

Analisis Molekuler Gen Partenokarpi *DefH9-RI-iaaM* pada Progeni Tomat Transgenik

(Molecular Analysis of *DefH9-RI-iaaM* Parthenocarpic Gene in Transgenic Tomato Progenies)

Saptowo J. Pardal^{1*}, Slamet¹, Ragapadmi Purnamaningsih¹, Endang G. Lestari¹, dan Sutini²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: s_j_pardal@yahoo.com

²Fakultas Biologi, FMIPA, Universitas Indonesia, Jl. Prof. Dr. Sudjono D. Pusponogoro, Depok 16424 Indonesia

Diajukan: 4 November 2014; Direvisi: 12 Desember 2014; Diterima: 3 Maret 2015

ABSTRACT

The development of seedless tomato fruits will be more attractive to both consumers and industries. Seedless tomatoes can be produced through parthenocarpy technology. Artificial parthenocarpy can be induced by conventional crossing, hormone application, or genetic engineering. The development of parthenocarpic tomatoes through genetic engineering has been carried out by inserting *DefH9-iaaM* parthenocarpic gene into tomato genome via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Sixty putative transgenic tomato lines were produced and three events (OvR1#14-4, OvM2#10-1, and OvM2#6-2) were selected as the best events. The background of the tomato lines was Oval variety, and based on PCR results, the three selected lines contained *DefH9-RI-iaaM* in their genome. The objective of this research was to determine the integration of *DefH9-RI-iaaM* gene in the progenies of three transgenic tomatoes lines using PCR technique. The research was conducted in the laboratory and Biosafety Containment Facility of Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (ICABIOGRAD). Parental variety, Oval (neither transgenic nor *in vitro* cultured), and elite line of CL 6046 were used as control plants. The results indicated that the progenies (T₁, T₂, and T₃) of the three tomato lines contained the insert *DefH9-RI-iaaM* gene.

Keywords: Molecular analysis, transgenic tomato lines, parthenocarpic gene, genetic engineering.

ABSTRAK

Pengembangan buah tomat tanpa biji (*fully seedless*) akan sangat menarik dan diminati para konsumen dan industri. Salah satu teknologi untuk menghasilkan tomat tanpa biji adalah melalui partenokarpi. Partenokarpi buatan dapat diinduksi, baik melalui persilangan, aplikasi hormon, maupun rekayasa genetika. Perakitan tomat partenokarpi telah dilakukan dengan penyisipan gen partenokarpi *DefH9-RI-iaaM* melalui transformasi yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens*. Sebanyak enam puluh galur tomat transgenik putatif telah dihasilkan dan tiga *events* di antaranya, yaitu OvR1#14-4, OvM2#10-1, dan OvM2#6-2, merupakan *events* terbaik. Galur-galur ini berasal dari varietas Oval dan berdasarkan hasil uji PCR, ketiga galur ini mengandung insersi gen *DefH9-RI-iaaM* di dalam genomnya. Penelitian ini bertujuan mengetahui integrasi gen *DefH9-RI-iaaM* pada tiga galur tomat transgenik partenokarpi menggunakan teknik PCR. Penelitian dilakukan di laboratorium dan Fasilitas Uji Terbatas (FUT), Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen). Sebagai tanaman pembandingan digunakan varietas tetua Oval (nontransgenik, bukan hasil kultur jaringan) dan galur unggul CL 6046. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga galur tomat transgenik OvR1#14-4, OvM2#10-1, dan OvM2#6-2 masih membawa gen *DefH9-RI-iaaM* hingga generasi ketiga.

Kata kunci: Analisis molekuler, galur tomat transgenik, gen partenokarpi, rekayasa genetika.

PENDAHULUAN

Buah tomat mempunyai nilai ekonomis dan potensi ekspor yang tinggi. Selain itu, buah tomat juga kaya akan gizi, terutama sebagai salah satu sumber vitamin C, A, dan B1 serta beberapa mineral penting yang bermanfaat bagi kesehatan (Nurtika, 1994). Hal tersebut menyebabkan buah tomat banyak dikonsumsi, baik dalam bentuk segar maupun olahan (Ameriana, 2005). Total produksi buah tomat secara nasional masih sangat rendah, yaitu hanya 992.780 ton sehingga belum mencukupi permintaan pasar yang mencapai 1.230.000 ton (BPS, 2013). Produksi buah tomat yang rendah tersebut disebabkan oleh berbagai kendala di lapang (Nurtika, 1994), di antaranya serangan hama dan penyakit serta faktor lingkungan, seperti suhu yang panas. Diketahui bahwa tomat sangat sensitif terhadap suhu panas, bunga-bunga tomat banyak yang gugur akibat panas sehingga produksinya rendah. Masalah lain yang sering dihadapi petani adalah buah tomat umumnya banyak mengandung biji sehingga kurang disenangi oleh konsumen sebagai buah meja (*table fruit*) dan industri. Untuk itu, upaya perakitan varietas tomat yang dapat menghasilkan buah dengan sedikit (*seedless*) atau tanpa biji (*fullyseedless*) akan lebih menarik bagi konsumen dan industri.

Buah tomat tanpa biji dapat dihasilkan melalui teknologi partenokarpi. Buah partenokarpi dapat terbentuk tanpa melalui proses penyerbukan (polinasi) dan atau pembuahan (fertilisasi). Buah partenokarpi umumnya hanya menghasilkan sedikit biji atau bahkan tanpa biji. Partenokarpi dapat terjadi secara alami atau buatan, namun pembentukan buah partenokarpi alami jarang terjadi di alam. Partenokarpi buatan dapat dirangsang melalui aplikasi zat pengatur tumbuh, seperti auksin, giberelin, dan sitokinin (Foz *et al.*, 1999). Namun, metode tersebut kurang ekonomis untuk areal pertanaman yang luas dan dapat menyebabkan malformasi pada buah (Donzella *et al.*, 2000).

Buah partenokarpi buatan dapat pula diinduksi melalui rekayasa genetika, yaitu dengan menginsersikan gen partenokarpi ke dalam genom tanaman (Rotino *et al.*, 1997). Pembentukan buah partenokarpi melalui rekayasa genetika telah berhasil dilakukan pada tanaman tomat (Ficcadenti *et al.*, 1998), terung (Donzella *et al.*, 2000), stroberi dan rasberi (Mezzetti *et al.*, 2004), serta anggur (Constantini *et al.*, 2007), dengan penyisipan gen partenokarpi *DefH9-iaaM*. Gen ini akan mengode hormon auksin IAA pada bagian ovulum dan plasenta (Ficcadenti *et al.*, 1998) sehingga tanaman akan membentuk buah partenokarpi (Rotino *et al.*, 1997). Partenokarpi juga akan meningkatkan produksi buah melalui peningkatan pembentukan buah (*fruit setting*). Buah tomat partenokarpi umum-

nya berbiji sedikit sehingga sangat sesuai untuk buah konsumsi atau industri (Pandolfini *et al.*, 2002).

Purnamaningsih (2010) telah berhasil melakukan transfer dua konstruksi gen partenokarpi, *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM*, ke dalam genom tomat melalui bantuan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. Konstruksi gen *DefH9-iaaM* mengekspresikan senyawa prekursor IAA lebih tinggi pada bagian ovulum atau plasenta sehingga buah partenokarpi yang dihasilkan memiliki jumlah biji lebih sedikit atau bahkan tanpa biji. Konstruksi gen ini lebih sesuai untuk produksi buah tomat tanpa biji. Sementara itu, konstruksi gen *DefH9-RI-iaaM* mengekspresikan senyawa prekursor IAA lebih rendah sehingga buah partenokarpi yang dihasilkan tidak sepenuhnya tanpa biji (*not fully seedless*). Tanaman partenokarpi yang dihasilkan masih dapat diperbanyak melalui biji yang dihasilkan. Sebanyak enam puluh *events* (galur) tomat transgenik telah diperoleh. Tiga galur di antaranya, yang berasal dari varietas Oval dan membawa gen *DefH9-RI-iaaM*, yaitu OvR1#14-4, OvM2#10-1, dan OvM2#6-2, dipilih sebagai bahan pengujian dalam penelitian ini.

Keberhasilan suatu proses transfer gen dalam perakitan tanaman transgenik adalah jika diperoleh tanaman transgenik yang stabil, yaitu memiliki insersi yang telah terintegrasi ke dalam genom dan diwariskan ke generasi berikutnya (Christou *et al.*, 1992). Integrasi insersi transgen di dalam tanaman transgenik dapat diketahui secara molekuler dengan teknik *polymerase chain reaction* (PCR). Penelitian ini bertujuan mengetahui integrasi insersi gen *DefH9-RI-iaaM* pada progeni tiga galur tomat transgenik partenokarpi generasi T₁, T₂, dan T₃ berdasarkan analisis molekuler dengan teknik PCR.

BAHAN DAN METODE

Bahan penelitian berupa tanaman tomat transgenik generasi T₁, T₂, dan T₃ galur OvR1#14-4, OvM2#10-1, dan OvM2#6-2 yang membawa gen *DefH9-RI-iaaM*. Sebagai tanaman pembandingan digunakan varietas tetua Oval (nontransgenik, bukan hasil kultur jaringan) dan galur unggul CL 6046 (koleksi Balai Penelitian Tanaman Sayuran). Primer yang digunakan untuk analisis PCR adalah IAAM 5 (*forward*: 5'-CAAAGAATCGTAATCCGGG-TAGCACG-3') dan IAAM 3 (*reverse*: 5'-AATAGCTG-CCTATGCCTCCCGTCAT-3').

Analisis Molekuler, Uji Ekspresi, dan Uji Fenotipik Gen *DefH9-RI-iaaM* pada Galur Tomat Transgenik T₁

Biji tomat T₁ disemai di bak plastik yang berisi media tanam, kemudian kecambah yang tumbuh dipindahkan satu per satu ke dalam polibag kecil. Setelah berumur 2 minggu, dari setiap galur dipilih 30

tanaman dan dipindahkan ke media di dalam ember besar (ukuran 10 kg) untuk pendewasaan dan ditanam di rumah kaca FUT, BB Biogen. Setelah berumur 4–5 minggu (2–3 minggu setelah dipindahkan ke media ember), dilakukan pengambilan sampel daun muda tanaman untuk analisis molekuler. Dari tiap galur tomat transgenik T₁ di-sampling sebanyak 10 tanaman untuk analisis molekuler.

Analisis molekuler gen *DefH9-RI-iaaM* pada galur T₁

Analisis molekuler dilakukan dengan teknik PCR menggunakan metode Wang *et al.* (2008). Teknik ini dilakukan dengan tujuan mendeteksi keberadaan gen *DefH9-RI-iaaM* pada sampel tiga galur tomat transgenik. Sampel yang digunakan untuk analisis molekuler berupa DNA yang diisolasi dari daun muda. Jumlah sampel daun yang digunakan sebanyak 10 helai untuk setiap galur tanaman. Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan protokol Extract-N-Amp™ Plant PCR Kit (Invitrogen™) yang terdiri atas *extraction solution* dan *dilution solution*.

Sampel daun dipotong dengan menggunakan *paper punch* berdiameter 0,5 cm, lalu dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml yang berisi 100 μ l *extraction solution*, kemudian diinkubasi di dalam *waterbath incubator* dengan suhu 95°C selama 10 menit. Selanjutnya, sampel diinkubasi pada suhu ruang hingga dingin, kemudian ditambah dengan 100 μ l *dilution solution*. Sampel DNA yang diperoleh selanjutnya diambil sedikit untuk proses PCR dan sisanya disimpan di dalam *freezer* -20°C sebagai cadangan.

Sampel DNA selanjutnya diamplifikasi menggunakan mesin Peltier Thermal Cycler PTC-100™ (MJ Research). Reaksi PCR terdiri atas 4 μ l DNA genom sebagai cetakan (*template*), 10 μ l RED Extract-N-Amp™ PCR Reaction Mix, 0,4 μ l primer IAAM 5, 0,4 μ l IAAM 3, dan ditambah akuades steril sampai dengan volume 20 μ l. *Template* yang digunakan dalam reaksi PCR adalah DNA genom yang diisolasi dari daun tanaman tomat transgenik, varietas Oval dan CL 6046 nontransgenik (kontrol negatif), serta DNA plasmid *A. tumefaciens* yang memiliki insersi gen partenokarpi *DefH9-iaaM* (kontrol positif). Kondisi optimal reaksi PCR, yaitu tahap denaturasi awal 95°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan denaturasi pada suhu 95°C selama 15 detik, proses *annealing* pada suhu 60°C selama 30 detik, serta polimerisasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Proses denaturasi, *annealing*, dan polimerisasi tersebut dilakukan secara berulang sebanyak 40 siklus. Tahap akhir amplifikasi diperpanjang dengan inkubasi pada suhu 15°C selama 60 menit, kemudian dilanjutkan pada suhu 4°C selama 15 menit.

Fragmen DNA hasil amplifikasi kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarosa 1% (b/v) berdasarkan metode Sambrook *et al.* (1989). Sebanyak 10 μ l produk PCR diambil untuk proses elektroforesis gel. Sisa produk PCR disimpan di dalam *freezer* -20°C sebagai cadangan. Setiap sampel DNA, kontrol positif, kontrol negatif, dan marka DNA *ladder* 1 kb ditambah 2 μ l *loading dye* 10 \times dan dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa, lalu elektroforesis dijalankan dengan tegangan listrik tetap 80 V selama 60 menit hingga migrasi *loading buffer* sejauh 70% dari panjang gel. Gel agarosa kemudian divisualisasikan dengan mesin ChemiDoc™ (Bio-Rad) yang memiliki program QuantityOne®.

Analisis data sampel DNA dilakukan secara kualitatif berdasarkan ukuran pita DNA dibanding dengan marka DNA dan kontrol positif. Hasil positif amplifikasi DNA menghasilkan pita berukuran 158 bp. Hasil negatif didapatkan jika ukuran DNA yang terdeteksi berada di luar kisaran tersebut atau pita DNA tidak terlihat pada gel elektroforesis. Hasil amplifikasi dibanding dengan kontrol positif untuk melihat ada tidaknya kontaminasi DNA genomik. Kontrol negatif digunakan untuk melihat ada tidaknya kontaminasi pada proses kerja.

Uji ekspresi gen *DefH9-RI-iaaM* pada galur T₁

Untuk uji ekspresi *DefH9-RI-iaaM*, dari setiap galur tomat hanya dipilih satu tanaman tomat T₁ yang positif membawa gen tersebut. Uji ekspresi menggunakan teknik *real-time* PCR dengan sampel berupa mRNA yang diisolasi dari kuncup bunga tomat sekitar 200 mg (2–3 kuncup bunga). Hal ini dilakukan karena gen *DefH9-RI-iaaM* oleh promotor *DefH9* hanya diekspresikan pada bagian ovulum dan plasenta bunga.

Tahapan uji ekspresi gen *DefH9-RI-iaaM* meliputi isolasi mRNA, sintesis cDNA, *real-time* PCR, dan analisis data. Tahapan isolasi mRNA dimulai dengan memasukkan sampel kuncup bunga dari setiap galur tomat ke dalam larutan nitrogen cair untuk menghentikan proses metabolisme sel. Selanjutnya, sampel kuncup bunga diambil dan digerus di dalam mortar steril hingga lembut. Sampel kuncup bunga yang telah menjadi serbuk dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 ml, lalu ditambahkan larutan bufer untuk ekstraksi mRNA. Isolasi mRNA tomat dilakukan menggunakan protokol dari Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit. Selanjutnya, mRNA yang diperoleh dijadikan *template* untuk sintesis cDNA. Sintesis cDNA dilakukan dengan metode *one step* menggunakan SYBR® Green Reaction Kit (Invitrogen™) dengan primer spesifik untuk gen *DefH9-RI-iaaM*, yaitu primer IAAM 5 dan IAAM 3. Proses sintesis cDNA berlangsung secara otomatis di dalam mesin *real-time* PCR. Mesin di-

program untuk sintesis cDNA sebagai berikut. Tahap aktivasi dengan suhu 50°C selama 3 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, amplifikasi sebanyak 40 siklus pada suhu 95°C selama 15 detik, kemudian 60°C selama 30 detik, dan tahap akhir amplifikasi pada suhu 40°C selama 1 menit.

Eksresi gen *DefH9-RI-iaaM* dapat dianalisis berdasarkan saat munculnya sinyal amplikon pada grafik hasil *real-time* PCR. Ekspresi gen yang tinggi ditandai dengan semakin cepat munculnya sinyal amplikon (Pardal *et al.*, 2007). Sebagai kontrol ekspresi, pada proses *real-time* PCR digunakan sampel mRNA gen *actin* tomat (*housekeeping gene*). Gen ini digunakan untuk membandingkan tingkat ekspresi suatu gen, baik secara kualitatif maupun kuantitatif.

Uji fenotipik partenokarpi pada galur T₁

Uji fenotipik dimaksudkan untuk mengetahui ekspresi *DefH9-RI-iaaM* secara fenotipik dengan mengamati karakter partenokarpi pada galur tomat transgenik T₁. Lima tanaman terbaik sebagai ulangan dipilih untuk setiap galur sebagai bahan pengujian fenotipik. Percobaan dilakukan dengan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (*Randomized Complete Block Design*/RCBD). Sebagai kontrol digunakan varietas Oval (nontransgenik). Pengamatan dan pengambilan data dilakukan setiap minggu dengan peubah jumlah bunga per tanaman, jumlah buah per tanaman, sedangkan jumlah biji dan berat buah segar diambil setiap panen (lima kali panen). Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis ragam ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%.

Analisis Molekuler Gen *DefH9-RI-iaaM* pada Galur Tomat Transgenik T₂

Prosedur analisis galur tomat transgenik T₂ sama dengan analisis galur T₁. Sebanyak 10 tanaman per galur generasi T₂ dipilih untuk analisis molekuler. Pengambilan sampel daun dilakukan pada saat tanaman berumur 4–5 minggu setelah tanam. Foto visualisasi sampel DNA hasil elektroforesis gel diamati dan dianalisis berdasarkan ada tidaknya pita DNA berukuran 158 bp.

Analisis Molekuler Gen *DefH9-RI-iaaM* pada Galur Tomat Transgenik T₃

Prosedur analisis galur tomat transgenik T₃ sama dengan analisis galur T₁ dan T₂. Sebanyak 10 tanaman

per galur generasi T₃ dipilih untuk analisis molekuler. Pengambilan sampel daun dilakukan pada saat tanaman berumur 4–5 minggu setelah tanam. Foto visualisasi sampel DNA hasil elektroforesis gel diamati dan dianalisis berdasarkan ada tidaknya pita DNA berukuran 158 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Molekuler, Uji Ekspresi, dan Uji Fenotipik Gen *DefH9-RI-iaaM* pada Galur Tomat Transgenik T₁

Analisis molekuler gen *DefH9-RI-iaaM* pada galur T₁

Hasil analisis molekuler terhadap tiga galur tomat transgenik T₁ dengan teknik PCR menunjukkan bahwa sampel tanaman dari ketiga galur tomat yang dianalisis masih membawa gen *DefH9-RI-iaaM*. Galur tomat transgenik OvR1#14-4 menunjukkan integrasi gen *DefH9-RI-iaaM* lebih baik/stabil dibanding dengan galur OvM2#10-1 dan OvM2#6-2. Hal ini ditunjukkan dengan adanya persentase sampel positif yang lebih tinggi pada galur OvR1#14-4, yaitu sembilan sampel positif dan satu sampel negatif, sedangkan pada galur OvM2#10-1 terdapat enam sampel positif dan empat sampel negatif, pada galur OvM2#6-2 hanya lima sampel positif dan lima sampel negatif (Tabel 1). Jika gen telah terintegrasi dengan baik pada genom tanaman, gen akan lebih stabil dan diwariskan pada sebagian besar tanaman keturunannya (Christou *et al.*, 1992).

Uji ekspresi gen *DefH9-RI-iaaM* pada galur T₁

Hasil uji ekspresi gen *DefH9-RI-iaaM* terhadap tiga galur tomat transgenik T₁ menunjukkan bahwa sinyal amplikon gen tersebut pada galur OvR1#14-4 terdeteksi pada siklus PCR (amplifikasi) lebih awal, disusul galur OvM2#10-1 dan terakhir galur OvM2#6-2. Pada grafik hasil reaksi *real-time* PCR (Gambar 1) terlihat bahwa sinyal amplikon gen *actin* muncul/terdeteksi paling awal, yaitu pada siklus ke-17 dengan *threshold* (nilai Ct = 17), kemudian galur OvR1#14-4 pada siklus ke-23 (Ct = 23), OvM2#10-1 pada siklus ke-27 (Ct = 27), dan OvM2#6-2 pada siklus ke-39 (Ct = 39). Hal ini menunjukkan bahwa level ekspresi gen *actin* paling tinggi, kemudian level ekspresi untuk gen *DefH9-RI-iaaM* pada galur OvR1#14-4 lebih tinggi daripada galur OvM2#10-1 dan terendah pada galur OvM2#6-2. Data ekspresi gen *DefH9-RI-iaaM* ini me-

Tabel 1. Hasil analisis PCR tiga galur tomat transgenik T₁.

Galur tomat	Jumlah sampel	Jumlah sampel positif	Jumlah sampel negatif
OvR1#14-4	10	9 (90%)	1 (10%)
OvM2#10-1	10	6 (60%)	4 (40%)
OvM2#6-2	10	5 (50%)	5 (50%)

nunjukkan bahwa ketiga galur tomat T₁ yang dianalisis membawa gen *DefH9-RI-iaaM* dan mengekspresikan dengan level yang berbeda, dengan ekspresi gen tertinggi terdapat pada galur OvR1#14-4.

Level ekspresi suatu gen yang tinggi ditunjukkan dengan semakin cepat munculnya sinyal amplikon pada proses/siklus amplifikasi (Pandolfini *et al.*, 2002). Kurva amplifikasi memiliki sejumlah informasi penting yang dapat digunakan untuk pengukuran kuantitatif dari RNA atau DNA. Garis *threshold* pada kurva amplifikasi berfungsi sebagai detektor atau titik yang menunjukkan bahwa suatu reaksi amplifikasi mencapai intensitas emisi fluoresen tertinggi. Kondisi tersebut menggambarkan bahwa amplikon telah terbentuk (gen target terdeteksi). Garis *threshold* diatur pada fase eksponensial amplifikasi untuk meningkatkan keakuratan analisis data. Siklus tempat sebuah reaksi amplifikasi mencapai tingkat intensitas emisi tersebut dinamakan *cycle threshold* (Ct). Nilai Ct akan digunakan dalam proses analisis kuantitatif data produk *real-time* PCR (Pardal *et al.*, 2007).

Uji fenotipik galur tomat T₁

Hasil uji fenotipik terhadap tiga galur tomat transgenik partenokarpi T₁ di FUT disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan hasil pengamatan, sifat morfologis dari galur-galur tomat yang diuji tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dalam jumlah bunga antara tanaman transgenik dan nontransgenik (Gambar 2). Namun, ketiga galur berbeda dalam

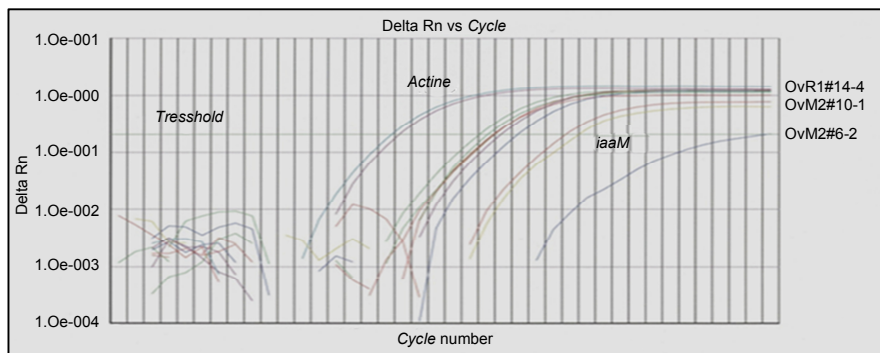
jumlah buah dan berat basah buah. Sebagian besar tanaman transgenik menunjukkan fenotipe partenokarpi, yaitu menghasilkan jumlah buah per tanaman lebih banyak dan ukuran buah lebih besar daripada kontrol.

Galur OvR1#14-4 menunjukkan fenotipe terbaik, yaitu menghasilkan jumlah buah paling banyak dibandingkan dengan dua galur lainnya dan tanaman kontrol (berbeda nyata berdasarkan uji ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%). Galur tomat ini juga memiliki rerata berat basah buah yang lebih besar (61%) dan jumlah biji lebih sedikit (90,1%) dibandingkan dengan tanaman kontrol (Gambar 3), meskipun tidak berbeda nyata secara statistik.

Dua galur tomat transgenik lainnya, yaitu galur OvM2#10-1 dan OvM2#6-2, menghasilkan rerata jumlah buah lebih banyak (49% dan 27,9%), rerata berat basah buah lebih besar (53,9% dan 33,4%), dan jumlah biji lebih sedikit (36% dan 19,9%) dibandingkan dengan tanaman kontrol (Tabel 2).

Analisis Molekuler Gen *DefH9-RI-iaaM* pada Galur Tomat Transgenik T₂

Hasil analisis PCR terhadap tiga galur tomat T₂ dengan jumlah masing-masing 30 sampel menunjukkan bahwa ketiga galur tomat T₂ sebagian besar masih membawa gen *DefH9-RI-iaaM* (Gambar 4). Hasil analisis PCR terhadap galur OvR1#14-4 menunjukkan 23 sampel positif mengandung gen *DefH9-RI-iaaM* (menghasilkan pita DNA berukuran 158 bp) dan 7



Gambar 1. Grafik hasil proses *real-time* PCR dari tiga sampel mRNA tomat transgenik. Dari kiri ke kanan adalah ekspresi gen *actin* pada galur OvR1#14-4 dan ekspresi gen *DefH9-RI-iaaM* berturut-turut pada galur OvR1#14-4, OvM2#10-1, dan OvM2#6-2.

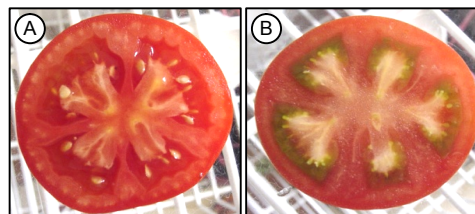
Tabel 2. Data fenotipik tiga galur tomat transgenik T₁ di FUT.

Galur tomat T ₁	Rerata jumlah bunga/tanaman (buah)	Rerata jumlah buah/tanaman (buah)	Rerata berat basah buah (g)	Rerata jumlah biji/buah
OvR1#14-4	108,37 a	31,60 a	27,59 ab	16,44 a
OvM2#10-1	116,07 a	24,03 b	26,36 ab	22,98 a
OvM2#6-2(2)	120,83 a	20,63 bc	22,85 ab	26,07 a
Oval (kontrol)	57,23 bc	16,13 bc	17,13 bc	31,25 a

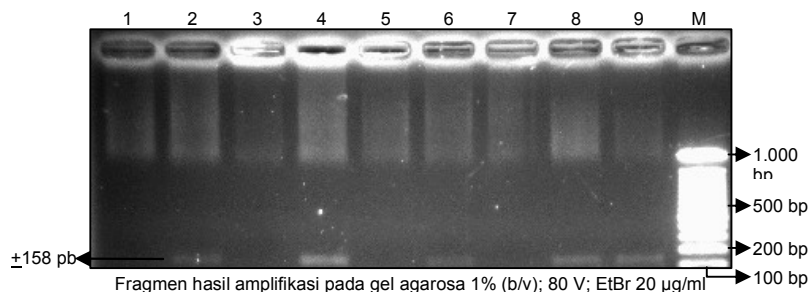
Angka-angka dalam satu kolom yang diikuti dengan huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan nyata berdasarkan uji ANOVA dengan tingkat kepercayaan 95%.



Gambar 2. Penampilan galur tomat transgenik T_1 pada berbagai fase pertumbuhan di FUT. A = saat berbunga, B = saat berbuah, C = pematangan buah, D = buah masak.



Gambar 3. Perbandingan jumlah biji tomat transgenik T_1 dan nontransgenik. A = penampang melintang buah tomat nontransgenik Oval (berbiji banyak), B = penampang melintang buah tomat transgenik galur OvR1#14-4 (berbiji sedikit).



Gambar 4. Contoh visualisasi fragmen gen *DefH9-RI-iaaM* hasil amplifikasi dengan sepasang primer (IAAM 5 dan IAAM 3) pada tiga galur tomat transgenik T_2 . M = marka DNA *ladder* 1 kb, 1 = kontrol negatif, 2 = kontrol positif (plasmid), 3 = OvM2#6-2 individu nomor 23, 4 = OvM2#6-2 individu nomor 24, 5 = OvM2#10-1 individu nomor 24, 6 = OvM2#10-1 individu nomor 25, 7 = OvR1#14-4 individu nomor 23, 8 = OvR1#14-4 individu nomor 24, 9 = OvR1#14-4 individu nomor 25.

sampel lainnya menunjukkan hasil negatif (tidak menghasilkan pita DNA berukuran 158 bp). Hasil analisis PCR terhadap galur OvM2#10-1 menunjukkan 14 sampel positif dan 16 sampel negatif, sedangkan galur OvM2#6-2 terdiri atas 16 sampel positif dan 14 sampel negatif (Tabel 3).

Hasil ini menunjukkan bahwa integrasi gen *DefH9-RI-iaaM* pada tanaman tomat transgenik T_1 stabil dan diwariskan ke generasi berikutnya (T_2). Gen *DefH9-iaaM* kemungkinan besar telah terintegrasi ke dalam genom tanaman tomat. Berdasarkan hasil penelitian Dai *et al.* (2001), integrasi gen *insert* relatif lebih stabil pada tanaman padi transgenik hasil trans-

formasi menggunakan *Agrobacterium* daripada melalui penembakan partikel (*particle bombardment*). Hasil yang sama juga ditunjukkan pada penelitian Pardal *et al.* (2005), yaitu transformasi tanaman kedelai dengan gen *pinII* menggunakan *Agrobacterium* lebih stabil dibanding dengan penembakan partikel.

Tanaman menyerbuk sendiri (*self pollination*) seperti tomat, umumnya akan memiliki integrasi gen yang stabil pada generasi ke-4 (T_4), sedangkan pada tanaman menyerbuk silang (*cross pollination*), gen insersi baru akan terintegrasi stabil pada generasi T_8 (Oard *et al.*, 1996).

Analisis Molekuler Gen *DefH9-RI-iaaM* pada Galur Tomat Transgenik T₃

Hasil analisis PCR terhadap tiga galur tomat transgenik T₃ menunjukkan bahwa ketiga galur sebagian besar masih membawa gen *DefH9-RI-iaaM* (Gambar 5). Hasil analisis PCR terhadap 10 sampel tanaman T₃ galur OvR1#14-4 menunjukkan semuanya positif mengandung gen *DefH9-RI-iaaM*. Sementara itu, hasil analisis PCR terhadap galur OvM2#10-1 menunjukkan empat sampel positif dan enam sampel negatif, sedangkan galur OvM2#6-2 terdiri atas lima sampel positif dan lima sampel negatif (Tabel 4).

Data di atas menunjukkan bahwa gen partenokarpi *DefH9-RI-iaaM* masih diwariskan dari galur tomat generasi T₂ ke generasi T₃. Namun dari ketiga

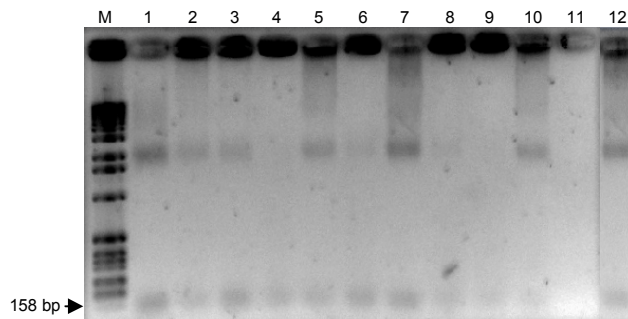
galur tersebut, OvR1#14-4 menunjukkan stabilitas insersi gen partenokarpi yang lebih baik dibanding dengan dua galur lainnya (Gambar 6). Hal ini terlihat dari banyaknya sampel tanaman yang positif membawa gen *DefH9-RI-iaaM*, baik pada generasi T₁, T₂, maupun T₃. Berdasarkan hasil uji fenotipik terhadap tiga galur tomat transgenik T₃ (data tidak ditampilkan), galur OvR1#14-4 generasi T₃ juga menunjukkan karakter partenokarpi yang lebih baik dibanding dengan dua galur lainnya, yaitu memiliki jumlah buah lebih banyak, ukuran buah lebih besar, dan jumlah biji lebih sedikit (Sutini, 2008) sehingga galur ini sangat potensial sebagai kandidat galur unggul tomat partenokarpi dan perlu diuji lebih lanjut, baik secara molekuler maupun fenotipik.

Tabel 3. Hasil analisis PCR tiga galur tomat transgenik T₂.

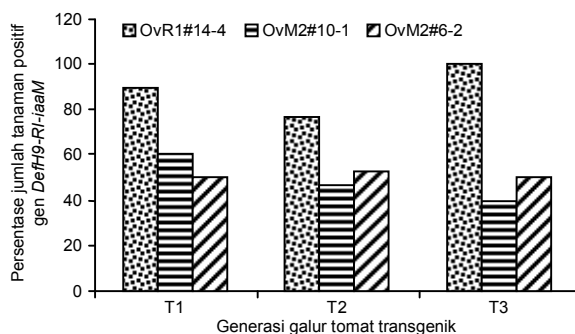
Galur tomat	Jumlah sampel	Jumlah sampel positif	Jumlah sampel negatif
OvR1#14-4	30	23 (76,7%)	7 (23,3%)
OvM2#10-1	30	14 (46,7%)	16 (53,3%)
OvM2#6-2	30	16 (53,3%)	14 (46,7%)

Tabel 4. Hasil analisis PCR tiga galur tomat transgenik T₃.

Galur tomat	Jumlah sampel	Jumlah sampel positif	Jumlah sampel negatif
OvR1#14-4	10	10 (100%)	0 (0%)
OvM2#10-1	10	4 (40%)	6 (60%)
OvM2#6-2	10	5 (50%)	5 (50%)



Gambar 5. Hasil uji PCR sampel daun tomat transgenik galur OvR1#14-4. M = marka DNA ladder 1 kb, 1–10 = sampel, 11 = kontrol negatif (varietas Oval), 12 = kontrol positif (DNA plasmid mengandung gen *DefH9-RI-iaaM*).



Gambar 6. Persentase tanaman positif membawa gen *DefH9-RI-iaaM* pada generasi T₁, T₂, dan T₃.

KESIMPULAN

Stabilitas integrasi insersi suatu gen pada progeni suatu galur (*event*) tanaman hasil transformasi genetika dapat diketahui melalui data hasil uji PCR. Bila suatu galur tanaman transgenik menunjukkan hasil PCR positif dari generasi awal (T_0) dan pada generasi berikutnya, dapat diindikasikan integrasi insersi gen pada galur tersebut stabil.

Hasil analisis molekuler terhadap progeni dari tiga galur tomat transgenik (OvR1#14-4, OvM2#10-1, dan OvM2#6-2) hingga generasi T_3 pada penelitian ini menunjukkan bahwa ketiga galur tomat tersebut masih memiliki insersi gen partenokarpi *DefH9-RI-iaaM*. Namun, dari ketiga galur tomat transgenik tersebut, galur OvR1#14-4 menunjukkan stabilitas insersi yang lebih baik dibanding dengan dua galur lainnya. Galur ini selalu menunjukkan persentase sampel PCR positif yang lebih tinggi dibanding dengan dua galur lainnya, baik pada generasi T_1 , T_2 , maupun T_3 sehingga galur ini sangat potensial dijadikan sebagai kandidat galur unggul tomat transgenik partenokarpi dan perlu diuji lebih lanjut baik secara molekuler maupun karakter fenotipiknya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Pengelola Program Riset Insentif, Kementerian Negara Riset dan Teknologi, atas bantuan dana penelitian selama tiga tahun berturut-turut (2007–2009), serta kepada Dr. Giuseppe Rotino dari Pusat Penelitian Tanaman Sayuran di Montanazo, Milan, Italia, yang telah memberikan izin penggunaan konstruksi gen partenokarpi untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ameriana, M. 2005. Ketersediaan konsumen membayar premium untuk tomat aman residu pestisida. *J. Hort.* 16(2):165–174.
- Badan Pusat Statistik, 2013. Produksi sayuran di Indonesia 1997–2013.
- Christou, P., P. Vain, A. Kohli, M. Leech, J. Oard, and S. Linscombe. 1992. Introduction of multiple genes into elite rice varieties: Evaluation of transgene stability, gene expression, and field performance of herbicide-resistant transgenic plants. *Ann. Bot.* 77:223–235.
- Constantini, E., L. Landi, O. Silvestroni, T. Pandolfini, A. Spena, and B. Mezzetti. 2007. Auxin synthesis-encoding transgene enhances grape fecundity. *Plant Physiol.* 147:1689–1694.
- Dai, S.P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, S. Chen, R.N. Beachy, and C. Fauquet. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particles bombardment. *Mol. Breed.* 7:25–33.
- Donzella, G., A. Spena, and G.L. Rotino. 2000. Transgenic parthenocarpic eggplants: Superior germplasm for increased winter production. *Mol. Breed.* 6:79–86.
- Ficcadenti, N., S. Sestili, T. Pandolfini, C. Cirillo, G.L. Rotino, and A. Spena. 1998. Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Mol. Breed.* 5:463–470.
- Foz, M., F. Nuez, and J.L. Garcia-Martinez. 1999. The gene *pat-2* which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol.* 122(2):471–480.
- Mezzetti, B., L. Landi, T. Pandolfini, and A. Spena. 2004. The *DefH9-iaaM* auxin synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol.* 4:1–10.
- Nurtika, N. 1994. Penelitian usaha tani tomat dalam Pelita V. Prosiding Evaluasi Hasil Penelitian Hortikultura dalam Pelita V. 27–29 Juni 1994. Segunung, Jawa Barat.
- Oard, J.H., S.D. Linscombe, M.P. Braverman, F. Jodari, D.C. Blouin, M. Leech, A. Kohli, P. Vain, J.C. Cooley, and P. Christou. 1996. Development, field evaluation, and agronomic performance of transgenic herbicide resistant rice. *Mol. Breed.* 2:359–368.
- Pandolfini, T., G.L. Rotino, S. Camerini, R. Defez, and A. Spena. 2002. Optimization of transgene action at the post-transcriptional level: High quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnol.* 2:1–10.
- Pardal, S.J., G.A. Wattimena, H. Aswidinnoor, dan M. Herman. 2005. Transformasi genetik kedelai dengan gen *Proteinase Inhibitor II* melalui metode *particle bombardment*. *J. AgroBiogen* 1(2):53–61.
- Pardal, S.J., R. Purnamaningsih, E.G. Lestari, Slamet, dan Sutini. 2007. Laporan Akhir Program Riset Insentif Terapan, Ristek. Kementerian Riset dan Teknologi.
- Purnamaningsih, R. 2010. Introduksi gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM* ke dalam genom tanaman tomat menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*. *J. AgroBiogen* 6(1):18–25.
- Rotino, G.L., H. Sommer, H. Saedler, and A. Spena. 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat. Biotechnol.* 15:1398–1401.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed. CSHL Press, New York.
- Sutini. 2008. Analisis stabilitas insersi dan ekspresi fenotipik gen partenokarpi *DefH9-iaaM* pada T_3 tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) transgenik asal varietas Oval. Skripsi S1, Universitas Indonesia, Depok.
- Wang, D., K. Song, C. Kreader, S. Weber, J. van Dinter, and R. Valdes-Camin. 2008. A high throughput system for the rapid extraction of plant genomic DNA for genomic mapping and marker-assisted breeding studies. Sigma-Aldrich Corporation.