

**TRANSFORMASI GEN PADA NILAM UNTUK KETAHANAN TERHADAP PENYAKIT UTAMA
MENGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens*
Gene Transformation on Patchouli For Resistance to Major Diseases
Mediated by *Agrobacterium tumefaciens***

Sukamto¹⁾, Tri Joko Santoso²⁾, Atmitri Siharmini²⁾, Aniversari Apriana²⁾, Amalia¹⁾ dan Nursalam Sirait¹⁾

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat¹⁾
Jalan Tentara Pelajar No. 3 Bogor 16111
Telp 0251-8321879 Faks 0251-8327010
Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian²⁾
Jalan Tentara Pelajar No. 4 Bogor 16111
sukamtown@yahoo.com

(diterima 20 Juli 2016, direvisi 21 Agustus 2016, disetujui 30 Mei 2017)

ABSTRAK

Nilam banyak dibudidayakan di Indonesia, dan lebih dari 80% produksi minyak nilam dunia dipasok dari Indonesia. Masalah utama dalam budidaya nilam di Indonesia adalah penyakit, seperti penyakit layu bakteri, budok dan nematoda. Sampai saat ini varietas tahan terhadap penyakit, khususnya budok, belum diperoleh. Tanaman tahan dapat diperoleh dengan teknik transformasi gen. Transkripsi faktor WRKY telah diketahui dapat meregulasi serangan beberapa patogen penyebab penyakit tanaman. Gen *OsWRKY76* terletak pada segmen kromosom 9 tanaman padi yang telah diidentifikasi terkait dengan ketahanan berspektrum luas. Penelitian bertujuan untuk mengintroduksi konstruksi gen *OsWRKY76* yang berasal dari padi ke dalam tanaman nilam melalui bantuan *Agrobacterium tumefaciens*. Pada percobaan pertama, tanaman nilam ditransformasi dengan *A. tumefaciens* strain EHA 105 yang mengandung gen *OsWRKY76*. Perlakuan terdiri atas waktu induksi eksplan yang akan ditransformasi (pre-kultur) di dalam medium MS, yaitu 5 dan 7 hari, dan waktu inokulasi *A. tumefaciens* yaitu 10 dan 20 menit. Pada percobaan kedua, analisis molekuler untuk mengkonfirmasi keberadaan gen *OsWRKY76* dalam tanaman nilam menggunakan teknik PCR dengan primer *hptII*. Hasil penelitian menunjukkan waktu induksi eksplan terbaik sebelum transformasi adalah 5 hari, dengan perendaman di dalam suspensi *A. tumefaciens* selama 10 menit. Dari transformasi tersebut telah dihasilkan 187 kalus independen. Hasil analisis PCR terhadap galur-galur putatif transgenik independen, lima galur (T1, T8, T10, T11, T13) positif mengandung gen *hptII*, yaitu gen penanda ketahanan terhadap antibiotik higromisin yang berada satu konstruk dengan gen *OsWRKY76*. Hasil tersebut menunjukkan bahwa gen *OsWRKY76* yang berasal dari padi dapat diintroduksi pada tanaman nilam dan berpotensi sebagai kandidat tahan terhadap penyakit utama.

Kata kunci: *Pogostemon cablin* Benth, gen *OsWRKY76*, ketahanan terhadap penyakit

ABSTRACT

The patchouli plant have been cultivated commercially in Indonesia, which contributes over 80% of world patchouli oil production. The main problem in patchouli cultivation in Indonesia is plant diseases such as wilt disease, "budok" and nematode. Currently, patchouli varieties resistant to those diseases, especially budok, are unavailable. Plants resistant to disease can be obtained through several techniques such as genetic transformation. WRKY transcription factors have been known to regulate expression of pathogens causing infectious disease. OsWRKY76 gene located in the ninth of chromosome segment in rice has been identified related to its broad spectrum of plant resistance. The research was aimed to introduce OsWRKY76 from rice into patchouli through Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation. At the first experiment, leaves of patchouli were transformed with A. tumefaciens strain EHA 105 containing OsWRKY76 gene. The treatments were explants induction time in MS medium before transformation (pre-culture) viz. 5 and 7 days, and inoculation time of A. tumefaciens viz. 10 and 20 minutes. The second experiment was molecular analysis to confirm the integration of OsWRKY76 gene into patchouli using PCR technique with hptII primer. The result

indicated the best treatment for explants induction before transformation was 5 days, and 10 minutes for inoculation time of A. tumefaciens. There were 187 independent calli lines have been produced from this transformation. PCR analysis indicated five independent putative transgenic lines (T1, T8, T10, T11, T13) were positively harboring the hptII gene, a selectable marker used in the OsWRKY76 construct gene. These suggested that the OsWRKY76 gene derived from rice can be introduced into patchouli plants and is potential candidate for plant resistance to major diseases.

Key words: *Pogostemon cablin Benth, OsWRKY76 gene, disease resistance*

PENDAHULUAN

Nilam (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) merupakan salah satu tanaman aromatik yang berasal dari Asia, dan secara intensif telah dikembangkan di Indonesia, Cina, India, Malaysia, Filipina, Thailand dan Vietnam (Chakrapani *et al.* 2013). Indonesia merupakan penghasil utama minyak nilam yang memasok lebih dari 80% kebutuhan dunia (Singh dan Rao 2009). Salah satu masalah dalam budidaya nilam di Indonesia adalah adanya serangan penyakit tanaman (Sukamto *et al.* 2014; Djiwanti dan Wahyuno 2012). Beberapa penyakit utama pada tanaman nilam adalah penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* (Nasrun *et al.* 2005), penyakit budok yang disebabkan oleh jamur *Synchytrium pogostemonis* (Wahyuno dan Sukamto 2010), nematoda (Djiwanti dan Momota 1991), dan penyakit yang disebabkan oleh virus (Sukamto *et al.* 2007; Noveriza *et al.* 2012). Pengendalian penyakit dapat dilakukan secara terpadu yaitu dengan agensia hayati, pestisida nabati, penggunaan varietas tahan maupun fungisida. Penggunaan varietas tahan adalah cara yang paling efektif untuk mengendalikan penyakit tanaman. Usaha untuk memperoleh varietas tahan melalui persilangan tidak dapat dilakukan, karena nilam yang dibudidayakan tidak berbunga. Transformasi genetik dengan gen asing dari tanaman lain merupakan cara alternatif untuk memperoleh tanaman yang memiliki sifat yang diinginkan.

Ketahanan terhadap penyakit pada tanaman terjadi karena adanya interaksi antara produk gen *Avr* dari patogen dan produk gen *R* dari tanaman. Gen *Avr* patogen menjadi protein elisitor yang berinteraksi secara fisik dengan

protein reseptor kinase (NBS-LRR) yang merupakan produk gen *R* dari tanaman (Hu *et al.* 2012). Protein reseptor kinase yang diaktifkan melalui interaksi ini selanjutnya dapat mengaktifkan protein-protein yang lainnya seperti faktor transkripsi melalui mekanisme fosforilasi. Faktor transkripsi yang sudah diketahui terlibat dalam mekanisme pertahanan tanaman terhadap penyakit, cekaman biotik, maupun abiotik lainnya yaitu *ethylene responsive factor* (ERF), *myelocytomatosis related proteins* (MYC), *myeloblastosis related proteins* (MYB), *basic leucine zipper containing domain proteins* (bZIP), dan *amino-acid sequence WRKYGQK* (WRKY) (Liu *et al.* 2014). WRKY merupakan salah satu gen faktor transkripsi yang dapat menginduksi ketahanan terhadap berbagai patogen penyebab penyakit tanaman seperti terhadap jamur (Li dan Luan 2014), bakteri (Hu *et al.* 2012) dan virus (Ando *et al.* 2014; Huh *et al.* 2012). Faktor transkripsi *CaWRKY* asal tanaman cabai dapat menginduksi ketahanan tanaman terhadap cekaman biotik dan abiotik seperti salinitas, kekeringan, pemanasan (*heat shock*) dan penyakit (*Phytophthora capsici*) (Tripathi *et al.* 2014; Diao *et al.* 2016). Gen *OsWRKY76* merupakan salah satu gen dari keluarga *OsWRKY* yang meningkatkan ketahanan tanaman padi terhadap cendawan *Pyricularia grisea* (Ryu *et al.* 2006). Gen ini terletak pada segmen kromosom 9 yang mempunyai ketahanan terhadap penyakit dengan spektrum luas (Wisser *et al.* 2005). Fragmen gen *OsWRKY76* telah diisolasi dari padi varietas Nipponbare, dan telah dikonstruksi pada vektor biner pCAMBIA-1301::35S::OsWRKY76 (Apriana *et al.* 2011).

Metode transfer gen dari tanaman satu ke tanaman lain telah banyak dilakukan antara lain menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Meto-

de ini sangat sederhana dan murah karena pada prinsipnya gen yang akan dipindahkan disisipkan ke plasmid T-DNA *A. tumefaciens*, lalu diinokulasikan ke jaringan tanaman yang telah dilukai. Namun keberhasilan transformasi dengan *A. tumefaciens* tergantung pada jenis tanaman, strain *Agrobacterium*, vektor plasmid, medium transformasi dan suhu lingkungan (Opabode 2006; Krenek et al. 2015). Protokol transformasi gen dengan metode ATMT (*Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation*) belum banyak tersedia pada tanaman obat dan atsiri (Khan et al. 2015). Tanaman nilam merupakan tanaman aromatik yang dapat berfungsi sebagai antibakteri seperti terhadap *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Serratia marcescens* (Das et al. 2011). Keberadaan antibakteri ini pada tanaman nilam diduga akan mempengaruhi bakteri *A. tumefaciens* pada saat transformasi.

Penelitian ini bertujuan memperoleh metode transformasi terbaik untuk mengintroduksi gen *OsWRKY76* asal tanaman padi ke dalam tanaman nilam (varietas Sidikalang) melalui vektor *A. tumefaciens*, sehingga dapat dihasilkan tanaman nilam hasil transformasi yang mengandung gen *OsWRKY76* sebagai kandidat ketahanan terhadap penyakit.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan dan Penyakit Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro), Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB-Biogen). Penelitian menggunakan tanaman nilam varietas Sidikalang, dengan keunggulan kadar *patchouli alcohol* dan produksi minyak tertinggi dibandingkan dengan dua varietas unggul lainnya (Lhokseumawe dan Tapaktuan). Oleh karena itu, varietas Sidikalang disukai oleh petani dan paling banyak dibudidayakan (Setiawan dan Sukamto 2016). Trans-

formasi genetik menggunakan plasmid rekombinan 35SCaMV-*OsWRKY76* dalam vektor biner pCAMBIA-1301 yang diperoleh dari Laboratorium Biologi Molekuler, BB-Biogen. Selain membawa gen *OsWRKY76*, T-DNA pada vektor biner juga dilengkapi dengan gen marka seleksi higromisin (*hptII*) dan gen marka pelapor *gus*. Untuk seleksi bakteri, plasmid biner juga membawa gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin (*nptII*). *A. tumefaciens* yang digunakan adalah strain EHA 105 yang resisten terhadap antibiotik rifampisin. Penelitian dilakukan melalui dua kegiatan berkesinambungan, yaitu (1) transformasi gen *OsWRKY76* pada eksplan nilam dengan vektor *A. tumefaciens*, dan (2) deteksi gen *hptII* pada tanaman nilam transgenik dengan teknik PCR.

Transformasi nilam dengan gen *OsWRKY76* melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*

Bakteri *Agrobacterium* yang membawa konstruk pCAMBIA-1301::35S::*OsWRKY76* dikulturkan dalam media YEP padat (*Yeast Extract Pepton*) yang mengandung 100 mg.l⁻¹ kanamisin dan 10 mg.l⁻¹ rifampisin. Kultur bakteri diinkubasi pada suhu 28°C selama 2 hari dengan pengoyangan. Kultur *Agrobacterium* yang telah tumbuh pada media padat selanjutnya dikulturkan dalam media AAM (media AA *modified* untuk infeksi *Agrobacterium*) (Hiei et al. 1994), tanpa antibiotik dan dikocok menggunakan *shaker* selama 1-2 jam. Induksi eksplan (pre-kultur) berupa potongan daun nilam dari varietas Sidikalang yang diambil dari ruas kedua dari atas (Paul et al. 2012) dilakukan selama 5 dan 7 hari dalam media MS (Murashige Skoog). Untuk proses infeksi, eksplan-eksplan dari pre-kultur (5 dan 7 hari) direndam dalam kultur cair *Agrobacterium* selama 10 dan 20 menit. Eksplan dan bakteri di ko-kultivasi dalam media IK3-AS (0,5 mg.l⁻¹ IAA dan 1 mg.l⁻¹ kinetin yang mengandung 10 mM asetosiringone) dan diinkubasi pada suhu 25°C selama 3 hari dalam gelap. Setelah ko-kultivasi, eksplan dicuci dengan 400 mg.l⁻¹ cefotaxime dan diseleksi pada media IK3-C250H25 (IK3 yang mengandung 250 mg.l⁻¹ cefotaxime dan 25 mg.l⁻¹ higromisin). Kalus yang

tahan terhadap antibiotik higromisin disubkultur ke dalam media regenerasi (MS + 0,5 mg.l⁻¹ IAA + 0,3 mg.l⁻¹ BAP dan 0,5% phytagel). Planlet yang diperoleh ditanam pada media dasar MS tanpa hormon. Setelah cukup besar dan berakar, plantlet diaklimatisasi pada media tanah di rumah kaca. Efisiensi transformasi dan efisiensi regenerasi dihitung berdasarkan rumus (Mulyaningsih *et al.* 2010):

$$\text{Efisiensi transformasi (\%)} = \frac{\text{Kalus tahan higromisin}}{\text{Kalus awal ditransformasi}} \times 100\%$$

$$\text{Efisiensi regenerasi (\%)} = \frac{\text{Kalus beregenerasi}}{\text{Kalus tahan higromisin}} \times 100\%$$

Analisis molekuler tanaman hasil transformasi

Analisis molekuler untuk mengonfirmasi keberadaan transgen *OsWRKY76* dilakukan melalui teknik PCR dengan menggunakan primer *hptII*. Isolasi DNA untuk analisis PCR dilakukan dari daun yang diambil dari tanaman nilam hasil aklimatisasi. DNA genom total nilam diisolasi dengan menggunakan metode CTAB (*Cetyltrimethylammonium bromida*) mengikuti Doyle dan Doyle (1990). Pelet DNA dilarutkan dengan 50 µl TE buffer. Sampel DNA nilam hasil isolasi siap diamplifikasi menggunakan PCR atau disimpan pada suhu -20°C.

Amplifikasi DNA dengan teknik PCR dilakukan pada total reaksi 20 µl yang terdiri atas 2,0 µl 10x PCR buffer (100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,3); 1,2 µl-50 mM MgCl₂; 0,4 µl-10 mM dNTP mix; 1 µl-10 uM dari masing-masing primer *hpt* (F dan R) yaitu primer *Forward* : 5'-GATGCCTCCGCTCGAAGTAGCG-3' dan primer *Reverse*: 5'-GCATCTCCCGCCGTGCAC-3', 1 unit Taq DNA polymerase (5 unit/µl), dan 2 µl DNA nilam sebagai cetakan. Reaksi amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR (PCT 100) dengan program sebagai berikut: satu siklus tahap denaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 60°C selama 30 detik, dan pemanjangan/sintesis DNA pada suhu 72°C selama 45 detik. Proses pemanjangan/sintesis DNA akhir pada suhu 72°C

selama 5 menit. Setelah program PCR selesai selanjutnya dilakukan elektroforesis hasil PCR.

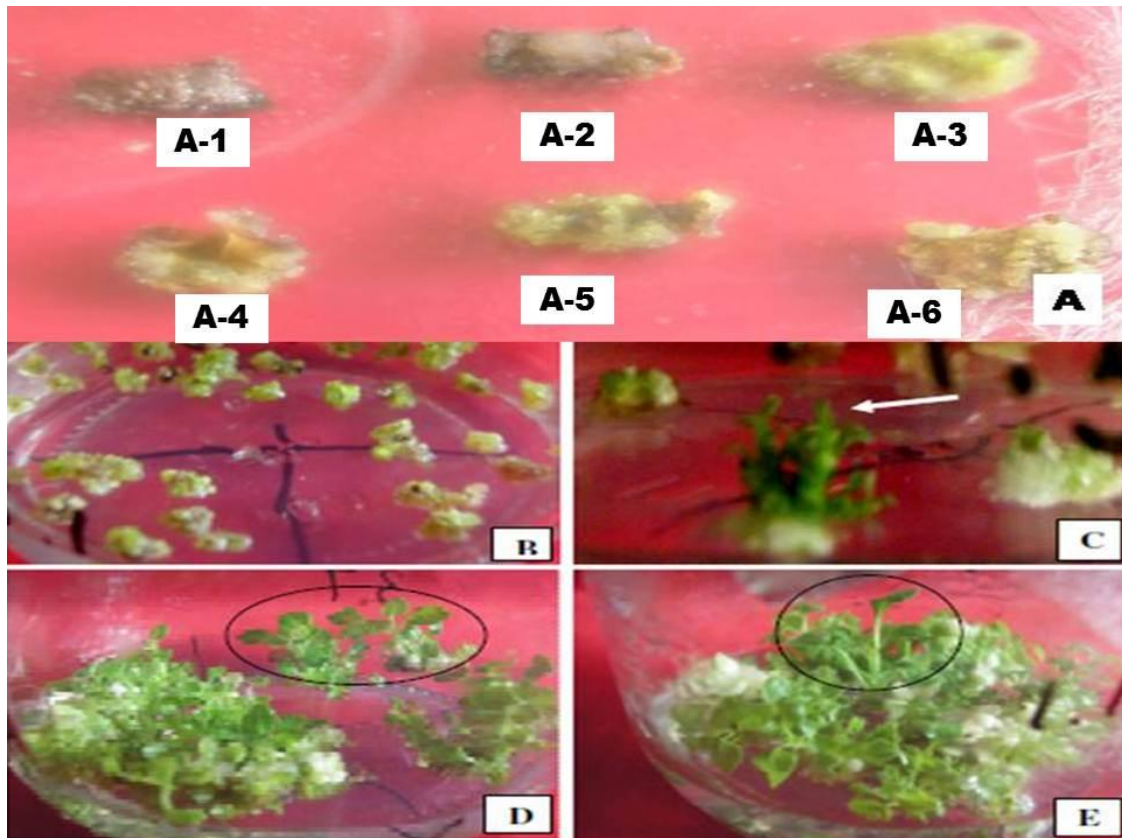
Sebanyak 10 µl produk PCR ditambahkan 1 µl *loading dye* dan dicampur sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel dan dilarikan dalam gel agarose 1% pada tegangan listrik 80 volt. Gel agarosa diwarnai dengan larutan etidium bromida (10 mg.l⁻¹) selama 10 menit, dan divisualisasi pada *UV Illuminator ChemiDoc EQ Biorad*. Analisis data hasil PCR dilakukan dengan melihat ada tidaknya pita DNA yang terbentuk pada ukuran sekitar 500 bp pada masing-masing sampel transforman yang diuji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Transformasi nilam dengan gen *OsWRKY76* melalui *Agrobacterium tumefaciens*

Jumlah kalus yang dapat mencapai tahap regenerasi semakin menurun, setelah dilakukan transformasi. Kalus yang tidak tahan pada medium seleksi yang mengandung antibiotik higromisin akan mati, ditunjukkan dengan perubahan warna kalus dari putih pucat menjadi hitam (Gambar 1A1 dan 1A2). Kalus yang tahan pada medium seleksi terus tumbuh dicirikan dengan terjadinya pertumbuhan kalus yang berwarna putih kehijauan (Gambar 1A3, 1A4 dan 1A5). Kalus tahan diduga mengandung gen *OsWRKY76* yang ditransfer oleh *Agrobacterium*. Bagian T-DNA yang ditransfer dari plasmid rekombinan yang digunakan untuk transformasi selain mengandung *OsWRKY76* juga mengandung gen ketahanan terhadap higromisin. Proses transfer gen melalui vektor *Agrobacterium* akan memindahkan satu set gen yang berada pada daerah transfer DNA (T-DNA) dan mengintegrasikannya ke bagian genom tanaman (Lee dan Gelvin 2008).

Setelah pre-kultur selama 5 hari, dari total 93 eksplan yang ditransformasi, perendaman di dalam suspensi bakteri *A. tumefaciens* selama 10 menit menghasilkan 80 kalus yang tumbuh pada media seleksi higromisin. Kalus-kalus tahan tersebut kemudian diregenerasikan dan menghasilkan 63 kalus transforman independen. Vektor



Gambar 1. A. Eksplan yang telah ditransformasi pada media selektif higromisin 50 mg.l⁻¹ (A1-A2, tidak tumbuh, A3-A6, tumbuh); B. Kalus di dalam media regenerasi; C. Kalus yang beregenerasi membentuk tunas; D dan E. Tunas-tunas nilam yang terbentuk pada media regenerasi.

Figure 1. A. Transformed explants in selective medium containing antibiotic hygromycin 50 mg.l⁻¹. (A1-A2, dead calli; A3-A6, survived calli); B. Calli in regeneration medium; C. Shoots from regenerated calli; D and E. Patchouli shoots transformed in regeneration medium.

pCAMBIA-1301 yang mengandung gen *OsWRKY76* yang digunakan dalam penelitian ini juga membawa gen ketahanan terhadap higromisin (gen *hptII*), maka dapat diduga bahwa kalus-kalus yang tahan pada media seleksi tersebut telah terinfeksi oleh *Agrobacterium*. Pada proses infeksi ini, T-DNA yang membawa gen *OsWRKY76* dan gen *hptII* dipindahkan dari sel bakteri *Agrobacterium* ke dalam sel tanaman nilam (Birch 1997). Induksi eksplan 5 hari dan inokulasi bakteri selama 10 menit, menunjukkan efisiensi transformasi 86,02%, dan efisiensi regenerasi 78,75% (Tabel 1).

Pre-kultur 5 hari yang diikuti dengan perendaman pada suspensi bakteri selama 20 menit menghasilkan 91 kalus yang terseleksi higromisin dari total 114 eksplan yang ditransformasi. Kalus kalus tahan kemudian beregenerasi dan meng-

hasilkan 60 kalus transforman independen, dengan efisiensi transformasi 79,82%, dan efisiensi regenerasi 65,93% (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan bahwa dengan waktu pre-kultur yang sama (5 hari), inokulasi eksplan dengan suspensi *Agrobacterium* selama 10 menit lebih efisien dibandingkan dengan inokulasi 20 menit. Folta *et al.* (2006) melaporkan bahwa inokulasi yang terlalu lama akan mendorong bakteri mengkoloni eksplan. Pertumbuhan koloni yang berlebihan akan menyebabkan nekrosis yang pada akhirnya dapat menyebabkan kematian kalus, dan berpengaruh terhadap daya regenerasi.

Pre-kultur 7 hari yang diikuti dengan perendaman di dalam suspensi bakteri selama 10 menit, dari 100 eksplan menghasilkan 56 kalus transforman. Kalus-kalus tahan kemudian berege-

Tabel 1. Jumlah kalus tahan pada media seleksi higromisin dan kalus beregenerasi setelah transformasi dengan *OsWRKY76* melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*.

Table 1. The number of survived callus in selection media with hygromycin and regenerated callus after genetic transformation with *OsWRKY76* gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens* vector.

Waktu induksi eksplant (pre-kultur) (hari)	Waktu inokulasi (menit)	Jumlah eksplan	Jumlah kalus tahan pada higromisin	Efisiensi transformasi (%)	Jumlah kalus beregenerasi	Efisiensi regenerasi (%)
5	10	93	80	86,02	63	78,75
	20	114	91	79,82	60	65,93
7	10	100	56	56,00	38	67,85
	20	47	23	48,94	23	100,00

nerasi dan menghasilkan 38 kalus transforman independen. Sementara itu, perlakuan pre-kultur 7 hari dengan perendaman di dalam suspensi bakteri selama 20 menit dari 47 eksplan menghasilkan 23 kalus terseleksi higromisin. Total 23 kalus tahan tersebut kemudian beregenerasi dan menghasilkan 23 kalus transforman independen (Tabel 1). Seperti pada pre-kultur 5 hari, pada pre-kultur 7 hari juga perendaman dengan suspensi bakteri (infeksi *Agrobacterium*) selama 10 menit lebih efisien (56%) dibandingkan dengan perendaman 20 menit (48,94%). Khan *et al.* (2015) melaporkan bahwa transformasi menggunakan plasmid pBI-121 yang mengandung gen ketahanan terhadap kanamisin (*nptII*) pada tanaman basil (*Ocimum gratissimum*), efisiensi transformasi terbaik terjadi pada waktu infeksi *Agrobacterium* 10-15 menit, dan terus menurun seiring lamanya perendaman (waktu infeksi). Hal yang sama dilaporkan Faisal *et al.* (2015) pada tanaman timun (varietas Shital), dimana efisiensi transformasi terbaik terjadi pada perlakuan infeksi *Agrobacterium* 5 menit.

Keberhasilan infeksi dan transfer gen antara lain ditentukan oleh strain *Agrobacterium*, lama inokulasi bakteri, masa inkubasi bakteri (*co-cultivation*), jenis eksplan, dan induksi eksplan (pre-kultur) (Hassanein *et al.* 2005). Pada eksplan tanaman tomat yang tidak diinduksi, transformasi gen terjadi hanya 0,45% sedangkan bila diinduksi selama 2 hari, efisiensi transformasi meningkat menjadi 6,32% (Rai *et al.* 2012). Eksplan yang diinduksi dapat mengaktifkan pembelahan sel sehingga dapat meningkatkan transformasi. Induksi

eksplan juga dapat meningkatkan persentasi regenerasi dan kekuatan sel sehingga mengurangi stres akibat inokulasi *Agrobacterium*. Kalus-kalus yang tumbuh pada media seleksi, dan dipindahkan ke media regenerasi (MS + 0,5 mg.l⁻¹ IAA + 0,3 mg.l⁻¹ BAP dan 0,5% phy-tagel) akan membentuk spot-spot hijau (Gambar 1B dan 1C). Tunas-tunas yang muncul dari spot-spot hijau kemudian ditumbuhkan pada media MS untuk menginduksi perakaran (Gambar 1D dan 1E). Planlet transgenik membentuk akar secara sempurna yang berwarna putih.

Analisis molekuler tanaman hasil transformasi

Dua puluh dua populasi planlet nilam hasil transformasi *OsWRKY76* (T1–T22) telah diaklimatisasi di rumah kaca, menunjukkan pertumbuhan yang normal. Tanaman T1–T22 tersebut kemudian diisolasi DNA genomiknya untuk dilakukan analisis molekuler dengan teknik PCR, untuk melihat keberhasilan integrasi gen *OsWRKY76* ke dalam genom tanaman nilam. Pada penelitian ini tidak digunakan primer spesifik untuk gen *WRKY*, karena gen tersebut secara alami juga terdapat pada tanaman nilam, sehingga untuk membedakan antara tanaman transgenik dan non transgenik harus digunakan primer spesifik untuk gen yang tidak terdapat dalam tanaman non transgenik. Gen yang ditransformasikan yaitu *hptII* dan gen *OsWRKY76* terdapat dalam satu konstruk T-DNA dari plasmid/vektor biner pCAMBIA-1301.

Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa dari 22 galur independen yang dianalisis, lima

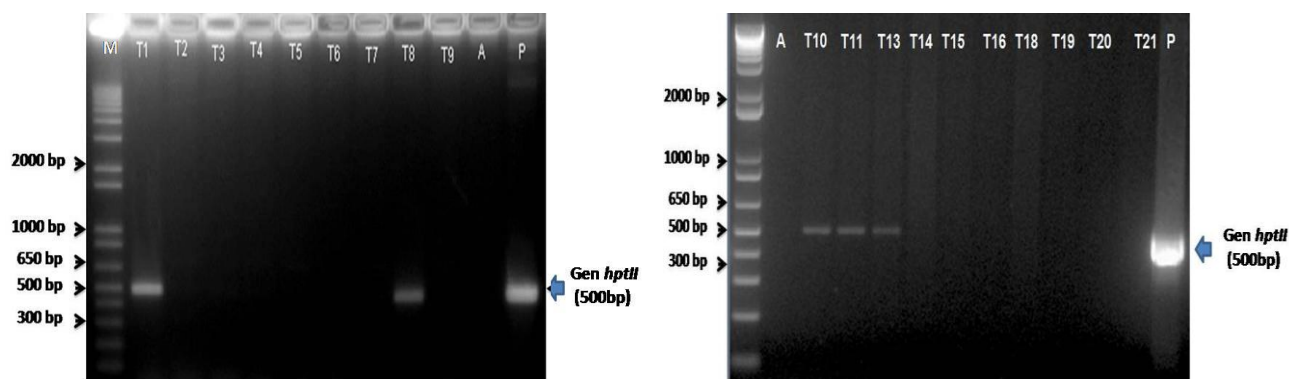
galur independen (T1, T8, T10, T11, dan T13) mengandung gen penanda seleksi higromisin (*hptII*) yang diindikasikan dengan terbentuknya amplikon berukuran 500 bp (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan bahwa gen *WRKY76* yang diisolasi dari tanaman padi dapat diintegrasikan pada tanaman nilam dengan bantuan vektor *A. tumefaciens*. Penggunaan *A. tumefaciens* untuk transfer gen PaMMV coat protein (CP) pada tanaman nilam telah dilakukan, dan menghasilkan tanaman yang tahan terhadap virus yaitu *Patchouli mild mosaic virus* (Kadotani dan Ikegami 2002). Paul et al. (2012) dengan menggunakan *A. tumefaciens* dari strain yang sama dengan penelitian ini yaitu EHA 105, telah berhasil mentransfer vektor pCAMBIA-2301 yang mengandung *neomycin phosphotransferase* (*nptII*) pada tanaman nilam. Namun demikian, rekayasa genetik dengan bantuan *A. tumefaciens* pada tanaman yang menghasilkan atsiri mungkin memerlukan protokol yang khusus karena beberapa komponen minyak atsiri yang bersifat antibakteri.

Syarat utama dalam perbaikan genetik tanaman melalui rekayasa genetik dengan memanfaatkan teknik *in vitro* adalah penguasaan protokol regenerasi. Protokol regenerasi *in vitro*

tanaman nilam sudah tersedia, selain itu secara konvensional nilam diperbanyak secara vegetatif dengan setek. Oleh karena itu, sekali diperoleh nilam transgenik dengan karakter yang diinginkan, maka tanaman transgenik tersebut tinggal diperbanyak secara vegetatif tanpa terjadi perubahan genetik. Namun demikian, jumlah *copy*, efikasi dan stabilitas ekspresi gen target pada generasi vegetatif lebih lanjut tetap perlu dikaji, agar sifat yang diinginkan diwariskan dan diekspresikan secara optimal kepada keturunannya. Selain itu, aplikasi teknik ini masih dibatasi oleh proses pengkajian keamanan hayati yang memerlukan banyak waktu dan biaya tinggi, sehingga produk tanaman transgenik belum dapat secara langsung dimanfaatkan oleh petani atau pengguna lain.

KESIMPULAN

Transformasi gen pada tanaman nilam (varietas Sidikalang) dapat dilakukan dengan menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Efisiensi transformasi dapat dicapai dengan menginduksi eksplan (pre-kultur) di dalam medium MS selama 5 hari dan menginfeksi eksplan dengan perendaman di dalam suspensi *A. tumefaciens* selama 10 menit. Lima galur independen putatif



Gambar 2. Hasil analisis PCR dari nilam putatif transgenik dengan menggunakan primer untuk gen *hptII*. Amplikon berukuran 500 bp merupakan fragmen gen *hptII*. Keterangan : M=marker, T1-T22 =sampel tanaman transgenik, A= air, P=plasmid pCAMBIA-1301-35S-OsWRKY76.

Figure 2. Result of PCR analysis of patchouli putative transgenic using *hptII* specific primer. The amplicon of 500 bp indicated the *hptII* gene fragment. Note: M=marker, T1-T22 =transgenic lines, A=water, P=plasmid of pCAMBIA-1301-35S-OsWRKY76.

transgenik (T1, T8, T10, T11, T13) teramplifikasi dengan primer spesifik gen *hptII*, dan berpeluang menjadi kandidat varietas tahan terhadap penyakit utama pada tanaman nilam.

DAFTAR PUSTAKA

- Ando, S., Obinata, A. & Takahashi, H. (2014) WRKY70 Interacting with RCY1 Disease Resistance Protein is Required for Resistance to Cucumber Mosaic Virus in *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 85, 8–14. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2013.11.001>.
- Apriana, A., Sisharmini, A., Enggarini, W., Sudarsono, S., Khumaida, N. & Trijatmiko, K.R. (2011) Introduksi Konstruksi Over-Ekspresi Kandidat gen OsWRKY76 melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Padi Nipponbare. *Jurnal AgroBiogen*. 7 (1), 19–27.
- Birch, R.G. (1997) Plant Transformation: Problems and Strategies for Practical Application. *Annual Review of Plant Biology*. 48 (1), 297–326.
- Chakrapani, P., Venkatesh, K., Singh, B.C.S., Jyothi, B.A., Kumar, P., Amareshwari, P. & Roja, A.R. (2013) Phytochemical, Pharmacological Importance of Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) an Aromatic Medicinal Plant. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 21 (2), 7–15.
- Das, K., Gupta, N., Vijayabhaskar, S. & Manjunath, U. (2011) Antimicrobial Potential on Patchouli Oil Cultivated under Acidic Soil Zone of South India. *Indian Journal of Novel Drug Delivery*. 3 (2), 101–104.
- Diao, W.-P., Snyder, J.C., Wang, S.-B., Liu, J.-B., Pan, B.-G., Guo, G.-J. & Wei, G. (2016) Genome-Wide Identification and Expression Analysis of WRKY Gene Family in *Capsicum annuum* L. *Frontiers in Plant Science*. 7, 1727. doi:10.3389/fpls.2016.00211.
- Djiwanti, S. & Wahyuno, D. (2012) Pengelolaan Penyakit-penyakit pada Tanaman Atsiri. In: *Bunga Rampai Inovasi Tanaman Atsiri Indonesia*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. IAARD Press, pp.134–142.
- Djiwanti, S.R. & Momota, Y. (1991) Parasitic Nematodes Associated with Patchouli Disease in West Java. *Indust Crops Res J.* 3, 31–34.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990) Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*. 12 (1), 13–15.
- Faisal, S.M., Haque, M.S. & Nasiruddin, K.M. (2015) *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation in Cucumber (var. Shital) as Influenced by Explant, Inoculation Time and Co-cultivation Period. *Universal Journal of Plant Science*. 3 (2), 25–31. doi:10.13189/ujps.2015.030203.
- Folta, K.M., Dhingra, A. & Lakshmanan, P. (2006) Transformation of Strawberry: The Basis for Translational Genomics in Rosaceae. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. 42 (6), 482–490. Available from: doi:10.1079/IVP2006807.
- Hassanein, A., Chevreau, E. & Dorion, N. (2005) Highly Efficient Transformation of Zonal (*Pelargonium x hortorum*) and Scented (*P. capitatum*) Geraniums via *Agrobacterium tumefaciens* Using Leaf Discs. *Plant Science*. 169 (3), 532–541. doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.04.014>.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. & Kumashiro, T. (1994) Efficient Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.) Mediated by *Agrobacterium* and Sequence Analysis of the Boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*. 6 (2), 271–282. doi/10.1046/j.1365-3113X.1994.6020271.x/pdf.
- Hu, Y., Dong, Q. & Yu, D. (2012) Arabidopsis WRKY46 Coordinates with WRKY70 and WRKY53 in Basal Resistance against Pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Science*. 185–186, 288–297. doi:10.1016/j.plantsci.2011.12.003.
- Huh, S.U., Choi, L.M., Lee, G.-J., Kim, Y.J. & Paek, K.-H. (2012) *Capsicum annuum* WRKY Transcription Factor d (CaWRKYd) Regulates Hypersensitive Response and Defense Response upon Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Science*. 197, 50–58. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.12.074>.
- Kadotani, N. & Ikegami, M. (2002) Production of Patchouli Mild Mosaic Virus Resistant Patchouli Plants by Genetic Engineering of Coat Protein Precursor Gene. *Pest Management Science*. 58 (11), 1137–1142. doi:10.1002/ps.581.
- Khan, S., Fahim, N., Singh, P. & Rahman, L.U. (2015) *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Genetic Transformation of *Ocimum gratissimum*: A Medicinally Important Crop. *Industrial Crops and*

- Products*. 71, 138–146. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.080>.
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Daskocilova, A., Komis, G. & Samaj, J. (2015) Transient Plant Transformation Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, Methods and Applications. *Biotechnology Advances*. 33 (6), 1024–1042.
- Lee, L.-Y. & Gelvin, S.B. (2008) T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*. 146, 325–332. doi:10.1104/pp.107.113001.
- Li, J. & Luan, Y. (2014) Molecular Cloning and Characterization of a Pathogen-Induced WRKY Transcription Factor Gene from Late Blight Resistant Tomato Varieties *Solanum pimpinellifolium* L3708. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 87, 25–31. doi:<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.05.004>.
- Liu, B., Hong, Y.-B., Zhang, Y.-F., Li, X.-H., Huang, L., Zhang, H.-J., Li, D.-Y. & Song, F.-M. (2014) Tomato WRKY Transcriptional Factor SIDRW1 is Required for Disease Resistance Against *Botrytis cinerea* and Tolerance to Oxidative Stress. *Plant Science*. 227, 145–156. doi:10.1016/j.plantsci.2014.08.001.
- Mulyaningsih, E.S., Aswidinnoor, H., Sopandie, D., Ouwerkerk, P.B.F., Nugroho, S. & Loedin, I.H.S. (2010) Perbandingan Tiga Metode Transformasi *Agrobacterium* untuk Pencarian Gen-Gen Terkait Toleransi Kekeringan Menggunakan Transposon Ac/Ds pada Padi cv. Batutegi. *Jurnal Biologi Indonesia*. 6 (3), 367–381.
- Nasrun, Christanti, Arwiyanto, T. & Mariska, I. (2005) Pengendalian Penyakit Layu Bakteri Nilam menggunakan *Pseudomonad fluoresen*. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 11 (1), 19–24.
- Noveriza, R., Suastika, G., Hidayat, S.H. & Kartosuwondo, U. (2012) Potyvirus Associated with Mosaic Disease on Patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) Plants in Indonesia. *Journal of ISSAAS*. 18 (1), 131–146.
- Opabode, J.T. (2006) *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Plants: Emerging Factors that Influence Efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 1 (1), 12–20.
- Paul, A., Bakshi, S., Sahoo, D.P., Kalita, M.C. & Sahoo, L. (2012) *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. Using Leaf Explants: Bactericidal Effect of Leaf Extracts and Counteracting Strategies. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166 (8), 1871–1895. doi:10.1007/s12010-012-9612-0.
- Rai, G.K., Rai, N.P., Kumar, S., Yadav, A., Rathaur, S. & Singh, M. (2012) Effects of Explant Age, Germination Medium, Pre-Culture Parameters, Inoculation Medium, pH, Washing Medium, and Selection Regime on *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Tomato. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 48 (5), 565–578. doi:10.1007/s11627-012-9442-3.
- Ryu, H.-S., Han, M., Lee, S.-K., Cho, J.-I., Ryoo, N., Heu, S., Lee, Y.-H., Bhoo, S.H., Wang, G.-L. & Hahn, T.-R. (2006) A Comprehensive Expression Analysis of The WRKY Gene Superfamily in Rice Plants during Defense Response. *Plant Cell Reports*. 25 (8), 836–847.
- Setiawan & Sukamto (2016) Karakter Morfologis dan Fisiologis Tanaman Nilam di Bawah Naungan dan Tanpa Naungan. *Bul Littro*. 27 (2), 137–146. doi:<http://dx.doi.org/10.21082/bullittro.v27n2.2016.137-146>.
- Singh, M. & Rao, R.S.G. (2009) Influence of Sources and Doses of N and K on Herbage, Oil Yield and Nutrient Uptake of Patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] in Semi-Arid Tropics. *Industrial Crops and Products*. 29 (1), 229–234. doi:10.1016/j.indcrop.2008.05.005.
- Sukamto, Rahardjo, I. & Sulyo, Y. (2007) *Detection of Potyvirus on Patchouli Plant (Pogostemon cablin Benth.) from Indonesia*. In: *Proceeding International Seminar on Essential Oil*. Jakarta 7-9 November 2007, pp.72–77.
- Sukamto, Syakir, M. & Djazuli, M. (2014) *Pengendalian Penyakit Budok pada Tanaman Nilam dengan Agensi Hayati dan Pembenah Tanah*. In: Wahyudi, A. et al. (eds.) *Prosiding Seminar Nasional Pertanian Organik, Inovasi Teknologi Pertanian Organik*. Bogor 18-19 Juni 2014, IAARD Press, pp.321–328.

- Tripathi, P., Rabara, R.C. & Rushton, P.J. (2014) A Systems Biology Perspective on the Role of WRKY Transcription Factors in Drought Responses in Plants. *Planta*. 239 (2), 255–266. doi:10.1007/s00425-013-1985-y.
- Wahyuno, D. & Sukamto (2010) Ketahanan *Pogostemon cablin* dan *Pogostemon heyneanus* terhadap *Synchytrium pogostemonis*. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri*. 16 (3), 91–97.
- Wisser, R.J., Sun, Q., Hulbert, S.H., Kresovich, S. & Nelson, R.J. (2005) Identification and Characterization of Regions of the Rice Genome Associated with Broad-Spectrum, Quantitative Disease Resistance. *Genetics*. 169, 2277–2293. doi:10.1534/genetics.104.036327.