

# Ekspresi Transien *GUS* pada Tahap Awal Transformasi Genetik Tanaman Kopi melalui *Agrobacterium tumefaciens*

Siswanto<sup>1</sup>, Asmini Budiani<sup>1</sup>, Tetty Chaldamsari<sup>1</sup>, dan A. Darussamin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor

<sup>2</sup>Pusat Penelitian Karet, Sungai Putih, Medan

## ABSTRAK

Untuk mempelajari efektivitas transformasi pada tanaman kopi, telah dilakukan inokulasi pada potongan daun muda kopi dengan *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105-Kan yang mengandung gen  $\beta$ -glucuronidase (*GUS A*). Inokulasi dengan 100  $\mu$ l ( $1 \times 10^7$  sel/ml) atau 1.000  $\mu$ l ( $1 \times 10^8$  sel/ml) *Agrobacterium* dan penambahan 100  $\mu$ M acetosyringone dilakukan terhadap daun muda yang tanpa atau telah diprekultur selama empat hari dalam media MS yang dimodifikasi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekspresi *GUS* yang ditandai oleh terbentuknya warna biru dalam sel/jaringan mulai terdeteksi setelah 48-72 jam ko-kultivasi. Prekultur tidak meningkatkan efektivitas transformasi dan pencucian dengan karbenisilin atau moxalactam 500  $\mu$ g/ml selama tiga jam, cukup efektif untuk membunuh *Agrobacterium*. Efektivitas transformasi lebih tinggi pada klon B6 dibanding BP 358 dan konsentrasi *Agrobacterium* terbaik adalah 1.000  $\mu$ l ( $1 \times 10^8$  sel/ml). Induksi kalus pada jaringan yang tertransformasi memerlukan waktu lebih lama dan pertumbuhan kalus lebih lambat dibanding pada jaringan normal.

**Kata kunci:** *GUS*, transformasi, tanaman kopi, *Agrobacterium tumefaciens*.

## ABSTRACT

In order to study the effectiveness of *Agrobacterium* mediated DNA transformation into coffee, young leaf of coffee was inoculated with *A. tumefaciens* strain EHA 105-Kan carrying  $\beta$ -glucuronidase (*GUS A*) gene. Inoculation was conducted with 100  $\mu$ l ( $1 \times 10^7$  cells/ml) or 1,000  $\mu$ l ( $1 \times 10^8$  cells/ml) of *Agrobacterium* suspension in the presence of 100  $\mu$ M acetosyringone on either fresh explant or explant previously precultured on MS media for four days. The result showed that *GUS A* expression marked by the formation of blue spots in the cell or tissue was observed 48-72 hours after co-cultivation. Preculture did not enhance the effectiveness of the transformation. Washing during three hours with carbenicillin or moxalactam 500  $\mu$ g/ml could effectively eliminate *Agrobacterium* contamination. The effectiveness of the DNA transformation was higher on B6 clone compared to that on BP 358 clone. The optimum concentration of *Agrobacterium* was 1,000  $\mu$ l ( $1 \times 10^8$  cells/ml). Callus induction on transformed tissue took a longer time than that of untransformed tissue. Likewise the growth of transgenic callus was slower than that of control.

**Key words:** *GUS*, transformation, coffee, *Agrobacterium tumefaciens*

## PENDAHULUAN

Kopi merupakan salah satu komoditas utama hasil perkebunan. Luas areal tanaman kopi di Indonesia pada tahun 1995 yaitu 1.159.825 ha dengan produksi 455.384 ton (Direktorat Jenderal Perkebunan, 1995). Hasil ini menjadikan Indonesia sebagai negara produsen kopi terbesar ketiga dunia setelah Brazil dan Kolumbia. Kendala yang dihadapi dalam pemuliaan konvensional adalah diperlukannya waktu yang cukup lama yaitu 25-30 tahun. Kemajuan di bidang transformasi DNA telah memungkinkan diperolehnya tanaman dengan sifat-sifat agronomis yang diinginkan dalam waktu relatif singkat.

Beberapa teknik transformasi pada tanaman kopi telah dilaporkan dengan hasil bervariasi. Teknik elektroporasi pada protoplas mengalami kesulitan terutama dalam regenerasinya (Barton *et al.*, 1991). Ekspresi transien *GUS* untuk mengevaluasi efektivitas teknik *biolistic* menunjukkan bahwa eksplan berupa daun kopi dari *microcutting* adalah lebih baik dari pada eksplan daun asal rumah kaca (Boxtel *et al.*, 1995). Dengan diketahuinya metode induksi kalus dan regenerasi tanaman kopi akan mempermudah dilakukannya aplikasi transformasi DNA baik dengan *biolistic* maupun melalui *A. tumefaciens* (Sumaryono dan Tahardi, 1993). *Agrobacterium* merupakan bakteri tanah patogen yang menginfeksi jaringan tanaman melalui pelukaan sehingga menginduksi terbentuknya tumor pada daerah infeksi. Kemampuan transformasi pada sel-sel tumor oleh bakteri tersebut yang disertai oleh transfer potongan DNA yaitu T-DNA dari sel bakteri ke sel tanaman adalah yang mendasari semakin banyaknya rekayasa genetika menggunakan *Agrobacterium*. Gen bakteri *uid A* yang mengkode-glucuronidase (*GUS*) telah digunakan secara luas sebagai penanda untuk mempelajari ekspresi gen pada tanaman. Oleh karena spesivitas dari gen *GUS* tersebut maka ekspresi *GUS* dapat dideteksi secara kualitatif baik dengan teknik histokimia dengan substrat X-gluc (p-nitrophenylglucuronide) yang menghasilkan produk reaksi berwarna biru ataupun dengan substrat 4-MUG (4-methylumberliferyl- $\beta$ -glucuronide) yang menghasilkan reaksi fluoresensi dan dideteksi dengan lampu UV (Martin *et al.*, 1992). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas transformasi DNA melalui *A. tumefaciens* pada tanaman kopi dengan menguji ekspresi transien *GUS* segera setelah ko-kultivasi serta perkembangan kalus setelah transformasi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan Eksplan dan Kondisi Kultur Jaringan

Eksplan daun muda dua klon kopi Robusta yaitu B6 dan BP 358, atau eksplan daun tembakau sebagai kontrol dicuci dalam detergen 10 menit, kemudian dalam dithane 0,05% selama 20 menit dan 10 g/l kalsium hipoklorit selama 20 menit diikuti pencucian tiga kali dalam air steril, selanjutnya dipotong-potong ukuran 5x5 mm dan diprekulturkan selama satu minggu dalam kondisi gelap, 26-27°C, pada media MS

modifikasi yang mengandung garam-garam mineral dan vitamin dan pH 5,5-5,6 disesuaikan dengan penambahan HCl sebelum diautoklav 115°C, 20 menit (Lopez-Baez *et al.*, 1993). Setelah diprekulturkan eksplan diinokulasi dengan 0, 100 ( $1 \times 10^7$  sel/ml) atau 1.000  $\mu$ l ( $1 \times 10^8$  sel/ml) *Agrobacterium* selama 15 menit pada media induksi (MI) cair yang mengandung asetosiringon 100  $\mu$ g/ml pada shaker kecepatan 100 rpm dalam kondisi gelap, suhu 28°C. Kemudian dikokultivasikan pada MI padat selama empat hari pada kondisi gelap, suhu 28°C. Selanjutnya eksplan dicuci pada media MI mengandung karbenisilin atau moxalactam 500  $\mu$ g/ml selama 3 atau 24 jam sambil digoyang dengan *shaker* dalam keadaan gelap pada suhu 28°C. Sebelum dipindahkan ke medium berikutnya, eksplan dicuci 2x10 menit dengan medium pencuci yang sama. Kemudian dikulturkan pada medium MI yang mengandung karbenisilin atau moxalactam 250  $\mu$ g/ml selama 10 hari dengan kondisi 14 jam terang dan 10 jam gelap pada suhu 28°C.

Eksplan selanjutnya dipindahkan dalam medium seleksi (MI) yang mengandung kanamisin 25  $\mu$ g/ml dan karbenisilin atau moxalactam 250  $\mu$ g/ml. Setelah terbentuk kalus eksplan disubkulturkan pada media ekspresi yang mengandung kanamisin 50  $\mu$ g/ml selama 6-8 minggu dan disubkultur tiap tiga minggu pada kondisi gelap, 26-27°C.

### Strain Bakteri dan Vektor

Strain *Agrobacterium* yang digunakan adalah EHA 105-Kan/*GUS* yang membawa plasmid pGPTV-Kan/35 *GUS* yang merupakan pemberian dari Dr. D. Furtek, American Cocoa Res. Inst. Molec. Biol. Lab, Pennsylvania State University, USA. Gen *GUS* yang dikendalikan oleh CaMV 35 S promoter digunakan sebagai reporter gen dalam uji histokimia. Gen NPT II yang dikendalikan oleh Pnos promoter dalam T-DNA yang memiliki sifat ketahanan terhadap kanamisin digunakan sebagai penanda seleksi. *Agrobacterium* strain EHA 105 di"streak" pada petri berisi medium 523 padat (Rodriguez dan Tait, 1983) + 25 mg/l kanamisin, lalu diinkubasi dalam gelap, 28°C selama 48 jam. Dengan *loop* inokulasi yang steril, satu koloni *Agrobacterium* ditransfer dari petri ke dalam erlenmeyer yang berisi 10-15 ml medium 523 cair tanpa antibiotika. Erlenmeyer diinkubasi pada *shaker* 150-250 rpm, 28°C selama semalam ( $\pm$  16 jam). Keesokan harinya, 25 ml medium 523 segar ditambahkan ke dalam kultur 10-15 ml, lalu diinkubasi selama 3-4 jam lagi pada 28°C (atau OD 550 nm mencapai 0,8-1,0 yang berarti mengandung  $0,8-1 \times 10^9$  sel/ml). Kultur bakteri tersebut disentrifugasi pada 4.000-5.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan medium inokulasi hingga konsentrasi  $1 \times 10^9$  sel per ml.

### Uji Ekspresi Transien *GUS*

Ekspresi transien *GUS* diamati pada 0, 24, 48, 72, 96, 120 jam setelah ko-kultivasi. Ekspresi gen reporter *GUS* dideteksi dengan pengujian histokimia dengan substrat X-

Gluc (Herrera-Estrella *et al.*, 1988) yaitu 25 mM p-nitrophenylglucuronide yang dilarutkan dalam bufer 50 mM sodium fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0), mengandung 10 mM merkaptoethanol, 10 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  dan 0,1% Triton X-100. Pengujian secara histokimia adalah lebih cepat dan memberikan data visual berupa bercak atau spot berwarna biru dan dapat diamati di bawah mikroskop.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekspresi Transien *GUS* pada Tahap Awal Transformasi

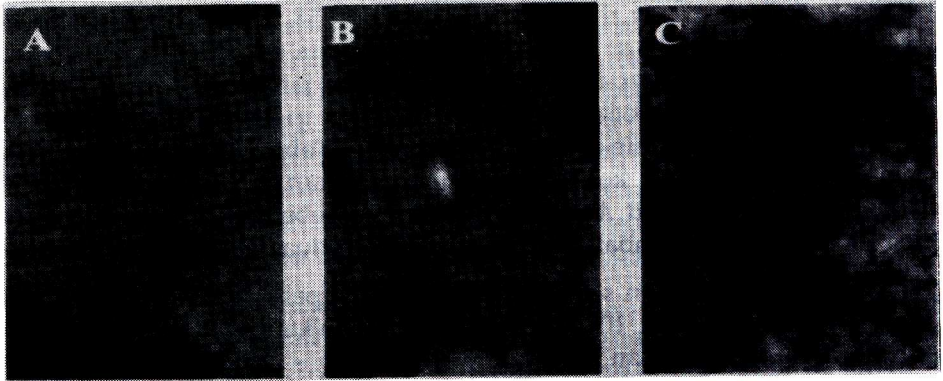
Uji ekspresi *GUS* pada jaringan transforman dilakukan secara histokimia setelah dikokultivasi selama 0, 24, 48, dan 72 jam. Hasil pengujian menunjukkan bahwa tidak terdapat ekspresi *GUS* pada eksplan kopi kontrol terbukti dari tidak adanya warna biru pada jaringan (Gambar 1A). Sedangkan eksplan kopi maupun tembakau yang ditransformasi dengan 1.000  $\mu\text{l}$  *Agrobacterium* ekspresi *GUS* mulai terdeteksi setelah 48 jam ko-kultivasi yang ditandai oleh terbentuknya warna biru dalam sel/ jaringan (Gambar 1B dan 1C). Hal ini membuktikan bahwa T-DNA sudah terintegrasi pada genom tanaman kopi yang dimulai dari bagian tepi daun yang dilukai. Untuk mengetahui apakah integrasi T-DNA tersebut secara stabil pada genom tanaman maka uji ekspresi *GUS* masih harus dilakukan pada tahapan regenerasi selanjutnya yaitu setelah terbentuk kalus maupun pada planlet transforman.

### Pengaruh Prekultur

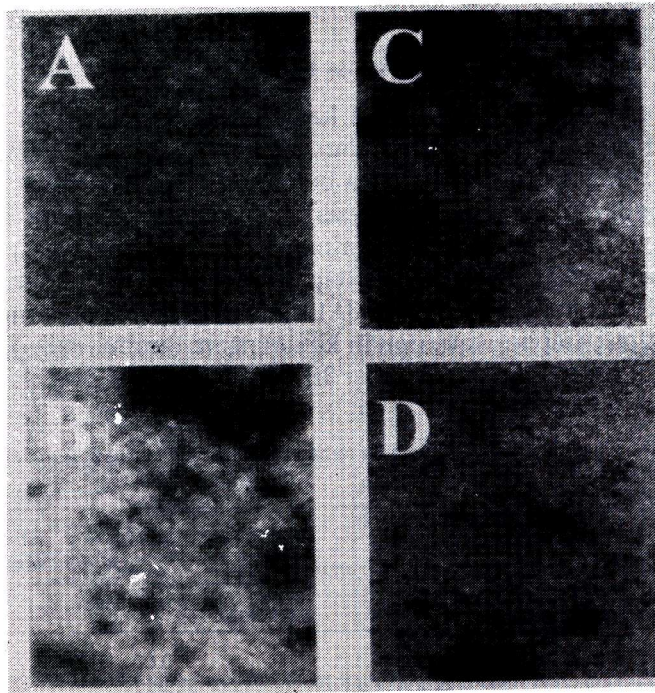
Prekultur diharapkan dapat menurunkan efek stres pelukaan serta adaptasi eksplan terhadap kondisi medium sehingga dapat meningkatkan efektivitas transformasi. Sebelum diinokulasi dan dikokultivasi dengan *Agrobacterium*, eksplan diprekultur selama satu minggu dalam kondisi gelap, 26-27°C, dalam media MS modifikasi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada tanaman kopi prekultur tidak meningkatkan efektivitas transformasi. Eksplan yang diprekulturkan cenderung menjadi menebal pada seluruh permukaan dan pada daerah pelukaan terjadi pencoklatan. Penebalan jaringan ini diduga menghambat masuknya T-DNA dalam genom tanaman. Sebaliknya pada tanaman apel efektivitas transformasi justru meningkat sehubungan dengan lamanya prekultur hingga 6-8 hari (De Bondt *et al.*, 1994).

### Pengaruh Konsentrasi *Agrobacterium* dan Klon

Eksplan daun kopi klon B6 yang dikokultivasi dengan 1000  $\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^8$  sel/ml) *Agrobacterium* menunjukkan ekspresi *GUS* dengan jumlah spot dan intensitas warna biru yang lebih tinggi dibanding konsentrasi 100  $\mu\text{l}$  ataupun klon BP 358 dengan konsentrasi 100  $\mu\text{l}$  dan 1.000  $\mu\text{l}$  (Gambar 2).



**Gambar 1.** Ekspresi *GUS* setelah 48 jam ko-kultivasi pada eksplan kopi kontrol (A), kopi transforman (B), dan tembakau transforman (C).



**Gambar 2.** Ekspresi *GUS* pada klon B6 konsentrasi 100 µl (A), 1.000 µl (B), klon BP 358 konsentrasi 100 µl (C), dan 1.000 µl *Agrobacterium* (D).

## Pengaruh Pencucian setelah Kokultivasi

Pada kedua klon yang diuji yaitu B6 dan BP 358, lamanya pencucian setelah kokultivasi yaitu 3 dan 24 jam tidak berpengaruh nyata terhadap tingkat kontaminasi eksplan oleh *Agrobacterium*. Pencucian selama tiga jam sudah cukup efektif untuk membunuh bakteri. Antibiotik karbenisilin maupun moxalactam pada konsentrasi 500 µg/ml mempunyai efektivitas yang sama (Tabel 1). Namun untuk lebih meyakinkan tidak adanya kontaminasi *Agrobacterium* lebih lanjut terutama pada perlakuan dengan 1.000 µl *Agrobacterium* maka sebelum dipindahkan ke media seleksi, eksplan dicuci kembali pada media pencuci dua kali selama 10 menit.

Moxalactam dilaporkan sebagai antibiotik yang paling efektif untuk membunuh *A. tumefaciens* strain EHA 101 dan tidak menimbulkan efek pada perkembangan kalus (Shackelford dan Chlan, 1996).

Ketersediaan dalam jumlah yang cukup sel *Agrobacterium* adalah diperlukan untuk membawa dan mentransfer T-DNA. Namun ketersediaan yang cukup tersebut perlu diantisipasi untuk menghindari pertumbuhan bakteri yang berlebihan pada eksplan. Oleh karena itu, diperlukan pengendalian secara hati-hati eksekusi suspensi bakteri dari eksplan yang diinokulasi sebelum dikultur.

## Pertumbuhan Kalus setelah Transformasi

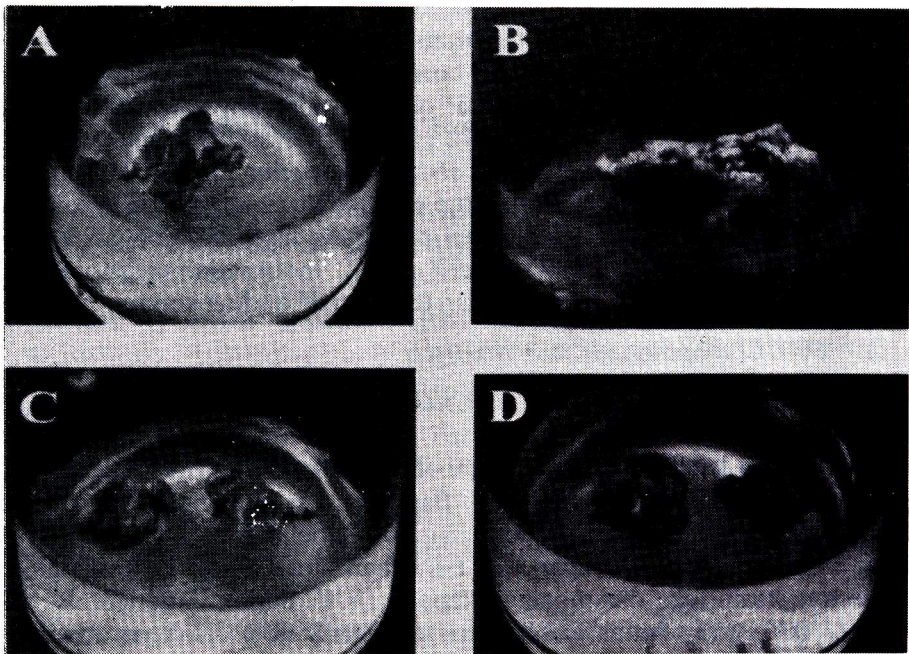
Pada eksplan klon BP 358 induksi kalus terjadi lebih lambat yaitu setelah dua minggu dalam MI (Lopez-Baez, 1993) dan setelah satu bulan ± 50% eksplan tumbuh kalus. Namun setelah lebih kurang dua bulan tumbuh akar. Kalus yang dipindah ke media ME (media untuk embriogenesis), sebagian cenderung berubah menjadi berwarna hijau dan mengarah ke embrioid. Sedangkan pada eksplan klon B6 yang tidak diinokulasi *Agrobacterium*, kalus dapat diinduksi dari daun muda setelah lebih kurang 10 hari dikulturkan (Gambar 3A). Setelah 2,5 bulan hampir 100% eksplan membentuk kalus yang berwarna putih kekuningan, tumbuh baik dan kompak yang merupakan embriogenik kalus (Gambar 3B).

Tabel 1. Pengaruh antibiotik dan lama pencucian terhadap tingkat kontaminasi *Agrobacterium* dalam medium induksi.

Antibiotik	Konsentrasi <i>Agrobacterium</i>	Jumlah eksplan terkontaminasi <i>Agrobacterium</i> (%)	
		3 jam pencucian	24 jam pencucian
Karbenisilin 500 µg/ml	100 µl	0,00	0,00
	1:000 µl	15,00	0,00
Moxalactam 500 µg/ml	100 µl	0,00	0,00
	1.000 µl	0,00	0,00

Pada jaringan yang ditransformasi dengan 100  $\mu\text{l}$  dan 1.000  $\mu\text{l}$  *Agrobacterium*, baik pada klon B6 maupun BP 358, inisiasi kalus berlangsung lebih lambat yaitu setelah empat minggu. Pengamatan hingga 10 minggu menunjukkan bahwa daun masih tetap berwarna hijau dan kalus tidak berkembang hanya terlihat benjolan-benjolan yang belum berkembang menjadi kalus. Dilihat dari perkembangannya maka tingkat stres lebih tinggi pada perlakuan 1.000  $\mu\text{l}$  (Gambar 3C) dibanding yang diinokulasi dengan 100  $\mu\text{l}$  *Agrobacterium* (Gambar 3D). Terhambatnya pertumbuhan kalus pada jaringan transforman dapat disebabkan oleh beberapa alasan antara lain oleh pengaruh stres pelukaan dan inokulasi bakteri, kanamisin yang digunakan untuk seleksi atau produksi hormon tumbuh yang tidak seimbang.

NPT II (Neomycin phosphotransferase) adalah agen seleksi yang umum digunakan, namun demikian substratnya, kanamisin sering dilaporkan menghambat regenerasi sel walaupun T-DNA yang terinsersi dalam genom tanaman juga mensintesis enzim tersebut. Selain itu sel transforman kemungkinan juga terhambat oleh kematian jaringan nontransforman di sekitarnya (Graham *et al.*, 1990).



**Gambar 3.** Perkembangan kalus eksplan daun kopi klon B6 dalam medium induksi. Eksplan yang tidak ditransformasi setelah 2 minggu (A) dan 10 minggu (B). Eksplan yang ditransformasi dengan 100  $\mu\text{l}$  (C) dan 1.000  $\mu\text{l}$  *Agrobacterium* setelah 10 minggu.

Untuk mengurangi efek penghambatannya maka selang waktu untuk pemindahan eksplan dari medium induksi ke medium seleksi yang mengandung kanamisin hendaknya diperlama menjadi lebih dari 10 hari, agar sel-sel dapat memulihkan kondisinya setelah infeksi dan mulai memproduksi sejumlah besar NPT II (Boulter *et al.*, 1990). Jaringan transforman yang terhambat perkembangan kalusnya mungkin juga disebabkan karena T-DNA yang terintegrasi secara stabil dalam genom tanaman mensintesis dalam jumlah yang banyak fitohormon seperti auksin, IAA, dan sitokinin sehingga menghambat proliferasi dan differensiasi sel (Herrera-Estrella dan Simpson, 1988). Stres baik oleh pelukaan maupun infeksi *Agrobacterium* dapat berakibat terjadinya akumulasi etilen yang dapat menghambat pertumbuhan dan regenerasi jaringan. Untuk mengurangi pengaruh etilen, penambahan silver thiosulfat dalam medium kultur terbukti dapat meningkatkan sangat nyata efektivitas transformasi maupun frekuensi regenerasi pada tanaman *Arabidopsis thaliana* (Clarke *et al.*, 1992).

## KESIMPULAN

Efektivitas transformasi pada tanaman kopi melalui *A. tumefaciens* dapat dideteksi secara dini setelah kokultivasi berdasarkan ekspresi gen  $\beta$ -glucuronidase (*GUS A*). Ekspresi *GUS* yang ditandai oleh terbentuknya warna biru dalam sel/jaringan mulai terdeteksi setelah 48-72 jam ko-kultivasi. Efektivitas transformasi tidak meningkat oleh perlakuan prekultur sedang pencucian dengan karbenisilin atau moxalactam 500  $\mu\text{g/ml}$  selama 3 jam, cukup efektif untuk membunuh *Agrobacterium*. Klon B6 menunjukkan respon lebih tinggi dibanding klon 358 dengan konsentrasi *Agrobacterium* terbaik adalah 1.000  $\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^8$  sel/ml). Induksi dan pertumbuhan kalus pada jaringan transforman lebih lambat dan tertekan dibanding kontrol.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Ir. Roy Heru Trisnamurti, MS, Direktur Puslitbang Kimia Terapan, LIPI, Bandung atas dukungan dan bantuannya dalam realisasi pendanaan proyek penelitian ini. Penelitian ini dibiayai oleh Proyek RUT kerja sama antara LIPI dengan Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. D. Furtek, American Cocoa Res. Inst. Molec. Biol. Lab, Pennsylvania State University, USA atas pemberian strain *Agrobacterium*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Barton, C., T. Adams, and M. Zarowitz. 1991. In 14<sup>eme</sup> Colloq. Sci Int Café, Asic, Paris: 460-464.
- Boulter, M.E., E. Croy, P. Simpson, R. Shields, R.R.D. Croy, and A.H. Shirsat. 1990. Transformation of *Brassica napus* L oil seed rape using *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*: A comparaison. Plant Science 70: 91-99.
- Boxtel, J.V., M. Berthouly, C. Carasco, M. Dufour, and A. Eskes. 1995. Transient expression of  $\beta$ -glucuronidase following biolistic delivery of foreign DNA into coffee tissues. Plant Cell Reports. 14: 748-752.
- Clarke, M.C., W. Wei, and K. Lindsey. 1992. High-frequency transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. Rep. 10(2): 178-189.
- De Bondt, A., K. Eggermont, P. Druart, M. De Vil, I. Goderis, J. Vanderleyden, and W.F. Broekaert. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting gene transferefficiency during transformation steps.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 1995. Statistik perkebunan Indonesia 1994-1996: Kopi. 81 hal.
- Graham, J., R.J. McNicol, and A. Kumar. 1990. Use of the *GUS*-gene as selectable marker for *Agrobacterium* mediated transformation of Rubus. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 20: 35-39.
- Herrera-Estrella, L. and J. Simpson. 1988. Foreign gene expression in plants. In C.H. Shaw (Ed.). Plant Molecular Biology, a practical approach. 131-158.
- Lopez-Baez, O., H. Bollon, A. Eskes, and V. Petiard. 1993. Embryogenese somatique de cacaoyer *Theobroma cacao* L. a partir de pieces florales. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life Sciences. 316: 579-584.
- Martin, T., R. Schmidt, T. Altman, and W.B. Frommer. 1992. Non destructive assay systems for detection of glucuronidase activity in higher plants. Plant Mol. Biol. Rep 10(1): 37-46.
- Rodriquez, R.L. and R.C. Tait. 1983. Recombinant DNA technique: an introduction. Benjamin/Cummings, Menlo Park.
- Shackelford, N.J. and C.A. Chlan. 1996. Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. Rep. 14(1): 50-57.
- Sumaryono dan J.S. Tahardi. 1993. Perbanyakkan klon kopi robusta toleran nematoda melalui embriogenesis somatik langsung. Menara Perkebunan, 61(3): 50-55.