

Transformasi Gen *SoSPS1* Melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavalle) Secara *In Planta*

**I GUSTI AGUNG INDRA MERTAWAN, RINDANG DWIYANI^{*)}, DAN
HESTIN YUSWANTI**

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Jln. PB. Sudirman Denpasar 80231 Bali
^{*)}E-mail: rindangdwiyani@yahoo.co.id

ABSTRACT

In Planta Transformation of *SoSPS1* Gene Through *Agrobacterium tumefaciens* in Balinese Grapevine (*Vitis Vinifera* L. var. Alphonso Lavalle).

Vitis vinifera L. var. Alphonso Lavalle is one of the cultivar of grapevine cultivated in Bali. The sour taste of fruit is one of the problem of these cultivar that make it is less prefer by consumer. Research regarding improvement of fruit quality through genetic engineering has been investigated. The aims of the research were to find out the most proper methods of *in planta* transformation mediated with *Agrobacterium tumefaciens* applied on *V. vinifera*. The T-DNA harbored the *SoSPS1* gene under the control of promoter of the CaMV from Cauliflower Mosaic Virus and contained the *NPTII* gene, a kanamycin resistant gene as a selectable marker for transformant selection. *V. vinifera* seedlings from stem cutting aged 40-50 days were ripped and then dipped with the bacterial suspension for 1 hour, 2 hours, 1 day, and 2 days. Visualization of *V. vinifera* samples after PCR showed that ripping and dipping for 2 hours method was positively integrated with *NPTII* gene. The dipping of plants wound for 2 hours treatment was effective for inserting gene of interest in ripping and dipping methods.

Keywords: *Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavalle, *In Planta* Transformation, *SoSPS1*, *Agrobacterium tumefaciens*

PENDAHULUAN

Anggur merupakan buah yang cukup digemari oleh masyarakat Indonesia baik dikonsumsi langsung dalam keadaan segar ataupun telah diolah (Hidayati, 2014), sehingga anggur dinilai cukup menjanjikan untuk dibudidayakan. Beberapa wilayah di Indonesia dikenal

sebagai sentra produksi anggur, dimana salah satunya adalah Bali. Prabu Bestari dan anggur Bali (*Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavalle) merupakan dua varietas yang banyak dibudidayakan di Bali, namun anggur Bali lebih dominan untuk dibudidayakan (Rai *et al.*, 2016).

Peminat dari anggur Bali dipasaran cukup sepi jika dibandingkan dengan anggur dari varietas lain. Berdasarkan survei yang dilakukan Astawa *et al.* (2015), kurangnya kualitas dari buah anggur yang dihasilkan seperti ukuran buah yang kecil, adanya biji dan rasa buah yang kurang manis diduga menjadi penyebab sepi peminat anggur Bali dipasaran. Beberapa usaha telah dilakukan dalam upaya perbaikan kualitas terutama meningkatkan rasa manis pada buah seperti dengan melakukan penyemprotan GA3 pada bunga anggur Bali yang belum mekar (Astawa *et al.*, 2015). Penelitian ini berhasil meningkatkan kandungan sukrosa pada buah yang dihasilkan, namun metode ini masih memiliki beberapa kelemahan seperti memerlukan biaya, waktu, dan tenaga yang lebih serta sifat yang dihasilkan hanya sementara. Artinya jika tanaman tidak disemprot dengan GA3 maka rasa buah yang dihasilkan akan kembali seperti semula. Berdasarkan kelemahan - kelemahan tersebut maka diperlukan metode pemuliaan tanaman yang lebih baik dalam usaha peningkatan rasa manis pada buah anggur Bali.

Pemuliaan tanaman dengan tujuan perbaikan kualitas tanaman dapat dilakukan dengan beberapa cara seperti persilangan tanaman (konvensional) (Apriana *et al.*, 2011) dan penyisipan gen (Dwiyani *et al.*, 2012). Bennet dalam Nuraida (2012) berpendapat bahwa persilangan tanaman memiliki banyak kelemahan seperti memerlukan waktu lama dan tempat yang luas untuk menghasilkan tanaman dengan kualitas yang lebih baik. Para pemulia tanaman

saat ini mulai beralih pada metode penyisipan gen pada tanaman untuk memperoleh tanaman dengan sifat yang unggul. Metode penyisipan gen dipilih karena lebih cepat dalam menghasilkan tanaman dengan sifat unggul, selain itu juga tidak memerlukan tempat yang luas dan hemat biaya.

Transformasi genetik pada tanaman merupakan suatu proses menyisipkan gen asing yang berasal dari tanaman, hewan, bakteri atau manusia pada tanaman tertentu dengan tujuan untuk mendapatkan tanaman jenis baru yang lebih unggul dibandingkan dengan induknya (Dwiyani *et al.*, 2016a). Transformasi genetik pada tanaman dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in planta*. Transformasi secara *in planta* merupakan metode yang tidak menggunakan kultur jaringan dalam proses penyisipan gen pada tanaman (Kalbande and Patil, 2016). Metode *in planta* memiliki banyak kelebihan dibandingkan dengan metode *in vitro* diantaranya adalah memerlukan biaya yang lebih murah, tidak memerlukan keterampilan khusus terutama dalam bidang kultur jaringan, dan metode transformasi yang lebih sederhana (Bent, 2000).

Pemulia tanaman yang akan melakukan transformasi genetik harus memiliki tanaman sampel sebagai target transformasi serta gen yang akan disisipkan (*gene of interest*) pada tanaman. Perbaikan kualitas anggur Bali dengan usaha untuk meningkatkan rasa manis memerlukan gen yang berperan dalam proses biosintesis sukrosa pada tanaman sehingga diharapkan kandungan sukrosa dalam tanaman meningkat dan buah yang dihasilkan menjadi lebih manis. Berdasarkan tujuan tersebut maka pada penelitian ini akan menggunakan gen *SoSPS1* sebagai *gene of interest* dan anggur Bali sebagai tanaman target. *SoSPS1* merupakan

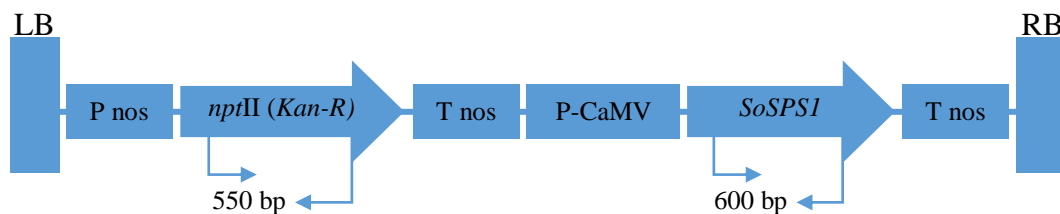
gen yang dikloning dari tanaman tebu (*Saccharum officinarum*) yang berperan dalam menyandikan protein *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS). *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) merupakan enzim yang berperan dalam proses biosintesis sukrosa pada sel tanaman (Satria *et al.*, 2015).

Penelitian ini akan menggunakan metode transformasi genetik melalui bakteri *Agrobacterium tumefaciens* secara *in planta* dengan menggunakan gen *SoSPS1* pada tanaman anggur Bali. Penelitian ini menggunakan metode rompes rendam. Daun pada tanaman anggur Bali yang telah berumur 40 - 50 hari dirompes dengan tujuan untuk membuat luka pada tanaman yang berfungsi agar bakteri *A. tumefaciens* dapat melakukan proses penyisipan gen. Anggur Bali yang telah dirompes kemudian diberi perlakuan dengan cara merendam tanaman yang telah dirompes dengan suspensi bakteri dengan 4 perlakuan lama perendaman yaitu selama 1 jam, 2 jam, 1 hari, dan 2 hari.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2017 - Februari 2018 di Laboratorium Kultur Jaringan, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana pada tahap pembuatan suspensi bakteri dan inokulasi tanaman target. Pemeliharaan tanaman target dilaksanakan di Rumah Paranet Himagrotek yang berlokasi di Kebun Percobaan Fakultas Pertanian, Universitas Udayana di Jalan Pulau Moyo, Denpasar. Analisis molekuler dilakukan di *Center Development for Advanced Science and Technology* (CDAST), Universitas Jember, Jember, Jawa Timur.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah anggur Bali (*Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavalle) sebagai tanaman target transformasi dan bakteri *A. tumefaciens* strain GV 3101. Bahan yang digunakan untuk kultur bakteri antara lain adalah aquades steril, alkohol 70%, sukrosa, media MS (Murashige dan Skoog), Tween 20, acetosyringone, antibiotik kanamisin, rifampisin, gentamisin, media LB (Luria Bertani) dan *Bacto agar*. Isolasi DNA dan elektroforesis menggunakan buffer (Tris, EDTA, dan NaCl), SDS 20%, β -mercaptoetanol, agarosa, isopropanol, potassium acetate, cloroform, etanol 70%, PCl, master mix, dan plasmid gen *NPTII* marka. Konstruksi T-DNA dari konstruk plasmid pKYS-*SoSPS1* dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Peta konstruk plasmid pKYS-*SoSPS1* yang mengandung gen *SoSPS1* dan gen *NPTII* yang merupakan gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin (Aswan, 2015)

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah : *autoclave*, timbangan analitik, mikropipet, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), *centrifuge*,

cawan petri, gelas ukur, gelas kaca, *erlenmeyer*, kamera, gunting, pH meter, plastik klip, *cotton bud*, aluminium foil, *beaker glass*, pinset, karet gelang, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, kertas label, pensil, kawat ose, *shaker*, *timer*, *vortex*, *ependorf*, elektroforesis kit, *UV Cabinet*, dan PCR.

Pelaksanaan Percobaan

Konfirmasi keberadaan gen NPTII pada A. tumefaciens

Bakteri dibiakkan dengan cara *di-strike* pada media LB padat yang telah ditambahkan antibiotik kanamisin 50 ppm, rifampisin 100 ppm, dan gentamisin 12,5 ppm, lalu diinkubasi selama 48 jam dengan suhu ruang. *Single colony* yang terbentuk kemudian diamplifikasi pada PCR. Sampel bakteri *A. tumefaciens* setelah PCR, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran agarosa padat lalu di *running* selama 25 menit pada 100 volt. Hasil yang diperoleh kemudian divisualisasi pada *UV cabinet*. Sampel bakteri yang positif mengandung gen *NPTII* selanjutnya digunakan untuk proses transformasi.

Persiapan suspensi A. tumefaciens.

A. tumefaciens strain GV 3101 yang mengandung gen *SoSPS1* distrike pada media LB padat yang mengandung antibiotik rifampisin 100 ppm, kanamisin 50 ppm dan gentamisin 12,5 ppm selama 48 jam. Setelah 48 jam akan terbentuk koloni *A. tumefaciens*. *Single colony* dikultur pada 2 ml media LB cair dengan antibiotik yang sama lalu diinkubasi dalam shaker.

Setelah keruh (OD 0.6), *A. tumefaciens* dikultur kembali dengan cara memindahkan setiap 1 ml kultur dari bakteri *single colony* tersebut pada 20 ml media LB cair dengan antibiotik rifampisin 100 ppm, kanamisin 50 ppm dan gentamisin 12,5 ppm lalu diinkubasi dalam shaker sampai keruh.

Kultur bakteri kemudian disentrifugasi 5000 rpm, selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang, lalu pelet yang dihasilkan disuspensikan pada media ½ MS cair steril tanpa sukrosa ditambah antibiotik rifampisin 100 ppm, kanamisin 50 ppm dan gentamisin 12,5 ppm, acetosyringone 100 ppm, dan Tween 20 hingga volume mencapai 50 ml lalu dicampur kembali sampai homogen. Suspensi bakteri siap digunakan untuk transformasi.

Persiapan tanaman target

Tanaman target yang digunakan adalah bibit tanaman anggur Bali (*Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavalle) yang telah keluar tunas dan berumur kurang lebih 40-50 hari dan telah terbentuk beberapa buku (node) pada tanaman yang akan berfungsi sebagai tempat tumbuhnya tunas baru saat regenerasi. Tanaman target yang digunakan untuk penelitian dipilih tanaman yang sehat.

Infeksi A. tumefaciens pada tanaman target (Inokulasi)

Daun dari tanaman sampel dihilangkan dengan cara dirompes secara berhati-hati agar tidak merusak mata tunas pada bagian node tanaman.

Tanaman sampel kemudian direndam menggunakan suspensi *A. tumefaciens* selama 1 jam, 2 jam, 1 hari dan 2 hari menggunakan plastik klip dengan cara direbahkan.

Pengambilan sampel tanaman kandidat transforman.

Pengambilan sampel yang berupa daun tanaman dilakukan 4 minggu setelah inokulasi agar terjadi proses regenerasi pada tanaman ditandai dengan munculnya tunas dan daun baru pada sampel. Daun tanaman yang digunakan sebagai sampel digunting dan dimasukkan pada plastik klip lalu diberi label sesuai dengan perlakuan yang diberikan.

Isolasi DNA tanaman kandidat transforman

DNA dari tanaman sampel kandidat transforman diisolasi menggunakan metode modifikasi Mini Prep-Method (Zhang and Stewart, 2000) yaitu metode dengan menggunakan sampel yang lebih sedikit, penggerusan secara manual dengan mortar, dan penggunaan bahan kimia yang lebih sedikit.

Analisis PCR dan Elektroforesis

Hasil Isolasi DNA tanaman sampel kemudian di PCR dengan *forward primer NPTII* (5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3') 101, dan *reverse primer NPTII* (5'-

GTCGCTTGGTCCGGTCATTTTC-3') 101. Hasil yang diperoleh kemudian di visualisasi pada *UV cabinet*.

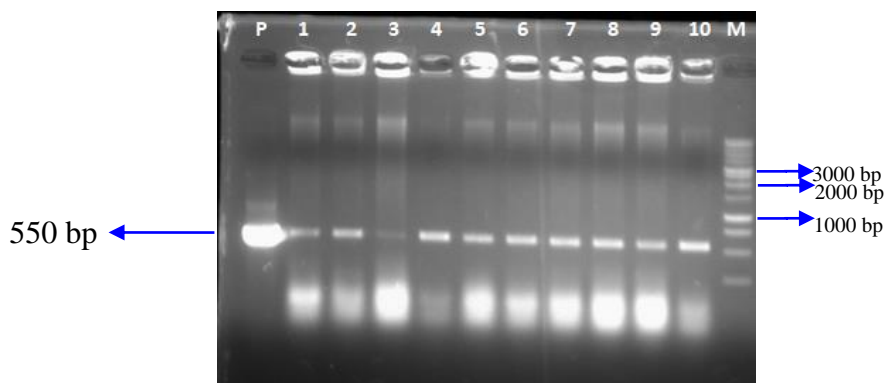
Analisis Data

Data yang didapatkan setelah melakukan penelitian dan pengamatan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA dan PCR pada Bakteri A. tumefaciens

Bakteri *A. tumefaciens* strain GV 3101 didapatkan dari CDAST Universitas Jember yang kemudian digunakan sebagai vektor pembawa gen *SoSPS1* untuk ditransfer ke genom tanaman anggur Bali (*Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavalley). *NPTII* digunakan sebagai gen marker untuk seleksi bakteri *A. tumefaciens* yang mengandung gen *SoSPS1* dengan mikroorganisme lainnya. Hasil konfirmasi gen *NPTII* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil konfirmasi gen *NPTII* pada *A. tumefaciens*. P (Plasmid *pKYS-SoSPS1*), Nomor 1-10 (Sampel *single colony* bakteri yang digunakan) dan M (1 kb DNA ladder Marka)

Berdasarkan hasil isolasi DNA dan analisis PCR yang dilakukan, bakteri *A. tumefaciens* yang digunakan dalam penelitian ini positif mengandung gen *SoSPS1* dengan gen marker *NPTII*. Terbukti dengan teramplifikasinya pita sepanjang 550 bp dari sampel bakteri yang akan digunakan. Analisis PCR pada bakteri diperlukan untuk mengkonfirmasi keberadaan gen target di dalam genom bakteri.

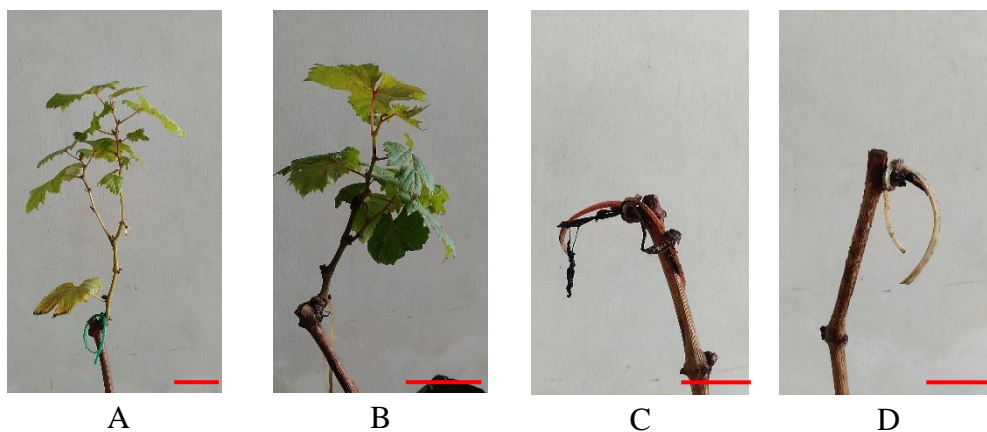
Regenerasi Tanaman Sampel

Regenerasi tanaman merupakan salah satu tahap penting yang menentukan keberhasilan proses transformasi genetik (Purnamaningsih *et al.*, 2005). Dalam upaya untuk memperoleh tanaman transforman kemampuan regenerasi tanaman yang baik diperlukan sebab jika tanaman tidak mampu melakukan regenerasi dengan baik maka tanaman

transforman juga tidak didapatkan dan proses transformasi genetik menjadi gagal.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, tanaman sampel yang mendapatkan perlakuan rompes rendam 1 jam dan 2 jam dapat melakukan regenerasi dengan baik ditandai dengan munculnya tunas dan daun baru yang nantinya digunakan untuk analisis PCR. Regenerasi tanaman sampel setelah 4 minggu dapat dilihat pada Gambar 3.

Sampel tanaman dengan perlakuan rompes rendam 1 hari dan 2 hari tidak mampu melakukan regenerasi. Hal ini ditandai dengan tunas yang terendam berubah warna menjadi kecoklatan setelah selesai diinokulasi dengan suspensi bakteri selama 1 hari dan 2 hari.



Gambar 3. Regenerasi pada sampel tanaman anggur Bali setelah 4 minggu. A (Rompes Rendam 1 Jam), B (Rompes Rendam 2 Jam), C (Rompes Rendam 1 hari), dan D (Rompes Rendam 2 hari)
(Skala = 2 cm)

Perendaman yang terlalu lama dengan menggunakan suspensi *A. tumefaciens* diduga dapat memicu terjadinya pencoklatan (*browning*) pada tanaman sampel,

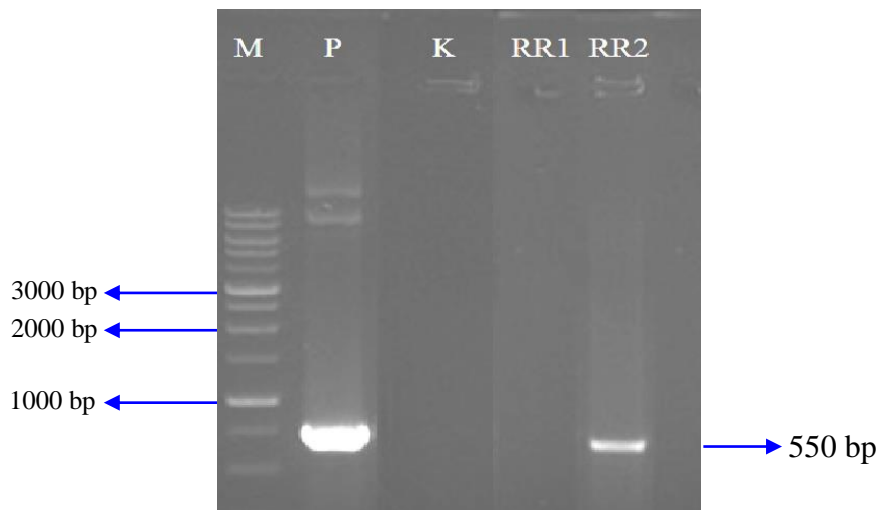
hal ini ditandainya dengan perubahan warna tunas tanaman yang semula berwarna hijau menjadi coklat setelah direndam selama 1 dan 2 hari dengan suspensi bakteri.

Pencoklatan (*browning*) merupakan proses perubahan warna pada tanaman sampel menjadi kecoklatan akibat dari aktifitas senyawa fenolik dalam tanaman. Menurut Dwiyani (2015), senyawa fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada jaringan tanaman dan tereksudasi dari jaringan tanaman akibat luka pada jaringan tanaman. Fungsi dari senyawa fenolik bagi tanaman adalah melindungi tumbuhan dari stres biologi dan lingkungan, selain itu senyawa ini disintesa untuk merespon serangan patogen seperti bakteri dan jamur yang menyerang tanaman (Krisanti, 2014). Perendaman tanaman sampel dengan suspensi *A. tumefaciens* yang terlalu lama serta perompesan daun yang cukup banyak pada tanaman diduga menyebabkan tanaman sampel menjadi stres dan memproduksi senyawa fenolik dalam jumlah yang banyak. Produksi senyawa fenolik yang tinggi menyebabkan tanaman sampel mengalami pencoklatan (*browning*) dan menyebabkan kematian pada tanaman.

Perendaman dengan bakteri yang terlalu lama juga diduga dapat menyebabkan tanaman mengalami reaksi nekrotik hipersensitif. Menurut Kuta and Tripathi (2005) reaksi nekrotik dapat disebabkan karena durasi infeksi pada tanaman yang terlalu panjang. Pada penelitian yang dilakukan, tanaman yang mendapat perlakuan perendaman bakteri selama 1 hari dan 2 hari diduga mengalami peristiwa nekrotik hipersensitif ditandai dengan mengeringnya pucuk tanaman setelah inokulasi. Peristiwa nekrotik hipersensitif pada tanaman sampel ditandai dengan mengeringnya pucuk tanaman setelah inokulasi sehingga tanaman tidak dapat melakukan regenerasi dan akhirnya mengalami kematian.

Isolasi DNA dan Analisis PCR pada Sampel

Proses isolasi DNA menggunakan metode Zhang and Stewart (2000). Dengan metode ini diketahui bahwa DNA yang berasal dari daun tanaman anggur Bali dapat diekstraksi serta dapat dilanjutkan dengan melakukan PCR dan hasil yang diperoleh selanjutnya divisualisasi dengan menggunakan elektroforesis. Hasil PCR dan visualisasi pada sampel dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Hasil PCR dan visualisasi pada sampel, M (1 kb DNA ladder Marka), P (Plasmid *pKYS-SoSPS1*), K (Kontrol), RR1 (Rompes & Rendam 1 Jam), dan RR2 (Rompes & Rendam 2 Jam)

Hasil visualisasi yang telah dilakukan dapat diketahui terdapat 1 dari 3 tanaman sampel yaitu rompes rendam selama 2 jam (RR2) yang positif tersisipi gen *NPTII*. Hal ini ditandai dengan munculnya pita berukuran 550 bp yang merupakan hasil amplifikasi DNA dengan primer untuk gen *NPTII* yakni *forward primer NPTII* (5'-GTCATCTCACCTTGCTCCTGCC-3') dan *reverse primer NPTII* (5'-GTCGCTTGGTCGGTCATTTC-3'). Gen *NPTII* disertakan dalam konstruk gen bersama dengan gen *SoSPS1*. Gen *NPTII* (*Neomycin Phosphotransferase*) merupakan gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin (Amirhusin, 2004). Teramplifikasinya pita sepanjang 550 bp menunjukkan bahwa T-DNA berhasil terinsersi kedalam genom tanaman target.

Dua tanaman sampel yang lain yaitu kontrol (K) dan perlakuan rompes rendam 1 jam (RR1) tidak teramplifikasi pita berukuran 550 bp berdasarkan hasil

visualisasi sehingga dapat disimpulkan pada kontrol (K) dan rompes rendam 1 jam (RR1) tidak terdapat gen *NPTII* pada tanaman. Tidak teramplifikasinya pita sepanjang 550 bp pada kontrol (K) sekaligus membuktikan bahwa tanaman anggur Bali secara alami tidak memiliki gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin. Penggunaan *NPTII* sebagai *selectable marker* untuk metode transformasi genetik pada tanaman anggur Bali dapat dilakukan.

Metode rompes rendam memerlukan waktu yang optimal dalam proses penyisipan gen. Menurut Dwiyani *et al.* (2016b), lama waktu perendaman pada fase inokulasi merupakan salah satu faktor penting dalam transformasi genetik melalui *A. tumefaciens*. Perlakuan rompes rendam 2 jam (RR2) tampak muncul pita sepanjang 550 bp menunjukkan bahwa perendaman tanaman sampel dengan menggunakan suspensi bakteri selama 2 jam mampu menyediakan waktu yang optimal sehingga gen dapat disisipkan ke genom tanaman.

SIMPULAN

1. Metode transformasi *in planta* melalui *A. tumefaciens* pada tanaman anggur Bali (*Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavalley) berhasil dilakukan dengan metode rompes rendam 2 jam (RR2).
2. Perlakuan rompes rendam yang efektif untuk proses transfer gen dan regenerasi tanaman terbaik adalah perlakuan perendaman selama 2 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Amirhusin, B. 2004. PERAKITAN TANAMAN TRANSGENIK TAHAN HAMA. Jurnal Litbang Pertanian 23(1) : 1-7
- Apriana, A., A. Sisharmini, W. Enggarini, Sudarsono, N. Khumaida, dan K. R. Trijatmiko. 2011. Introduksi Konstruksi Over-Ekspresi Kandidat Gen OsWRKY76 melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada Tanaman Padi Nipponbare. Jurnal AgroBiogen 7 (1):19-27
- Astawa, I N. G., N. N. A. Mayadewi, I M. Sukewijaya, N. L. M. Pradnyawathi, dan R. Dwiyani. 2015. Perbaikan Kualitas Buah Anggur Bali (*Vitis Vinifera* L. Var. Alphonso Lavalley) melalui Aplikasi GA3 sebelum Bunga Mekar. AGROTROP, 5 (1): 37 – 42.
- Aswan, M. S. 2015. Transformasi pada Tebu Produk Rekayasa Genetik Event 2 dan 20 dengan Gen untuk Sucrose Phosphate Syntase. Tesis. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember
- Bent, A. F. 2000. Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. Plant Physiol 124 :1540-1547
- Dwiyani, R. 2015. Kultur Jaringan Tanaman. Penerbit : Pelawa Sari. Bali
- Dwiyani, R., H. Yuswanti, I. A. P. Darmawati, dan N. N. A. Mayadewi. 2016a. Transformasi Genetik pada Tanaman Melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Penerbit : Swasta Nulus. Bali.
- Dwiyani, R., H. Yuswanti, I. S. Mercuriani, Dan E. Semiarti. 2016b. Transformasi Gen Pembungaan melalui *Agrobacterium tumefaciens* Secara In-Vitro pada Tanaman Anggrek *Vanda tricolor*. AGROTROP, 6 (1): 83 - 89
- Dwiyani, R., A. Purwantoro, A. Indrianto, dan E. Semiarti. 2012. Peranan Vitamin C dan Acetosyringone pada Transformasi Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Bionatura-Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik. 14(3): 215-220.
- Hidayati, Rr. S. 2014. Uji Penggunaan Jumlah Mata Tunas dan Media Tanam pada Pembibitan Tanaman Anggur (*Vitis vinifera*) Varietas Prabu Bestari. Agrotechbiz,1(1):1-12.
- Kalbande, B. B. and A. S. Patil. 2016. Plant tissue culture independent *Agrobacterium tumefaciens* mediated In-plant transformation strategy for upland cotton (*Gossypium hirsutum*). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 14:9–18
- Krisanti, L. 2014. Pemberian Ekstrak Anggur (*Vitis Vinifera*) Oraldapat Mencegah Kenaikan Berat Badan Dan Lemak Abdominal Pada Tikus Wistar Jantan Yang Diberi Diet Tinggi Karbohidrat Dan Lemak. Tesis. Program Pasca Sarjana, Universitas Udayana
- Kuta, D. D. and L. Tripathi. 2005. *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer.

African Journal of Biotechnology 4
(8) : 752-757

- Nuraida, D. 2012. Pemuliaan Tanaman Cepat Dan Tepat Melalui Pendekatan Marka Molekuler. El-Hayah 2 (2):97-103
- Purnamaningsih, R., I. Mariska, dan S. Hutami. 2005. Regenerasi Tanaman Pepaya Hasil Transformasi Dengan Gen Acc Oksidase Antisense. Berita Biologi 7 (5):233-240
- Rai, I N., G. Wijana, I P. Sudana, I W. Wiraatmaja, dan Cok. G. A. Semarang. 2016. Buah – Buah Lokal Bali. Penerbit : Pelawa Sari.
- Satria, D. B. R., B. Sugiharto dan D. P. Restanto. 2015. Transformasi Gen *SoSPS1* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens* dan Eksplan Tunas Apikal Padi Indica cv. Inpari 14 SS. Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa.
- Zhang, J. and J. McD. Stewart. 2000. Molecular Biology Economical and Rapid Method for Extracting Cotton Genomic DNA. The Journal of Cotton Science 4 : 193-201