Jurnal Bioteknologi Pertanian, Vol. 4, No. 1, 1999, pp. 28-35

Transformasi dan ekspresi gen GUS pada beberapa jaringan tanaman kakao

Transformation and expression of GUS gene in several tissues of cocoa

Tetty Chaidamsari[1], Antonius Suwanto[2], Livi Winata[2], dan Djoko Santoso[1]*

[1]*Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Jalan Taman Kencana no.1, Bogor 16151, Indonesia*
[2]*Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16610, Indonesia*

ABSTRACT

The problem of pod borer pest in cocoa plantation in Indonesia and the advantages of genetic engineering in plant genetic improvement have led to the development of DNA transformation system in cocoa. Tissue culture technique for cocoa faces some problems, mainly in plant regeneration and possibility of somaclonal variation. This research aims at developing a method for DNA transformation into cocoa cells. Several factors that may affect transformation were studied. Preculture treatment before inoculation of cocoa explants did not increase transformation efficiency. To obtain the most suitable explant for the transformation as well as regeneration, fresh explants of leaves, petals, and zygotic embryos were tested. Of those fresh explants, the zygotic embryos and petals could be transformed and expressed the reporter gene. PCR analysis showed that reporter *gus* gene could be introduced into cocoa cells. Histochemical assay of GUS activity demonstrated that the zygotic embryos were the best. In addition, the use of the zygotic embryos is predicted to minimize the occurrence of somaclonal variations.

[*Keywords*: *Theobroma cacao*, DNA transformation, GUS, *Agrobacterium*]

ABSTRAK

Masalah hama penggerek buah pada perkebunan kakao di Indonesia dan keunggulan rekayasa genetik dalam perbaikan genetik tanaman telah mendorong dikembangkannya metode transformasi DNA ke dalam tanaman tersebut. Teknik kultur jaringan tanaman kakao yang diperlukan dalam usaha tersebut menghadapi kendala pada rendahnya tingkat regenerasi dan kemungkinan terjadinya variasi somaklonal. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode transformasi DNA pada sel tanaman kakao. Beberapa faktor yang berpengaruh telah dikaji. Perlakuan prakultur terhadap eksplan kakao sebelum inokulasi tidak meningkatkan efisiensi transformasi. Untuk mendapatkan sumber eksplan yang paling sesuai dalam transformasi DNA dan regenerasi tanaman kakao transgenik nantinya, telah dicoba beberapa jaringan segar. Dari jaringan segar tersebut, jaringan embrio zigotik dan kelopak bunga dapat dimasuki dan mengekspresikan secara transien gen reporter *gus* dengan baik. Pengujian dengan PCR menunjukkan bahwa gen reporter tersebut dapat diintroduksikan dengan baik ke dalam sel tanaman kakao. Hasil pengujian aktivitas GUS secara histokimia terhadap embrio zigotik memberikan hasil yang paling baik. Pemakaian jaringan embrio zigotik diperkirakan dapat mengatasi masalah regenerasi pada kultur jaringan tanaman kakao dan variasi somaklonal.

[*Kata kunci*: *Theobroma cacao*, Transformasi DNA, GUS, *Agrobacterium*]

PENDAHULUAN

Perbaikan sifat tanaman kakao melalui pemuliaan konvensional menghadapi kendala sempitnya keragaman genetik dan lamanya siklus seleksi. Sifat-sifat unggul yang diminati umumnya tidak dimiliki oleh tetua-tetua tanaman kakao yang digunakan dalam penyilangan. Selain itu, masa praproduktif yang panjang menyebabkan lamanya siklus seleksi. Evaluasi tanaman hasil penyilangan seringkali harus menunggu tanaman tersebut berbuah yang memerlukan waktu 3 hingga 5 tahun. Dengan demikian, untuk mendapatkan tanaman dengan sifat dan kemampuan yang baru memerlukan waktu tidak kurang dari 20 tahun.

Rekayasa genetik yang tidak dibatasi oleh kompatibilitas seksual diperkirakan dapat mengatasi masalah sempitnya keragaman sumber daya genetik. Gen yang membawa sifat unggul yang diminati dapat berasal dari berbagai sumber. Selain itu, terjadinya pemindahan sifat yang dibawa oleh gen tersebut dapat diperkirakan secara molekuler pada tingkat sel atau pada saat tanaman belum menghasilkan. Dengan demikian, proses seleksi dapat berlangsung lebih

*Corresponding author's e-mail: briec@indo.net.id

efisien, karena hanya sel atau tanaman yang membawa dan atau mengekspresikan transgen saja yang perlu dikembangbiakkan.

Salah satu masalah yang dihadapi pada rekayasa genetik tanaman kakao adalah berkaitan dengan kultur jaringan tanaman. Meskipun kultur jaringan tanaman kakao di Indonesia telah dimulai lebih dari satu dasawarsa (Tahardi, 1984), hasilnya belum memuaskan (Tahardi dan Mardiana, 1995; Santoso *et al.*, 1997). Metode regenerasi embrio somatik dari kultur petal kakao yang dilaporkan oleh Lopez-Baez *et al.* (1993) serta Tahardi dan Mardiana (1995) belum dapat diterapkan untuk jenis kakao UAH yang banyak ditanam di perkebunan kakao di Indonesia.

Sistem kultur jaringan yang baik merupakan prasyarat bagi keberhasilan rekayasa genetik tanaman. Transformasi DNA pada sel tanaman kakao dilaporkan oleh beberapa pakar, antara lain Purdy dan Dicstein (1989) yang menginduksi tumor pada biji kakao menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Namun, hasilnya belum menunjukkan adanya perubahan sifat biokimia dan molekuler yang dapat membuktikan adanya integrasi T-DNA pada biji kakao yang telah ditransformasi. Selanjutnya, Saint *et al.* (1994) berhasil melakukan transformasi DNA pada kalus yang berasal dari eksplan daun kakao. Hasil penelitiannya juga belum memuaskan.

Kultur jaringan yang sedang dikembangkan pada tanaman kakao Indonesia selama satu dasawarsa terakhir adalah yang menggunakan eksplan dari kotiledon dan kelopak bunga, namun demikian belum juga berhasil dengan baik. Regenerasi dari eksplan yang berasal dari embrio zigotik telah dikembangkan oleh Tahardi (1984), tetapi hal tersebut masih memerlukan kondisi yang optimum untuk regenerasi embrio transgenik.

Penelitian ini bertujuan mencari metode yang efektif untuk transformasi DNA ke dalam sel tanaman kakao melalui *A. tumefaciens* dengan menggunakan jaringan daun, petal, dan embrio muda. Di dalam tulisan ini dilaporkan hasil penelitian transformasi dan pengujian ekspresi gen reporter *gus* pada eksplan daun, kelopak bunga, dan embrio zigotik tanaman kakao.

BAHAN DAN METODE

Plasmid pGPTV-Kan/35SGUS yang digunakan dalam penelitian transformasi genetik tanaman kakao ini adalah vektor biner yang membawa konstruksi gen reporter *gus* dengan promoter konstitutif CaMV 35S. Selain itu, di antara *right border* (RB) dan *left border* (LB) dari T-DNA terdapat juga gen *nptII* yang dikontrol oleh promoter Pnos. (Becker *et al.*, 1992). Vektor ini terklon di dalam *A. tumefaciens* EHA105. Pengujian transformasi dan ekspresi pada tanaman tembakau menunjukkan bahwa pGPTV-Kan/35SGUS masih berfungsi dengan baik dalam arti gen yang dibawa dalam T-DNA dapat diekspresikan di dalam jaringan tanaman tembakau (Santoso *et al.*, 1997).

Eksplan

Tanaman kakao hibrida jenis UAH diambil dari Kebun Percobaan Ciomas milik Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor dan Kebun Raja Mandala milik PTPN VIII.

Sumber eksplan yang digunakan yaitu daun muda; kelopak bunga (petal) yang masih kuncup dengan panjang 0,4 cm; dan embrio zigotik dari buah kakao yang berumur 2,5 bulan. Eksplan yang dikulturkan sebanyak 50 petri dan setiap petri berisi 10 kelopak. Jumlah embrio muda yang dikulturkan adalah 25 botol dan masing-masing botol berisi 10 embrio muda, sedangkan eksplan daun adalah 30 botol dan masing-masing botol berisi 3 eksplan.

Media tumbuh

Plasmid pGPTV-Kan/35SGUS dalam *A. tumefaciens* EHA105 ditumbuhkan pada media 523 padat (Rodriguez dan Tait, 1983) yang mengandung kanamisin 50 µg/ml. Tunas tembakau diinduksi menggunakan media MS + BAP 0,5 mg/l.

Transformasi DNA

Transfer gen dilakukan melalui *A. tumefaciens*. Keberadaan transgen tersebut di dalam jaringan tanaman diuji dengan teknik PCR menggunakan pasangan primer spesifik untuk amplifikasi fragmen DNA di antara batas kanan (RB) dari T-DNA dan ujung 3' dari gen *gus*. Ekspresi GUS pada eksplan tersebut ditentukan secara histokimiawi.

Sebelum ditransformasi, eksplan yang baru dipanen dari kebun disterilisasi menggunakan larutan kaporit. Setelah dicuci dengan air, eksplan segar direndam di dalam larutan kaporit 7,5% selama 15 menit sambil sesekali digoyang. Setelah larutan kaporit dibuang, eksplan tersebut dicuci dengan akuades steril sebanyak lima kali untuk menghilangkan sisa kaporit yang tertinggal pada eksplan. Selanjutnya, eksplan dibagi dua, yaitu sebagian untuk perlakuan prakultur dan sisanya tanpa prakultur, dimana setelah disterilisasi langsung ditransformasi menggunakan *A. tumefaciens*.

Eksplan yang diprakultur diperlakukan sebagai berikut: masing-masing eksplan dikulturkan pada media induksi kalus yang sesuai untuk masing-masing jenis eksplan selama 7 hari. Setelah 1 minggu dikulturkan, ditransformasi dengan *A. tumefaciens*. Perlakuan selanjutnya sama dengan eksplan yang tidak diprakultur.

Eksplan yang telah disterilkan diinokulasi dengan *A. tumefaciens* EHA105 dengan cara sebagai berikut: eksplan diinkubasi dalam suspensi *A. tumefaciens* pada fase log yang berumur 3 jam dengan konsentrasi 10^7, 10^8, dan 10^9 sel/ml pada suhu 28°C selama 15 menit. Setelah itu, dikokultivasi selama 2, 4, dan 5 hari pada media Murashige and Skoog (MS) padat pH 5,7 yang mengandung *acetosyringone* 100 µM (Saint *et al.*, 1994). Setelah kokultivasi, eksplan dicuci dua kali dengan media MS cair yang mengandung karbenisilin 500 mg/l dalam erlenmeyer dan dikocok pada 150 rpm menggunakan *orbital shaker*. Setelah dicuci, eksplan dikultur dalam keadaan gelap pada media MS padat yang mengandung karbenisilin, moksalaktam atau sefotaksim 250 mg/l selama 10 hari dengan periode penyinaran 14 jam per hari dari lampu TL 40W pada suhu 26-28°C.

Selanjutnya, seleksi sel transgenik dilakukan dengan cara mengkulturkan masing-masing eksplan tersebut pada media kultur padat. Untuk eksplan petal menggunakan media Lopez-Baez *et al.* (1993) yang mengandung kanamisin 25 µg/ml, dan eksplan daun menggunakan medium yang dikemukakan oleh Saint *et al.* (1994) dan ditambah antibiotika penyeleksi kanamisin 25-50 mg/l. Media yang digunakan untuk pertumbuhan embrio sama dengan media yang digunakan pada petal, 2,4-D dan kinetin diganti dengan IAA 0,5 -1,5 µg/ml.

Pengujian masuknya gen ke dalam jaringan

Masuknya konstruksi gen ke dalam sel jaringan kakao yang telah ditransformasi dikonfirmasi dengan teknik PCR. DNA genomik diisolasi dari jaringan transforman menurut metode Castillo *et al.* (1994) yang biasa digunakan pada tanaman perkebunan. Uji PCR dilakukan dengan menggunakan sepasang primer DNA (produk Promega) yang secara spesifik dirancang untuk mengamplifikasi fragmen DNA pada posisi antara batas kanan T-DNA dan poliadenilasi konstruksi gen *gus* dengan ukuran 0,48 kb. Adapun urutan basa dari primer 20 mer yang digunakan adalah sebagai berikut: 5' CTTCGGTGAAAAACCGCAGC 3' dan 5' CTGAAGGCGGGAAACGACAA 3'.

Reaksi amplifikasi dikerjakan berdasarkan metode yang digunakan oleh Carozzi *et al.* (1991). Jumlah siklus amplifikasi sebanyak 30 dan konsentrasi dNTP 5µl/100 µl; Taq 0,5µl/100 µl; DNA sampel 100 ng/100 µl; primer masing-masing 1 µl; Mg 2,5 µl/ 100 µl; buffer 10 µl/100 µl. Waktu 98/00:60,s 55/00:45; dan 72/00:30. Hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarose 1% untuk melihat adanya pita DNA yang berukuran 0,48 kb. Elektroforesis dijalankan pada tegangan konstan 50 V menggunakan piranti elektroforesis Mupid-21 dari Cosmo Bio Co. Ltd, Jepang, sedangkan alat PCR yang digunakan adalah Genetic Thermal Cycler.

Pengujian ekspresi GUS

Analisis ekspresi gen reporter *gus* dilakukan dengan menguji aktivitas GUS pada jaringan contoh secara histokimiawi menggunakan substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronide (X-Gluc) sesuai dengan yang dijelaskan oleh Jefferson (1987). Eksplan yang akan dilihat aktivitas GUSnya diwarnai selama 15 menit sampai 24 jam pada 37°C dalam pereaksi pewarna GUS, kemudian dicuci dengan akuades dan disimpan dalam etanol 70%. Warna biru yang menandakan aktivitas GUS diamati di bawah mikroskop binokuler.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, beberapa faktor yang diperkirakan berpengaruh dalam transformasi pada tanaman kakao telah dikaji untuk mencari kondisi optimum. Faktor tersebut antara lain adalah perlakuan prakultur terhadap eksplan sebelum transformasi, jenis eksplan, konsentrasi sel *Agrobacterium* yang dipergunakan dalam inokulasi, dan lamanya kokultivasi.

Perlakuan prakultur

Perlakuan yang diberikan terhadap eksplan berupa prakultur pada media kultur yang sesuai (Lopez-Baez *et al.*, 1993; Saint *et al.*, 1994). Pengaruh prakultur sebelum inokulasi pada transformasi kakao dibandingkan dengan jaringan yang tidak diprakultur. Prakultur jaringan tanaman kakao ternyata tidak meningkatkan efisiensi transformasi, bahkan cenderung menghambat dengan tingkatan yang bervariasi (Tabel 1). Pengaruh negatif prakultur terhadap

Tabel . Pengaruh prakultur terhadap transformasi DNA ke dalam jaringan tanaman kakao.
Table 1 The effect of preculture on DNA transformation into cocoa tissues.

Jaringan *Tissues*	Prakultur *Preculture*	Masuknya T-DNA *Transfer of T-DNA*	Aktivitas GUS *Activity of GUS*	Pertumbuhan/Stabilitas *Growth/Stability*
Daun (*Leaves*)	Tanpa (*without*)	+	+	+
Petal	Tanpa (*without*)	+	+	+++
Embrio zigotik (*Zygotic embryos*)	Tanpa (*without*)	+	+	+++
Daun (*Leaves*)	Tanpa (*without*)	-	-	-
Petal	Tanpa (*without*)	+	+	-
Embrio zigotik (*Zygotic embryos*)	Tanpa (*without*)	+	+	+

Keterangan (note)
- \- ekspresi GUS negatif (*GUS expression negative*)
- \+ ekspresi GUS positif (*GUS expression positive*)
- +++ ekspresi GUS tinggi (*GUS expression high*)

transfer terbukti terjadi pada eksplan daun. Pada eksplan daun kakao yang telah ditransformasi tidak terdeteksi adanya T-DNA tersebut. Demikian juga aktivitas GUSnya. Pada eksplan dari petal dan embrio zigotik, pengaruhnya lebih berupa penurunan stabilitas atau pertumbuhan jaringan tertransformasi. Adanya GUS dan ekspresinya dapat terdeteksi pada jaringan petal dan embrio zigotik beberapa hari setelah dikokultivasi. Namun demikian, ketika dipindahkan kepada media seleksi yang mengandung kanamisin, warna jaringan petal transforman berubah secara perlahan menjadi hitam dan akhirnya mati. Perkembangan yang serupa terjadi pada jaringan embrio transforman.

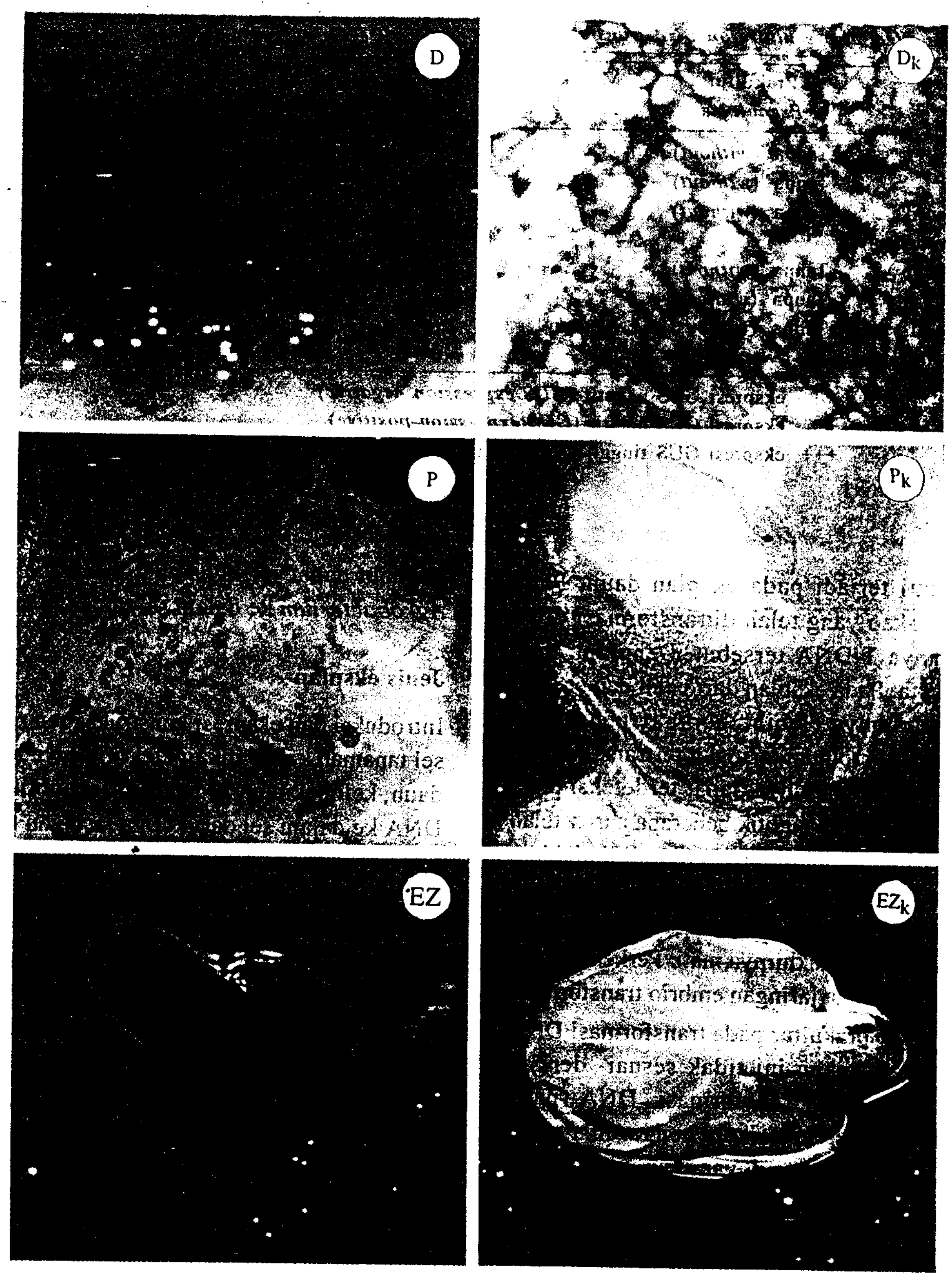
Pengaruh negatif prakultur pada transformasi DNA ke dalam jaringan kakao ini tidak sesuai dengan pengaruhnya terhadap transformasi DNA pada tanaman apel yang memberikan pengaruh positif (Nehra *et al.*, 1990). Pengaruh yang kurang baik ini juga terjadi pada tanaman kiwi (Jansen dan Gardner, 1993). Pada tanaman tersebut, prakultur sebelum inokulasi mampu meningkatkan efisiensi.

Faktor pada prakultur yang kemungkinan berpengaruh langsung terhadap transformasi DNA pada jaringan tanaman kakao adalah adanya senyawa yang diekskresikan oleh jaringan selama proses inokulasi, kokultivasi, atau seleksi. Senyawa tersebut cukup mematikan atau menghambat pertumbuhan jaringan transforman pada media seleksi. Fenomena ini tidak terjadi pada jaringan segar dan yang belum mempunyai kemampuan untuk mensintesis senyawa tersebut karena masih dalam proses adaptasi dengan media buatan. Kemungkinan lain adalah selama prakultur sel daun kakao pada daerah sayatan mengalami penebalan atau mengeluarkan zat anti stress. Melalui mekanisme tertentu, zat anti stress tersebut dapat menghambat masuknya T-DNA dari *Agrobacterium* ke dalam sel tanaman kakao.

Jenis eksplan

Introduksi dan ekspresi konstruksi gen reporter *gus* di sel tanaman kakao dikaji efektifitasnya untuk jaringan daun, kelopak bunga, dan embrio zigotik. Transfer T-DNA ke dalam sel dari ketiga jaringan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang mencolok.

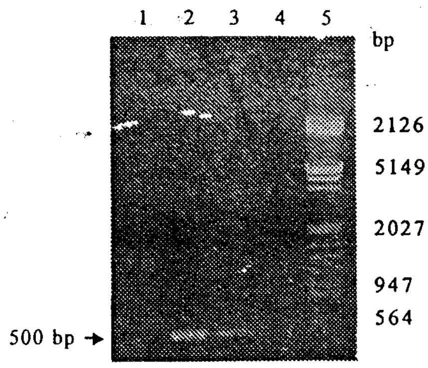
Hasil pengujian aktivitas GUS pada ketiga jaringan uji disajikan pada Gambar 1. Dari sebaran aktivitas GUS yang ditunjukkan oleh meratanya warna biru, jelas terlihat bahwa jaringan embrio zigotik adalah yang terbaik. T-DNA dapat ditransfer secara merata hampir ke semua bagian jaringan, sedangkan pada jaringan petal dan daun, warna biru hanya terdapat pada beberapa bagian saja. Demikian juga dari segi intensitas warna biru yang ditimbulkan, jaringan embrio zigotik adalah terbaik. Hal ini merupakan indikasi bahwa faktor penghalang masuknya T-DNA ke dalam sel jaringan embrio zigotik sangat kecil dibandingkan pada kedua jaringan lainnya. Tidak meratanya atau rendahnya intensitas warna biru pada jaringan petal dan daun kemungkinan berkaitan dengan rendahnya aktivitas GUS pada kedua jaringan tersebut dibandingkan embrio zigotik. Rendahnya aktivitas ini disebabkan rendahnya jumlah GUS atau rendahnya kualitas reaksi perubahan warna oleh GUS. Hal yang terakhir kemungkinan karena jaringan mengeluarkan senyawa yang dapat menghambat aktivitas GUS. Penelitian pada tanaman cranberry menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang menghambat aktivitas β-glucuronidase tersebut adalah senyawa flavonol dan *proanthocyanin* (Serres *et al.*, 1997).



Gambar 1. Pengujian histokimiawi aktivitas GUS pada jaringan daun (D), petal (P), dan embrio zigotik (EZ) tanaman kakao. Huruf K pada masing-masing jaringan adalah kontrol dari yang tidak ditransformasi.

Fig. 1. Histochemical GUS assay on cocoa tissues of leaves (D), petals (P), and zygotic embryos (EZ). K represents untransformed tissues.

Gambar 2 adalah hasil PCR yang menunjukkan bahwa T-DNA telah berhasil ditransfer dari *A. tumefacien* EHA105 ke dalam jaringan contoh. Hasil PCR ini membuktikan bahwa warna biru pada jaringan yang telah ditransformasi tersebut bukan karena *Agrobacterium* yang belum tercuci bersih, melainkan oleh GUS yang masuk dan diekspresikan di dalam jaringan tersebut. Keyakinan ini didasarkan alasan bahwa primer yang digunakan dalam PCR tersebut adalah spesifik untuk amplifikasi fragmen DNA di antara RB dengan ujung 3' dari gen *gus* yang besarnya hampir 0,5 kb.



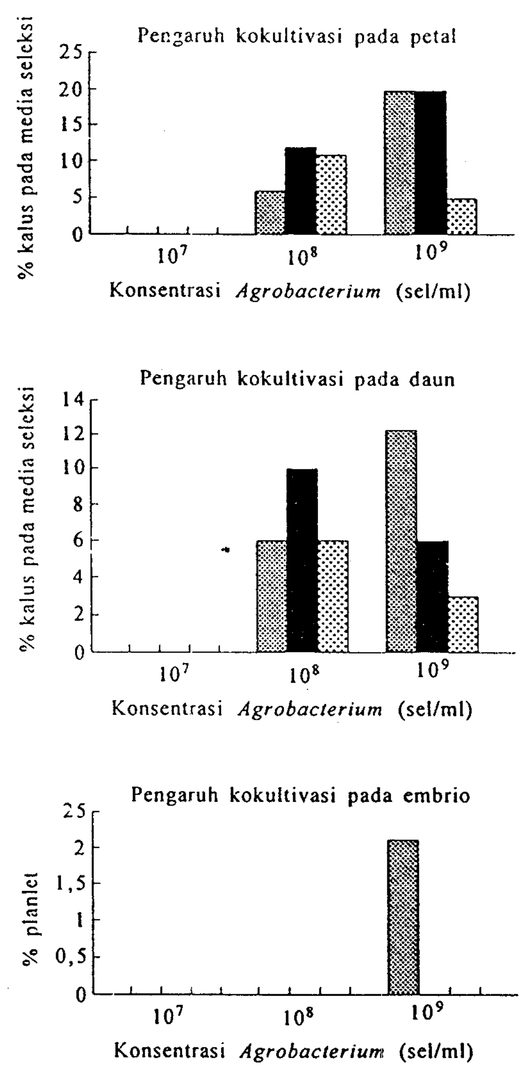
Gambar 2. Hasil PCR menggunakan primer spesifik dari DNA genomik yang diisolasi dari jaringan kakao. Lajur 1 s/d 5, masing-masing adalah dari kalus petal kontrol, kalus transgenik, embrio kontrol, dan λ DNA marker *Hind*III + *Eco*RI.
*Fig. 2. Amplification of cocoa genomic DNA using specific primers. Lane 1 to 5 are from untransformed calli, transgenic calli, transgenic embryos, unstransformed embryos, and λ DNA marker double digested with Hind*III + *Eco*RI.

Variasi konsentrasi *Agrobacterium* dan lamanya kokultivasi

Konsentrasi *Agrobacterium* dan waktu pada tahapan kokultivasi memiliki pengaruh yang saling berkaitan. Hasil studi kedua faktor tersebut disajikan pada Gambar 3. Gambar tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi untuk inokulasi agar transformasi DNA ke dalam sel tanaman kakao untuk semua jenis eksplan memberikan hasil yang baik adalah 10^9 sel /ml. Dengan konsentrasi ini hanya diperlukan waktu kokultivasi selama 2 hari. Konsentrasi 10^8 sel/ml dapat digunakan, tetapi memerlukan waktu kokultivasi yang lebih lama (5 hari). Kokultivasi selama 5 hari umumnya menghadapi masalah dengan pencucian *Agrobacterium* yang pada akhirnya berpengaruh terhadap kesehatan eksplan. Waktu kokultivasi yang terlalu lama dapat menyebabkan kontaminasi oleh *A. tumefaciens* semakin banyak, sehingga eksplan harus dicuci berulang kali dengan media yang mengandung antibiotik untuk menghilangkan *Agrobacterium*nya. Pemakaian konsentrasi *A. tumefaciens* 10^7 sel/ml berdasarkan pengamatan hasil uji GUS secara histokimiawi tidak memberikan hasil yang memuaskan.

Regenerasi jaringan transforman di media seleksi

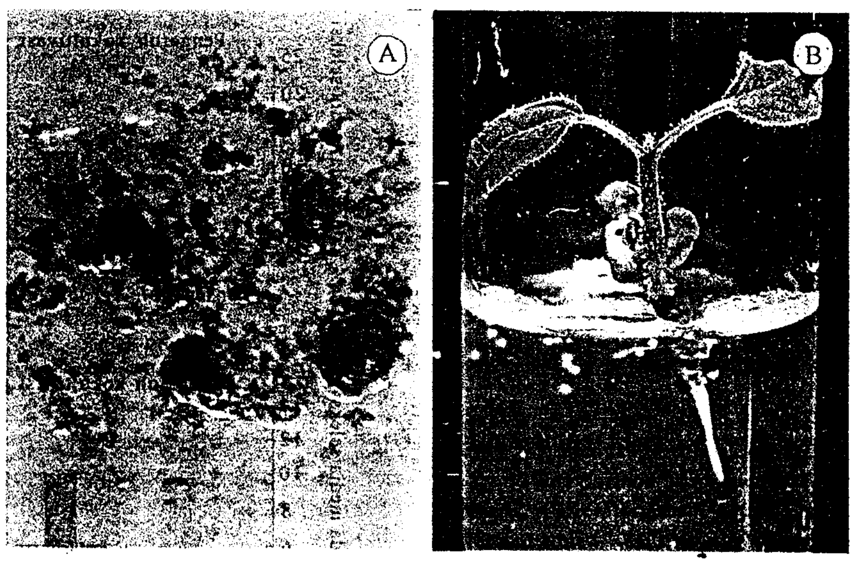
Eksplan yang berasal dari daun tanpa perlakuan prakultur dapat berkembang dengan baik, sehingga terjadi inisiasi kalus dari bekas luka sayatan pada hari ke-7. Perkembangan kalus terlihat jelas pada hari ke-14



Gambar3. Pengaruh konsentrasi *Agrobacterium* dan lamanya kokultivasi terhadap transformasi jaringan tanaman kakao; ▨ = 2 hari, ■ = 4 hari, dan ▧ = 5 hari.
Fig. 3. The effect of Agrobacterium concentration and cocultivation time on the transformation of cocoa tissues; ▨ = *2 days,* ■ = *4 days,* ▧ = *5 days.*

pada medium yang mengandung sefotaksim yang berfungsi untuk membunuh *Agrobacterium* hari ke-15 setelah dipindahkan pada medium seleksi yang mengandung kanamisin 25 µg/ml. Kalus terlihat menunjukkan perubahan warna, yang pada mulanya kuning muda menjadi kecokelatan. Pada saat tersebut ekspresi GUS menunjukkan hasil negatif. Hal ini dapat disebabkan oleh metabolit sekunder yang dihasilkan daun menghambat pertumbuhan sel-sel daun selanjutnya.

Eksplan petal tanpa perlakuan prakultur dapat membentuk kalus pada hari ke 15 setelah inokulasi (Gambar 4A). Setelah disubkultur pada media seleksi,



Gambar 4. Regenerasi tanaman dari petal (A) dan embrio zigotik (B).
Fig. 4. Plant regeneration from petal (A) and zygotic embryo (B).

sebagian kalus dapat bertahan pada media seleksi dan hasil uji GUS menunjukkan hasil positif pada seluruh jaringan yang diuji.

Embrio zigotik yang dikulturkan tanpa perlakuan prakultur menunjukkan hasil uji GUS positif pada keseluruhan embrio muda. Setelah dikulturkan pada media seleksi yang mengandung kanamisin 25 µg/ml terlihat perubahan warna dari putih menjadi hijau muda. Embrio zigotik transforman ini akhirnya berkembang menjadi plantlet. Hasil pengamatan menunjukkan adanya perkembangan yang normal (Gambar 4B) dan tidak normal. Pertumbuhan yang tidak normal dalam hal ini ada yang hanya membentuk akar saja, ada yang pucuk daun berkembang menjadi keriting dan ada yang tidak berkembang, tetapi tidak mati.

KESIMPULAN

1. Transfer T-DNA dari vektor pGPTV-Kan/35SGUS ke dalam jaringan daun, petal, dan embrio zigotik tanaman kakao dapat dilakukan melalui *A. tumefaciens* EHA105.
2. Berdasarkan pengujian aktivitas GUS secara histokimiawi, eksplan embrio zigotik kakao memberikan hasil transformasi yang lebih baik dibandingkan dengan daun dan petal.
3. Perlakuan prakultur terhadap eksplan segar dari tanaman kakao sebelum inokulasi tidak meningkatkan efisiensi transformasi ataupun pertumbuhan jaringan transforman.
4. Pemakaian jaringan embrio zigotik memberikan harapan dalam regenerasi langsung planlet kakao transgenik.

DAFTAR PUSTAKA

Becker, D., E. Kemper, J. Schell, and R. Masterson. 1992. New plantbinary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197.

Carozzi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola, and M.G. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. Appl. Environ. Microbiol 57: 3057-3061.

Castillo, O.C., K.J. Chalmers, R. Waugh, and W. Powell. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene in coffee using RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 87: 332-339.

Jansen, B.J. and R.C. Gardner. 1993. The use of transien GUS expression to develope an *Agrobacterium* - mediated gene transfer system for kiwi fruit. Plant Cell Rep. 13: 28-31.

Jefferson, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants, the GUS gene fusion system. Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387-465.

Lopez-Baez, O., H. Bollon, A. Eskes, and V. Petiard. 1993. Embryogenese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. a portir de pieces florale. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences dala vie/Life Sciences 316: 579-584.

Nehra, N.S., R.N. Chibbar, K.K. Kartha, R.S.S. Datla, W.L. Crosby, and C. Stushnoff. 1990. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. Plant Cell Rep. 9: 293-298.

Purdy, L.H. and E.R. Dicstein. 1989. *Theobroma cacao*, a host for *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Disease 73: 638-639.

Rodriguez, R.L. and R.C. Tait. 1983. Recombinant DNA Techniques an Introduction. Benjamin/Cummings. Menlo Park

Saint S.L., K.K. Oduro, and D.B. Furtek. 1994. Genetic transformation of cocoa leaf cells using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell and Organ Culture 37: 243-251.

Santoso, D., T. Chaidamsari, and A. Budiani. 1997. Perkembangan awal jaringan beberapa tanaman perkebunan setelah transformasi DNA melalui *Agrobacterium*. Prosiding Seminar PBPI, Surabaya, 12-14 Maret 1997.

Serres, R., B. McCown, and E. Zeldin. 1997. Detectable β-glucuronidase activity in transgenic cranberry is affected by endogenous inhibitors and plant development. Plant Cell Rep. 16: 641-646.

Tahardi, J.S. 1984. Tissue cultures of *Theobroma cacao* L. Menara Perkebunan 52: 174-178.

Tahardi, J.S. and N. Mardiana. 1995. Cocoa regeneration via somatic embryogenesis. Menara Perkebunan 63: 3-7.

Pedoman Bagi Penulis

Penyusunan pedoman ini dimaksudkan untuk membantu penulis menyiapkan naskah untuk diterbitkan pada Jurnal Bioteknologi Pertanian.

Redaksi hanya menerima naskah yang belum pernah dipublikasikan dan tidak dalam proses penerbitan oleh publikasi lain.

Ruang Lingkup

Jurnal Bioteknologi Pertanian memuat artikel primer yang bersumber langsung dari hasil penelitian bioteknologi bidang pertanian. Bioteknologi bidang pertanian yang dimaksud meliputi: a) bioteknologi tanaman, mencakup kultur jaringan, baik untuk perbanyakan tanaman maupun untuk membantu penelitian yang lebih luas, rekayasa genetik dan diagnostik penyakit tanaman; b) bioteknologi pangan mencakup hasil-hasil bioteknologi dalam pemrosesan pangan atau pakan; c) bioteknologi hewan mencakup rekayasa genetik pada hewan dan ikan, alih embrio, perbaikan pemrosesan pakan dalam saluran pencernaan, diagnostik penyakit hewan dan ikan; d) bioteknologi mikroba pertanian mencakup mikrobiologi terapan mencakup transformasi genetik yang dibantu mikroba, perbaikan sifat-sifat mikroba pertanian dengan menyisipkan gen asing; e) bioproses mencakup penanganan limbah pertanian yang dikaitkan dengan penggunaan mikroba.

Bahasa dan Bentuk Naskah

Naskah ditulis dalam bahasa Indonesia atau Inggris dengan abstrak berbahasa Indonesia dan Inggris. Naskah diketik dua spasi memakai tipe dan ukuran huruf baku. Jumlah halaman maksimal 18 halaman ketik. Semua halaman diberi nomor secara berurutan.

Judul dan Nama Penulis

Judul harus singkat (sebaiknya tidak lebih dari 15 kata), jelas, dan secara konsisten menggambarkan isi naskah serta mengandung kata kunci yang mencerminkan isi naskah. Nama-nama penulis disertai dengan nama dan alamat instansi tempat bekerja. Penempatan sub-sub judul disusun berurutan, sebagai berikut: Abstrak (bahasa Indonesia), Kata kunci (bahasa Indonesia), Abstrak (bahasa Inggris), Kata kunci (bahasa Inggris), Pendahuluan, Bahan dan Metode, Hasil dan Pembahasan, Kesimpulan dan Saran (jika ada), Ucapan Terima Kasih (jika ada), Daftar Pustaka dan Lampiran (jika ada).

Abstrak dan Kata Kunci

Abstrak memuat latar belakang secara ringkas, tujuan, metode, hasil serta kesimpulan suatu penelitian. Abstrak ditulis dalam satu paragraf. Di dalam Abstrak tidak diperkenankan mencantumkan istilah-istilah yang tidak diketahui secara luas, akronim, nama/merek dagang atau tanda lain tanpa suatu keterangan. Abstrak berbahasa Inggris merupakan terjemahan dari Abstrak berbahasa Indonesia dan disertai terjemahan judul naskah. Di bawah abstrak dicantumkan kata kunci.

Pendahuluan

Isi pendahuluan mencakup latar belakang, temuan terdahulu yang akan dikembangkan atau disanggah, hipotesis, pendekatan umum dan tujuan penelitian.

Bahan dan Metode

Berisi penjelasan ringkas tetapi rinci tentang waktu dan tempat penelitian, bahan-bahan dan metode yang digunakan, rancangan percobaan dan analisis data.

Hasil dan Pembahasan

Hasil dan Pembahasan dapat ditulis dalam satu bab atau terpisah. Hasil merupakan data atau fakta yang diperoleh dari penelitian. Data atau fakta penting yang tidak dapat dinarasikan dengan jelas dapat ditampilkan dalam bentuk tabel atau gambar atau ilustrasi lain. Bila hasil disajikan dalam bentuk tabel atau gambar, maka tidak perlu diuraikan secara panjang lebar. Pembahasan merupakan ulasan tentang hasil, menjelaskan makna hasil penelitian, kesesuaian dengan hasil atau penelitian terdahulu, peran hasil terhadap pemecahan masalah yang disebutkan dalam pendahuluan serta kemungkinan pengembangannya.

Kesimpulan dan Saran

Ditulis dengan ringkas hasil-hasil dan saran penelitian yang kongkrit.