

Evaluasi Transformasi Kacang Tanah dengan Bantuan *Agrobacterium* sebagai Model Sistem Ekspresi Transgen

Setyo Dwi Utomo¹, Thomas G. Isleib², dan Arthur K. Weissinger²

¹Fakultas Pertanian Universitas Lampung,

²Dept. Crop Science, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA

ABSTRAK

Sebelum dilakukan usaha skala besar dalam transformasi genetik spesies rekalsitran misalnya kacang tanah, informasi dini tentang ekspresi konstruksi genetik pada spesies yang akan ditransformasi akan sangat berguna. Ekspresi konstruksi genetik pada kalus kacang tanah mungkin dapat menduga tingkah laku yang sebenarnya suatu konstruksi genetik secara lebih teliti daripada jika diduga berdasar ekspresi pada sistem heterolog. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi penggunaan transformasi daun tua kacang tanah dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai model sistem ekspresi transgen. Tujuh puluh dua sub-subklon kalus dievaluasi berdasar tingkat ekspresi *GUS* menggunakan fluorometric assay. Tujuh puluh dua sub-subklon tersebut diturunkan dari dua sumber eksplan kultivar NC 7, dua transforman independen *Agrobacterium* per eksplan, tiga cawan kultur per transforman *Agrobacterium*, dua klon per cawan kultur, dan tiga sub-subklon per klon. Rata-rata 58 klon kalus transgenik dihasilkan tiap 100 potongan daun yang dikulturkan. Tiap klon berbobot 50-100 mg pada tujuh minggu setelah eksplan dikulturkan. Dalam dua minggu, bobot kalus bertambah 4-6 kali lipat. Rata-rata aktivitas *GUS* adalah 0,1071 dan berkisar dari 0,0145 sampai 0,3243 nmol/menit/ μ g protein. Secara keseluruhan, ekspresi *GUS* konsisten, tidak dipengaruhi oleh sumber eksplan, transforman *Agrobacterium*, cawan kultur, dan klon kalus. Disimpulkan bahwa sistem ekspresi ini cukup efisien untuk menunjukkan suatu konstruksi genetik diekspresi secara semestinya.

Kata kunci: *Arachis hypogaea* L., ekspresi gen, transformasi genetik, *A. tumefaciens*.

ABSTRACT

Prior to a wide scale of genetic transformation of recalcitrant species, such as peanut, the information on the expression of the species genetic construction is very important. The expression of a genetic construction on the peanut callus may estimate the real characteristics more accurately compared to the estimation based on the expression of heterologous system. The objective of the research was to evaluate the utilization of the transformation of peanut old leaves with *Agrobacterium tumefaciens* as the model of transgene expression system. Seventy-two sub-sub clone calluses were evaluated based on *GUS* expression level using fluorometric assay. The seventy-two sub-sub clone calluses derived from 2 explant sources of cultivar NC7, 2 *Agrobacterium* independence transforman per explant, 3 petridishes of culture per *Agrobacterium* transforman, 2 clones per culture petridish, and 3 sub-sub clones per clone. In average, 58 clones of transgenic calluses were obtained from every 100 pieces of leaves which were cultured. Each clone weighed 50-100 mg on 7 weeks after the explants were culture. In 2 weeks, the callus weight increased 4-6 times. The average *GUS* activity was 0.1071, and it ranged from 0.0145 to 0.3243 nmol/minute/ μ g protein. In general, the *GUS* expression was consistent, it was not influenced by the explant source, *Agrobacterium* transforman,

culture petridish, and callus clone. It was concluded that this expression system was efficient in showing the genetic construction.

Key words: *Arachis hypogaea* L., gene expression, genetic transformation, *A. tumefaciens*.

PENDAHULUAN

Beberapa prosedur transformasi genetik kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.) telah dipublikasikan (Clemente *et al.*, 1992; Ozias-Akins *et al.*, 1993; Eapen and George, 1994; Brar *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Livingstone and Birch, 1995; McKently *et al.*, 1995) yang menunjukkan bahwa transformasi adalah pendekatan yang layak untuk mengintroduksi gen-gen berguna ke dalam genom kacang tanah. Jika dibandingkan dengan prosedur transformasi tanaman model (a.l., tembakau), sebagian besar prosedur transformasi kacang tanah memerlukan lebih banyak waktu dan tenaga. Dengan demikian, akan sangat bermanfaat jika peneliti yakin bahwa gen yang akan disisipkan ke dalam genom kacang tanah diekspresikan secara semestinya sebelum transformasi dalam skala besar dilakukan.

Untuk spesies tanaman yang rekalsitran, ekspresi konstruksi gen sering diuji dulu dalam sistem heterolog a.l., tembakau dan sel telur *Xenopus laevis* (Larkins *et al.*, 1979; Heikkila, 1993; Theodoulou and Miller, 1995). Meskipun demikian, karena perbedaan kelas taksonomi, informasi yang diperoleh dari sistem model tersebut mungkin tidak dapat menduga secara memuaskan tingkah laku konstruksi genetik dalam spesies sasaran. Sebagai contoh, promotor gen-gen biosintesis auksin dari *A. tumefaciens* aktif pada tembakau tetapi tidak pada barlei dalam asay ekspresi transien (Gaudin *et al.*, 1994). Sebelum konstruksi gen digunakan dalam transformasi skala besar, sangat diinginkan untuk menguji ekspresi konstruksi gen dalam spesies yang sama dengan spesies yang akhirnya akan ditransformasi dalam skala besar. Jika aparatus untuk memproses hasil translasi pada kalus terdapat seperti dalam tanaman, maka pemrosesan hasil produk gen dapat diuji *in vitro*. Dalam kasus konstruksi gen yang direkayasa untuk ketahanan terhadap jasad pengganggu, produk gen dapat diekstraksi dan uji efikasi terhadap jasad pengganggu dapat dilakukan sebelum dilakukan transformasi dalam skala besar.

Suatu sistem ekspresi yang baik seharusnya cepat, dapat diulang, dan meminimumkan keragaman ekspresi antartransforman. Jika ekspresi gen konsisten pada berbagai lingkungan dan perlakuan, maka skala pengujian dapat diminimumkan tanpa mengorbankan ketepatan. Luo *et al.* (1994) membuat prosedur yang sederhana untuk mengevaluasi ekspresi gen dalam kalus kedelai transgenik menggunakan protokol berdasar transformasi menggunakan *Agrobacterium* dan gen penyandi β -glucuronidase (*GUS*). Sistemnya menghasilkan kalus yang cukup (sekitar 500 mg) untuk analisis ekspresi *GUS* dalam empat minggu. Mereka mendapatkan 81% eksplan menghasilkan kalus transgenik dan 50% kalus transgenik mengekspresikan *GUS*. Hasil yang diperoleh Dr. L. A. Urban (kom. pers.) menunjukkan bahwa protokol

transformasi menggunakan *Agrobacterium* dapat digunakan untuk menghasilkan secara cepat kalus kacang tanah transgenik.

Tujuan percobaan ini adalah untuk mengevaluasi transformasi kacang tanah dengan bantuan *Agrobacterium* sebagai model sistem ekspresi transgen. Peubah yang diamati adalah kisaran dan konsistensi ekspresi gen *GUS* pada berbagai sumber eksplan, transforman independen *A. tumefaciens*, cawan kultur, klon kalus, dan kalus sub-subklon kalus.

BAHAN DAN METODE

Konstruksi Gen *GUS* dan Penyiapan Transforman Independen *A. tumefaciens*

Plasmid pBI121 (Jefferson *et al.*, 1987) yang membawa kaset *GUS* dan NPTII diperoleh dari Clontech (cat. no. 6018-1). Kaset *GUS* terdiri dari promoter CaMV35S (800 bp) yang disambung dengan urutan penyandi (1870 bp) gen *uidA* dari *Escherichia coli*, dan signal poliadenilasi (260 bp) gen nopalinsintase (*NOS*) dari Ti plasmid *A. tumefaciens*. Kaset NPTII terdiri dari urutan penyandi neomycin phosphotransferase (NPTII) yang diapit oleh promoter *NOS* dan signal poliadenilasi. Konstruksi ini mengekspresikan *GUS* dalam taraf tinggi jika ditransformasikan ke dalam sel tembakau menggunakan bantuan *Agrobacterium*. Plasmid tersebut ditransformasikan ke dalam *A. tumefaciens* strain EHA105 (diperoleh dari Dr. Stanton Gelvin, Purdue Univ., West Lafayette, IN, USA) menggunakan metode beku-cair (Holsters *et al.*, 1978). Koloni *A. tumefaciens* yang membawa pBI121 diidentifikasi berdasar ketahanan terhadap 10 mg L⁻¹ rifampisin dan 50 mg L⁻¹ kanamisin. Empat koloni transforman independen (berasal dari cawan petri yang berbeda) dipilih secara acak dan digunakan untuk transformasi yang akan diuraikan dalam percobaan ini.

Penyiapan Eksplan, Infeksi *A. tumefaciens*, dan Pemeliharaan Kalus

Protokol untuk penyiapan eksplan dan infeksi *A. tumefaciens* adalah modifikasi dari protokol yang dibuat oleh Dr. L. A. Urban (Crop Science Dept., NCSU, Raleigh, NC 27695, USA). Sumber eksplan adalah tanaman dari benih dasar 1993 dan benih penjenis 1994 kultivar NC 7, tipe virginia berbiji besar (*A. hypogaea* subsp. *hypogaea* var. *hypogaea*) yang dilepas tahun 1978 (Wynne *et al.*, 1979). Daun termuda yang sudah membuka penuh dipanen dari tanaman berumur 4-5 minggu. Lembar daun disterilisasi permukaan dalam dengan menggunakan 70% etanol selama satu menit, diikuti dengan perlakuan 0,53% sodium hipoklorit selama lima menit, kemudian dibilas dua kali menggunakan air suling steril. Pinggir daun dipotong sehingga dihasilkan potongan persegi panjang 1 cm². Potongan persegi panjang segera direndam se-

lama lima menit dalam suspensi yang terdiri dari satu bagian kultur *A. tumefaciens* ($OD_{600} = 0,6-0,8$) dan 19 bagian medium 1 x MS garam-garam MS (Murashige and Skoog, 1962), sukrosa, dan vitamin B5 (Gamborg *et al.*, 1968). Eksplan di blot pada kertas merang steril, dan kemudian ditempatkan pada cawan petri 60x15 mm berisi berturut-turut lapisan medium padat 15 ml, kalus tembakau kultivar Burley 21, dan kertas saring steril (Fisher cat. no. 09-795A). Medium padat berisi garam MS yang dilengkapi 4 mg L⁻¹ 6-benzyl aminopurin (BAP) dan 2 mg L⁻¹ α -naphthaleneacetic acid (NAA), dan dipadatkan dengan agar 0,8%. Dua ratus potongan daun yang dipanen dari benih dasar 1993 dan 225 potongan daun dari benih penjenis dikulturkan. Cawan kultur diinkubasi pada suhu kamar dengan intensitas cahaya rendah selama lima hari. Eksplan kemudian dipindahkan ke medium segar yang mengandung 4 mg L⁻¹ BAP, 2 mg L⁻¹ NAA, 100 mg L⁻¹ kanamisin, dan 500 mg L⁻¹ karbenisilin, dan diinkubasi pada 28°C dengan penyinaran 16/8 jam terang/gelap. Subkultur dilakukan tiap dua minggu. Eksplan tanpa infeksi *Agrobacterium* (infeksi ditandai oleh produksi kalus berwarna hijau atau hijau pucat) dibuang paling awal setelah empat minggu dalam seleksi kanamisin. Kalus tahan kanamisin yang tumbuh dari tempat terpisah pada eksplan disebut klon (Donnelly and Vidaver, 1988) dan dipertimbangkan sebagai kejadian transformasi tunggal. Uji histokimia *GUS* dilakukan enam minggu setelah eksplan dalam seleksi untuk mendapatkan data kualitatif tentang ekspresi *GUS*. Pada saat delapan minggu, 100 klon dibagi menjadi subklon dengan cara memindahkan ke medium segar dan membagi menjadi bagian kecil (klum) (diameter 3-5 mm dan berat 20-35 mg, 8-12 klum per cawan). Pada saat 10 minggu dalam seleksi kanamisin, tiga subklon (SK₁) yang tumbuh cepat dipilih dan dipindahkan ke medium segar; dan pada saat bersamaan setiap SK₁ dibagi menjadi sub-subklon. SK₂ diperoleh dari 24 SK₁ yang mewakili 24 klon. Dua puluh empat klon ini terdiri dari 12 pasang, tiap pasang berasal dari kultur yang dipelihara dalam cawan petri yang sama selama delapan minggu dalam seleksi kanamisin. Tiap tiga cawan petri (terdiri dari 6 klon) diinfeksi oleh salah satu dari empat transforman independen *A. tumefaciens*. Klon dalam enam cawan petri (diinfeksi dengan dua dari empat transforman independen *A. tumefaciens*) berasal dari eksplan dari benih dasar 1993 atau benih penjenis. Tiga dari satu SK₁ ditumbuhkan dalam satu cawan petri. Cawan petri diatur dalam ruang tumbuh berdasar pengacakan rancangan split-split-split plot, sumber eksplan sebagai plot utama, transforman independen *A. tumefaciens* sebagai sub-plot, cawan kultur sebagai sub-subplot, klon sebagai sub-sub-subplot, and SK₂ sebagai sub-sub-sub-subplot. Percobaan terdiri dari dua ulangan.

Uji Histokimia dan Reaksi Polimerisasi Berantai (PCR) terhadap *GUS*

Larutan substrat terdiri dari 0,001 M of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-GLUC) dan 0,1% (v/v) Triton X-100 (Jefferson, 1987; Jefferson *et al.*, 1987). Kalus sebanyak 40-60 mg dari 100 klon yang tahan kanamisin direndam dalam 400 μ l larutan substrat dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Primer yang digunakan untuk reaksi PCR terletak dalam promotor 35S (5'-ATGACGCACAATCCCACTAT-3')

dan dalam daerah penyandi gen *GUS* (5'-GCCAGTTCAGTTCGTTGTTC-3'). Panjang hasil penggandaan yang diharapkan adalah 512 bp.

Uji Fluorometri *GUS*

Pada saat 14 minggu dalam seleksi kanamisin, 50-60% kalus dari masing-masing 72 SK₂ dipanen untuk uji fluorometri *GUS* ulangan pertama (Jefferson, 1987; Jefferson *et al.*, 1987), dan 40-50% kalus dipindahkan ke medium segar. Pada saat 16 minggu dalam seleksi kanamisin, kalus dipanen untuk uji fluorometri ulangan kedua. Kalus yang dipanen disimpan dalam freezer -80°C. Contoh kalus 250-500 mg yang diambil dari freezer -80°C secepatnya direndam dalam larutan penyangga ekstraksi *GUS* dan digiling dengan kecepatan sedang selama dua menit. Contoh kalus kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Ekstrak diendapkan dengan penambahan polyvinylpyrrolidone tidak larut dan disentrifugasi. Konsentrasi protein ditentukan menggunakan metode Bradford (1976) dengan kit dibeli dari Bio-Rad Laboratories (cat. no. 500-0001). Konsentrasi protein kemudian disesuaikan sehingga semua contoh diuji pada konsentrasi yang sama. Aktivitas spesifik *GUS* dikuantifikasi berdasar fluoresen dari 4-methyl umbelliferone (4-Mu) yang dihasilkan dari hidrolisis of 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide (MUG) yang dikatalisatori oleh *GUS*. Reaksi hidrolisis dilakukan pada suhu 37°C selama 60 menit, dua reaksi per contoh. Fluoresen 4-Mu dikuantifikasi menggunakan fluorometer Hoefer model TKO 100 dan distandarisasi berdasar fluoresen larutan 4-Mu yang sudah diketahui konsentrasinya. Aktivitas spesifik *GUS* diekspresikan dalam nmol 4-Mu yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis selama satu menit jika terdapat 1 μ g protein terlarut. Protein terlarut mencakup *GUS*. Pembacaan fluoresen untuk tiap reaksi dilakukan dua kali menggunakan dua fluorometer. Analisis ragam dilakukan terhadap aktivitas spesifik *GUS* (SAS Institute Inc., 1990).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Infeksi *Agrobacterium* biasanya terjadi di daerah sekitar jaringan pembuluh utama pada lembar daun. Infeksi pada suatu bagian yang terpisah pada eksplan menghasilkan satu klon kalus. Dua puluh delapan persen dari jumlah potongan daun yang dikulturkan menghasilkan ≥ 1 klon transgenik yang terdistribusi pada lebih dari 59% dari cawan petri (Tabel 1). Rata-rata 58 klon transgenik dihasilkan per 100 potongan daun yang dikulturkan. Pada saat enam minggu dalam seleksi kanamisin, berat setiap klon 50-100 mg. Dua minggu berikutnya, berat kalus meningkat 4-6 lipat.

Tabel 1. Frekuensi klon kalus transgenik.

Sumber eksplan	Transforman independen <i>A. tumefaciens</i>	Jumlah cawan kultur	Jumlah potongan daun yang dikulturkan	Cawan kultur yang memiliki ≥ 1	Potongan daun yang menghasilkan ≥ 1 Klon kalus transgenik	Klon transgenik independen	Jumlah klon transgenik per potongan daun (%)
Benih dasar 1993	A	16	80	5	10	22	27,5
Benih dasar 1993	B	24	120	11	40	89	74,2
Benih penjenis 1994	C	20	100	0	27	52	52,0
Benih Penjenis 1994	D	25	125	24	42	82	65,6
Total		85	425	40	119	245	

Proporsi cawan petri yang menghasilkan ≥ 1 kalus klon tiap potongan daun $40/85 = 59\%$.

Proporsi potongan daun yang menghasilkan ≥ 1 kalus klon transgenik adalah $119/425 = 28\%$.

Rata-rata produksi klon independen tiap potongan daun adalah $245/425=58\%$.

Berdasar uji histokimia *GUS*, 93 dari 100 klon kalus yang tahan menunjukkan warna biru dengan intensitas warna beragam, sedangkan kalus nontransgenik tidak menunjukkan warna biru. Berdasar data PCR 19 SK₂ yang dipilih secara acak, 16 dari 19 SK₂ menunjukkan pita 512 bp yang menunjukkan adanya penyisipan gen *GUS*. Berdasar uji fluorometri, semua SK₂ yang tahan kanamisin menunjukkan aktivitas *GUS* yang lebih tinggi daripada klon nontransgenik (Tabel 3). Di antara klon-klon yang diuji, ketahanan kanamisin merupakan penduga yang baik untuk ekspresi *GUS*.

Berdasar uji F dalam analisis ragam terhadap peubah aktivitas spesifik *GUS* (Tabel 2), pengaruh SK₂ terhadap aktivitas spesifik *GUS* dalam suatu klon adalah nyata ($P \leq 0,05$). Perbedaan antarnilai tengah SK₂ dalam suatu klon nyata ($P \leq 0,05$) pada 13 dari 24 klon yang diuji (Tabel 3). Hasil ini menunjukkan bahwa pembagian klon menjadi sub-subklon tidak menghasilkan subklon transgenik yang betul-betul homogen. Sebaliknya, pengaruh sumber eksplan, transforman independen *A. tumefaciens*, cawan kultur, dan klon terhadap ekspresi *GUS* secara statistik tidak nyata (Tabel 2), yang menunjukkan bahwa ekspresi *GUS* pada umumnya konsisten pada keempat perlakuan. Berdasar hasil ini, uji ekspresi transgen dapat dilakukan menggunakan sumber eksplan, transforman independen *A. tumefaciens*, cawan kultur, dan klon dalam jumlah yang lebih kecil tanpa mengorbankan ketepatan. Meskipun demikian, sub-subklon sebaiknya tidak digunakan untuk mewakili subklon atau klon. Satu klon sebaiknya dipelihara dengan cara menggabung contoh-contoh yang mewakili dari subklon. Nilai tengah dan kisaran ekspresi *GUS* berturut-turut $0,1071 \text{ nmol menit}^{-1} (\mu\text{g protein})^{-1}$ dan dari $0,0145$ sampai $0,3243 \text{ nmol menit}^{-1} (\mu\text{g protein})^{-1}$.

Tabel 2. Analisis ragam aktivitas spesifik *GUS*.

Sumber	Derajat bebas	Kuadrat tengah
Blok	1	0,1992**
Sumber eksplan	1	0,1210
Galat a ¹	3	0,0773
Transforman independen <i>A. tumefaciens</i> (sumber eksplan)	2	0,0796
Galat b ²	7	0,0517
Cawan kultur (transforman independen <i>A. tumefaciens</i> , sumber eksplan)	8	0,0505
Galat c ³	11	0,0256
Klon (cawan kultur, transforman independen <i>A. tumefaciens</i> , sumber eksplan)	12	0,0255
Galat d ⁴	24	0,0136
Sub-subklon (klon, cawan kultur, transforman independen <i>A. tumefaciens</i> , sumber eksplan)	47	0,0109**
Blok x sumber eksplan	1	0,0047
Blok x transforman independen <i>A. tumefaciens</i> (sumber eksplan)	2	0,0070
Blok x cawan kultur (transforman independen <i>A. tumefaciens</i> , sumber eksplan)	8	0,0059
Blok x klon (cawan kultur, transforman independen <i>A. tumefaciens</i> , sumber eksplan)	12	0,0057
Galat sisa	47	0,0030

Koefisien keragaman = 17%

** Nyata pada taraf $\alpha=1\%$

- Galat a¹ = (transforman independen *A. tumefaciens* (sumber eksplan) + blok x sumber eksplan - blok x transforman independen *A. tumefaciens* (sumber eksplan).
- Galat b² = (Cawan kultur (transforman independen *A. tumefaciens*, sumber eksplan) + blok x transforman independen *A. tumefaciens* (sumber eksplan) - blok x cawan kultur (transforman independen *A. tumefaciens*, sumber eksplan).
- Galat c³ = (Klon (cawan kultur, transforman independen *A. tumefaciens*, sumber eksplan) + blok x cawan kultur (transforman independen *A. tumefaciens*, sumber eksplan) - blok x klon (cawan kultur, *A. tumefaciens* transforman independen, sumber eksplan).
- Galat d⁴ = (Sub-subklon (klon, cawan kultur, *A. tumefaciens* independen transforman, sumber eksplan) + blok x klon (cawan kultur, *A. tumefaciens* transforman independen, sumber eksplan) - residual galat).

Tabel 3. Aktivitas spesifik *GUS* pada sub-subklon dalam suatu klon.

Entri	Sumber eksplan	Transforman independen <i>A. tumefaciens</i>	Cawan kultur No.	Subklon	Sub-subklon No.	Aktivitas spesifik <i>GUS</i> ¹
						nmol 4-Mu menit ⁻¹ (μ g protein)-1
1.	benih dasar 1993	1	1	G6-2	1	0,1565 ^a
2.	benih dasar 1993	1	1	G6-2	2	0,1529 ^a
3.	benih dasar 1993	1	1	G6-2	3	0,2043 ^a
4.	benih dasar 1993	1	1	G6-4	1	0,1385 ^a
5.	benih dasar 1993	1	1	G6-4	2	0,1177 ^a
6.	benih dasar 1993	1	1	G6-4	3	0,1159 ^a
7.	benih dasar 1993	1	2	G9-2	1	0,3243 ^a
8.	benih dasar 1993	1	2	G9-2	2	0,1877 ^b
9.	benih dasar 1993	1	2	G9-2	3	0,1887 ^b
10.	benih dasar 1993	1	2	G9-3	1	0,1860 ^a
11.	benih dasar 1993	1	2	G9-3	2	0,0890 ^b
12.	benih dasar 1993	1	2	G9-3	3	0,1505 ^{ab}
13.	benih dasar 1993	1	3	G10-1	1	0,1490 ^a
14.	benih dasar 1993	1	3	G10-1	2	0,1460 ^a
15.	benih dasar 1993	1	3	G10-1	3	0,0402 ^b
16.	benih dasar 1993	1	3	G10-3	1	0,1839 ^a
17.	benih dasar 1993	1	3	G10-3	2	0,0910 ^b
18.	benih dasar 1993	1	3	G10-3	3	0,1766 ^a
19.	benih dasar 1993	2	1	H12-1	1	0,1337 ^a
20.	benih dasar 1993	2	1	H12-1	2	0,1141 ^a
21.	benih dasar 1993	2	1	H12-1	3	0,0672 ^a
22.	benih dasar 1993	2	1	H12-2	1	0,0193 ^a
23.	benih dasar 1993	2	1	H12-2	2	0,0145 ^a
24.	benih dasar 1993	2	1	H12-2	3	0,0483 ^a
25.	benih dasar 1993	2	2	H19-2	1	0,0249 ^b
26.	benih dasar 1993	2	2	H19-2	2	0,1156 ^a
27.	benih dasar 1993	2	2	H19-2	3	0,0740 ^{ab}
28.	benih dasar 1993	2	2	H19-3	1	0,1599 ^a
29.	benih dasar 1993	2	2	H19-3	2	0,1963 ^a
30.	benih dasar 1993	2	2	H19-3	3	0,0679 ^b
31.	benih dasar 1993	2	3	H27-1	1	0,1927 ^a
32.	benih dasar 1993	2	3	H27-1	2	0,1025 ^b
33.	benih dasar 1993	2	3	H27-1	3	0,0677 ^b
34.	benih dasar 1993	2	3	H27-2	1	0,1162 ^a
35.	benih dasar 1993	2	3	H27-2	2	0,0380 ^b
36.	benih dasar 1993	2	3	H27-2	3	0,1214 ^a
37.	benih penjenis 1994	3	1	J9-1	1	0,0358 ^b
38.	benih penjenis 1994	3	1	J9-1	2	0,1261 ^a
39.	benih penjenis 1994	3	1	J9-1	3	0,0770 ^{ab}
40.	benih penjenis 1994	3	1	J9-2	1	0,0768 ^a

Tabel 3. (lanjutan).

Entri	Sumber eksplan	Transforman independen <i>A. tumefaciens</i>	Cawan kultur No.	Subklon	Sub-subklon No.	Aktivitas spesifik <i>GUS</i> ¹ nmol 4-Mu menit ⁻¹ (μ g protein) ⁻¹
41.	benih penjenis 1994	3	1	J9-2	2	0,0112 ^b
42.	benih penjenis 1994	3	1	J9-2	3	0,0359 ^{ab}
43.	benih penjenis 1994	3	2	J15-2	1	0,0604 ^a
44.	benih penjenis 1994	3	2	J15-2	2	0,0236 ^a
45.	benih penjenis 1994	3	2	J15-2	3	
46.	benih penjenis 1994	3	2	J15-3	1	0,0700 ^a
47.	benih penjenis 1994	3	2	J15-3	2	0,0328 ^a
48.	benih penjenis 1994	3	2	J15-3	3	0,0334 ^a
49.	benih penjenis 1994	3	3	J17-1	1	0,2051 ^a
50.	benih penjenis 1994	3	3	J17-1	2	0,1101 ^a
51.	benih penjenis 1994	3	3	J17-1	3	0,1395 ^a
52.	benih penjenis 1994	3	3	J17-2	1	0,1657 ^a
53.	benih penjenis 1994	3	3	J17-2	2	0,1538 ^a
54.	benih penjenis 1994	3	3	J17-2	3	0,1511 ^a
55.	benih penjenis 1994	4	1	K7-1	1	0,1034 ^{ab}
56.	benih penjenis 1994	4	1	K7-1	2	0,0428 ^b
57.	benih penjenis 1994	4	1	K7-1	3	0,1476 ^a
58.	benih penjenis 1994	4	1	K7-2	1	0,1237 ^b
59.	benih penjenis 1994	4	1	K7-2	2	0,2331 ^a
60.	benih penjenis 1994	4	1	K7-2	3	0,0630 ^c
61.	benih penjenis 1994	4	2	K6-1	1	0,1136 ^a
62.	benih penjenis 1994	4	2	K6-1	2	0,0885 ^a
63.	benih penjenis 1994	4	2	K6-1	3	0,0627 ^a
64.	benih penjenis 1994	4	2	K6-2	1	0,0095 ^a
65.	benih penjenis 1994	4	2	K6-2	2	0,0290 ^a
66.	benih penjenis 1994	4	2	K6-2	3	0,0145 ^a
67.	benih penjenis 1994	4	3	K23-1	1	0,0514 ^b
68.	benih penjenis 1994	4	3	K23-1	2	0,0881 ^b
69.	benih penjenis 1994	4	3	K23-1	3	0,2277 ^a
70.	benih penjenis 1994	4	3	K23-2	1	0,0610 ^a
71.	benih penjenis 1994	4	3	K23-2	2	0,1009 ^a
72.	benih penjenis 1994	4	3	K23-2	3	0,0534 ^a
73.	benih penjenis 1994	4	3	K23-2	3	0,0534 ^a

Keterangan : ¹Nilai yang diikuti huruf yang sama dalam satu kolom tidak berbeda nyata berdasar uji LSD pada taraf $\alpha = 5\%$.

KESIMPULAN

Sistem transformasi yang telah diuraikan dapat direproduksi dan cukup efisien untuk mendemonstrasikan bahwa konstruksi genetik berfungsi secara semestinya dalam jaringan tanaman kacang tanah. Ekspresi gen pada umumnya konsisten pada kalus dari eksplan yang berasal dari dua plot benih, diinfeksi dengan empat transforman independen *A. tumefaciens*, dan diinkubasi pada cawan petri yang berbeda. Ekspresi *GUS* berkisar dari 0,0145 sampai 0,3243 nmol menit⁻¹ (μg protein)⁻¹

DAFTAR PUSTAKA

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive methods for the quantification of microgram amounts of protein using the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brar, G.S., B.S. Cohen, C.L. Vick, and G.W. Johnson. 1994. Recovery of trans-genic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from elite cultivars utilizing ACCELL® technology. *Plant J.* 5: 745-753.
- Cheng, M., D.C.H. Hsi, and G.C. Phillips. 1994. Recovery of primary transformants of valencia-type peanut using *Agrobacterium tumefaciens*. *Peanut Sci.* 21: 84-88.
- Clemente, T.E., D. Robertson, T G. Isleib, M.K. Beute, and A.K. Weissinger. 1992. Evaluation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) leaflets from immature zygotic embryos as recipient tissue for biolistic gene transfer. *Transgenic. Res.* 1: 275-284.
- Donnelly, D.J. and W.E. Vidaver, 1988. Glossary of Plant Tissue Culture. Dioscorides Press, Portland, OR. 141 pp.
- Eapen, S. and L. George. 1994. *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Cell Rep.* 13: 582-586.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures and soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50: 151-158.
- Gaudin, V., S. Lutticke, and L. Jouanin. 1994. A reporter gene under the control of *tms* or *aux* promoters is differentially expressed in tobacco and barley protoplasts. *Plant Cell Rep.* 13: 155-158.
- Heikkila, J.J. 1993. Use of *Xenopus* oocytes to monitor plant gene expression, pp. 167-178. In B.R. Click and J.E. Thomson (Eds.). *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Holsters, M., D. de Waele, A. Depicker, E. Messens, M. van Montagu, and J. Schell, 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molec. Gen. Genet.* 163: 181-178.

- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan. 1987.** *GUS* fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Jefferson, R.A. 1987.** Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Larkins, B.A., K. Pedersen, A.K. Handa, W.J. Hurkman, and L.D. Smith. 1979.** Synthesis and processing of maize storage proteins in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6448-6452.
- Livingstone, D.M. and R.G. Birch. 1995.** Regeneration and microprojectile-mediated gene transfer in embryonic leaflets of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 585-591.
- Luo, G., A. Hepburn, and J. Widholm, 1994.** A simple procedure for the expression of genes in transgenic soybean callus tissue. *Plant Cell Rep.* 13: 632-636.
- McKently, A.H., G.A. Moore, H. Doostdar, and R.P. Niedz. 1995.** *Agrobacterium*-mediated transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) embryo axes and the development of transgenic plants. *Plant Cell Rep.* 14: 699-703.
- Murashige, L.A., and F. Skoog, 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Ozias-Akins, P., J.A. Schnall, W.F. Anderson, C. Singsit, T.E. Clemente, M.J. Adang, and A.K. Weissinger. 1993.** Regeneration of transgenic peanut plants from stably transformed embryonic callus. *Plant Sci.* 93: 185-194.
- Ressler, P.M., J.M. Stucky, and J.P. Miksche. 1981.** Cytophotometric determination of the amount of DNA in *Arachis* L. sect. *Arachis* (Leguminosae). *Amer. J. Bot.* 68: 149-153.
- SAS Institute Inc. 1990.** SAS/STAT User's Guide, Version 6, 4th Ed. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Theodoulou, F.L. and A.J. Miller, 1995.** *Xenopus* oocytes as a heterologous expression system for plant protein. *Mol. Biotech.* 3: 101-115.
- Wynne, J.C., R.W. Mazingo, and D.A. Emery. 1979.** Registration of NC 7 peanut. *Crop Sci.* 19:563.