

Transformasi Genetik Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) dengan Gen *acvB* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*

DARWIN SILALAH^{*)}, I GEDE PUTU WIRAWAN, DAN MADE SRITAMIN

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana

Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali 80232

^{*)}E-mail: dsilalahi331@gmail.com

ABSTRACT

***Agrobacterium tumefaciens* Mediated Genetic Transformation of *acvB* Gene in Potato (*Solanum tuberosum* L.).** Genetic transformations are now routinely applied to plant mediated by *Agrobacterium tumefaciens* as the most convenient technique. This study aimed to prove the success of *A. tumefaciens* mediated genetic transformation in potato. *A. tumefaciens* LBA (*pBI 121*) and explant of potato shoot were used in this study. Explants were grown *in vitro* on Murashige and Skoog media. Transformation was implemented using smear technique by smearing *A. tumefaciens* to injured explant. Experimental groups consisted of two groups: control group which did not receive transformation treatment and treatment group receiving transformation treatment. Explant growth was observed through the presence of shoots, branches and the shoot height. Explants in the treatment group resulted in a higher number of shoots, branches, and shoot heights compared to control. Phenol compounds appear in explant epidermal tissue, indicating the wounds produced by *A. tumefaciens* infection, thus the gene predicted to be transformed. Identification by PCR is needed to prove the existence of the *acvB* gene in potato plants genome, using *acvB* specific PCR primer as the marker, such as (5'-CCCT CTAG AGAC CCGC GCCA AGGCG-3') and (5'CGCG TCGA CCTT GTCG GAAAG -3') with 540-bp in base pair size produced.

Keywords: *in-vitro*, transformation, smear technique, *acvB*

PENDAHULUAN

Transformasi genetik digunakan secara luas untuk mempelajari fisiologi, genetik dan perkembangan biologi tanaman. *Agrobacterium tumefaciens* banyak sekali digunakan untuk melakukan transformasi

genetik tanaman. Transformasi dengan bakteri ini mempunyai keuntungan diantaranya adalah efisiensi transformasi tinggi, jumlah salinan gen sedikit yang tersisip ke dalam genom tanaman, dan dapat

DARWIN SILALAHI et al. Transformasi Genetik Tanaman Kentang (*Solanum...*

mentransferkan gen berukuran besar (Hiei & Komari, 2008).

Kentang merupakan tanaman pangan bernilai ekonomi tinggi yang dapat mendatangkan keuntungan bagi pengusaha industri makanan olahan, pedagang, dan petani yang membudidayakannya, sehingga tanaman kentang dianggap salah satu komoditas penting di dalam negeri dan diekspor. Mendukung pengembangan kualitas tanaman kentang diperlukan benih bermutu dan dalam program pembenihan kentang, penggunaan benih bebas patogen mutlak diperlukan. Benih tersebut dapat diperoleh melalui kultur jaringan disertai dengan pengujian patogen secara intensif dan dilanjutkan dengan teknik perbanyakan cepat secara *in vitro*.

Menurut Duriat (1987) upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produktivitas kentang dengan teknik mikropropagasi yaitu pemanfaatan teknik kultur jaringan tanaman untuk perbanyakan tanaman. Keuntungan perbanyakan tanaman kentang melalui kultur jaringan dibandingkan dengan metode lain adalah dapat menghasilkan tanaman bebas penyakit (Nematoda parasit, mikoplasma, viroid, virus, dan jamur) serta membuat variasi genetik. Hal ini karena cendawan dan bakteri dapat berkembang dengan cepat dalam

kondisi *in vitro*, sehingga hanya tanaman yang benar-benar bersih (bebas cendawan dan bakteri) yang dipelihara (Zulkarnain *et al.*, 2005).

Kultur jaringan adalah suatu metode untuk memperbanyak tanaman dengan menggunakan bagian tanaman seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan dan organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik atau steril hingga bagian-bagian tersebut dapat berkembang dan beregenerasi menjadi tanaman lengkap (Gunawan, 1987).

Teknik ini sangat membantu dalam usaha mengeliminasi patogen (penyakit sistemik), dengan metode kultur jaringan dapat dipilih bagian-bagian atau sel-sel yang tidak mengandung patogen sistemik terutama virus dan menumbuhkan sel-sel (bagian) tanaman tersebut serta meregenerasikannya kembali menjadi tanaman sempurna dan sehat.

Gamborg dan Skyluk dalam Biondi & Thorpe (1981) menyatakan bahwa keberhasilan dalam teknologi dan aplikasi metode kultur jaringan erat dengan penyediaan hara yang mencukupi dan sesuai dengan kultur sel ataupun jaringan. Hal yang terpenting dalam menentukan keberhasilan kultur jaringan, yaitu sterilisasi alat, kualitas eksplan, dan media kultur yang digunakan

(Roca *et al.* 1978; Goodwin 1980) *A. tumefaciens* merupakan bakteri patogen yang banyak digunakan untuk memasukkan gen asing ke dalam sel tanaman untuk menghasilkan suatu tanaman transgenik. Secara alami, *A. tumefaciens* dapat menginfeksi tanaman dikotil melalui bagian tanaman yang terluka sehingga menyebabkan tumor (*crown gall*). Bakteri yang tergolong dalam gram negatif ini memiliki sebuah plasmid besar yang disebut plasmid-Ti yang berisi gen penyandi faktor virulensi penyebab infeksi bakteri ini pada tanaman. Untuk memulai pembentukan tumor *A. tumefaciens* harus menempel terlebih dahulu pada permukaan sel inang dengan memanfaatkan polisakarida yang akan digunakan untuk mengkolonisasi atau menguasai sel tanaman.

Rekayasa genetika digambarkan sebagai ilmu dimana karakteristik suatu organisme yang sengaja dimodifikasi dengan manipulasi materi genetik, terutama DNA dan transformasi gen tertentu untuk menciptakan variasi yang baru, dengan memanipulasi DNA dan memindahkannya dari suatu organisme ke organisme lain (disebut teknik rekombinan DNA), memungkinkan untuk memasukkan sifat pada hampir semua organisme pada tanaman, bakteri, virus atau hewan.

Organisme transgenik saat ini diproduksi massal, seperti enzim, antibodi monoklonal, nutrient, hormon dan produk farmasi yaitu obat dan vaksin (Campbell, 1996).

Gen *acvB* merupakan gen virulen kromosom baru. Penelitian homologinya mengungkapkan bahwa homolog gen *acvB* berfungsi dalam *A. tumefaciens* dan tidak ditemukan dalam bakteri lainnya. *A. tumefaciens* mampu mentransfer DNA ke dalam sel tanaman, sementara bakteri lain yang diuji dalam studi tidak mampu mentransfer DNA ke dalam sel tanaman. Akibatnya, distribusi gen *acvB* yang seperti ini menunjukkan bahwa gen *acvB* terlibat dalam proses transfer DNA pada sel tanaman. Gen *acvB* digunakan sebagai indikator, oleh karena itu, perlu diadakan pengujian mengenai respon pada tanaman kultur kentang secara *in vitro* terhadap transformasi genetik dengan menggunakan *A. tumefaciens*.

Penelitian ini dilakukan untuk menghasilkan metode transformasi gen pada tanaman (*Solanum tuberosum* L.) dan menghasilkan tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) transgenik melalui kultur *in vitro* yang membawa gen *acvB*. Penelitian ini dapat memberikan sumbangan dalam ilmu pengetahuan mengenai Transformasi Genetik Kentang (*Solanum tuberosum* L.)

DARWIN SILALAH I et al. Transformasi Genetik Tanaman Kentang (*Solanum...*

dengan Gen *acvB* melalui perantara *A. tumefaciens*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan sejak Desember 2019 sampai Maret 2020. Penelitian di Laboratorium Sumberdaya Genetika dan Molekuler Universitas Udayana.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas timbangan digital, magnetik stirrer, autoklaf, microwave/oven, *Laminar Air Flow Cabinet*, inkubator, mesin vortex, water bath, pestle, PCR tube, transiluminator UV, mesin elektroforesis, kertas parafilm, spatula, kertas label, kamera digital, gelas ukur, gelas beker, gelas labu erlenmeyer, botol kultur, pinset, gunting, skalpel, mortar, mikropipet, tissue, api bunsen, cawan petri, sentrifus, sprayer dan eppendorf (tabung mikro).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas eksplan yaitu jaringan meristem pada tunas umbi kentang, aquades, media LB, gellan gum, sucrosa, klorox 10%, detergen, benlate, alkohol 70%, natrium hipoklorit, Tween, Agarose, TAE 100 ml, Gen *acvB* pada DNA.

Sumber eksplan umbi kentang diambil dari Unit Sayur Mayur Perusahaan Daerah Provinsi Bali, umbi yang dipilih adalah besar

dan tidak bergejala penyakit. Umbi didiamkan tumbuh dalam wadah, tunas yang tumbuh diambil untuk eksplan.

Sterilisasi Eksplan

Eksplan tanaman dimasukkan ke dalam klorox dengan mengaduk atau digoyang-goyangkan ± 5 menit. Bilas eksplan tanaman ke dalam air steril dengan mengaduk ± 1 menit. Dipindahkan eksplan tanaman ke dalam alkohol dengan mencelupkan eksplan selama 3 detik, dan disterilkan kembali ke dalam air steril. Eksplan yang sudah steril kemudian direndam dalam larutan betadine (5 ml aquades + 1 tetes betadine) dan digoyang-goyangkan.

Sterilisasi Alat dan Bahan dan Ruang Inokulasi

Botol kultur, pinset dan cawan petri yang digunakan dicuci dengan bersih menggunakan detergen. Kemudian dikeringkan. Setelah kering cawan petri dibungkus rapi menggunakan kertas, pinset skapel dibungkus menggunakan aluminium foil, kemudian diautoclave selama 15 menit dengan suhu 121° C. Ruang inokulum dan *Laminar Air Flow* yang akan digunakan dibersihkan dengan menyemprotkan 70% keseluruhan dinding dan alasnya kemudian

LAF dikeringkan menggunakan tissue, kemudian lampu ultraviolet dihidupkan dan didiamkan selama 30-60 menit.

Pembuatan Media

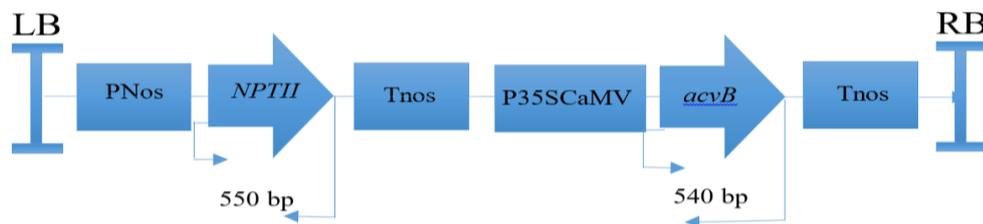
Untuk 100 ml, stock MS dibutuhkan 2,5 gr/ml, agar 1,5 gr/100 ml dan 2 gr sukrosa. Stock vitamin yang digunakan terdiri dari 100 mg/ml myoinositol, 10 mg/ml thiamine- HCL, 1 mg/ml nicotinic acid, 1 mg/ml pyridoxine-H. Media LB agar dibuat dengan melarutkan 1,5 g agar dan 100 ml media LB cair dengan magnetik stirrer

sehingga homogen, kemudian di autoklaf 15 menit pada suhu 121°C.

Kultur Bakteri *A. tumefaciens*

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Agrobacterium tumefaciens* LBA (pBI 121 + acvB) yang berasal dari kultur stok gliserol dengan suhu pendinginan -80°C. Bakteri dikulturkan pada media luria bertani (LB), yaitu media khusus untuk menumbuhkan gram negatif. Kultur dilakukan dengan menggunakan dua metode yaitu metode gores dan metode tusuk.

Konstruksi gen



Gambar 1. Peta Konstruksi T-DNA pada plasmid pBI 121 -acvB.

Plasmid pBI 121-acvB dengan konstruksi T-DNA mengandung *left border* (LB), *promotor noplina synthase* (PNos), *neomycin phosphotransferase* (NPTII), *terminator noplina synthase* (TNos), *promotor CaMV* (P35SCaMV), *acvB*, dan *right border* (RB) sebagai batas bagian T-DNA.

Konstruksi gen memiliki LB (*left border*) dan RB (*right border*) yang merupakan jembatan antar gen, setiap konstruksi memiliki marka penanda yang berfungsi sebagai penanda bahwa indikator gen itu sudah masuk atau belum pada saat proses PCR yang menjadi penanda keberhasilan. Dalam konstruksi penanda

DARWIN SILALAH et al. Transformasi Genetik Tanaman Kentang (*Solanum...*

terdapat dua gen, yaitu gen marka dan gen interest (*acvB*). Setiap gen mempunyai kaset sekuensing dari kaset awal (*promotor*) dan kaset sekuensing (*terminator*). NPTII (*neomycin phosphotransferase*) digunakan karena menggunakan *kanamisin*, biasanya digunakan TNos (*terminator noplone synthase*) dan gen interest yang ada di *Agrobacterium tumefaciens* (gen *acvB*) biasanya digunakan P35SCaMV (*promotor CaMV*) sebagai ketahanan tanaman dan penutup tetap menggunakan TNos (*terminator noplone synthase*).

Transformasi Kentang dengan Gen *acvB*

Proses transformasi secara *in vitro* pada penelitian ini terdapat dua perlakuan yaitu (1) Eksplan yang tidak diinokulasikan dengan *Agrobacterium tumefaciens*, (2) Eksplan yang diinokulasikan dengan *Agrobacterium tumefaciens*. Eksplan di olesi dengan koloni *A.tumefaciens*, kemudian eksplan dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali, selanjutnya eksplan yang diberi perlakuan ditanam pada media kultur *in vitro* yaitu media MS.

Isolasi DNA *A. tumefaciens*

Isolasi total DNA *A.tumefaciens* menggunakan DNA Mini Kit. Koloni bakteri yang sudah tumbuh dengan

menggunakan metode tusuk diambil dari cawan petri dan ditumbuhkan pada 2 ml media LB cair, kemudian inkubasi pada shaker dengan penggoyangan 10 rpm selama 18-24 jam. Bakteri diinkubasi pada suhu 37°C dalam keadaan ruangan gelap. Bakteri yang berhasil tumbuh dipindahkan ke dalam eppendorf tube, lalu disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm dan dibuang supernatannya. Pellet yang ada ditambahkan 400 µl GP1 buffer dan di vortex, kemudian diinkubasi pada 60°C selama 10 menit. Ditambahkan 100 µl GP2 buffer dan di vortex, kemudian ditambahkan 750 µl GP3 buffer dan di vortex. Setelah semua tercampur kemudian didiamkan selama 5 menit. Disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm sampai terbentuk pellet pada eppendorf tube. Cairan yang terdapat pada eppendorf disebut supernatant dan dimasukkan pada GD colum dan ditambahkan 400 µl W1 buffer serta di vortex. GD colum di tempatkan dalam collection tube, disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm. Dibuang cairannya dan GD colum ditempatkan pada eppendorf lalu ditambahkan 15 µl Elution buffer di tengah GD colum lalu didiamkan 3-5 menit. Disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14.000-16.000 rpm. Cairan

sebanyak 15 µl yang tertampung pada eppendorf tube adalah DNA dan di simpan pada suhu -20°C (Wirawan & Supartana, 2009).

Pengamatan Tanaman Kentang Hasil Kultur Jaringan secara *in vitro* secara visual

Transformasi tanaman kentang secara kultur *in vitro* diberikan dua perlakuan yaitu eksplan yang diinokulasikan dengan *A. tumefaciens* dan tidak diinokulasikan dengan *A. tumefaciens*, eksplan tersebut diamati selama 9 HST dan 20 HST, dimana eksplan tersebut menghasilkan jumlah tunas, jumlah cabang, dan tinggi tunas yang berbeda. Eksplan yang diinokulasi dengan bakteri terlihat bahwa ada fenolik di sekitar tempelan, dan eksplan yang tidak diinokulasi dengan bakteri tidak adanya fenolik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Bakteri *A. tumefaciens* pada Media LB

Hasil pengamatan yang telah dilakukan dalam tahap awal penelitian ini, dapat dilihat pada Gambar 2. bahwa pengamatan selama 48 jam ditemukan pertumbuhan koloni bakteri secara mengelompok dan koloni bakteri tunggal didapat pada alur goresan. Koloni bakteri tunggal yang tumbuh kemudian dipindahkan ke media LB yang baru untuk diperbanyak. Faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan *Agrobacterium* adalah ketepatan nutrisi dan kesesuaian suhu. Brown (2006) mengatakan media luria bertani (LB) memiliki kandungan *yeast ekstrak*, NaCl, *tryotone* dan NaOH 1 N. Bakteri diinkubasi pada suhu 28°C-36°C selama 2-3 hari.

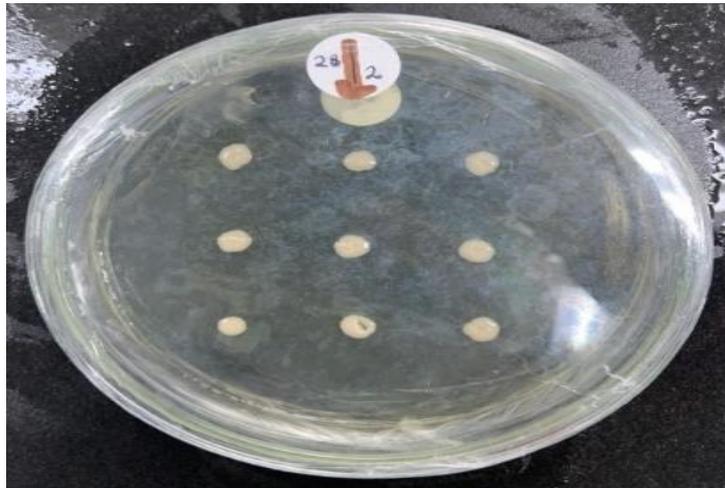


Gambar 2. Pertumbuhan koloni *A. tumefaciens* LBA (pBI 121 + acvB) dengan Metode Gores.

DARWIN SILALAH *et al.* Transformasi Genetik Tanaman Kentang (*Solanum...*

Pertumbuhan *A. tumefaciens* pada media LB terdapat 9 koloni yang telah disubkultur menggunakan metode tusuk dan berbentuk koloni tunggal yang tumbuh baik pada media LB padat. Manalu *et al.* (2014), menyatakan bakteri *A. tumefaciens* LBA

(pBI 121 + acvB) mempunyai ciri-ciri berbentuk bulat, permukaan cembung, tepi koloni rata dan berwarna krem. Hal ini membuktikan adanya pertumbuhan *A. tumefaciens* yaitu pada media LB, dapat dilihat pada Gambar 3.



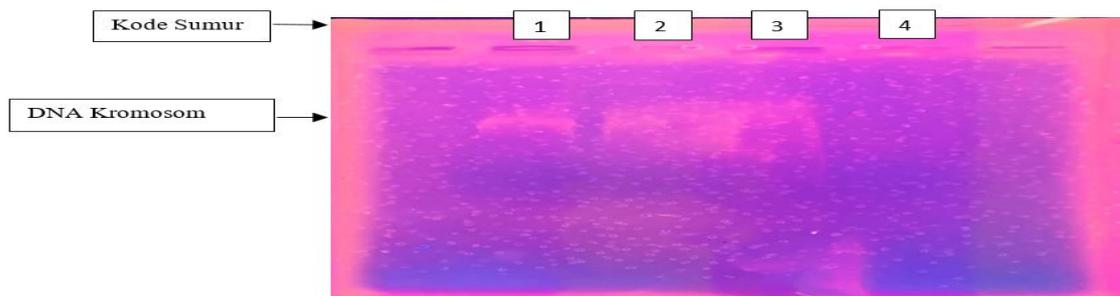
Gambar 3. Pertumbuhan koloni *Agrobacterium tumefaciens* LBA (pBI 121 + acvB) pada media LB dengan menggunakan Metode tusuk

Bakteri yang tergolong kedalam gram negatif ini memiliki sebuah plasmid yang besar yang disebut plasmid-Ti yang membawa gen penyandi faktor virulensi penyebab infeksi bakteri ini pada tanaman. Untuk memulai pembentukan *A. tumefaciens* harus menempel terdahulu pada permukaan sel inang dengan memanfaatkan polisakarida yang dibutuhkan tanaman

kemudia akan digunakan untuk mengkolonisasi atau menguasai sel tanaman (Silitonga *et al.*, 2014).

Hasil Isolasi Total DNA

Hasil penyinaran di bawah lampu UV dapat dilihat pada Gambar 4. Pada penelitian ini konsentrasi gel agarose yang digunakan adalah 1 % menggunakan larutan TAE 1X.



Gambar 4. Sumur 1,2,3 dan 4 merupakan hasil visualisasi total DNA bakteri *Agrobacterium tumefaciens* pada elektroforesis gel agarose 1%.

Hasil isolasi pada sumur/well 1 bahwa *A. tumefaciens* LBA (pBI 121 + acvB) memiliki pita yang terlihat tebal dan jelas atau terang. Pita tebal dan terang secara kualitatif mengindikasikan konsentrasi hasil isolasi DNA yang dihasilkan tinggi. Hal ini membuktikan bahwa saat isolasi DNA kromosom tidak terikat pada *buffer*. Sedangkan pada sumur/well ke 2 dan 3 yaitu *A. tumefaciens* mempunyai ketebalan yang kurang pekat. Sehingga DNA terlihat blur atau kabur atau noise. Pita yang terlihat buram atau noise mengindikasikan konsentrasi DNA yang dihasilkan kecil. Dan pada sumur ke 4 yaitu *A. tumefaciens* LBA (pBI 121 + acvB) tidak terlihat saat di elektroforesis, hal ini mengindikasikan bahwa kegagalan tersebut disebabkan karena stok bakteri yang ada tidak *viable* lagi.

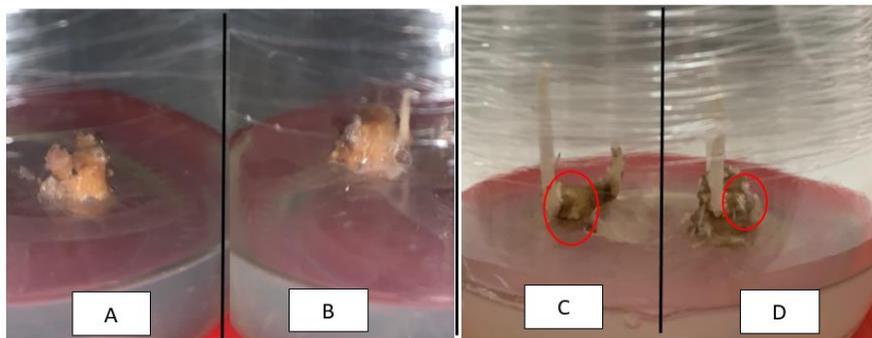
Kultur Tanaman Kentang Hasil Transformasi Menggunakan Metode Kultur Tunas

Penelitian ini dilakukan dengan dua perlakuan yaitu (1) Eksplan yang tidak diinokulasikan dengan *A. tumefaciens* (kontrol), (2) Eksplan yang diinokulasikan dengan *A. tumefaciens*. Masing-masing menggunakan dua eksplan tiap perlakuan. seperti pada Gambar 5. Eksplan tersebut menghasilkan jumlah tunas, jumlah cabang, dan tinggi tunas yang berbeda. Penelitian ini dilakukan dengan dua perlakuan yaitu (1) Eksplan yang diinokulasikan dengan *A. tumefaciens* (kontrol), (2) Eksplan yang diinokulasikan dengan *A. tumefaciens*. Masing-masing menggunakan dua eksplan tiap perlakuan. seperti pada Gambar 5. Eksplan tersebut menghasilkan jumlah tunas, jumlah cabang, dan tinggi tunas yang berbeda. Berdasarkan Gambar 5. terlihat bahwa

DARWIN SILALAHI *et al.* Transformasi Genetik Tanaman Kentang (*Solanum...*

pertumbuhan tunas eksplan A tidak memunculkan tunas dengan baik pada 9 HST (Hari Setelah Tanam). Pada eksplan B sudah memunculkan tunas pada eksplan. Pertumbuhan eksplan C terlihat

pertumbuhan yang baik dikarenakan sudah memunculkan 3 tunas baru, sedangkan eksplan D terlihat bahwa 4 tunas sudah tumbuh dengan baik.



Gambar 5. Perkembangan eksplan tanaman kentang yang tidak diinokulasikan dan diinokulasikan dengan *A. tumefaciens* yang mengandung *acvB* di media seleksi yaitu media MS selama 9 HST. (A dan B) Eksplan yang tidak diinokulasikan dengan *Agrobacterium* pada media seleksi. (C dan D) Eksplan yang diinokulasikan dengan *Agrobacterium* dengan media seleksi

Pengaplikasian transformasi genetik dengan menggunakan Metode oles, yaitu dengan mengolesi satu koloni *A. tumefaciens* yang membawa gen *acvB* ke eksplan tanaman kentang selanjutnya dilakukan pengamatan pada tanaman kultur *in vitro*. Data ekspresi tersebut menunjukkan bahwa sebagian jaringan eksplan terinfeksi *Agrobacterium* (Gambar 5. pada C dan D yang dilingkarkan merah) mengeluarkan fenolik yang menunjukkan bahwa infeksi diduga telah masuk dalam jaringan dan diindikasikan bahwa gen itu juga masuk ke dalam sel tanaman. *A. tumefaciens*

menempel pada eksplan kentang yang terluka karena tanaman tersebut mengeluarkan molekul sinyal berupa senyawa-senyawa fenolik, seperti *acetosyringone*. Senyawa-senyawa fenolik ini akan mengaktifkan gen *vir* yang terdapat di dalam Ti-plasmid, yang bertanggung jawab untuk mentransfer T-DNA dari *A. tumefaciens* menuju sel inangnya (tanaman).

Pada tanaman dikotil, senyawa-senyawa fenolik akan merangsang *A. tumefaciens* untuk menempel dan mentransfer T-DNA. Sehingga untuk lebih lanjut untuk mengetahui teramplifikasi atau tidak gen

tersebut yaitu dengan menggunakan tahap molekuler yaitu PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Infeksi merupakan salah satu tahap dalam proses transfer gen dengan menggunakan *Agrobacterium*. Dalam proses infeksi, ruas T-DNA dipindahkan dari sel bakteri *Agrobacterium* ke dalam sel tanaman.

Fragmen DNA NPTII–Gus dipotong menjadi DNA satu rantai (ssDNA) yang kemudian pada ujung 5' dari ssDNA tersebut berikatan protein *virD2* dan *virE2* menjadi selubungnya (coat protein). Kompleks DNA protein ini disebut T-kompleks yang akan bergerak, dimana pada protoplasma prion *acvB* akan berikatan pada kompleks ini dan mentransfernya keluar sel *A. tumefaciens* dan masuk kedalam sel tanaman. Pada plasmid pBI121, gen GUS diganti dengan gen *acvB*. Keberadaan gen *acvB* berperan dalam proses transfer DNA kedalam sel inang.

Berdasarkan Gambar 6, eksplan tanaman kentang menghasilkan keberhasilan pertumbuhan yang berbeda-beda. Pengamatan selama 20 HST terdapat kontaminan pada sumber eksplan kentang A

yang disebabkan oleh bakteri. Sumber kontaminan yang disebabkan oleh bakteri menunjukkan ciri-ciri terbentuknya lapisan lendir berwarna putih dan lendir berwarna putih kecoklatan di bagian permukaan media yang terkontaminasi. Kontaminasi disebabkan oleh banyak hal salah satunya adalah kondisi laboratorium yang kurang steril. Selain itu tempat inkubasi yang dianggap bersih, sebenarnya tidak steril. Ditambah banyaknya mahasiswa sering membuka inkubator yang menyebabkan suhu pada inkubator tidak kontinyu. Eksplan B mengalami pertumbuhan tunas serta mengalami kontaminan pada media. Sedangkan pada eksplan C menunjukkan pertumbuhan tanaman dengan baik dan memperbanyak tunas yang baru, pada beberapa tunas tersebut mengalami perubahan warna pada ujung tunas menjadi kecoklatan (*Browning*) yang kemungkinan terjadi karena faktor cahaya, pencoklatan dapat berkurang dan dapat dihindari dengan perlakuan ruang gelap. Eksplan D menunjukkan fisiologi tanaman tumbuh dan berkembang dengan sangat bagus.



Gambar 6. Perkembangan eksplan tanaman kentang yang tidak diinokulasikan dan diinokulasikan dengan *A. tumefaciens* yang mengandung *acvB* di media seleksi yaitu media MS selama 20 HST. (A) Eksplan yang mengalami kontaminan. (B) Eksplan tumbuh dan mengalami kontaminan (C) Ekplan tumbuh dan mengalami *Browning* (D) Eksplan tumbuh dengan baik

SIMPULAN

Kultur *in vitro* tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L) dapat tumbuh dengan baik. Eksplan tanaman kentang yang ditanam pada media MS (Murashige and Skoog) menghasilkan jumlah tunas, jumlah cabang, dan tinggi tunas yang berbeda. Data ekspresi tersebut menunjukkan bahwa sebagian jaringan eksplan terinfeksi (*A. tumefaciens*) mengeluarkan fenolik yang menunjukkan bahwa infeksi diduga telah masuk dalam jaringan dan diindikasikan bahwa transformasi telah terjadi. Eksplan yang diinokulasi dengan bakteri terlihat bahwa ada fenolik di sekitar tempelan, dan eksplan yang tidak diinokulasi dengan bakteri tidak adanya fenolik.

DAFTAR PUSTAKA

- Biondi, S., & Thorpe, T. A. (1981). *Requirements for a tissue culture facility*. In: Thorpe TA (Ed) *Plant Tissue Culture — Methods and Applications in Agriculture*. Academic Press.
- Brown, T. A. (2006). *Gene Cloning & DNA analysis: An Introduction, 5th Edition*. Wiley-Blackwell.
- Campbell, P. O. Q. (1996). Super foods: agricultural products and genetic engineering. *Biology Digest*, 1(23), 10–17.
- Duriat, A. S. (1987). Heat Treatment as a Mean Eliminating Potato Leaf Roll Virus from Seed of Potato. *Prosiding Mes Elevation Potato Seminar*.
- Goodwin, P. B. (1980). Methods for rapid propagation of potato. *Paper Presented in the Symposium at Potato Production in the Tropic*.
- Gunawan, L. W. (1987). *Teknik Kultur Jaringan Tumbuhan. Lab. Kultur Jaringan Tumbuhan. Lab. Kultur Jaringan Tumbuhan. Pusat Antar Universitas (PAU). Bioteknologi*.

IPB.Bogor.

- Hiei, Y., & Komari, T. (2008). Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocols*, 3(5), 824–834.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.46>
- Manalu, Y. H., Wirawan, I. G. P., & Susrama, I. G. K. (2014). Isolasi dan Identifikasi Agrobacterium tumefaciens dari Tanaman Wortel (*Daucus carota* L.). *Jurnal Agroekoteknologi Tropika (Journal of Tropical Agroecotechnology)*, 3(3), 119–127.
- Roca, W. M., Espinoza, N. O., Roca, M. R., & Bryan, J. E. (1978). A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes. *American Potato Journal*, 55(12), 691–701.
<https://doi.org/10.1007/BF02852143>
- Silitonga, N., Wirawan, I. G. P., & Susrama, I. G. K. (2014). Isolasi dan Identifikasi Agrobacterium Tumefaciens pada Tanaman Mawar (*Rosa* sp.). *Jurnal Agroekoteknologi Tropika (Journal of Tropical Agroecotechnology)*, 3(3), 166–175.
- Wirawan, I. G. P., & Supartana, P. (2009). *Bioteknologi Agrobacterium tumefaciens (Isolasi gen acvB, transformasi in planta dan produksi tanaman transgenic*. Udayana University Press.
- Zulkarnain, Ichwan, B., & Astuti, R. (2005). Mikropropagasi kentang (*Solanum tuberosum* L.) cv. Granola: Pengaruh periode gelap pada awal kultur dan pengaruh konsentrasi kinetin pada kultur lanjutan. *Jurnal Agronomi*, 9(1), 5–8.