dan memiliki akar. Tunas tersebut selanjutnya diletakkan di rumah kaca selama 1 minggu untuk persiapan aklimatisasi.

Proses aklimatisasi selanjutnya dilakukan setelah penyimpanan selama 1 minggu. Proses pertama aklimatisasi adalah mencuci bersih planlet dari sisa-sisa medium dan direndam selama 5--10 detik di dalam larutan fungisida. Planlet selanjutnya ditanam dalam tanah yang terdapat pada pot plastik kecil dan ditutup dengan plastik. Planlet disimpan dalam rumah kaca dengan pembukaan plastik dilakukan setelah 2 minggu dan pengantian media tanam dilakukan setelah 4 minggu.

3.5.3 Uji Validasi

3.5.3.1 Isolasi DNA tanaman pisang

Isolasi DNA tanaman pisang dilakukan berdasarkan modifikasi Zheng *dkk.* (2000: 101--115). Tahapan kultur terdiri atas persiapan eksplan, pembuatan *buffer*, dan isolasi DNA.

3.5.3.1.1 Persiapan eksplan

Tanaman pisang transgenik, alat dan bahan disiapkan. Bagian daun muda tanaman pisang dipotong menggunakan gunting steril. Daun yang telah dipotong dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml. *Tube* selanjutnya dimasukkan ke dalam termos yang berisi nitrogen cair. Proses isolasi dapat langsung dilakukan atau eksplan dapat pula disimpan di dalam *freezer* -20° C untuk pengerjaan di lain waktu.

3.5.3.1.2 Isolasi DNA

Tube 1, 5 ml yang berisi daun muda tanaman pisang disiapkan. Nitrogen cair dimasukkan ke dalam *tube*. Daun muda selanjutnya digerus menggunakan batang penggerus. *Buffer* isolasi (Lampiran 3) ditambahkan pada ekstrak daun sebanyak 750 µl. Ekstrak tersebut selanjutnya diinkubasi dalam oven 60 °C selama 1 jam. Kloroform + Isoamil alkohol (24:1) ditambahkan sebanyak 750 µl setelah proses inkubasi dan diinvert. Ekstrak tersebut selanjutnya disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan diambil dan dipindahkan ke *tube* yang baru. Isopropanol ditambahkan ke dalam supernatan sebanyak 400 µl dan diinvert. *Tube* yang telah diberi isopropanol diletakkan diatas es sebelum proses sentrifugasi. Proses sentrifugasi selanjutnya dilakukan selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Pelet diambil dan ditambahkan alkohol 70 % sebanyak 500 µl dan diinvert. Proses sentrifugasi selanjutnya dilakukan selama 3 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Pelet dikeringanginkan. Penambahan TE + RNase dilakukan sesuai dengan pelet yang didapatkan. DNA dapat disimpan di dalam kulkas dengan suhu 4 °C.

3.5.3.2 *Polymeration chain reaction* (PCR) dan Elektroforesis DNA

Polymeration chain reaction (PCR) dan Elektroforesis DNA dilakukan berdasarkan modifikasi Sambrook & Rusell (2001: 8.20--8.22 & 5.10--5.13). Tahapan *Polymeration chain reaction* (PCR) dan Elektroforesis DNA terdiri atas *polymeration chain reaction* (PCR), persiapan aparatus elektroforesis, pembuatan gel agarosa 1,2 %, *loading* sampel ke dalam *well* dan *running* elektroforesis.

3.5.3.2.1 *Polymeration chain reaction* (PCR)

DNA *template* dan bahan-bahan untuk larutan *mix reaction* (6x *Dream taq polymerase* (*Fermentase*), 20 μ M primer *hptF*, 20 μ M primer *hptR*, dan *nuclease free water*) disiapkan dan diletak di atas es. *Tube* PCR 200 μ l disiapkan dan diberi keterangan (no. Sampel). Larutan PCR dimasukkan ke dalam *tube* tersebut masing-masing sebanyak 10 μ l sesuai jumlah sampel (Tabel 3.5.3.2.1 (1)). DNA *template* masing-masing sampel dimasukkan sebanyak 1 μ l. *Tube* selanjutnya *dispin* dan dimasukkan ke dalam mesin PCR Biometra. Mesin PCR ditutup dan proses program dilakukan (Tabel 3.5.3.2.1(2)). Hasil PCR dapat dilihat menggunakan elektroforesis gel.

Tabel 3.5.3.2.1(1). Komposisi komponen reaksi PCR

No	Komponen reaksi PCR	Ukuran (μ l)
1.	<i>Nuclease free Water</i>	4,6
2.	<i>Dream Taq Polymerase</i>	5
3.	Primer <i>hpt Forward</i>	0,2
4.	Primer <i>hpt Reverse</i>	0,2
5.	DNA cetakan	1
Total		10 μ l untuk 1 sampel DNA

Tabel 3.5.3.2.1(2). Program mesin PCR

No	Program mesin PCR [Biometra] Padi→FAT 2→ 35 Siklus	Waktu
1.	Denaturasi 94° C	3'
2.	Denaturasi 94° C	1'
3.	Annealing 60° C	45''
4.	Polimerasi 72 °C	1'
5.	Polimerasi 72 °C	7'

Keterangan : 2, 3, dan 4 untuk 1 Siklus

3.5.3.2.2 Elektroforesis gel

3.5.3.2.2.1 Persiapan *aparatus* elektroforesis.

Aparatus elektroforesis yang terdiri dari *tray/container*, *power supply*, dan *comb* disiapkan. Jumlah *well* yang akan dibuat disesuaikan dengan jumlah sampel yang akan di *loading*. Bagian *tray/container* yang terbuka ditutup dengan selotip. *Comb* selanjutnya diletakkan pada *tray/container*.

3.5.3.2.2.2 *Loading* Sampel dan *Running* Elektroforesis

Produk PCR disiapkan. Gel yang telah mengeras diletakkan pada aparatus elektroforesis dan TBE 0,5X dituangkan hingga menutupi gel. Sampel satu persatu *dispin* dan selanjutnya *diloading* ke dalam *well*. Marka DNA berupa Lambda yang dipotong dengan *HindIII* terlebih dahulu diberikan *loading dye* sebanyak 6 µl sebelum *diloading* ke dalam *well*. Aparatus elektroforesis ditutup dan tutupnya dihubungkan dengan kutub positif dan negatif pada *power supply* dan tombol di *ON*-kan. *Running* elektroforesis dilakukan dengan tegangan sebesar 100 mA selama 45 menit.

3.5.3.2.2.3 Dokumentasi Gel.

Gel yang telah *dirunning* direndam di dalam etidium bromida (EtBr) selama 15 menit sebelum didokumentasikan. Perendaman di dalam air selama 10 menit dilakukan setelah perendaman dalam EtBr. Gel selanjutnya dimasukkan ke dalam mesih *GelDoc*. Hasil elektroforesis terlihat pada layar yang tersambung dengan mesin *GelDoc* difoto atau *diprint* sebagai dokumentasi.

3.5.3.3 Uji histokimia GUS

Uji histokimia GUS dilakukan berdasarkan modifikasi Stomp (1992: 103--113). Sampel berupa tunas tanaman pisang dan GUS *assay buffer* (104 mg X-Gluc 2mM, 16,5 mg potasium ferricyanide 0,5mM, 372 mg Na₂EDTA 10 mM, 0,1 ml triton X-100 0,1 %, 100 mL Na₂SO₄ *buffer* pH 7,7) (Lampiran 4) disiapkan. Bagian daun tanaman pisang direndam dalam larutan GUS *assay buffer* selama 48 jam pada suhu 37° C. Sampel selanjutnya dicuci menggunakan alkohol seri (50 %, 70 % dan 90 %) dan diamati setelah pencucian. Hasil uji histokimia GUS positif ditunjukkan dengan adanya spot berwarna biru.

3.5.3.4 Uji Higromisin pada daun tanaman

Uji higromisin dilakukan menurut metode Greco *dkk.* (2003: 12). Daun pada tanaman pisang kultivar lampung yang diujikan diberikan tanda (x) untuk ditetesi ± 10 µl larutan higromisin 50 mg/l dan 100 mg/l (gelatin, triton X-100, akuades, dan higromisin) (Lampiran 4). Hasil dapat dilihat setelah 3 hari setelah diberikan perlakuan. Hasil uji higromisin menunjukkan tanaman nontransgenik akan mengalami nekrosis pada bagian daun yang diberikan perlakuan larutan higromisin (hasil negatif), sedangkan tanaman transgenik tidak akan mengalami nekrosis (hasil positif).

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kultur Tanaman Pisang Hasil Transformasi Menggunakan Metode Kultur Tunas Pucuk

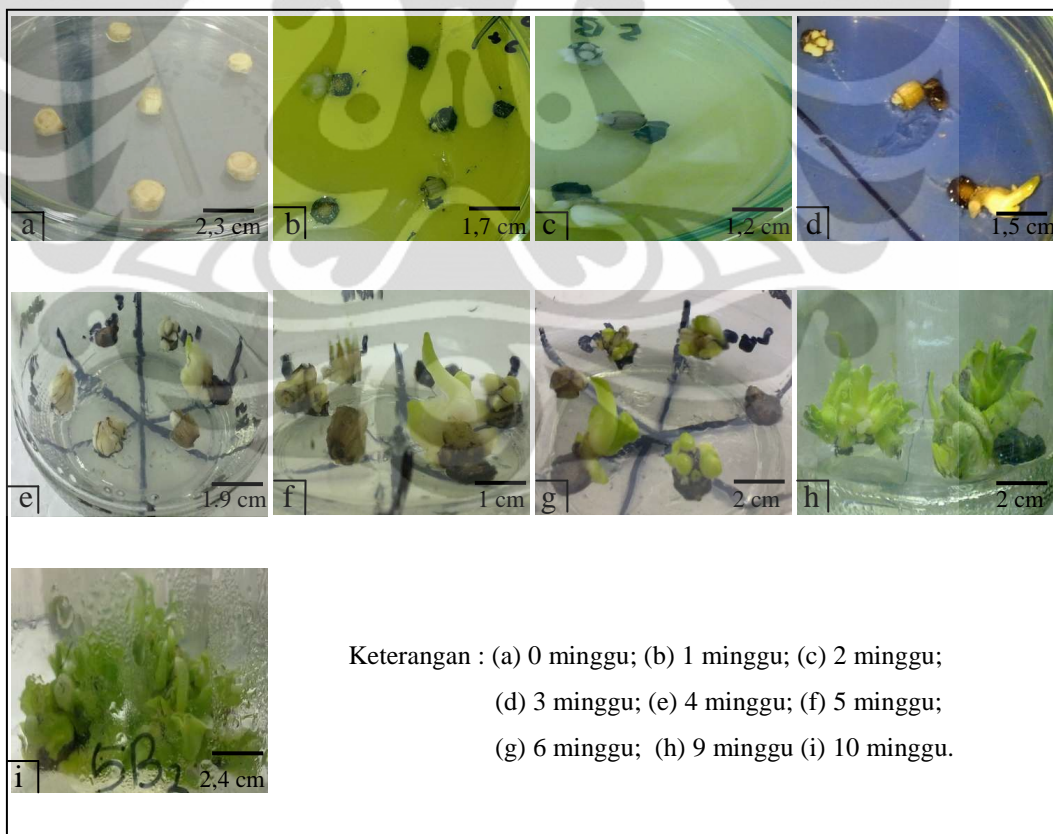
Kultur tunas pucuk dilakukan untuk mendapatkan tanaman pisang yang akan digunakan untuk uji higromisin. Tanaman pisang yang dibutuhkan untuk uji harus bersifat seragam dan berjumlah banyak. Menurut Zulkarnain (2009: 45), kultur tunas pucuk merupakan salah satu teknik mikropropagasi yang bertujuan untuk mendapatkan tumbuhan yang seragam dalam jumlah banyak dan waktu yang singkat. Eksplan yang digunakan pada kultur berupa tunas pucuk yang mengandung meristem apikal dan jaringan *corm* yang diiris menjadi lapisan tipis (3 mm). Eksplan yang berukuran besar digunakan dengan tujuan mendapatkan banyak tunas dengan cepat. Penggunaan eksplan dengan ukuran besar memiliki kekurangan, yaitu mudah mengalami penghitaman dan kontaminasi (Strosse & Panis 2004: 1).

Penanaman eksplan berupa irisan tunas pucuk dilakukan pada medium 20B (MS + 20 mg/l BAP) pada cawan petri (Gambar 4.1(a)). Satu minggu setelah penanaman didapatkan 1--2 titik tumbuh pada irisan eksplan (min 2 irisan) (Gambar 4.1(b)). Titik tumbuh selanjutnya ditanam pada medium 5B (MS + 5 mg/l BAP) pada botol gelas setelah 4 minggu (Gambar 4.1(e)). Titik tumbuh tersebut akan tumbuh menjadi tunas pada minggu-minggu selanjutnya (Gambar 4.1(f)). Penggunaan hormon BAP dengan konsentrasi 2--20 mg/l pada kultur tunas tanaman pisang digunakan untuk menginduksi pertumbuhan titik tumbuh pada eksplan yang selanjutnya berkembang menjadi tunas. Penggunaan 5 mg/l BAP bertujuan untuk mendapatkan tunas dengan ukuran yang lebih besar (Zulkarnain 2003: 99; Strosse & Panis 2004: 2).

Tunas selanjutnya dipindahkan ke medium 2B + IAA (MS + 2 mg/l BAP + 0,175 mg/l IAA) untuk perbanyak tunas pada minggu ke- 6 (Gambar 4.1(g)). Tunas dalam jumlah banyak didapat pada minggu ke- 9--10 dengan rata-rata 3 tunas untuk tiap irisan tunas pucuk (Gambar 4.1 (h) & (i)). Penggunaan

kombinasi 2 mg/L BAP dan 0,175 mg/l IAA dapat menginisiasi perbanyakan tunas tanaman pisang (Strosse & Panis 2004: 2). Tunas tersebut selanjutnya dipisahkan menjadi tunas tunggal dan disubkultur untuk mendapatkan tunas yang lebih banyak.

Hasil inisiasi dan perbanyakan tunas menunjukkan dari 18 tanaman transgenik yang tunas pucuknya diiris menjadi 6--7 irisan didapatkan 62 tunas untuk tanaman transgenik dalam waktu 10 minggu. Jumlah tunas yang dihasilkan dari perbanyakan bergantung konsentrasi sitokinin dan genotip. Penggunaan konsentrasi sitokinin, terutama BAP sebesar 2 mg/l merupakan konsentrasi yang ideal untuk multiplikasi dan kultivar pisang yang hanya memiliki genom A, seperti pisang kultivar lampung (AA) hanya memproduksi 2--4 tunas baru setiap satu siklus subkultur. Tanaman transgenik diketahui pula memiliki kemampuan beregenerasi lebih lambat dibandingkan tanaman non-transformasi (Strosse & Panis 2004: 2).



Gambar 4.1. Kultur tunas pucuk tanaman pisang transgenik
 [Sumber: Dokumentasi Puslit Bioteknologi LIPI, 2011.]

4.2 Uji Higromisin

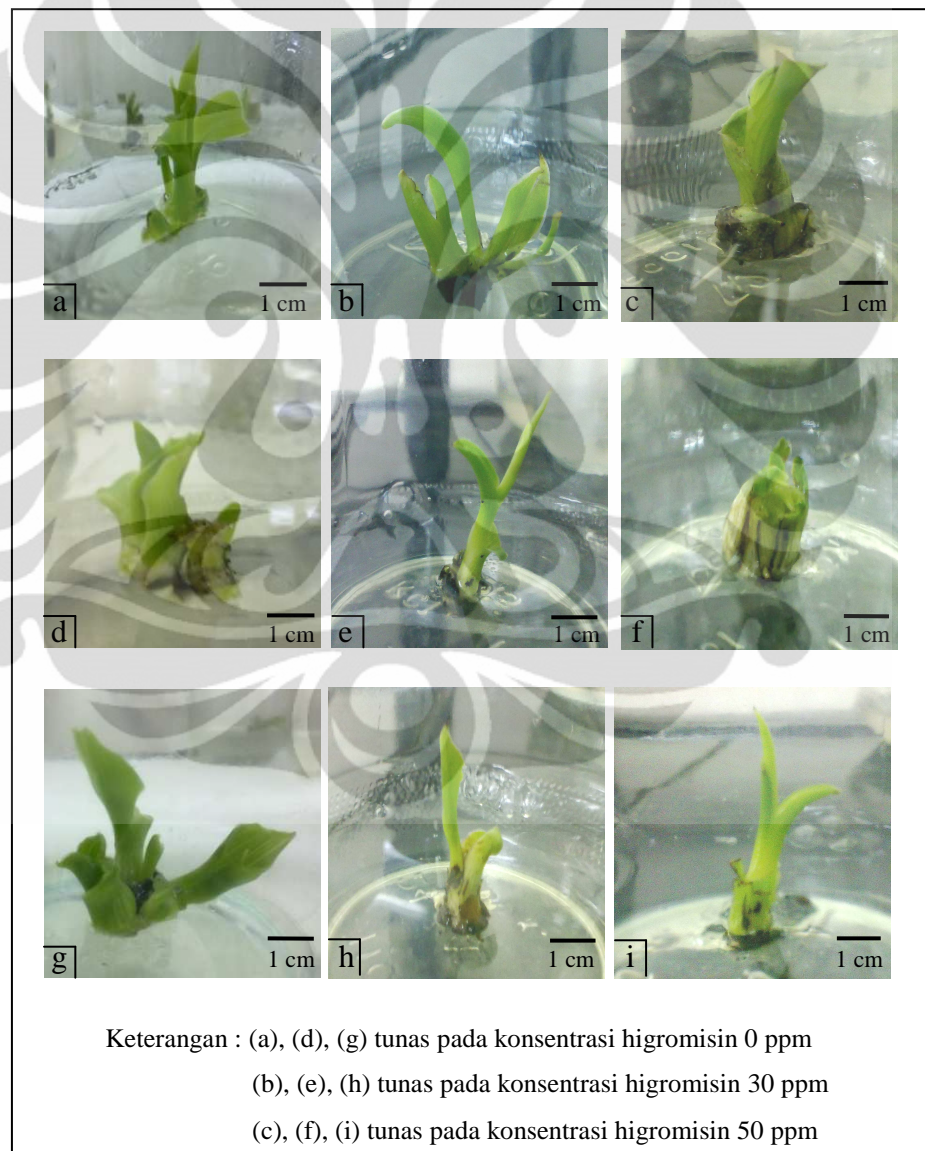
Uji higromisin dilakukan dengan menggunakan antibiotik higromisin yang bekerja dengan kombinasi adanya gen *hpt* pada genom tanaman. Higromisin diketahui sebagai agen seleksi paling potensial yang dapat digunakan pada transformasi tanaman pisang karena higromisin mampu menghambat pertumbuhan tanaman pisang nontransgenik pada konsentrasi rendah dan penghambatan pertumbuhan tersebut dapat diketahui dengan jelas dari fenotip tanaman pisang (Sreeramanan *dkk.* 2006: 193). Uji tersebut dilakukan pula untuk mengefisienkan analisis PCR pada proses transformasi tanaman. Hal tersebut disebabkan karena hanya tanaman yang bertahan setelah proses seleksi saja yang selanjutnya akan dianalisis menggunakan PCR untuk mengetahui keberhasilan transformasi. Penggunaan uji tersebut diharapkan dapat menghemat biaya dan waktu (Newbury 2003: 107).

Konsentrasi higromisin yang digunakan pada optimasi uji tersebut adalah 0 ppm sebagai kontrol, 30 ppm selama 3 minggu dan 50 ppm selama 2 minggu. Pemilihan konsentrasi tersebut didasari oleh penelitian yang dilakukan sebelumnya dengan menggunakan 6 konsentrasi higromisin, yaitu 0 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 50 ppm dan 60 ppm selama 5 minggu. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi yang paling potensial untuk digunakan pada uji seleksi tanaman pisang hasil transformasi.

Eksplan yang digunakan pada proses optimasi adalah tanaman pisang kultivar lampung transgenik yang berukuran minimal 3 mm dan berusia 3 minggu. Penggunaan eksplan yang berusia terlalu tua dan berukuran besar dapat mengakibatkan tanaman sudah cukup kuat untuk tumbuh pada medium seleksi walaupun tidak mengandung gen *hpt*. Sebaliknya, penggunaan eksplan yang terlalu kecil dan berusia terlalu muda dapat mengakibatkan tanaman tidak cukup kuat untuk tumbuh pada medium seleksi walaupun mengandung gen *hpt*. Hal tersebut disebabkan konsentrasi yang digunakan lebih tinggi daripada yang diekspresikan tanaman (Lin *dkk.* 1995: 49). Tanaman pisang yang tetap hidup setelah melalui uji higromisin merupakan tanaman yang menunjukkan hasil

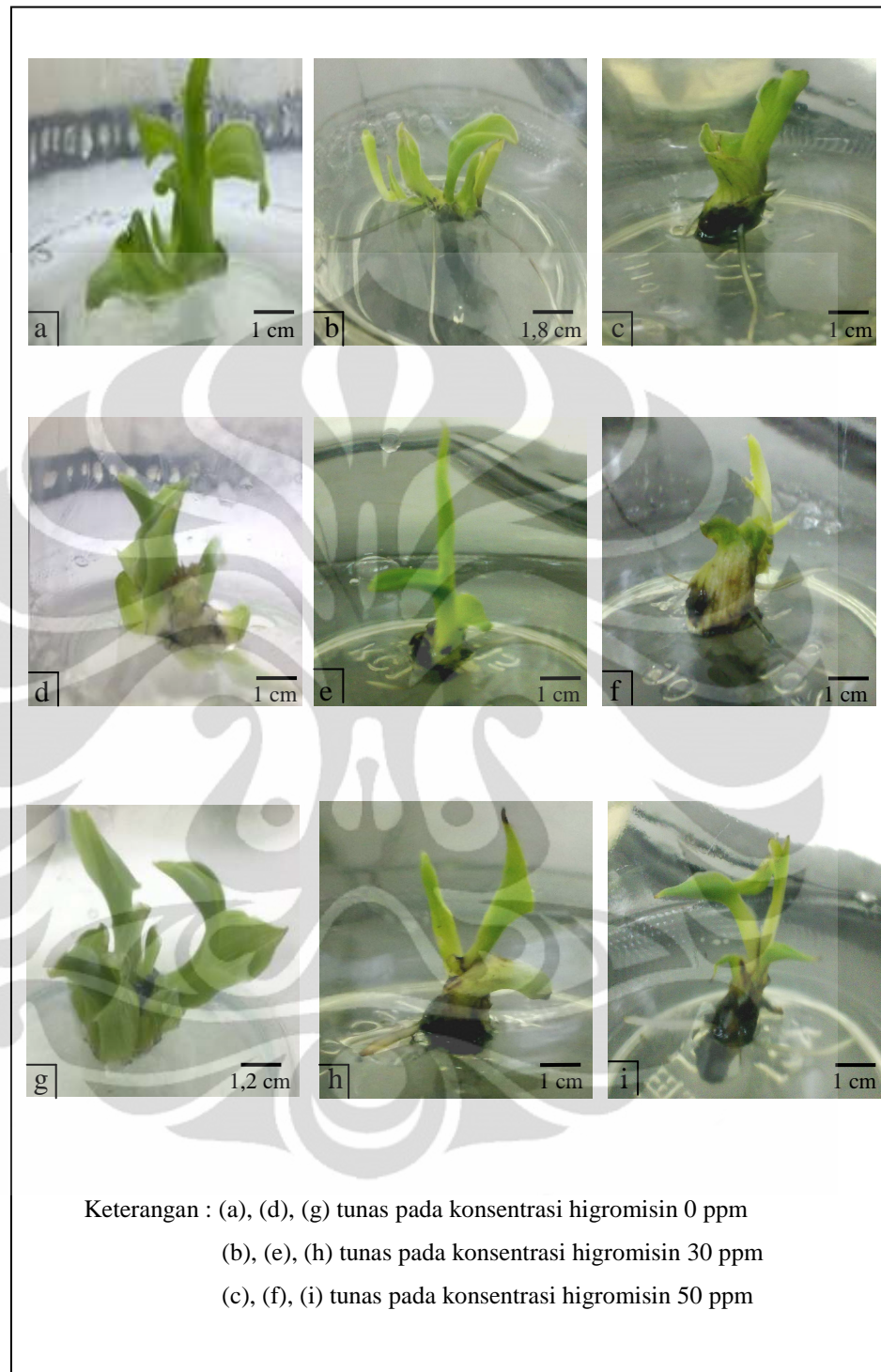
positif. Hasil positif tersebut menunjukkan kemungkinan adanya gen *hpt* pada genom tanaman pisang (Sreeramanan *dkk.* 2006: 193).

Optimasi uji higromisin telah dilakukan pada 42 tunas tanaman pisang, 6 tunas untuk konsentrasi higromisin 0 ppm sebagai kontrol, dan masing-masing 18 tanaman untuk konsentrasi 30 ppm selama 3 minggu, dan 50 ppm selama 2 minggu. Uji tersebut menunjukkan seluruh tunas tanaman pisang memberikan hasil yang positif (tanaman bertahan hidup), namun terdapat perbedaan pertumbuhan pada tunas tanaman pisang tersebut (Gambar 4.2(1) s/d 4.2(6)).

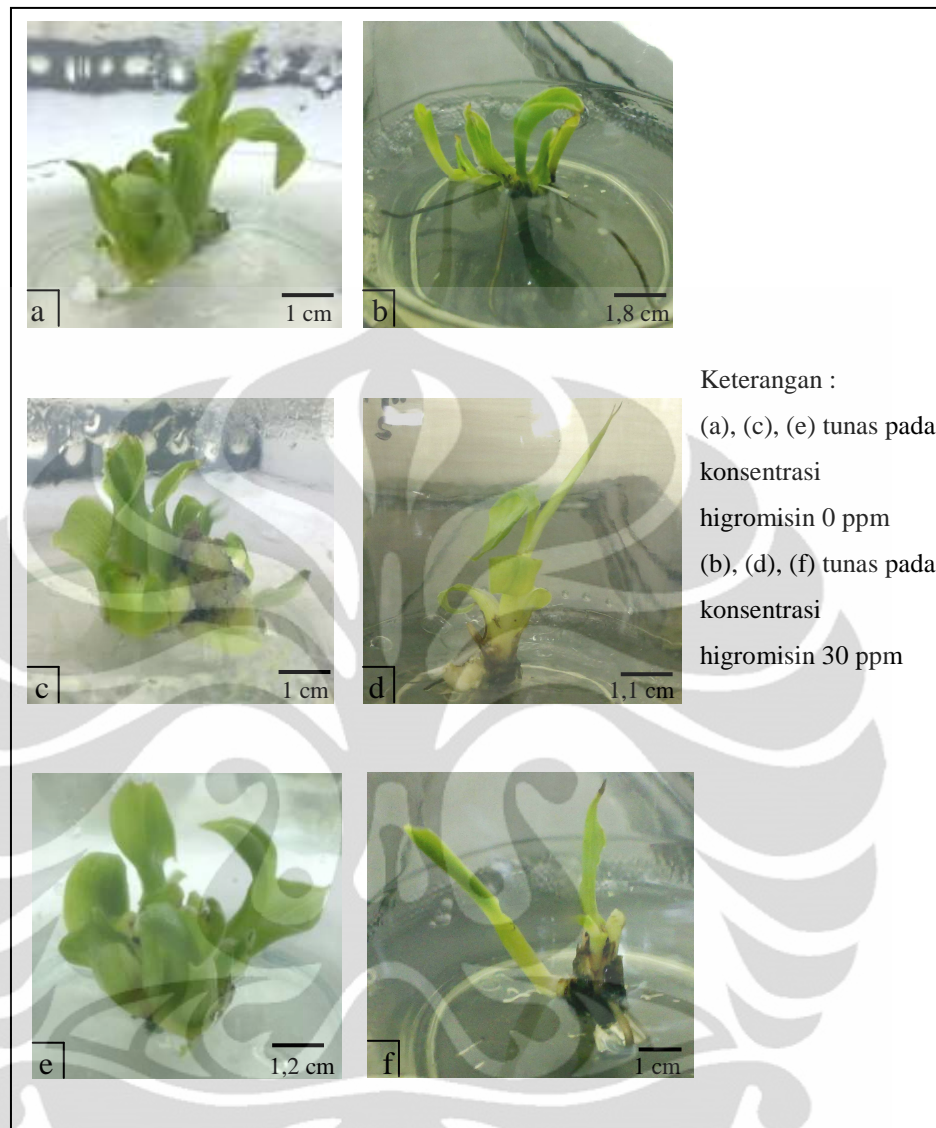


Gambar 4.2(1). Tunas tanaman pisang transgenik pada medium seleksi selama 1 minggu

[Sumber: Dokumentasi Puslit Bioteknologi LIPI, 2011.]



Gambar 4.2(2). Tunas tanaman pisang transgenik pada medium seleksi selama 2 minggu
 [Sumber: Dokumentasi Puslit Bioteknologi LIPI, 2011.]



Gambar 4.2(3). Tunas tanaman pisang transgenik pada medium seleksi selama 3 minggu (sampel 1, 2, dan 3)
[Sumber: Dokumentasi Puslit Bioteknologi LIPI, 2011.]

Tanaman pisang transgenik yang ditanam pada media dengan konsentrasi 0 ppm selama 2 maupun 3 minggu menunjukkan pertumbuhan (munculnya tunas baru, penambahan tinggi tunas dan jumlah daun) yang baik tiap minggunya (Gambar 4.2(1) s/d 4.2(3)). Hal tersebut disebabkan tidak adanya higromisin yang ditambahkan pada medium yang digunakan sehingga tanaman menunjukkan pertumbuhan yang baik tiap minggunya (Sreeramanan *dkk.* 2006: 193). Higromisin diketahui memiliki kemampuan untuk menghambat sintesis protein, yaitu dapat mengganggu translokasi. Hal tersebut dapat bersifat mematikan pada

tanaman nontransgenik yang tidak memiliki kemampuan untuk resisten terhadap higromisin (Lin *dkk.*1995: 47).

Hasil uji higromisin pada tunas tanaman pisang transgenik dengan konsentrasi 30 ppm selama 3 minggu menunjukkan pertumbuhan tunas tanaman yang lebih lambat dibandingkan tunas tanaman kontrol (Gambar 4.2(1) s/d 4.2(3)). Hal tersebut terlihat pada minggu ke-1, hanya terdapat satu tunas yang menunjukkan adanya akar (Gambar 4.2(1)(b)) dan tunas lainnya pada umumnya belum menunjukkan pertumbuhan sedangkan tunas kontrol sudah memperlihatkan pertumbuhan, yaitu adanya titik tumbuh dan bertambahnya ukuran daun (Gambar 4.2(1)). Pertumbuhan berupa tunas baru mulai terlihat pada minggu ke-2 (Gambar 4.2(3)(e) & (h)).

Hasil optimasi uji higromisin pada tunas tanaman pisang transgenik dengan konsentrasi 50 ppm selama 2 minggu menunjukkan hal yang hampir sama dengan uji higromisin pada konsentrasi 30 ppm selama 2 minggu, yaitu pada minggu ke-1, hanya terdapat dua tunas yang menunjukkan adanya akar (Gambar 4.2(1)(c) & (f)) dan tunas lainnya pada umumnya belum menunjukkan pertumbuhan. Perbedaan pertumbuhan pada tunas dikedua konsentrasi tersebut adalah pada konsentrasi 30 ppm pertumbuhan ditunjukkan dengan adanya tunas dan akar, sedangkan pada konsentrasi 50 ppm pertumbuhan hanya ditunjukkan dengan adanya akar (Gambar 4.2(1) s/d 4.2(2)).

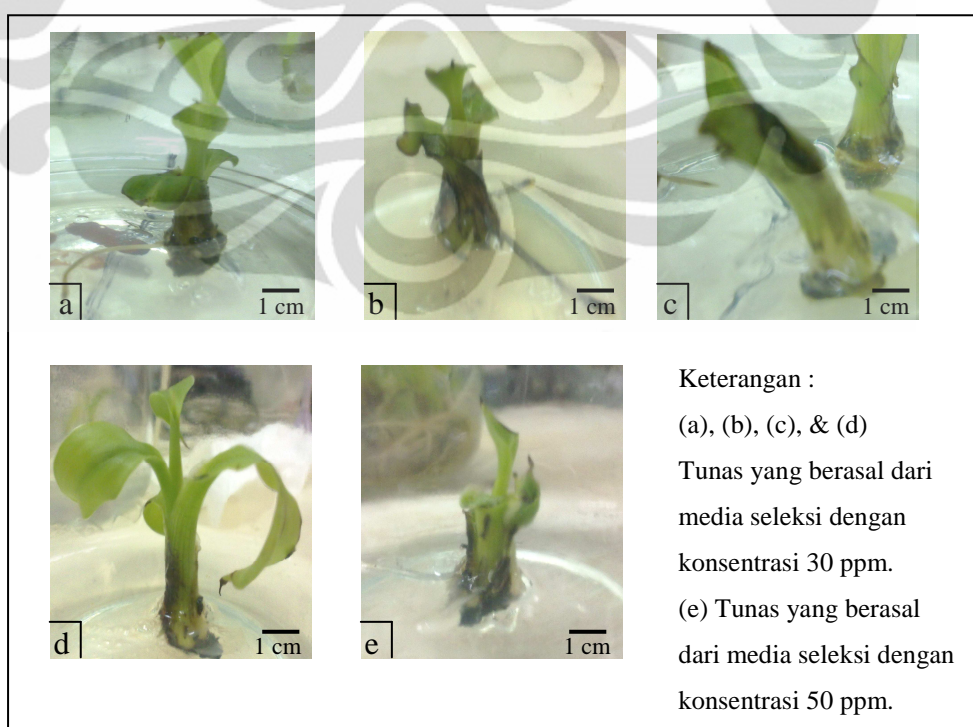
Pertumbuhan yang lebih lambat pada tunas yang diseleksi pada kedua konsentrasi menunjukkan bahwa higromisin mengakibatkan pertumbuhan tanaman transgenik sedikit terhambat namun tidak mengakibatkan kematian seperti pada tanaman nontransgenik. Penggunaan medium seleksi dapat mengakibatkan pertumbuhan rendah, menimbulkan *browning* dan menimbulkan kematian pada tanaman nontransgenik (Finer & McMullen 1991: 175). Tanaman transgenik tidak mengalami kematian disebabkan oleh adanya gen resisten yang dimiliki oleh tanaman transgenik mengkode kinase yang dapat menginaktivasi antibiotik higromisin melalui proses fosforilasi (Lin *dkk.* 1995: 47; Roche 2006: 1).

Perbedaan pertumbuhan tunas pada kedua konsentrasi dapat disebabkan oleh konsentrasi 50 ppm lebih menghambat pertumbuhan tunas dibandingkan

konsentrasi 30 ppm. Konsentrasi higromisin yang lebih tinggi bersifat lebih toksik sehingga dapat menyebabkan pertumbuhan lebih terhambat dan menyebabkan kematian lebih cepat pada tanaman nontransgenik (Sreeramanan *dkk.* 2006: 193).

Tanaman pisang yang bertahan hidup pada medium seleksi selanjutnya ditanam pada medium MS0 (MS tanpa zat pengatur tumbuh). Penggunaan medium tersebut dapat memulihkan kondisi tanaman setelah proses seleksi sehingga tanaman menjadi segar dan pertumbuhannya normal kembali . Pemulihan kondisi tanaman dilakukan hingga ukuran tanaman cukup besar dan memiliki akar yang cukup banyak untuk proses aklimatisasi (Sreeramanan *dkk.* 2006: 190).

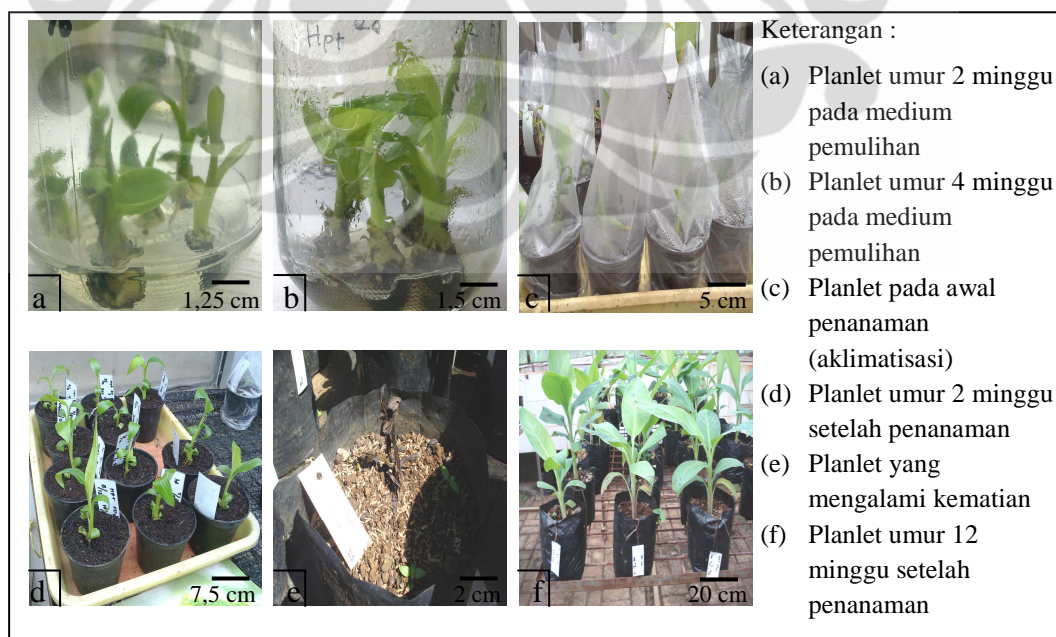
Hasil pemulihan tanaman menunjukkan terdapat 4 tunas yang berasal dari medium seleksi dengan konsentrasi higromisin 30 ppm, dan 1 tunas yang berasal dari medium seleksi dengan konsentrasi higromisin 50 ppm menunjukkan tanda-tanda kematian (bagian bawah tunas dan akar menghitam, daun mulai menguning hingga kecoklatan) dan selanjutnya mengalami kematian yang disebabkan oleh adanya kontaminasi (Gambar 4.2(7)).



Gambar 4.2(7). Kontaminasi pada tunas tanaman pisang transgenik
[Sumber: Dokumentasi Puslit Bioteknologi LIPI, 2011.]

Kontaminasi pada tunas tersebut dapat disebabkan oleh mikroorganisme yang dapat berasal dari medium, lingkungan kerja dan pelaksanaan tanaman yang kurang hati-hati dan kurang teliti. Mikroorganisme tersebut menyerang eksplan melalui luka-luka akibat pemotongan pada saat persiapan penanaman di medium pemulihan atau mengeluarkan senyawa beracun ke dalam medium kultur yang dapat menyebabkan kematian jaringan (Zulkarnain 2003: 92--93).

Proses aklimatisasi selanjutnya dilakukan setelah proses pemulihan. Proses aklimatisasi dilakukan untuk menyesuaikan kondisi tanaman yang berasal dari kultur *in vitro* dengan lingkungan *in vivo* yang septik (Zulkarnain (2003: 145). Hasil aklimatisasi menunjukkan terdapat 3 tanaman (30 ppm) dari 14 planlet dan 2 tanaman (50 ppm) dari 17 planlet yang mengalami kematian pada proses aklimatisasi, sedangkan planlet lainnya dapat tumbuh dengan baik (Gambar 4.2(7)). Menurut Zulkarnain (2003: 147), Kematian pada planlet dapat disebabkan oleh oleh banyak faktor, antara lain kurang bersihnya pencucian planlet dari sisa medium, adanya hama dan patogen karena kurangnya pemberian pestisida, penggunaan tanah yang tidak steril sebagai substrat tanaman dan kondisi lingkungan, seperti suhu yang tinggi dan kelembapan yang rendah dapat membahayakan planlet.



Gambar 4.2(8). Hasil aklimatisasi Tanaman pisang transgenik hasil uji higromisin [Sumber: Dokumentasi Puslit Bioteknologi LIPI, 2011.]

Hasil optimasi uji higromisin pada media tanam belum dapat menunjukkan konsentrasi yang paling baik untuk digunakan uji higromisin pada tanaman hasil transformasi. Hal tersebut disebabkan oleh kedua konsentrasi menunjukkan jumlah tanaman yang sama banyaknya dan hasilnya belum divalidasi. Hasil uji tersebut selanjutnya akan divalidasi dengan menggunakan analisis PCR, uji histokimia GUS, dan uji higromisin pada daun tanama.

4.3 Uji Validasi

4.3.1 Isolasi DNA Tanaman pisang kultivar lampung

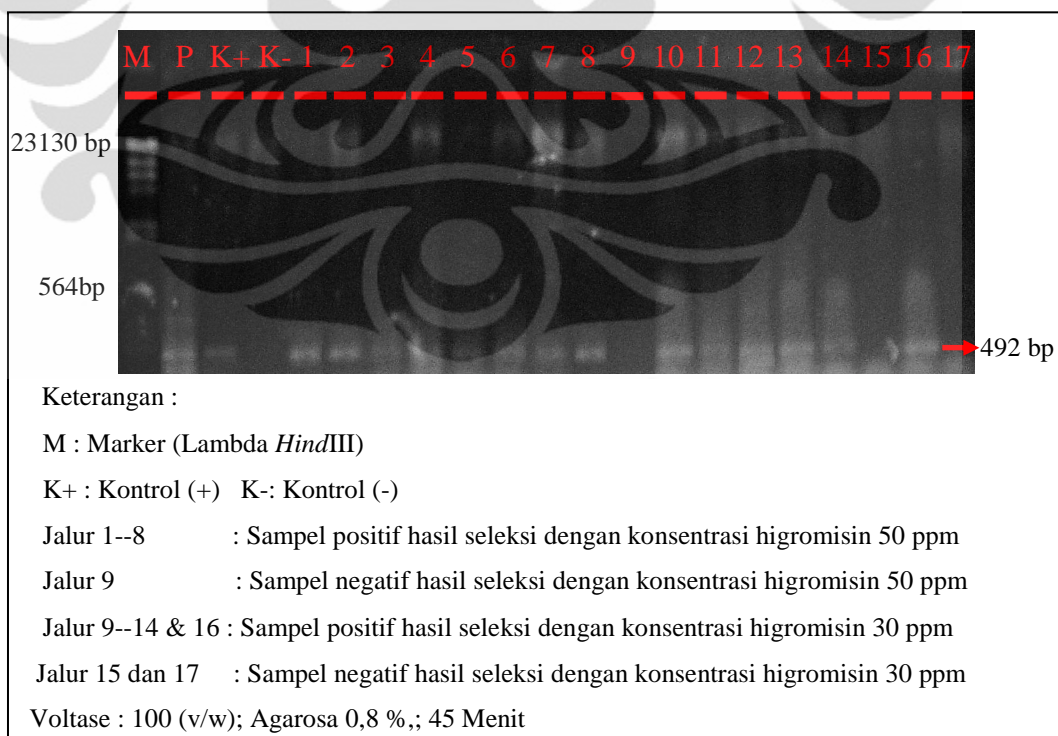
Isolasi DNA dilakukan untuk mendapatkan DNA genom dari tanaman pisang kultivar lampung. DNA tersebut selanjutnya akan digunakan pada proses PCR dan elektroforesis untuk mengetahui ada tidaknya gen hpt yang telah ditransformasikan. Pengisolasian DNA tanaman pisang dilakukan dengan menggunakan metode CTAB. Tujuan penggunaan metode tersebut adalah untuk mengatasi permasalahan adanya metabolit sekunder berupa fenol dan polisakarida yang banyak terdapat pada tanaman pisang yang dapat membuat DNA menjadi kental sehingga mengganggu proses PCR. Eksplan yang digunakan pada proses isolasi tersebut adalah daun muda tanaman pisang. Hal tersebut disebabkan daun muda mengandung fenol dan polisakarida yang lebih sedikit dibandingkan daun yang tua (Shangkar 2010: 84--85).

Hasil DNA yang didapatkan merupakan DNA murni berupa pelet yang bening setelah dilarutkan oleh Tris-EDTA (TE) dan RNase. Hasil tersebut menunjukkan bahwa DNA bersih dari pengotor seperti protein, garam, polisakarida dan senyawa metabolit sekunder. DNA yang murni didapatkan karena penggunaan *Cetyltrimethyl ammonium bromide* (CTAB) dan merkaptoetanol. Penggunaan CTAB dapat mengikat polisakarida yang dapat mengganggu pemurnian DNA dan β -mercaptoetanol mencegah terjadinya oksidasi protein dan polifenol sehingga didapatkan DNA yang baik (Khanuja 1999: 5; Clarke 2002: 1; Lekgari 2010: 2).

Hasil isolasi DNA tersebut selanjutnya digunakan untuk teknik PCR. Teknik PCR memiliki keuntungan, yaitu hanya membutuhkan jumlah DNA cetakan dalam jumlah sedikit untuk proses amplifikasi (Yuwono 2006: 1). Jumlah DNA yang digunakan untuk teknik PCR sebanyak 1 μ l memberikan hasil yang baik. Hasil tersebut dapat dilihat dari hasil elektroforesis pada gel agarosa 1,2 % dengan voltase 100 volt selama 45 menit yang menunjukkan adanya pita-pita DNA (Gambar 4.3.5).

4.3.5 *Polymerase chain reaction* (PCR) dan Elektroforesis

Proses PCR dan elektroforesis selanjutnya dilakukan setelah DNA larut dalam TE. *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya gen *hpt* dalam genom tanaman pisang. Tanaman pisang yang terbukti memiliki gen *hpt* selanjutnya akan digunakan untuk pengujian terhadap higromisin. Visualisasi hasil PCR dapat dilihat dengan mengelektroforesis DNA sampel yang telah melalui proses PCR (Maziah *dkk.* 2007: 505).



Gambar 4.3.1. Hasil Elektroforesis DNA tanaman pisang kultivar lampung
 [Sumber: Dokumentasi Puslit Bioteknologi LIPI, 2011.]

Hasil visualisasi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa 1,2 % (voltase 100 volt, 45 menit) menunjukkan 6 pita positif dari 11 tanaman (30 ppm) dan 11 pita positif dari 15 tanaman (50 ppm) (Gambar 4.3.1). Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pita berukuran 492 kb, yang merupakan gen *hpt* terdapat dalam genom tanaman pisang kultivar lampung (Sreeramanan *dkk.* 2009: 27).

Hasil PCR juga menunjukkan konsentrasi 50 ppm merupakan konsentrasi yang lebih baik digunakan untuk uji higromisin pada tanaman pisang hasil transformasi. Hal tersebut dikarenakan tanaman yang pada konsentrasi 50 ppm menunjukkan hasil yang positif yang lebih banyak dibandingkan tanaman yang diseleksi konsentrasi 30 ppm. Namun, penggunaan konsentrasi 50 ppm masih meloloskan tanaman yang diduga sebagai tanaman kimera dari seleksi uji higromisin. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya hasil negatif pada hasil PCR dari tanaman bertahan hidup pada konsentrasi 50 ppm (Sreemanan *dkk.* 2009: 27).

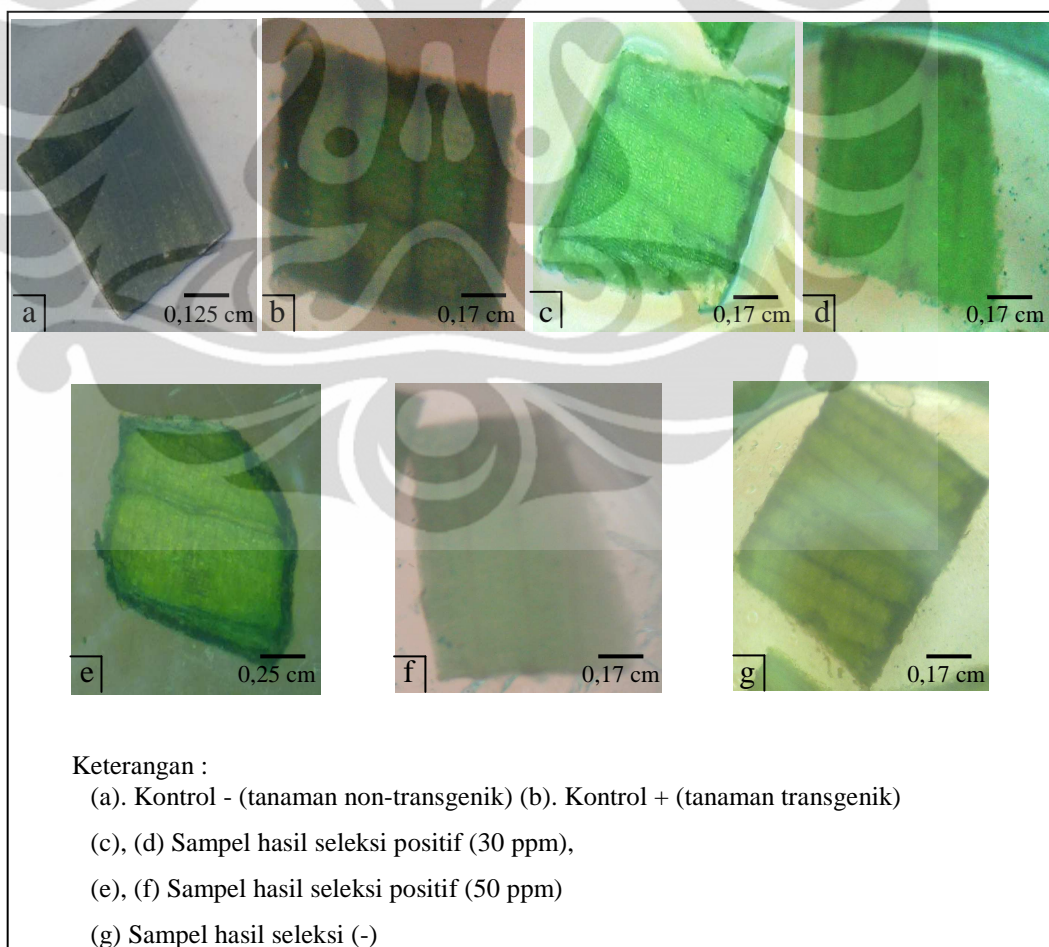
Tanaman kimera mungkin terbentuk karena hanya satu sel pada bagian jaringan meristem yang menerima T-DNA asing pada proses transformasi. Bagian yang menerima T-DNA asing (produk transgenik) akan menghasilkan aktifitas enzim yang akan memproteksi daerah sel di sekitarnya dari aktifitas antibiotik higromisin. Hal tersebut dapat menyebabkan lolosnya tanaman kimera dari seleksi. Penggunaan waktu seleksi yang kurang optimal juga dapat menyebabkan lolosnya tanaman kimera selama proses seleksi (May *dkk.* 1995 : 487). Pengoptimasian penggunaan waktu perlu dilakukan untuk mengoptimalkan kerja antibiotik higromisin (Sreemanan *dkk.* 2009: 27). Hasil analisis PCR selanjutnya akan dikolerasikan dengan hasil uji histokimia GUS dan hasil uji higromisin pada daun tanaman pisang.

4.3.2 Uji histokimia GUS

Uji Histokimia GUS merupakan salah satu metode yang dapat dilakukan untuk mengetahui ekspresi gen pada tanaman hasil transformasi. Gen yang diekspresikan adalah gen *gus* (β -glucuronidase) yang terdapat pada plasmid yang ditransformasikan dalam jaringan tanaman. Ekspresi gen tersebut menunjukkan

adanya spot berwarna biru (*dichloro dibromo indigo* (CIBr-indigo)) yang terdapat pada bagian tanaman yang diujikan. Spot biru tersebut terbentuk akibat adanya aktivitas enzim β -glucuronidase yang disebabkan oleh perendaman bagian tanaman dengan larutan *X-gluc* (Stomp 1992: 103--104). Hasil dari uji histokimia GUS dapat digunakan untuk melihat keberhasilan dari teknik transformasi yang dilakukan (Bond & Gresshoff 1993: 36).

Uji histokimia GUS dilakukan dengan menggunakan eksplan berupa daun yang berasal dari tanaman hasil seleksi. Hasil uji histokimia GUS menunjukkan 8 dari 11 tanaman (30 ppm), 13 dari 15 tanaman (50 ppm), dan 3 dari 6 tanaman (0 ppm) menunjukkan hasil yang positif, yaitu adanya spot biru. Kontrol negatif berupa daun yang berasal dari tanaman nontransforman menunjukkan hasil uji negatif. Hasil uji histokimia GUS juga menunjukkan bahwa tingkat ekspresi yang dihasilkan rendah (Gambar 4.3.2).



Gambar 4.3.2. Hasil uji histokimia GUS pada tanaman hasil uji higromisin
[Sumber: Dokumentasi Puslit Bioteknologi LIPI, 2011.]

Tingkat ekspresi yang rendah dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain difusi produk reaksi, senyawa penghambat yang dihasilkan tanaman, promotor gen *gus*, banyaknya perbanyakan (subkultur) dan usia tanaman (Fior & Gerola 2009: 7). Difusi oksigen yang kurang dalam reaksi dimerisasi oksidatif pada proses pembentukan spot biru dapat menyebabkan ekspresi gen *gus* yang rendah atau bahkan tidak tampak. Hal tersebut dapat disebabkan oleh tempat perendaman yang terlalu kecil sehingga menyebabkan kurangnya asupan oksigen (Bond & Gresshoff 1993: 36).

Senyawa yang dihasilkan tanaman dapat menghambat aktivitas GUS. Fior & Gerola (2009: 7) melaporkan terdapat aktifitas penghambatan GUS pada organ yang berasal dari tiga model tanaman, yaitu padi, arabidopsis, dan tembakau. Organ berupa bunga, daun dan batang merupakan organ yang cukup tinggi menghasilkan aktifitas penghambatan GUS. Aktifitas penghambatan GUS juga dilaporkan oleh Cote & Rutledge (2003: 623), yaitu adanya senyawa fenolik yang dihasilkan tanaman dapat mengganggu reaksi oksidatif melalui ikatan kovalen dari kuinon yang tinggi dikombinasikan dengan ikatan nonkovalen dari fenol. Penghambatan aktivitas GUS tersebut mungkin terjadi pada tanaman pisang dengan kadar fenol yang tinggi terutama pada bagian daun (Shangkar 2010: 84).

Promotor gen *gus*, yaitu CaMV 35S (*Cauliflower mosaic virus 35S*) juga dapat menyebabkan rendah atau tidak tampaknya ekspresi gen *gus*. Promoter tersebut mengatur lebih dari satu gen, yaitu gen *hpt* dan gen *gus* pada satu plasmid yang sama. Hal tersebut dapat menyebabkan salah satu gen yang diatur oleh promoter tersebut menjadi nonaktif (*silencing gene*) (Mazke *dkk.* 1989: 643). Hal tersebut didukung oleh penelitian yang dilaporkan Napoli *dkk.* (1990) dan Van der Krol *dkk.* (1990) dalam Finer *dkk.* (1992: 181). Penelitian tersebut menunjukkan bahwa intergrasi *multiple copies* suatu gen yang diatur oleh satu promoter (salinan promoter 35S) mengakibatkan *silencing gene*.

Banyaknya subkultur atau proses perbanyakan dan umur tanaman juga mempengaruhi tingkat ekspresi dari gen *gus*. Hal tersebut dilaporkan oleh Cornejo *dkk.* (1993) yang menyatakan bahwa ekspresi gen *gus* dapat turun bahkan hilang pada tanaman transgenik akibat banyaknya subkultur dan semakin tuanya umur tanaman. Hal tersebut mungkin terjadi pada ekspresi gen *gus* pada tanaman

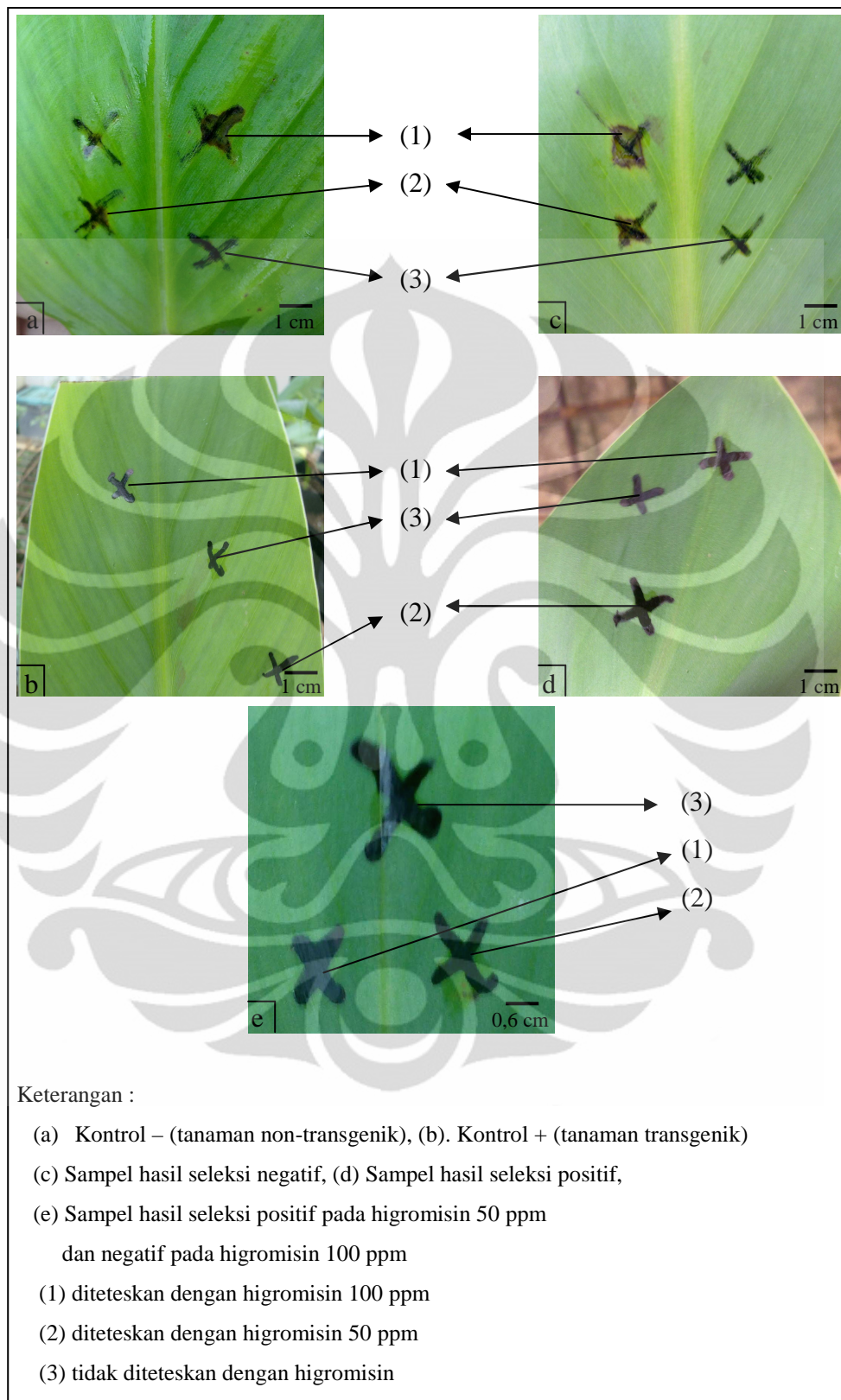
pisang kultivar lampung transgenik yang digunakan karena tanaman pisang tersebut sudah mengalami tiga kali tahap subkultur dan berumur 24 minggu dari proses subkultur ke-3 (Sreemanan *dkk.* 2009: 25).

Hasil uji histokimia GUS menunjukkan bahwa konsentrasi higromisin 50 ppm memiliki potensi paling besar sebagai konsentrasi yang paling baik digunakan untuk uji higromisin pada tanaman pisang hasil transformasi. Hal tersebut dikarenakan tanaman yang diseleksi pada konsentrasi 50 ppm lebih banyak menunjukkan hasil yang positif mengekspresikan gen *gus* (spot biru) dibandingkan tanaman yang diseleksi konsentrasi 30 ppm. Hasil tersebut selanjutnya akan dikolerasikan dengan analisis PCR dan hasil uji higromisin pada daun tanaman pisang.

4.3.3 Uji higromisin pada daun tanaman

Uji ketahanan pada daun yang berasal dari tanaman transgenik terhadap higromisin merupakan salah cara yang dapat dilakukan untuk mengetahui ekspresi gen *hpt* pada tanaman. Menurut Bashir *dkk.* (2004) Antibiotik higromisin akan bekerja dengan kombinasi ada atau tidaknya gen *hpt* dalam genom tanaman. Antibiotik tersebut akan menghambat sintesis protein melalui gangguan translokasi yang menyebabkan kesalahan translokasi pada ribosom 80S (Lihat Mulyaningsih *dkk.*2010: 64).

Hasil uji higromisin pada daun tanaman hasil seleksi menunjukkan 8 dari 11 tanaman (30 ppm), 14 dari 15 tanaman (50 ppm) untuk konsentrasi higromisin 50 mg/L dan 6 dari 11 tanaman (30 ppm), 11 dari 15 tanaman (50 ppm) konsentrasi higromisin 100 mg/L memperoleh hasil yang positif, yaitu tidak adanya nekrosis. Hasil tersebut juga menunjukkan ada 5 dari 11 tanaman (30 ppm) dan 8 dari 15 tanaman yang menunjukkan hasil positif pada dua konsentrasi yang digunakan. Kontrol negatif berupa daun yang berasal dari tanaman nontransforman menunjukkan hasil uji negatif. Kontrol positif berupa daun yang berasal dari tanaman transgenik (PCR positif) menunjukkan hasil uji positif (gambar 4.3.3).



Gambar 4.3.3. Hasil uji higromisin pada daun tanaman
 [Sumber: Dokumentasi Puslit Bioteknologi LIPI, 2011.]z

Hasil positif menunjukkan tanaman mengandung gen *hpt* dalam genomnya dan mengekspresikannya. Menurut Brasileiro & Aragao (2001), gen *hpt* tersebut akan menghasilkan enzim higromisin fosfotransferase yang mampu mendetoksifikasi antibiotik higromisin dan mengkatalis fosforilasi kelompok hidroksil dalam antibiotik sehingga menjadi tidak aktif dan tidak meracuni tanaman (Lihat Mulyaningsih *dkk.*2010: 64). Hasil yang tidak sama pada penggunaan kedua konsentrasi higromisin, yaitu hasil yang positif pada konsentrasi 50 mg/l dan negatif pada konsentrasi 100 mg/l dapat disebabkan oleh konsentrasi 100 mg/l yang digunakan lebih tinggi dibandingkan dengan ekspresi higromisin yang dihasilkan oleh tanaman transgenik. Konsentrasi yang lebih tinggi lebih bersifat toksik bagi tanaman (Lin *dkk.* 1995: 49).

Hasil uji higromisin pada daun tanaman menunjukkan bahwa konsentrasi higromisin 50 ppm memiliki potensi paling besar sebagai konsentrasi yang paling baik digunakan untuk uji higromisin pada tanaman pisang hasil transformasi. Hal tersebut dikarenakan tanaman yang diseleksi pada konsentrasi 50 ppm lebih banyak menunjukkan hasil yang positif mengekspresikan gen *hpt* dibandingkan tanaman yang diseleksi konsentrasi 30 ppm. Hasil tersebut selanjutnya akan dikolerasikan dengan hasil analisis PCR dan uji histokimia GUS.

4.3.6 Kolerasi hasil uji validasi

Hasil analisis PCR merupakan hasil yang lebih valid dibandingkan hasil uji lainnya. Hal tersebut dikarenakan proses PCR mendeteksi keberadaan gen asing pada tingkat DNA genom, sedangkan uji lainnya memiliki faktor kesalahan yang lebih tinggi dan mendeteksi pada tingkat sel dan organ tanaman (Yuwono 2006: 2). Hasil PCR selanjutnya dikolerasikan dengan uji validasi lainnya, yaitu uji histokimia GUS dan uji higromisin pada daun tanaman hasil seleksi. Hasil kolerasi menunjukkan terdapat 3 tanaman (no. 302, 305, dan 310) dari 11 tanaman (30 ppm) dan 7 tanaman (no.504, 506, 507, 520,521,522, dan 530) dari 15 tanaman hasil seleksi yang diujikan memperoleh hasil positif di ketiga uji (Tabel 4.3.6(1) dan Tabel 4.3.6(2)). Hasil tersebut menunjukkan tanaman tersebut

merupakan tanaman transgenik yang mengandung gen *hpt* dan mengekspresikannya (Mulyaningsih 2010: 64).

Hasil kolerasi dengan pembanding utama hasil PCR juga menunjukkan adanya hasil yang tidak positif pada ketiga uji, yaitu :

1. hasil PCR (adanya gen *hpt*) dan hasil uji higromisin pada daun tanaman positif (tidak nekrotik), hasil uji histokimia GUS negatif (tidak ada spot biru).
2. hasil PCR (adanya gen *hpt*) dan uji histokimia GUS positif (adanya spot biru), hasil uji higromisin pada daun tanaman negatif (nekrotik).
3. hasil PCR negatif (tidak ada gen *hpt*), hasil uji histokimia GUS (adanya spot biru) dan hasil uji higromisin pada daun tanaman positif (tidak nekrotik).

Tabel. 4.3.6(1).

Hasil uji higromisin pada medium seleksi dengan konsentrasi higromisin 30 ppm dan uji validasi (uji histokimia GUS, uji higromisin pada daun tanaman dan analisis PCR)

NO	No.Sampel	Uji Higromisin pada medium seleksi	Uji GUS	Uji Higromisin pada daun tanaman (50 ppm)	Uji Higromisin pada daun tanaman (100 ppm)	PCR
1	301	+	+	-	-	-
2	302	+	+	+	+	+
3	303	Mati				
4	304	+	+	+	+	-
5	305	+	+	+	+	+
6	306	+	+	+	+	-
7	307	+	-	+	-	-
8	308	+	-	+	+	+
9	309	Mati				
10	310	+	+	+	+	+
11	311	+	+	+	-	+
12	312	+	+	-	-	+
13	320	+	Mati			

14	321	+	+	+	-	-
15	322	Mati				
16	323	Mati				
17	324	+	Mati			
18	325	+	Mati			

Tabel. 4.3.6(2).

Hasil uji higromisin pada medium seleksi dengan konsentrasi higromisin 50 ppm dan uji validasi (uji histokimia GUS, uji higromisin pada daun tanaman dan analisis PCR)

NO	No.Sampel	Uji Higromisin pada medium seleksi	Uji GUS	Uji Higromisin pada daun tanaman (50 ppm)	Uji Higromisin pada daun tanaman (100 ppm)	PCR
1	501	+	-	+	-	-
2	502	+	Mati			
3	503	+	+	+	+	-
4	504	+	+	+	+	+
5	505	Mati				
6	506	+	+	+	+	+
7	507	+	+	+	+	+
8	520	+	+	+	+	+
9	521	+	+	+	+	+
10	522	+	+	+	+	+
11	523	+	+	+	+	-
12	524	+	+	+	+	+
13	525	+	+	+	+	+
14	526	+	-	-	-	-
15	527	+	Mati			
16	528	+	+	-	-	+
17	529	+	+	+	-	+
18	530	+	+	+	+	+

Tabel. 4.3.6(3).

Hasil perhitungan persentase kepercayaan seleksi (*reliabilty of selection*)

No	Konsentrasi seleksi	Jumlah eksplan	Jumlah tanaman yang bertahan hidup pada media seleksi (A)	Hasil Uji Histokimia GUS (B)		Hasil Uji Higromisin pada Daun Tanaman (C)				Hasil PCR (D)		Persentase kepercayaan seleksi (%) (D/A)
				+	-	50 ppm (C1)		100 ppm (C2)		+	-	
						+	-	+	-			
1	0 ppm	6	6	3	3	-	-	-	-	4	2	66,7
2	30 ppm selama 3 minggu	18	18	8	10	8	10	6	12	6	12	33,33
3	50 ppm selama 2 minggu	18	18	13	5	14	4	11	7	11	7	61,61

Hasil PCR dan uji higromisin pada daun tanaman positif, namun hasil uji histokimia GUS negatif (sampel 308) menunjukkan bahwa terdapat adanya kemungkinan, yaitu tanaman tersebut tidak mengekspresikan gen *gus* akibat adanya beberapa faktor (difusi produk reaksi, senyawa penghambat yang dihasilkan tanaman, promotor gen *gus* (mekanisme *silencing gene*), banyaknya perbanyakan (subkultur) dan usia tanaman) (Fior & Gerola 2009: 7) dan sekuen T-DNA tidak secara utuh masuk ke dalam genom (*truncated gene*). Keberadaan gen *hpt* dapat merupakan indikasi keberadaan gen lain, contohnya gen *gus* dalam satu T-DNA yang sama. Hal tersebut belum tentu tepat karena kemungkinannya terjadi *truncated gene* sehingga gen target terpotong atau tidak masuk dalam genom tanaman (Mulyaningsih 2010: 64).

Hasil PCR dan uji histokimia GUS positif, namun hasil uji higromisin pada daun tanaman negatif (sampel 311, 312, 529, 528) menunjukkan tanaman transgenik tersebut tidak mampu mengekspresikan ketahanan higromisin

sehingga menunjukkan gejala nekrotik. Hal tersebut diduga disebabkan oleh adanya mekanisme *silencing gene* pada gen *hpt*. Mekanisme *silencing gene* dapat terjadi pada transformasi genetik yang disebabkan oleh beberapa hal, salah satunya *silencing gene* pada tahap transkripsi (metilasi pada daerah promotor) (Mulyaningsih 2010: 64--65).

Hasil PCR negatif, namun hasil uji higromisin pada daun tanaman dan uji histokimia GUS positif (sampel 304, 306, 503, 523) menunjukkan tanaman yang diujikan diduga merupakan tanaman kimera. Tanaman kimera merupakan tanaman yang memiliki bagian tertentu saja yang berhasil ditransformasikan (mengandung gen *hpt*). Hal tersebut menunjukkan bahwa ada kemungkinan hanya bagian tertentu dari tanaman tersebut yang dapat mengekspresikan gen *hpt* dan gen *gus* (Suratman *dkk.* 2010: 126).

Hasil kolerasi dan perhitungan kepercayaan seleksi (*reliability of selection*) uji validasi menunjukkan bahwa konsentrasi higromisin 50 ppm lebih baik digunakan pada uji higromisin pada tanaman hasil transformasi dibandingkan dengan konsentrasi higromisin 30 ppm. Hal tersebut didasari oleh nilai kepercayaan penggunaan konsentrasi 50 ppm lebih tinggi dibandingkan konsentrasi 30 ppm (Tabel 4.3.6(3)). Namun, penggunaan konsentrasi 50 ppm selama 2 minggu masih menunjukkan adanya tanaman yang diduga sebagai tanaman kimera yang lolos seleksi, sehingga konsentrasi tersebut tidak dapat dikatakan sebagai konsentrasi yang paling baik digunakan untuk uji higromisin pada tanaman hasil transformasi. Konsentrasi yang paling baik adalah konsentrasi yang tidak meloloskan tanaman kimera pada uji seleksi tanaman hasil transformasi (Sreeramanan *dkk.* 2006: 193).

Penggunaan konsentrasi 50 ppm perlu dikaji lebih lanjut dengan melakukan seleksi dengan waktu yang lebih lama dari dua minggu. Penggunaan waktu yang lebih lama diharapkan dapat meminimalisir lolosnya tanaman nontransgenik pada seleksi. Penggunaan waktu yang dapat digunakan tidak melebihi waktu jenuh tanaman terhadap media tanam sehingga tidak terjadi kesalahan penentuan kematian tanaman akibat konsentrasi higromisin yang digunakan (Lin *dkk.* 1995: 49). Dua siklus seleksi irisan meristem pada media yang mengandung higromisin dapat juga dilakukan untuk menghilangkan tanaman kimera. Menurut May *dkk.*

(1995: 486), dua siklus propropagasi tanaman *putative* transgenik dari irisan jaringan meristem pada media seleksi dapat menghilangkan tanaman kimera.

Hibridisasi Southern juga perlu dilakukan untuk mengetahui jumlah salinan gen dalam genom tanaman. Hal tersebut terkait dengan peristiwa *silencing gene* yang dapat mengakibatkan tidak terekspresinya suatu gen. Jumlah salinan gen tunggal dapat mengantisipasi terjadinya peristiwa tersebut (Mulyaningsih *dkk.* 2010: 65).



BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Konsentrasi higromisin 50 ppm selama 2 minggu lebih baik digunakan pada uji higromisin pada tanaman hasil transformasi dibandingkan dengan konsentrasi higromisin 30 ppm. Konsentrasi tersebut bukan merupakan konsentrasi yang paling tepat yang dapat membunuh semua tanaman yang tidak berhasil ditransformasikan.

5.2 Saran

1. Waktu seleksi yang lebih lama dari 2 minggu dapat dilakukan untuk mengoptimalkan penggunaan konsentrasi higromisin 50 ppm pada uji seleksi tanaman hasil transformasi
2. Dua siklus seleksi irisan meristem pada media yang mengandung higromisin dapat dilakukan untuk menghilangkan tanaman kimera.
3. Hibridisasi Southern perlu dilakukan untuk mengetahui jumlah *copy number* T-DNA dalam genom tanaman terkait dengan stabilitas gen dalam genom tanaman.

DAFTAR REFERENSI

- Aoki, T., A. Kamizawa & S. Ayabe. 2002. Efficient Agrobacterium-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotic selection. *Plant Cell Report* **21**: 238--243.
- Arvanitoyannis, I. S., G. M. Athanassios, G.A. Garyfalia, & S. Michaela 2008. Banana: cultivars, biotechnological approaches and genetic transformation. *International Journal of Food Science and Technology* **43**: 1871--1879 .
- Ausubel, F. M., R. Brent, R.E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, & K. Sthruel. 1998. *Current protocol in molecular biology 1*. John Wiley & Sons Inc., Canada: xxvi + 2.1.1--2.1.9 + 2.3.1 + 2.5A.1 --2.5A.8 hlm.
- Bhojwani, S. S., & M. K. Razdan. 1996. *Plant tissue culture: Theory and practice*. Elsevier Science, Amsterdam: 603 hlm
- Bond, J. E & P. M. Gresshoff. 1993. Soybean transformation to study molecular physiology. *Dalam: Racheff, I. (ed.). 1993. Plant response the environment*. CRC Press, Inc., Knoxville: 25--44.
- Carr, S. 2010. The Polymerase Chain Reaction (PCR). (?): 1 hlm.
http://www.mun.ca/biology/scarr/PCR_simplified.html. 20 Agustus 2010, 9.35 WIB.
- Clarke, J. D. 2002. Cetyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) DNA Miniprep for Plant DNA Isolation. (?): 2 hlm.
<http://cshprotocols.cshlp.org/cgi/content/abstract/2009/3/pdb.prot5177>. 23 Oktober 2010, 14.32 WIB.
- Cote, C. & R. G. Rutledge. 2003. An improved MUG fluorescent assay for the determination of GUS activity within transgenic tissue of woody plants. *Plant Cell Report* **21**: 619--624.
- Cruz, D. F. S., Jr, L. S. Gueco, O. P. Damasco, V. C. Huelgas, I. G. Banasihan, R. V. Liadones, I. Van den Bergh, & AB Molina. 2007. *Catalogue of introduced and local banana cultivars in the Philippines: Results of a demonstration trial by the Institute of Plant Breeding*, University of the

- Philippines Los Baños. IPB-UPLB, Bioversity International and DA-BAR, Philippines. 63 hlm.
- Davis, L., M. Kuehl, & J. Battey. 1994. *Basic methods: Molecular biology*. 2nd ed. Appleton & Lange, Norwola: xii + 777 hlm.
- Fairbanks, D.J. & W.R. Andersen. 1999. *Genetics: The continuity of life*. 4th ed. Wadsworth Publishing Company, London: xix + 820 hlm.
- Finer, J. J., P. Vein, M.W. Jones & M. D. McMullen. 1992. Development of the particle in flow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Report* **40**: 321--328.
- Finer, J. & T. Dhillon. 2008. Transgenic plant production. Dalam Stewart, C. N. Jr. 2008. *Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Techniques, and Applications*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey : xxiii + 371 hlm.
- Fior, S. & Gerola, P. D. 2009. Impact of ubiquitous inhibitors on the GUS gene reporter system: evidence from the model plants Arabidopsis, tobacco and rice and correction methods for quantitative assay of transgenic and endogenous GUS. *Plant Methods* **5**: 1-11.
- Greco, R., P. B. F. Ouwerk, R. J. de Kam, C. Sallaud, C. Favalli, L. Colombo, E. Guiderdoni, A. H. Meijer, J. H. C. Hoge, & A. Pereira. 2003. Transpositional behaviour of an Ac/Ds system for reverse genetics in rice. *Theory Applied Genetics* **108**: 10--24.
- Guerinaeu, F. 1995. Tools for expressing foreign genes in plants. *Methods m Molecular Biology : Plant Gene Transfer and Expression Protocols* **49**: 1--32.
- Khanuja, S. P. S., A. K. Shasany, M.P. Darokar & S. Kumar. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Molecular Biology Reporter* **17**: 1--7.
- Klug, W.S. & M.R. Cummings. 1994. *Concepts of genetics*. 4th ed. Prentice-Hall Englewood, New Jersey: xvi + 773 hlm.
- Kumar, G. B. S., T. R. Ganapathi & V. A. Bapat. 2007. Production of hepatitis b surface antigen in recombinant plant system: an update. *Biotechnology* **23**: 532--539.

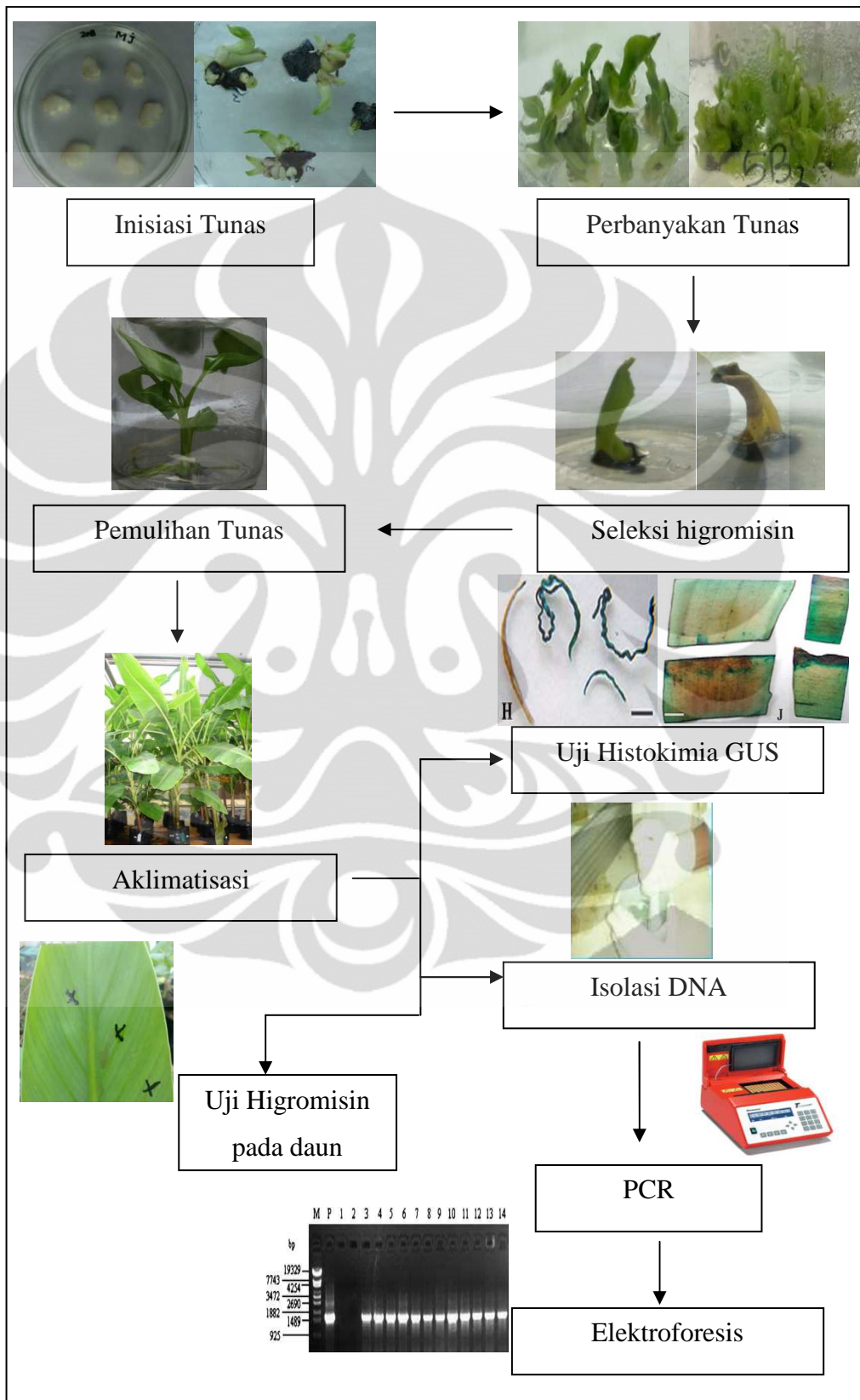
- Lekgari, L. 2010. Extraction of Nucleic Acids (DNA and RNA) From Plant Tissues. (?): 6 hlm. <http://www.biotecharticles.com/Biotech-Research-Article/Extraction-of-Nucleic-Acids-DNA-and-RNA-From-Plant-Tissues-329.html>, 23 Oktober 2010, 12.10 WIB.
- Leonard, D., Kuehl, & J. Battley. 1994. *Basic methods in molecular biology*. 2nd ed. Appletown & Lange Norwalk, Connecticut: xiv + 777 hlm.
- Lin J. J., J. Ma, N. G. Assad, & J. Kuo. 1995. Hygromycin b as an efficient antibiotic for the selection of transgenic plants. *Focus* **18(2)**: 47--49.
- May G. D., R. Afza, H. S. Mason, A. Wiecko, F. J. Novak, & C. J. Arntzen. 1995. Generation of transgenic banana (*musa acuminata*) plants via *agrobacterium*- mediated transformation. *Biotechnology* **13**: 486--492.
- Martin, T., R. V. Wohner, S. Hummel, L. Willmitzer, & W. B. Frommer. 1992. The gus reporter system as a tool to study plant gene expression. *GUS Protocol: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*: 23--43.
- Matzke, M. A., M. Primig, J. Trnovsky & A. J. M. Matzke. 1989. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *The EMBO Journal* **8(3)**: 643--649.
- Maziah, M., S. Sreeramanan, A. Puad & M. Sariah. 2007. Production of transgenic plant banana cultivar, rastali (ABB) via *agrobacterium*-mediated transformation with a rice chitinase gene. *Journal of Plant Sciences* **2(5)**: 504--517.
- McCullen, C. A. & Binns, A.N. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**: 101--127.
- Mulyaningsih, E. S., H. Aswidinnoor, D. Sopandie, P. B. F. Ouwerkerk, & I. H. S. Loedin. 2010. Pewarisan gen penanda *hpt* (Higromisin Phosphotransferase) berdasarkan analisis PCR dan ekspresinya pada populasi padi transforman mengoverekspresikan gen *hd zip oshox-6*. *Berita Biologi* **10(1)**: 59--66.
- Newbury, J. H. 2003. *Plant Molecular Breeding*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford: xii + 261 hlm.
- Nicholl, D.S.T. 2002. *An introduction to genetic engineering*. 2nd ed. Cambridge University Press, New York: xii + 292 hlm.

- Old, R. W. and S. B. Primrose. 2003. *Prinsip-prinsip manipulasi gen: Suatu pengantar rekayasa genetik*. Universitas Indonesia Press, Jakarta: vii + 446 hlm.
- Parsley, L. 2004. Transgenic plants: a budding controversy stems from consumer concerns. *Journal of Young Investigators* **8(1)**: 1--12.
- Plantlist. 2010. *Musa acuminata colla*. (?): 2 hlm.
<http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-254739>. 15 Januari 2011, 10.23 WIB.
- Primose, S. B., R. M. Twyman, & R. W. Old. 2001. *Principle of gene manipulation*. Blackwell Publishing Company, Oxford: vi + 319 hlm.
- Pua, C. E. & M. R. Davey. 2007. *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Transgenic Crop V*. Springer Berlin Heideberg, New York: xxiv + 549 hlm.
- Riva, G. A. D., J. G. Cabrera, R. V. Padron & C. A. Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* **1(3)**: 1--16.
- Roche. 2006. *Hygromycin B*. Roche Diagnostic, Mannheim: 4 hlm.
- Russell, P. J. 1994. *Fundamental of genetics*. Harper Collins Publishers, New York: xvi + 622 hlm.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, & T. Manniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: xxxviii + 5.31 + 6.9 hlm.
- Sambrook, J. & D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual vol 1*. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York: xvii + 7.9
- Shankar, K., L. Chavan, S. Shinde, & B. Patil. An improved DNA extraction protocol from four in vitro banana cultivars. *Asian Journal of Biotechnology* **3(1)**: 84--90.
- Seidman, L. A. & C. J. Moore. 2000. *Basic laboratory methods for biotechnology*. Prentice Hall, Inc., London: 751 hlm.
- Siregar, E. B. M., 2002. *Perbaikan tanaman via rekayasa genetika*. Universitas Sumatra Utara Digital Library, Medan: 6 hlm.

- Sreeramanan, S., M. Maziah, M. P. Abdullah, N. M. Rosli & R. Xavier. 2006. Potential selectable marker for genetic transformation in banana. *Biotechnology* **5(2)**: 189 --197.
- Sreeramanan, S., M. Maziah & R. Xavier. 2009. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of banana with a rice chitinase gene. *Journal Food Agriculture* **21(2)**: 18--33.
- Stomp, A. M. 1992. Histochemical localization of β -glucuronidase. *GUS Protocol: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*: 103--113.
- Strosse, H. V. & B. Panis. 2004. Banana improvement: cell and tissue culture, and mutation. *FAO corporate document prosperity*: 1--2.
- Surono, A & A. Himawan. 2010. Multiplikasi tunas pisang ambon secara in vitro dengan menggunakan medium murashige dan skoog dengan penambahan hormon *benzylaminopurin* dan *kinetin*. *CV. Biotech* **1**: 1--11.
- Suratman, F, F. Huyop, A. Wagiran, Z. Rahmat, H. Ghazali & G.K.A. Parveez. 2010. Biolistic Transformation of *Citrullus vulgaris* Schrad (Watermelon) . *Biotechnology* **9(2)**: 119---30.
- Suyanti & A. Supriyadi. 2008. Pisang: *budi daya, pengelolaan, dan prospek pasar*. Penerbit Swadaya, Depok: 130 hlm.
- Talengera, D., M. J. S. Magambo & P.R. Rubaihayo. 1994. Testing for a suitable culture medium for micropropagation of East African Highland bananas. *Africa Crop Science Journal* **2**: 17--21.
- USDA. 2011. *Musa acuminata* Colla : edible banana. 06 Maret 2011: 4 hlm. <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=MUAC>. 3 Juni 2011, 9.00 WIB
- Valmayor, R. H., S. H. Jamaluddin, B. Silayoi, S. Kusumo, L. D. Danh, O. C. Pascua & R. R. C. Espino. 2000. *Banana names and synonyms in southeast asia*. International network for the improvement of banana and plantain-Asia and Pasific office, Los banos Laguna: 29 hlm.
- Wilson, K. J., S. G. Hughes, & R. A. Jefferson. 1992. The *Escherichia coli* gus Operon: Induction and expression of the gus operon in *E.coli* and the occurrence and use of GUS in other bacteria. *GUS Protocol: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*: 7--22.

- Wolfe, S. L. 1993. *Molecular and cellular biology*. Wadsworth Publishing Company, Belmont: xviii + 1145 hlm.
- Yonghong, H., Y. Ganjun, Z. Birong, Z. Jiwu, & W. Yuanli. 2006. Progress of methodology of genetic transformation of banana. *Molecular Plant Breeding* **43(S)**: 79--84.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekular*. Erlangga, Jakarta: xiii + 269 hlm.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan aplikasi: Polymerase chain reaction*. Penerbit Andi, Yogyakarta: viii + 239.
- Zheng, S. J., L. Khrustaleva, B. Henken, E. Sofiari, E. Jacobsen, C. Kik & F. A. Krens. 2000. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. *Molecular Breeding* **7(2)**: 101--115.
- Zulkarnain. 2009. *Kultur jaringan tanaman*. PT. Bumi Aksara, Jakarta: xviii+249 hlm.

Lampiran 1. Skema kerja penelitian



Lampiran 2. Stok untuk Pembuatan Media

No	Bahan	Stok	Konsentrasi akhir (gr/l)/(mg/l)	Pengambilan
1.	<u>Hara makro</u>	1000 ml	(gr/l)	50 ml/l
a.	NH ₄ NO ₃	33000 mg	1.65	
b.	KNO ₃	38000 mg	1,9	
c.	MgSO ₄ .7H ₂ O	7400 mg	0.37	
d.	KH ₂ PO ₄	3400 mg	0.17	
e.	CaCl ₂ .2H ₂ O	8800 mg	0.44	
2.	<u>Hara mikro</u>	250 ml	(mg/l)	2 ml/l
a.	KI	103.75 mg	0.83	
b.	H ₃ BO ₃	775 mg	6,2	
c.	MnSO ₄ .4H ₂ O	2787.5 mg	22.3	
d.	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1075 mg	8.6	
e.	NaMoO ₄ .2H ₂ O	31.25 mg	0.25	
f.	CuSO ₄ .5H ₂ O	3.125 mg	0.025	
g.	CaCl ₂ .6H ₂ O	3.125 mg	0.025	
3.	<u>Vitamin & As.</u>	250 ml	(mg/l)	5 ml/l
a.	<u>amino</u>			
b.	Nicotinic acid	25 mg	0.5	
c.	Pyridoxine acid	25 mg	0.5	
d.	Thiamine HCl	5 mg	0.1	
	Glycine	150 mg	3	
4.	<u>NaFe EDTA</u>	250 ml	(mg/l)	5 ml/l
	NaFe EDTA	1835 mg	36,7	
5.	<u>Myoinositol</u>	250 ml	(mg/l)	5 ml/l
	Myoinositol	5000 mg	100	
6.	<u>Bentyl Amino Purine (BAP)</u>	100 ml	(mg/ml)	2 ml/l 5 ml/l 20 ml/l
	BAP	100 mg	1	

Lampiran 2. Lanjutan

7.	<u>Indol Acetic Acid (IAA)</u>	100 ml	(mg/ml)	0,175 ml/l
	IAA	100 mg	1	
8.	<u>Cefotaxime</u>	250 ml	(gr/10 ml)	2,5 ml/l
	Cefotaxime	25000 mg	1	
9.	<u>Polyvinylpyrrolidone</u>	-	-	50 mg/l
	PVP			
10.	<u>Sukrosa</u>	-	-	30 g/l
11.	<u>Gelzan Agar</u>	-	-	2,5 g/l

pH sebelum pemberian agar : 5,8

Lampiran 3. Komposisi *buffer* isolasi DNA

Buffer isolasi digunakan untuk 40 sampel. Masing-masing sampel membutuhkan 750 μ l, sehingga volume *buffer* isolasi yang dibutuhkan adalah 30.000 μ l (30 ml). *Buffer* isolasi terdiri atas *buffer* lisis, *buffer* ekstraksi, sarkosil 5 % (2,5 : 2,5: 1) dan β -mercaptoetan ol 0,2 %.

1. *Buffer* lisis

Volume total *buffer* lisis yang dibutuhkan untuk membuat 30 ml *buffer* isolasi adalah $2,5/6 \times 30 \text{ ml} = 12,5 \text{ ml}$

Komposisi *buffer* lisis yaitu:

Bahan	Stock	Final	Pengambilan (ml)
Tris-Cl pH 8	1 M	0,2 M	2,5
EDTA pH 8	0,5 M	0,05 M	1,25
NaCl	5 M	2 M	5
CTAB	10 %	2 %	2,5
dH ₂ O	-	-	1,25
Volume Total			12,5

2. *Buffer* ekstraksi

Volume total *buffer* ekstraksi yang dibutuhkan untuk membuat 30 ml *buffer* isolasi adalah $2,5/6 \times 30 \text{ ml} = 12,5 \text{ ml}$

Komposisi *buffer* ekstraksi yaitu:

Bahan	Stock	Final	Pengambilan (mL)
Sorbitol	0,7 M	0,35 M	6,25
Tris-Cl pH 8	1 M	0,1 M	1,25
EDTA pH 8	0,5 M	0,005 M	0,125
dH ₂ O	-	-	4,875
Volume Total			12,5

Lampiran 3. Lanjutan

Sorbitol 6,25 ml : $0,7 \times 182,17 \times 0,00625 = 0,803$ gr

3. Sarkosil 5 % : $1/6 \times 30$ ml = 5 ml

4. β -Merchптоetanol : $0,2$ % x 30 ml = 6 ml



Lampiran 4. Komposisi bahan kimia dan cara pembuatan larutan, *buffer*, dan medium yang digunakan

Larutan/ <i>buffer</i> / medium	Cara Pembuatan	Sumber
Hara makro	Bahan- bahan berupa zat kimia untuk pembuatan stok hara makro sebanyak 1.000 ml yang terdiri dari NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ditimbang sesuai dengan takaran yang diperlukan dan dimasukkan ke dalam gelas ukur tersebut. Air steril sebanyak 1/3 dari volume larutan stok dimasukan ke dalam gelas ukur berukuran 250 ml. <i>Stirer</i> dimasukkan ke dalam gelas ukur. Gelas ukur kemudian diletakkan di atas <i>hot plate magnetic stirer</i> untuk diaduk hingga bahan kimia di dalamnya larut. Air steril di dalam gelas ukur kemudian ditambahkan hingga volume larutan menjadi 1.000 ml setelah semua bahan kimia larut. Larutan stok hara makro tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol duran berukuran 1.000 ml dan disimpan di dalam lemari es dengan suhu 4 °C.	Zulkarnain (2009: 116--117)
Hara mikro	Bahan- bahan berupa zat kimia untuk pembuatan stok hara mikro sebanyak 250 ml yang terdiri dari KI, H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ditimbang sesuai dengan takaran yang diperlukan dan dimasukkan ke dalam gelas ukur tersebut. Air steril sebanyak 1/3 dari volume larutan stok dimasukan ke dalam gelas ukur berukuran 250 ml. <i>Stirer</i> dimasukkan ke dalam gelas ukur. Gelas ukur kemudian diletakkan di atas <i>hot plate magnetic stirer</i> untuk diaduk hingga bahan kimia di dalamnya larut. Air steril di dalam gelas ukur kemudian ditambahkan hingga volume larutan menjadi 250 ml setelah semua bahan kimia larut. Larutan stok hara mikro tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol duran berukuran 250 ml dan disimpan di dalam lemari es dengan suhu 4 °C.	Zulkarnain (2009: 118)

Vitamin & As. Amino	Bahan- bahan berupa zat kimia untuk pembuatan stok vitamin dan asam amino sebanyak 250 ml yang terdiri dari <i>nicotinic acid, pyridoxine acid, thiamine HCl, glycine</i> ditimbang sesuai dengan takaran yang diperlukan dan dimasukkan ke dalam gelas ukur tersebut. Air steril sebanyak 1/3 dari volume larutan stok dimasukan ke dalam gelas ukur berukuran 250 ml. <i>Stirer</i> dimasukkan ke dalam gelas ukur. Gelas ukur kemudian diletakkan di atas <i>hot plate magnetic stirer</i> untuk diaduk hingga bahan kimia di dalamnya larut. Air steril di dalam gelas ukur kemudian ditambahkan hingga volume larutan menjadi 250 ml setelah semua bahan kimia larut. Larutan stok vitamin dan asam amino tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol duran berukuran 250 ml dan disimpan di dalam lemari es dengan suhu 4 °C.	Zulkarnain (2009: 119)
NaFe EDTA	NaFe EDTA ditimbang hingga mencapai 36,7 mg. Air steril sebanyak 1/3 dari volume larutan stok dimasukan ke dalam gelas ukur berukuran 250 ml. NaFe EDTA yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas ukur. <i>Stirer</i> dimasukkan ke dalam gelas ukur tersebut. Gelas ukur diletakkan di atas <i>hot plate magnetic stirer</i> kemudian diaduk hingga larut. Air steril kemudian ditambahkan hingga volume larutan menjadi 250 ml. Larutan stok NaFe EDTA tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol duran berukuran 250 ml dan disimpan di dalam lemari es dengan suhu 4 °C.	Zulkarnain (2009: 118)
<i>Myoinositol</i>	<i>Myoinositol</i> ditimbang hingga mencapai 100 mg. Air steril sebanyak 1/3 dari volume larutan stok dimasukan ke dalam gelas ukur berukuran 250 ml. <i>Myoinositol</i> yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas ukur. <i>Stirer</i> dimasukkan ke dalam gelas ukur tersebut. Gelas ukur diletakkan di atas <i>hot plate magnetic stirer</i> kemudian diaduk hingga larut. Air steril kemudian ditambahkan hingga volume larutan menjadi 250 ml. Larutan stok <i>Myoinositol</i> tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol duran berukuran 250 ml dan disimpan di dalam lemari es dengan suhu 4 °C.	Zulkarnain (2009: 119)
<i>Benzil Amino Purine</i> (BAP)	<i>Benzil Amino Purine</i> (BAP) ditimbang hingga mencapai 1 mg. KOH 1 M sebanyak 5 ml dimasukan ke dalam gelas ukur berukuran 250 ml. <i>Benzil Amino Purine</i> (BAP) yang telah ditimbang dimasukkan ke	Zulkarnain (2009: 119--120)

	dalam gelas ukur. <i>Stirer</i> dimasukkan ke dalam gelas ukur tersebut. Gelas ukur diletakkan di atas <i>hot plate magnetic stirer</i> kemudian diaduk hingga larut. Air steril sebanyak 95 ml kemudian ditambahkan. Larutan stok BAP tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol duran berukuran 250 ml dan disimpan di dalam lemari es dengan suhu 4 °C.	
<i>Indol Acetic Acid</i> (IAA)	<i>Indol Acetic Acid</i> (IAA) ditimbang hingga mencapai 5 mg. KOH 1 M sebanyak 5 ml dimasukan ke dalam gelas ukur berukuran 5 ml. <i>Indol Acetic Acid</i> (IAA) yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas ukur. <i>Stirer</i> dimasukkan ke dalam gelas ukur tersebut. Gelas ukur diletakkan di atas <i>hot plate magnetic stirer</i> kemudian diaduk hingga larut. Larutan stok IAA dimasukkan ke dalam <i>tube</i> 1,5 ml masing-masing sebanyak 1 ml dengan cara penyaringan menggunakan <i>sterile syringe filter</i> . <i>Tube-tube</i> tersebut kemudian disimpan di dalam lemari es dengan suhu 4 °C.	Zulkarnain (2009: 119--120)
<i>Cefotaxime</i>	<i>Cefotaxime</i> ditimbang hingga mencapai 1 g. Air steril sebanyak 1/3 dari volume larutan stok dimasukan ke dalam gelas ukur berukuran 250 ml. <i>Cefotaxime</i> yang telah ditimbang dimasukkan ke dalam gelas ukur. <i>Stir bars</i> dimasukkan ke dalam gelas ukur tersebut. Gelas ukur diletakkan di atas <i>hot plate magnetic stirer</i> kemudian diaduk hingga larut. Air steril kemudian ditambahkan hingga volume larutan menjadi 250 ml. Larutan stok <i>Cefotaxime</i> tersebut kemudian dimasukkan ke dalam botol duran berukuran 250 ml dan disimpan di dalam lemari es dengan suhu 4 °C.	Zulkarnain (2009: 119)
Media untuk induksi tunas 20B (MS + 20 mg/l BAP)	Bahan-bahan untuk pembuatan media disiapkan. Bahan berupa stok cair seperti hara makro, hara mikro, <i>Myoinositol</i> , vitamin & asam amino, NaFe EDTA dan BAP (20 mg/l) dimasukkan ke dalam botol gelas sesuai dengan takaran yang telah ditentukan. Bahan-bahan tersebut dimasukkan dengan menggunakan pipet volumetrik. Bahan berupa stok padat seperti PVP dan sukrosa dimasukkan setelah semua stok cair dimasukkan. Akuades steril ditambahkan ke dalam botol gelas. <i>Stirer</i> dimasukan ke dalam botol gelas untuk proses pengadukkan. Botol gelas tersebut kemudian diletakan diatas <i>stirer hot magnetic plate</i> dan	Zulkarnain (2009: 121)

	<p>dilakukan proses pengadukkan. Pengukuran pH dilakukan setelah semua bahan-bahan telah larut. Larutan dipindahkan ke gelas ukur. Penambahan akuades steril selanjutnya dilakukan hingga larutan mencapai ukuran yang diinginkan (250 ml, 500 ml, atau 1.000 ml). Agar dimasukan ke dalam botol duran yang akan diisi oleh larutan medium. Larutan selanjutnya dipindahkan ke dalam botol duran sesuai dengan ukuran larutan tersebut. Larutan tersebut kemudian diautoklaf. Larutan yang telah diautoklaf selanjutnya dituang ke dalam cawan petri. Penuangan dilakukan di dalam <i>laminar air flow</i>. Cawan petri yang telah berisi media direkatkan menggunakan <i>plastic seal</i> dan diberi keterangan (nama media + tanggal pembuatan). Cawan petri tersebut selanjutnya disimpan di tempat penyimpanan.</p>	
<p>Media untuk kultur tunas 5B (MS + 5 mg/l BAP)</p>	<p>Bahan-bahan untuk pembuatan media disiapkan. Bahan berupa stok cair seperti hara makro, hara mikro, <i>Myoinositol</i>, vitamin & asam amino, NaFe EDTA dan BAP (5 mg/l) dimasukkan ke dalam botol gelas sesuai dengan takaran yang telah ditentukan. Bahan-bahan tersebut dimasukkan dengan menggunakan pipet volumetrik. Bahan berupa stok padat seperti PVP dan sukrosa dimasukkan setelah semua stok cair dimasukkan. Akuades steril ditambahkan ke dalam botol gelas. <i>Stir bars</i> dimasukan ke dalam botol gelas untuk proses pengadukkan. Botol gelas tersebut kemudian diletakan diatas <i>stirer hot magnetic plate</i> dan dilakukan proses pengadukkan. Pengukuran pH dilakukan setelah semua bahan-bahan telah larut. Larutan dipindahkan ke gelas ukur. Penambahan akuades steril selanjutnya dilakukan hingga larutan mencapai ukuran yang diinginkan (250 ml, 500 ml, atau 1.000 ml). Agar dimasukan ke dalam larutan tersebut. Larutan selanjutnya dipanaskan dengan menggunakan <i>microwave</i> selama 10 menit. Larutan yang telah dipanaskan dituang ke dalam botol gelas kira-kira sebanyak 30 ml tiap gelasnya. Botol gelas yang telah berisi media kemudian diautoklaf. Botol gelas yang telah diautoklaf selanjutnya dapat disimpan di tempat penyimpanan. Eksplan yang mengalami kontaminasi ditanam pada media 20B dengan penambahan <i>cefotaxime</i>. Pemberian <i>cefotaxime</i> dilakukan di dalam <i>laminar air flow</i>.</p>	<p>Zulkarnain (2009: 121)</p>

<p>Media untuk perbanyak tunas 2B + IAA (MS + 2 mg/l BAP + 0,175 mg/l IAA)</p>	<p>Bahan-bahan untuk pembuatan media disiapkan. Bahan berupa stok cair seperti hara makro, hara mikro, <i>Myoinositol</i>, vitamin & asam amino, NaFe EDTA dan BAP (2 mg/l) dimasukkan ke dalam botol gelas sesuai dengan takaran yang telah ditentukan. Bahan-bahan tersebut dimasukkan dengan menggunakan pipet volumetrik. Bahan berupa stok padat seperti PVP dan sukrosa dimasukkan setelah semua stok cair dimasukkan. Akuades steril ditambahkan ke dalam botol gelas. <i>Stir bars</i> dimasukan ke dalam botol gelas untuk proses pengadukkan. Botol gelas tersebut kemudian diletakan diatas <i>stirer hot magnetic plate</i> dan dilakukan proses pengadukkan. Pengukuran pH dilakukan setelah semua bahan-bahan telah larut. Larutan dipindahkan ke gelas ukur. Penambahan akuades steril selanjutnya dilakukan hingga larutan mencapai ukuran yang diinginkan (250 ml, 500 ml, atau 1.000 ml). Gelzan dimasukan ke dalam botol duran yang akan diisi oleh larutan tersebut. Larutan selanjutnya dipindahkan ke dalam botol duran sesuai dengan ukuran larutan tersebut. Larutan tersebut kemudian diautoklaf. Larutan yang telah diautoklaf selanjutnya dituang dalam botol gelas kira-kira sebanyak 30 ml tiap gelasnya. Larutan tersebut sebelum dituang, terlebih dahulu diberikan penambahan IAA 0,175 ml/l. Pemberian IAA dan penuangan dilakukan di dalam <i>laminar air flow</i>. Botol yang telah berisi media diberi keterangan (nama media + tanggal pembuatan). Media tersebut selanjutnya disimpan di tempat penyimpanan. Eksplan yang mengalami kontaminasi ditanam pada media 20B dengan penambahan <i>cefotaxime</i>. Pemberian <i>cefotaxime</i> dilakukan di dalam <i>laminar air flow</i>.</p>	<p>Zulkarnain (2009: 121)</p>
<p>Media untuk seleksi tanaman pisang 2B + IAA +</p>	<p>Bahan-bahan untuk pembuatan media disiapkan. Bahan berupa stok cair seperti hara makro, hara mikro, <i>Myoinositol</i>, vitamin & asam amino, NaFe EDTA dan BAP (2 mg/l) dimasukkan ke dalam botol gelas sesuai dengan takaran yang telah ditentukan. Bahan-bahan tersebut dimasukkan dengan menggunakan pipet volumetrik. Bahan berupa stok padat seperti PVP dan sukrosa dimasukkan setelah semua stok cair dimasukkan. Akuades steril ditambahkan ke dalam botol gelas. <i>Stir</i> dimasukan ke dalam botol gelas</p>	<p>Zulkarnain (2009: 121)</p>

Higromisin (MS + 2 mg/l BAP + 0,175 mg/l IAA + Higromisin)	<p>untuk proses pengadukkan. Botol gelas tersebut kemudian diletakan diatas <i>stirer hot magnetic plate</i> dan dilakukan proses pengadukkan. Pengukuran pH dilakukan setelah semua bahan-bahan telah larut.</p> <p>Larutan dipindahkan ke gelas ukur. Penambahan akuades steril selanjutnya dilakukan hingga larutan mencapai ukuran yang diinginkan (250 ml, 500 ml, atau 1000 ml). Agar dimasukan ke dalam botol duran yang akan diisi oleh larutan tersebut. Larutan selanjutnya dipindahkan ke dalam botol duran sesuai dengan ukuran larutan tersebut. Larutan tersebut kemudian diautoklaf. Larutan yang telah diautoklaf selanjutnya dituang ke botol gelas. Larutan tersebut sebelum dituang, terlebih dahulu diberikan penambahan IAA 0,175 ml/l dan higromisin (0%, 20%, 30%, 40%, 50%, & 60%). Pemberian IAA dan higromisin, serta penuangan dilakukan di dalam <i>laminar air flow</i>. Botol yang telah berisi media diberi keterangan (nama media + tanggal pembuatan). Media tersebut selanjutnya disimpan di tempat penyimpanan.</p>	
Tris-Cl (1 M) pH 7,5	121,1 g <i>Tris base</i> dilarutkan dengan akuades 800 ml. HCl sebanyak 50 ml selanjutnya ditambahkan pada larutan Tris base dan akuades. HCl ditambahkan lagi hingga mencapai pH 7,5. Akuades ditambahkan hingga volume larutan mencapai 1.000 ml. Larutan selanjutnya disterilkan dengan autoklaf.	Sambrook <i>dkk.</i> (1989: 9.38)
EDTA (1 M) pH 8	37,22 g EDTA dilarutkan dengan akuades 150 ml. NaOH selanjutnya ditambahkan pada larutan EDTA hingga larutan tampak bening. NaOH ditambahkan lagi hingga mencapai pH 8. Akuades ditambahkan hingga volume larutan mencapai 200 ml. Larutan selanjutnya disterilkan dengan autoklaf.	Sambrook <i>dkk.</i> (1989: 9.38)
EDTA (1 M) pH 7,5	37,22 g EDTA dilarutkan dengan akuades 150 ml. NaOH selanjutnya ditambahkan pada larutan EDTA hingga larutan tampak bening. NaOH ditambahkan lagi hingga mencapai pH 7,5. Akuades ditambahkan hingga volume larutan mencapai 200 ml. Larutan selanjutnya disterilkan dengan autoklaf.	Sambrook <i>dkk.</i> (1989: 9.38)

NaCl 5M	292,2 g NaCl dilarutkan dengan akuades hingga volume mencapai 1.000 ml dan selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf.	Ausubel <i>dkk.</i> (1998: 2.3.1)
CTAB 10 % 100 ml	10 g CTAB dilarutkan dengan 46,1 g NaOH 5 M dan selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf.	Sambrook <i>dkk.</i> (1989: 9.38)
HCl 1 M	84 ml HCl pekat (11,9 M) dilarutkan dengan akuades hingga volume mencapai 1.000 ml.	Ausubel <i>dkk.</i> (1998: 2.3.1)
TE (Tris-EDTA) pH 8	0,5 ml Tris-Cl pH 8 (10 mM) dilarutkan dengan 0,1 ml EDTA pH 8 (10 mM). Akuades ditambahkan lagi hingga volume mencapai 50 ml.	Seidman & Moore (2000: 505)
EtBr	14 µl etidium bromida (10 mg/ml) ditambahkan ke dalam 200 ml akuades	Sambrook <i>dkk.</i> (1989: 9.38)
Lambda <i>HindIII</i>	15,5 µl akuades ditambahkan dengan 2 µl <i>buffer</i> [Multicore] dan 0,5 µl <i>HindIII</i> . 2 µl lambda DNA dimasukkan ke dalam campuran tersebut lalu dilarutkan dengan <i>capsulefuge</i> .	Ausubel <i>dkk.</i> (1998: 2.3.1)
TBE 5x	54 g <i>tris base</i> dan 27,5 <i>boric acid</i> dilarutkan dengan akuades 500 ml. 20 ml EDTA pH 8 (0,5 mM) selanjutnya ditambahkan pada larutan tersebut. Akuades ditambahkan hingga volume larutan mencapai 1.000 ml. Larutan selanjutnya disterilkan dengan autoklaf.	Sambrook & Russel 2001: A1.17
TBE 0,5x	100 ml TBE 5x dilarutkan dengan akuades 900 ml.	Sambrook & Russel 2001: A1.17
NaOH 10 M	400 g NaOH dilarutkan dengan akuades hingga volume mencapai 1.000 ml.	Sambrook <i>dkk.</i> 1989: 9.38

GUS Assay <i>buffer</i>	Bahan-bahan pembuatan GUS Assay <i>buffer</i> (104 mg X-Gluc 2mM, 16,5 mg Potasium ferricyanide 0,5mM, 372 mg Na ₂ EDTA 10 mM, 0,1 ml Triton X-100 0,1 %, 100 ml Na ₂ SO ₄ <i>buffer</i> pH 7,7) disiapkan. Bahan-bahan tersebut dimasukkan ke dalam bejana gelas sterilnya masing-masing secara berturut-turut. Proses pengadukan <i>buffer</i> dapat dilakukan dengan cara mengoyangkan bejana gelas secara perlahan atau menggunakan <i>stirer plate</i> .	Stomp 1992: 107
Sarkosin 5 %	Sebanyak 5 g <i>N-Lauryl-sarcosine</i> ditimbang dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 80 ml. Akuades ditambah hingga volume mencapai 100 ml.	Ausubel <i>dkk.</i> 1998: 2.3.1
Larutan Higromisin 50 ppm	Sebanyak 0,05 µl larutan higromisin (konsentrasi 50 mg/ml, 500 µl gelatin, dan 1 µl triton-X dilarutkan dalam akuades hingga volume total	Greco, <i>dkk.</i> (2003: 12)
Larutan Higromisin 100 ppm	Sebanyak 0,1 µl larutan higromisin (konsentrasi 50 mg/ml, 500 µl gelatin, dan 1 µl triton-X dilarutkan dalam akuades hingga volume total	Greco, <i>dkk.</i> (2003: 12)