

## Transformasi kopi robusta (*Coffea canephora*) dengan gen kitinase melalui *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

*Transformation of robusta coffee (Coffea canephora) with chitinase gene mediated by Agrobacterium tumefaciens LBA4404*

SISWANTO<sup>1)</sup>, Fetrina OKTAVIA<sup>1)</sup>, Asmini BUDIANI<sup>1)</sup>, SUDARSONO<sup>2)</sup>, PRIYONO<sup>3)</sup> & Surip MAWARDI<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

<sup>2)</sup> Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>3)</sup> Pusat Penelitian Kopi dan Kakao, Jember, Indonesia

### Summary

Genetic engineering of robusta coffee for resistance to pathogenic fungi is considered to be one of the potential approaches to overcome the problem at robusta coffee plantation caused by pathogenic fungi. This research was aimed to introduce chitinase (CHI) gene into embryogenic calli of robusta coffee and regenerate the plantlets. Embryogenic calli were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 harboring pCAMBIA1301 which contains chitinase gene under 35S promoter. In this research four concentrations (0, 50, 100 and 150 mg/L) of acetosyringone (AC) were used in the co-cultivation medium. Selection for transformed calli was conducted by gradually increasing the concentration of hygromycin from 5 to 25 mg/L. Somatic embryo (SE) was induced from callus on the medium containing a combination of BAP 5 mg/L and IAA (0, 0.25 or 0.50 mg/L). Integration CHI in plant genome was examined by GUS assay and PCR. The result revealed that among the four AC concentrations tested, 100 mg/L gave the highest percentage of calli growing on the selection medium (42.5%). BAP concentration of 5 mg/L alone was the most effective for inducing of SE from transformed calli with the highest percentage of 43.1% and average number SE of  $8.8 \pm 3$ . The strongest

GUS expression on the calli at 3 days after transformation and the calli grown on selection medium containing 150 mg/L AC, which were 56.5% and 40% respectively. PCR analysis showed that 7 out of 12 plantlets tested, contained CHI gene. From this research 28 transgenic plantlets of robusta coffee were obtained.

[Keywords: Robusta coffee, *Coffea canephora* embryogenic callus, chitinase gene]

### Ringkasan

Rekayasa genetika untuk merakit tanaman kopi robusta tahan jamur patogen dipandang merupakan salah satu pendekatan alternatif yang potensial untuk mengatasi masalah pada perkebunan kopi robusta akibat serangan jamur patogen. Penelitian ini bertujuan untuk meng-introduksikan gen kitinase (CHI) ke dalam kalus embriogenik kopi robusta dan regenerasinya menjadi planlet, sebagai upaya untuk merakit tanaman kopi robusta tahan serangan jamur. Kalus embriogenik diko-kultivasi dengan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 pembawa pCAMBIA1301 yang mengandung gen kitinase di bawah kontrol promotor 35S. Pada percobaan

ini, empat konsentrasi asetosiringon (AS) (0, 50, 100 dan 150 mg/L) digunakan dalam medium ko-kultivasi. Seleksi kalus hasil transformasi dilakukan dengan peningkatan konsentrasi higromisin secara bertahap dari 5 mg/L sampai 25 mg/L. ES diinduksi dari kalus pada medium yang mengandung BAP 5 mg/L dan IAA (0; 0,25 dan 0,50 mg/L). Integrasi gen *CHI* ke dalam genom tanaman dianalisis melalui uji GUS dan PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari keempat konsentrasi AS yang diuji, AS 100 mg/L ternyata menghasilkan persentase tertinggi kalus yang tumbuh pada medium seleksi (42,5%). Konsentrasi BAP 5 mg/L tanpa penambahan IAA efektif menginduksi ES dari kalus hasil transformasi dengan persentase tertinggi 43,1% dan rata-rata jumlah ES  $8,8 \pm 3$ . Ekspresi *GUS* tertinggi dideteksi pada kalus tiga hari setelah transformasi dan kalus yang tumbuh di medium seleksi yang mengandung AS 150 mg/L, masing-masing 56,5% dan 40,0 %. Analisis PCR menunjukkan bahwa 7 planlet dari 12 planlet yang diuji, membawa gen *CHI*. Dari penelitian ini dihasilkan 28 planlet kopi robusta transgenik.

### Pendahuluan

Salah satu masalah utama dalam pengembangan tanaman kopi robusta adalah kepekaannya terhadap berbagai jenis penyakit, seperti penyakit busuk akar yang disebabkan oleh jamur *Fomes lamoensis*. Serangan penyakit ini dilaporkan dapat menurunkan hasil sampai 70% (Sri-Sukanto & Junianto, 1997). Upaya penanggulangan penyakit tersebut secara kimiawi kurang disukai karena selain biaya yang mahal, juga dapat meninggalkan residu yang membahayakan konsumen. Perakitan tanaman kopi tahan terhadap serangan jamur patogen melalui rekayasa genetik dipandang merupakan salah satu pendekatan potensial untuk mengatasi masalah tersebut. Hal ini dapat ditempuh dengan cara meng-

introduksi gen penyandi kitinase (*CHI*) ke dalam genom tanaman kopi.

Kitinase adalah enzim yang mempunyai kemampuan mendegradasi kitin, komponen utama dinding sel jamur (Datta *et al.*, 2000). Di samping memiliki kemampuan menempel pada dinding sel jamur secara langsung, kitinase juga melepaskan oligo-N-asetilglukosamin yang berfungsi sebagai elisitor, yang telah terbukti berperan penting dalam mengaktifkan respons ketahanan (Ren & West, 1992). Beberapa publikasi hasil penelitian melaporkan bahwa tanaman yang mengekspresikan gen kitinase terbukti mempunyai ketahanan terhadap berbagai cendawan tertentu, seperti tanaman tembakau yang tahan terhadap cendawan *Rhizoctonia solani* (Jach *et al.*, 1992), dan *Sclerotinia sclerotiorum* (Terekawa *et al.*, 1997), tanaman mentimun yang tahan terhadap serangan *Botrytis cinerea* (Tabei *et al.*, 1998) dan tanaman padi yang tahan terhadap *Rhizoctonia solani* (Lin *et al.*, 1995; Datta *et al.*, 2000).

Beberapa metode dapat digunakan untuk memasukkan gen asing ke dalam genom tanaman. Cara yang paling murah dan terbukti efektif untuk tanaman dikotil adalah transformasi menggunakan *A. tumefaciens* (Hatanaka *et al.*, 1999). Planlet kopi transgenik yang telah diperoleh, dilaporkan mengekspresikan gen *GUS*, *nptII* dan *hptII* (Hatanaka *et al.*, 1999), gen *cryIAc* untuk resistensi terhadap penyakit *leaf miner* (Leroy *et al.*, 2002), gen untuk resistensi terhadap herbisida (Sano & Kusano, 2002) dan gen untuk kandungan kafein yang lebih rendah (Ogita *et al.*, 2002).

Ada tiga faktor yang harus dipenuhi dalam rekayasa genetik, yaitu ketersediaan gen yang akan diintroduksi, sistem transformasi gen ke dalam genom tanaman

## *Transformasi kopi robusta (Coffea canephora) dengan gen kitinase...*

target dan sistem regenerasi sel-sel transforman menjadi planlet atau tanaman yang membawa dan mengekspresikan gen asing tersebut. Keberhasilan transformasi genetik tanaman ditandai dengan terintegrasinya dan terekspresinya gen yang diintroduksi, dan tetap terpelihara dalam seluruh proses pembelahan sel sampai regenerasi tanaman.

Untuk mendeteksi terintegrasinya gen asing, umumnya digunakan gen penanda, misalnya gen *GUS* yang menyandikan  $\beta$ -glukuronidase. Ekspresi gen penanda ini mudah diamati secara histokimia, karena reaksi yang dikatalisis oleh enzim tersebut menghasilkan produk berwarna biru. Gen *GUS* yang mengandung intron pada daerah N terminal dari *coding sequence* sangat disarankan penggunaannya karena *gus* diekspresikan hanya pada sel tanaman, tidak pada sel bakteri (Hiei *et al.*, 1997). Selain itu untuk menyeleksi sel-sel transforman dari sel yang tidak tertransformasi, diperlukan agen penyeleksi, biasanya digunakan antibiotik atau herbisida. Penelitian ini bertujuan untuk mengintroduksi gen kitinase ke dalam genom tanaman kopi robusta melalui *A. tumefaciens* LBA4404 dan meregenerasikannya menjadi planlet kopi transgenik yang membawa gen *CHI*.

### **Bahan dan Metode**

#### *Bahan tanaman, vektor dan galur bakteri*

Eksplan yang digunakan untuk transformasi adalah kalus embriogenik yang berasal dari eksplan daun kopi robusta klon BP308. Vektor untuk transformasi genetik yang digunakan adalah pCAMBIA1301 yang mengandung gen *hptII* dan gen *gus* dan telah disisipi gen *CHI* (Gambar 1). Sedangkan galur bakteri yang digunakan

adalah *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

#### *Optimasi medium seleksi*

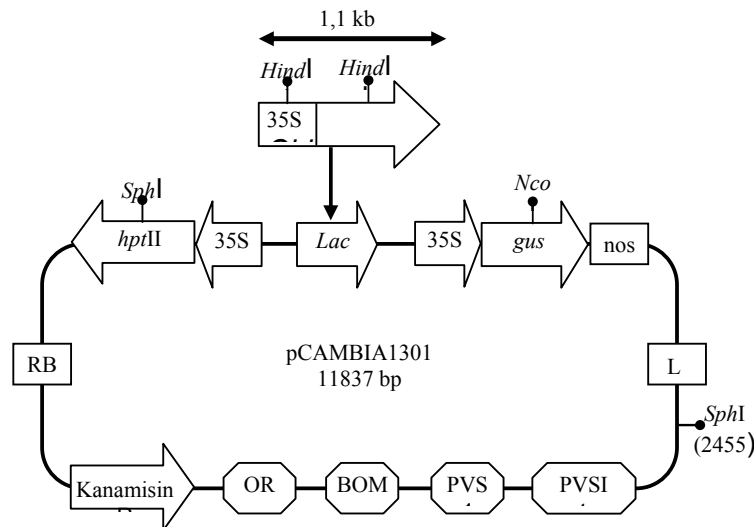
Untuk mendapatkan konsentrasi antibiotik higromisin yang tepat dalam menyeleksi tanaman kopi transgenik, dilakukan uji efektivitas konsentrasi higromisin menggunakan eksplan kalus pada medium  $\frac{1}{2}$  MS (Murashige & Skoog, 1962) yang dilengkapi dengan vitamin B5 (Gamborg *et al.*, 1968), 30 g/L sukrosa dan 2 mg/L gelrite. Konsentrasi higromisin yang diuji adalah 0, 15, 25, 35, dan 45 mg/L. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah kalus yang mati akibat pengaruh penambahan higromisin.

#### *Kultur A. tumefaciens*

*A. tumefaciens* yang mengandung pCAMBIA1301 ditumbuhkan pada medium LB yang mengandung 50 mg/L kanamisin dan 50 mg/L rifampisin dan diinkubasi semalam pada *incubator shaker* berkecepatan 150 rpm dengan suhu 28°C. Setelah dilakukan pengenceran 1:3 dengan medium LB, kultur diinkubasi kembali pada kondisi yang sama selama 3 jam. Kemudian campuran disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Pelet bakteri dipisahkan dari suspensi, kemudian dilarutkan dalam 20 mL medium  $\frac{1}{2}$  MS cair yang mengandung 5 mg/L BAP dan 100 mg/L asetosiringon. Campuran tersebut siap digunakan untuk transformasi.

#### *Transformasi dan regenerasi planlet transforman*

Transformasi gen *CHI* ke dalam kalus embriogenik dilakukan mengikuti prosedur



Gambar 1. Peta plasmid pCambia1301. RB (batas kanan) dan LB (batas kiri) T-DNA

Figure 1. pCambia1301 plasmid map. RB (Right Border) and LB (Left Border) T-DNA

Sano & Kusano (2002) dengan beberapa modifikasi. Inokulasi dilakukan dengan pengocokan eksplan bersama suspensi *A. tumefaciens* pada kecepatan 60 rpm selama 30 menit. Setelah 3 hari ko-kultivasi pada medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung asetosiringon pada berbagai tingkat konsentrasi yang berbeda (0, 50, 100 dan 150 mg/L), eksplan dicuci tiga kali dengan air steril, dilanjutkan dengan satu kali pencucian menggunakan larutan 300 mg/L sefotaksim. Eksplan yang telah ditransformasi kemudian dipindahkan ke medium seleksi yang mengandung 300 mg/L sefotaksim dan higromisin. Penggunaan medium seleksi dilakukan secara bertingkat yaitu medium seleksi mengandung 5 mg/L dan 15 mg/L higromisin, terakhir pada medium dengan dosis higromisin *lethal* minimum yaitu 25 mg/L. Pengamatan

dilakukan terhadap eksplan yang tumbuh pada tiap medium seleksi.

Eksplan yang hidup pada medium seleksi dipindahkan ke medium regenerasi yaitu medium  $\frac{1}{2}$  MS yang mengandung vitamin B5, 30 g/L sukrosa dan 2 g/L gelrite. Untuk menginduksi pembentukan ES, ke dalam medium ditambahkan kombinasi zat pengatur tumbuh 5 mg/L BAP dengan (0,00; 0,25 dan 0,50 mg/L) IAA. Pengamatan dilakukan terhadap persentase eksplan kalus yang membentuk ES dan rata-rata ES yang terbentuk per eksplan kalus. Untuk regenerasi planlet, ES yang sudah mencapai fase kotiledon dipindah ke medium  $\frac{1}{2}$  MS tanpa zat pengatur tumbuh. Pengamatan dilakukan terhadap persentase ES yang berkecambah, planlet yang terbentuk, planlet yang berakar dan tinggi rata-rata planlet.

## *Transformasi kopi robusta (Coffea canephora) dengan gen kitinase...*

### *Pengujian ekspresi gen GUS*

Untuk mengetahui keberhasilan transformasi pada eksplan hasil ko-kultivasi dan eksplan yang tumbuh di medium seleksi, dilakukan uji ekspresi *GUS* berdasarkan metode Jefferson *et al.* (1987). Eksplan yang telah ditransformasi diinkubasi semalam dalam larutan X-Gluc (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoronide*) pada suhu 37°C, dicuci dalam etanol 99% dan disimpan pada suhu 4°C, kemudian dilakukan pengamatan terhadap jumlah eksplan yang mengekspresikan gen *GUS* di bawah mikroskop.

### *Isolasi DNA dari planlet hasil transformasi dan analisis transgen*

DNA genom diekstraksi dari planlet menurut metode Castillo *et al.* (1994). Sebanyak 1 g daun digerus dalam nitrogen cair, dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf dan ditambah 750  $\mu$ L bufer ekstrak, kemudian diinkubasi pada 65°C selama 15 menit. Campuran dibiarkan dingin pada suhu kamar, kemudian diekstrak dengan larutan kloroform : isoamilalkohol (24:1). Setelah disentrifus 10 menit dengan kecepatan 13.000 rpm, pada suhu 4°C, supernatan dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf yang berisi isopropanol, kemudian dicampur dengan cara membolak-balikkan tabung dan disentrifus selama 10 menit pada 8.000 rpm. Endapan DNA dicuci dengan 70% etanol dan dikeringkan. Endapan DNA dilarutkan dalam 25  $\mu$ L bufer TE untuk digunakan dalam analisis lebih lanjut.

Integrasi transgen dalam tanaman dianalisis dengan PCR menggunakan primer *CHI* dengan urutan nukleotida adalah 5'-GGGACCCATCCAGATCACCT-3' dan 5'-GGTAGGGCCTCTGGTTGTAC-3'. Reaksi

PCR dengan *template* DNA dari daun planlet transforman, menggunakan Gene Amp PCR System 2400. Program PCR terdiri dari inkubasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit dilanjutkan dengan 35 siklus, yang masing-masing terdiri dari denaturasi 94°C 1 menit, penempelan (*annealing*) 55°C 1 menit dan ekstensi 72°C selama 1 menit, dilanjutkan 3 menit untuk ekstensi akhir pada suhu 72°C. Produk PCR diverifikasi dengan elektroforesis pada 0,8 % gel agarosa. Hasil elektroforesis diamati dan didokumentasi di atas UV transiluminator.

## **Hasil dan Pembahasan**

### *Optimasi medium seleksi*

Salah satu tahapan penting yang harus dilalui dalam sistem transformasi untuk mendapatkan tanaman transgenik adalah seleksi. Tersedianya metoda seleksi sangat diperlukan untuk menyeleksi sel-sel transforman. Seleksi tahap awal yang biasa dilakukan adalah dengan menumbuhkan eksplan hasil transformasi pada medium seleksi yang mengandung antibiotik tertentu sesuai gen yang dibawa dalam vektor. Vektor pCAMBIA 1301 membawa gen penyandi ketahanan higromisin dan kanamisin, sehingga seleksi sel-sel transforman dapat dilakukan menggunakan salah satu antibiotik tersebut.

Hasil pengujian efektivitas higromisin dalam menghambat pertumbuhan sel-sel kopi yang tidak membawa gen ketahanan menunjukkan bahwa eksplan kalus yang ditumbuhkan pada medium mengandung higromisin mengalami kematian, diawali pada bagian yang bersentuhan langsung dengan medium. Kematian kalus ditandai

dengan terjadinya pencokelatan, kemudian kalus mengering dan menghitam.

Kematian kalus mulai terdeteksi pada minggu kedua pengamatan dengan persentase yang berbeda-beda. Semua kalus yang dikulturkan pada medium dengan 25 mg/L higromisin mati pada minggu ke empat. Pada medium 35 dan 45 mg/L higromisin kematian semua kalus terjadi lebih cepat yaitu pada minggu ketiga (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan bahwa 25 mg/L adalah konsentrasi minimal higromisin yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan dan merupakan konsentrasi *lethal* pada kalus kopi robusta klon BP308. Oleh karena itu, pada tahapan percobaan selanjutnya digunakan 25 mg/L higromisin dalam medium seleksi.

*Transformasi dan regenerasi planlet transforman*

Pengaruh konsentrasi asetosiringon terhadap jumlah (persentase) kalus

transforman, dinyatakan sebagai kalus yang tahan dalam medium seleksi dan berkembang menjadi embrio (Tabel 2). Tampak bahwa penambahan asetosiringon mampu meningkatkan persentase kalus tumbuh pada medium seleksi, yang berarti meningkatkan efisiensi transformasi. Persentase tertinggi kalus tumbuh (42,5 %) diperoleh pada konsentrasi asetosiringon 100 mg/L. Peningkatan konsentrasi asetosiringon lebih dari 100 mg/L tidak meningkatkan jumlah kalus yang tumbuh. Tanpa asetosiringon, transformasi masih dapat terjadi yang ditunjukkan dengan adanya kalus tumbuh pada medium tersebut, meskipun persentasenya rendah (23 %) (Tabel 2). Hal ini diduga karena tingginya kandungan fenolik pada tanaman kopi yang dikeluarkan pada saat pelukaan selama proses transformasi.

Menurut James *et al.* (1993), penambahan asetosiringon ke dalam medium ko-kultivasi efektif meningkatkan efisiensi transformasi. Asetosiringon berperan menginduksi gen *VIR* yang berfungsi dalam

Tabel 1. Jumlah dan persentase kalus mati pada beberapa konsentrasi higromisin.

*Table 1. Number and percentage of dead calli on different hygromycin concentrations.*

Konsentrasi higromisin <i>Concentration of hygromycin (mg/L)</i>	Jumlah dan persentase eksplan mati (%) <i>Percentage of dead calli</i>					
	Minggu ( <i>Weeks</i> )					
	1	2	3	4	5	6
0	0/25 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)	0/25 (0)
15	0/25 (0)	0/25 (0)	6/25 (24)	11/25 (44)	16/25 (64)	23/25 (92)
25	0/25 (0)	3/25 (12)	19/25 (76)	25/25 (100)	25/25 (100)	0/25 (100)
35	0/25 (0)	17/25 (68)	25/25 (100)	25/25 (100)	25/25 (100)	0/25 (100)
45	0/25 (0)	21/25 (84)	25/25 (100)	25/25 (100)	25/25 (100)	0/25 (100)

Keterangan : Angka dalam kurung menunjukkan persentase eksplan mati.

Note : Number between the bracket indicated percentage of explants dead.

*Transformasi kopi robusta (Coffea canephora) dengan gen kitinase...*

mentransfer T-DNA ke dalam sel tanaman dan meningkatkan efisiensi infeksi *Agrobacterium* (Orlikowska *et al.*, 1995), sehingga dapat meningkatkan jumlah sel yang transforman. Namun asetosiringon tidak diperlukan apabila senyawa fenolik yang dikeluarkan oleh jaringan yang dilukai sudah cukup mengaktifkan gen *VIR* (Lopez *et al.*, 2000). Leroy *et al.* (2000) berhasil memperoleh tanaman transgenik kopi tahan penyakit *leaf miner* dengan penambahan 10 mg/L asetosiringon. Sedangkan Sano & Kusano (2002) menggunakan 50 mg/L asetosiringon pada transformasi untuk mendapatkan tanaman kopi tahan herbisida. Perubahan eksplan kalus mulai terlihat setelah 2 minggu dalam medium seleksi yang mengandung 5 mg/L higromisin, yang ditunjukkan dengan mulai terjadinya pencokelatan pada beberapa kalus. Pindahkan kalus ke medium seleksi dengan konsentrasi higromisin lebih tinggi meningkatkan jumlah kalus yang mengalami pencokelatan dan kematian. Kalus mati merupakan kalus

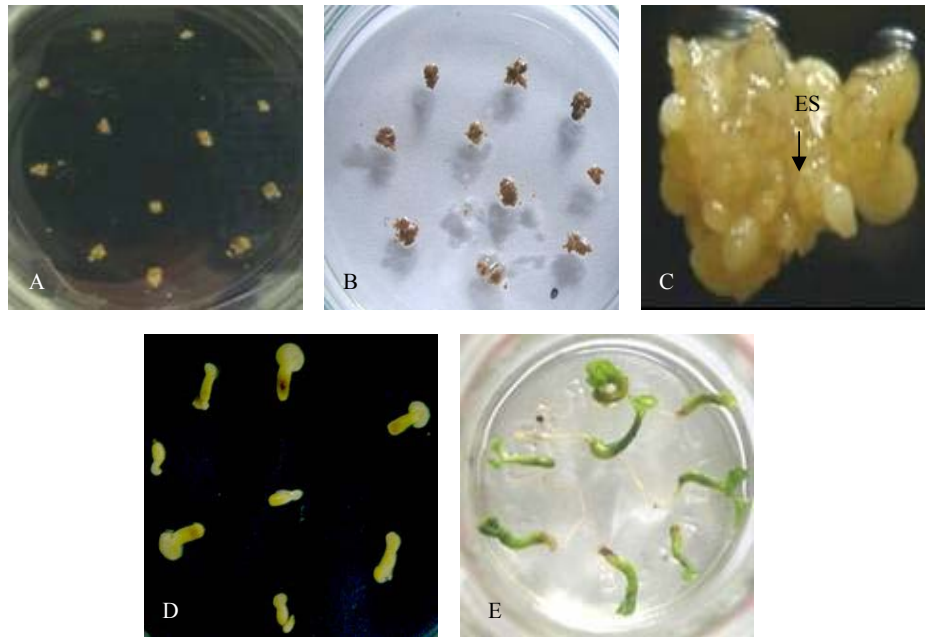
yang tidak tertransformasi, sehingga tidak mampu bertahan dalam medium mengandung higromisin. Sedangkan kalus tumbuh pada medium seleksi adalah kalus transforman. Kalus tersebut berwarna kuning remah, berstruktur embriogenik, dan berkembang membentuk planlet (Gambar 2). Selama dalam medium seleksi, kalus juga mengalami proliferasi dan regenerasi, yang ditandai dengan semakin banyaknya jumlah kalus serta munculnya embrioid pada beberapa kalus. Persentase tertinggi embrioid pada medium seleksi yaitu 15,6% pada perlakuan penambahan asetosiringon 50 mg/L. Kalus tumbuh pada medium seleksi yang mengandung 25 mg/L higromisin selanjutnya disubkultur ke medium regenerasi (R1, R2, R3 dan R4) selama 10 minggu untuk induksi dan regenerasi ES.

Pada semua medium yang digunakan, persentase kalus transforman yang menghasilkan ES dan rata-rata ES per kalus lebih rendah dibandingkan dengan kontrolnya

Tabel 2. Jumlah eksplan kalus yang tahan terhadap tiga tingkat konsentrasi higromisin, dan kalus hasil seleksi yang mampu membentuk embrio.

Table 2. Number of calli explants resistance to three gradually hygromycin concentrations, and selection of calli forming of embryo.

Konsentrasi Asetosiringon <i>Concentration of Acetosyringone (mg/L)</i>	Jumlah eksplan kalus <i>Number of calli explants</i>	Jumlah eksplan kalus tahan higromisin <i>Number of explants hygromycin resistant (%)</i>			Kalus yang membentuk embrio <i>Calli forming embryo (%)</i>
		5	15 (mg/L)	25	
0	200	143 (71,5)	87 (40,5)	46 (23,0)	6 (13,0)
50	200	166 (83,0)	121 (60,5)	77 (38,5)	12 (15,6)
100	200	171 (85,5)	132 (66,0)	85 (42,5)	10 (11,8)
150	200	154 (77,0)	128 (64,0)	82 (41,0)	7 (8,5)



Gambar 2. Perkembangan eksplan kalus kopi robusta hasil transformasi. (A) kalus embriogenik 3 hari setelah transformasi, (B) kalus yang tidak tumbuh di medium seleksi yang mengandung higromisin 25 mg/L, (C) kalus transforman yang membentuk ES pada medium dengan penambahan BAP 5 mg/L, (D) ES fase kotiledon, (E) ES yang berkecambah.

Figure 2. The development of transformed calli. (A) embryogenic calli 3 days after transformation, (B) dead calli on selection medium containing 25 mg/L hygromycin, (C) transformed calli form SE on 5 mg/L BAP medium, (D) cotyledonary SE, (E) germinant derived from SE.

(yang tidak ditransformasi). Persentase tertinggi kalus transforman yang menghasilkan ES (43,1%) dan rata-rata ES per kalus ( $8,8 \pm 3$ ), maupun kalus yang tidak ditransformasi (kontrol positif) yang membentuk ES (70%) dan rata-rata ES per kalus ( $11,6 \pm 2,8$ ) diperoleh pada medium regenerasi dengan penambahan 5 mg/L BAP tanpa IAA (Tabel 3 & Gambar 2C).

Persentase kalus embrioid dan rata-rata embrio per kalus mengalami penurunan seiring dengan peningkatan konsentrasi IAA dalam medium, meskipun masih lebih tinggi

dibandingkan dengan hasil pada medium tanpa zat pengatur tumbuh. Kecendrungan ini terjadi baik pada kalus transforman maupun kalus kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan BAP dan IAA mempengaruhi pembentukan ES dari kalus embriogenik dan jumlah ES yang dihasilkan. Sitokinin berperan penting dalam induksi ES, sebaliknya auksin cenderung menghambat. Hatanaka *et al.* (1991) berhasil mendapatkan ES kopi robusta pada medium yang hanya mengandung sitokinin.

Untuk regenerasi planlet, ES yang telah

*Transformasi kopi robusta (Coffea canephora) dengan gen kitinase...*

mencapai fase kotiledon (Gambar 2D) dipindah ke medium tanpa zat pengatur tumbuh. Pada Tabel 4 terlihat pertumbuhan dan regenerasi ES hasil transformasi. Setelah 4 minggu, dari 197 ES fase kotiledon hasil transformasi, hanya 49,8% yang mampu berkecambah (Gambar 2E). Dari kecambah tersebut, 28,6% membentuk planlet normal (28 planlet) dan 85,7% dari

planlet tersebut berakar. Rata-rata tinggi planlet transforman 8 bulan setelah transformasi adalah  $14,7 \pm 3,8$  mm (Tabel 4). Dibandingkan dengan tanaman kontrol, planlet transforman menunjukkan pertumbuhan yang lebih lambat (Gambar 3). Hal ini diduga disebabkan oleh perlakuan transformasi dan insersi gen asing serta pengaruh antibiotik dalam medium

Tabel 3. Induksi dan regenerasi ES hasil transformasi pada beberapa medium regenerasi.

*Table 3. Induction and regeneration of transformed SE on regeneration medium.*

Medium Medium BAP/IAA (mg/L)	Jumlah kalus untuk induksi ES		Jumlah kalus yang membentuk ES		Rata-rata ES yang terbentuk per kalus	
	<i>Number of calli for induction of SE</i>		<i>Number of calli form SE (%)</i>		<i>Average SE formed per calli</i>	
	Trans* Trans	Kontrol Control	Trans Trans	Kontrol Control	Trans Trans	Kontrol Control
0/0,00	72	10	16,7	20	$5,2 \pm 1,8$	$6,5 \pm 0,7$
5/0,00	72	10	43,1	70	$8,8 \pm 3$	$11,6 \pm 2,8$
5/0,25	73	10	41,7	60	$8,0 \pm 2,4$	$10,0 \pm 2$
5/0,50	73	10	37,5	60	$5,9 \pm 2,9$	$7,0 \pm 2,2$

\* Transformasi (*transformation*)



Gambar 3. Planlet transgenik (kiri), dan planlet kontrol (kanan).

*Figure 3. Transgenic plantlet (left), and control plantlet (right).*

Tabel 4. Regenerasi planlet dari ES hasil transformasi pada medium tanpa zat pengatur tumbuh setelah 14 minggu dikulturkan.

Table 4. Regeneration of plantlets from transformed SE on growth regulator-free medium after 14 week cultured.

Perlakuan <i>Treatment</i>	Embrio fase kotiledon <i>Cotyledonary phase embryo</i>	Embrio berkecambah setelah 4 minggu <i>Germinated embryo after 4 weeks (%)</i>	Planlet terbentuk setelah 14 minggu <i>Plantlets formed after 14 weeks</i>		
			Jumlah Planlet terbentuk <i>Number of plantlets formed (%)</i>	Planlet berakar <i>Plantlets with roots (%)</i>	Tinggi planlet rata-rata <i>Average high of plantlets (mm)</i>
Transformasi <i>Transformation</i>	197	98 (49,8)	28 (28,6)	24 (85,7)	14,71 ± 3,75
Kontrol <i>Control</i>	25	17 (68,0)	11 (64,7)	11 (100)	20,73 ± 2,49

Keterangan : Angka dalam kurung menunjukkan persentase.

Note : Number between the bracket indicated percentage.

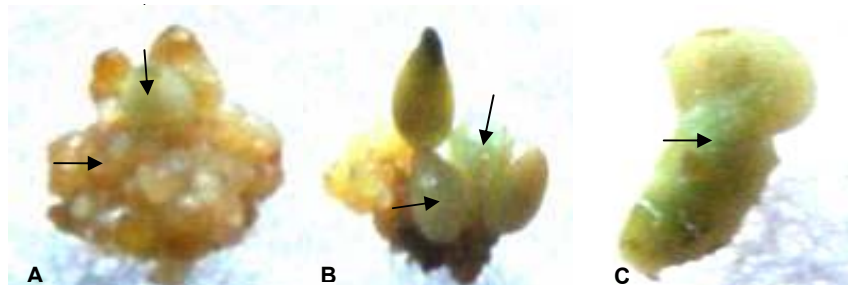
menyebabkan tanaman mengalami cekaman sehingga menurunkan daya regenerasinya.

#### Uji ekspresi GUS

Uji histokimia  $\beta$ -glukoronidase atau lebih dikenal dengan uji *GUS* dapat dilakukan pada tahap awal segera setelah ko-kultivasi (2-3 hari) maupun setelah gen terintegrasi dengan stabil. Uji *GUS* pada penelitian ini dilakukan pada kalus 3 hari setelah ko-kultivasi, kalus yang tumbuh pada medium seleksi, dan pada ES fase kotiledon yang terbentuk. Setelah direndam dengan larutan pewarna *GUS*, baik pada kalus setelah ko-kultivasi, kalus yang tumbuh pada medium seleksi, maupun pada embrio menunjukkan warna kebiruan yang menandakan adanya resipitasi hasil hidrolisa substrat X-gluc oleh enzim  $\beta$ -glukoronidase (Gambar 4).

Tabel 5 menyajikan hasil pengamatan uji ekspresi gen *GUS* pada kalus hasil transformasi dengan beberapa perlakuan konsentrasi asetosiringon. Tampak bahwa persentase kalus tertinggi yang mengekspresikan *GUS* dihasilkan pada konsentrasi asetosiringon 150 mg/L, baik pada pengamatan 3 hari setelah ko-kultivasi maupun pada kalus yang tumbuh di medium seleksi. Sedangkan hasil uji *GUS* pada embrio fase kotiledon menunjukkan bahwa dari 10 embrio yang diuji, hanya tiga embrio (30 %) yang positif mengekspresikan *GUS* (Tabel 5). Penambahan konsentrasi asetosiringon mampu meningkatkan persentase kalus yang mengekspresikan gen *GUS*. Menurut Otani *et al.* (1998) penambahan asetosiringon pada medium infeksi maupun ko-kultivasi dapat meningkatkan ekspresi sementara *GUS*. Uji *GUS* pada kalus yang

*Transformasi kopi robusta (Coffea canephora) dengan gen kitinase...*



Gambar 4. Uji ekspresi gen *GUS* hasil transformasi kopi robusta. (A) kalus 3 hari setelah transformasi, (B) kalus yang tumbuh pada medium seleksi dan (C) ES fase kotiledon. ekspresi *GUS* ditunjukkan dengan tanda panah.

Figure 4. *GUS* assay of transformant robusta coffee (A) 3 day transformed calli, (B) trans-formed calli growth on selection medium, and (C) cotyledonary SE *GUS* expression is shown by arrow sign.

Tabel 5. Uji *GUS* dengan perlakuan asetosiringon.

Table 5. *GUS* assay with acetosyringone treatment.

Konsentrasi asetosiringon <i>Concentration of acetosyringone</i> (mg/L)	Persentase eksplan positif <i>GUS</i> <i>Percentage of GUS positive explants (%)</i>	
	3 hari setelah kultur <i>3 days after culture</i>	Hasil seleksi <i>Result of selection</i>
0	5/15 (33,3)	0/10 (0)
50	9/17 (52,9)	2/10 (20)
100	10/18 (55,6)	1/10 (10)
150	13/23 (56,5)	4/10 (40)

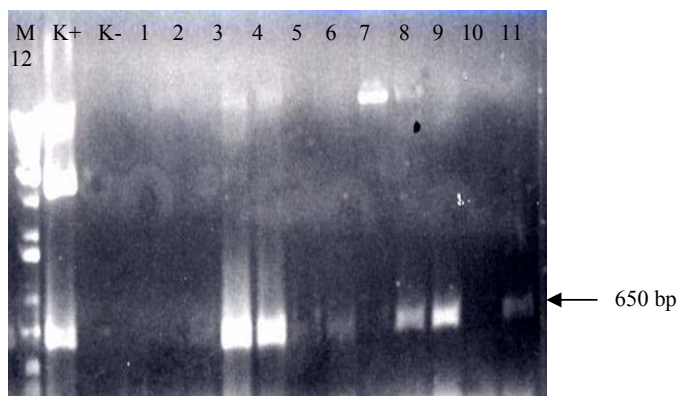
Keterangan : Angka dalam kurung menunjukkan persentase.

Note : Number between the bracket indicated percentage.

tumbuh pada medium seleksi menunjukkan bahwa tidak semua kalus yang diuji mengekspresikan gen *GUS*.

Tidak terekspresinya gen *GUS* meskipun kalus mampu tumbuh di medium seleksi kemungkinan disebabkan oleh beberapa hal di antaranya karena sekuen gen *GUS* atau bagian dari gen tersebut telah hilang, atau terjadi fenomena gen *silencing* (Hiei *et al.*, 1997).

Dengan terekspresinya gen *GUS* pada kalus dan embrio kopi robusta yang ditransformasi memberikan harapan bahwa gen penyandi kitinase telah terintegrasi, karena gen tersebut terdapat pada satu konstruksi T-DNA dalam plasmid vektor yang sama ditransfer oleh *Agrobacterium* ke tanaman.



Gambar 5. Analisis PCR planlet yang berasal dari kalus hasil transformasi M (Marker 1 kb ladder), K+ (Kontrol positif plasmid pCAMBIA1301-*chi*), K- (planlet yang tidak ditransformasi), 1-12 (planlet hasil transformasi).

Figure 5. PCR analysis of plantlets derived from transformed calli M (1 kb ladder marker), K+ (positive control of pCAMBIA1301-*chi* plasmid), K- (no transformation of plantlet), 1-12 (transformant plantlets).

#### Analisis transgen dalam jaringan

Dari analisis PCR 12 planlet putatif transgenik didapatkan 7 planlet yang terbukti mengandung sisipan gen kitinase yaitu planlet no 4, 5, 6, 7, 9, 10 dan 12 yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA berukuran sekitar 650 bp (Gambar 5). Hal ini memperkuat bukti bahwa gen kitinase yang diintroduksi berhasil tersisipi ke dalam genom tanaman kopi robusta klon BP308.

#### Kesimpulan

Penambahan asetosiringon ke dalam medium ko-kultivasi mempengaruhi jumlah kalus yang tumbuh pada medium seleksi dan persentase jumlah kalus yang mengekspresikan gen *GUS*. Persentase tertinggi kalus yang tumbuh diperoleh pada medium

seleksi yang mengandung 100 mg/L asetosiringon, sedangkan persentase tertinggi kalus yang mengekspresikan *GUS* baik pada kalus 3 hari setelah transformasi (56,5 %) maupun kalus yang tumbuh pada medium seleksi (40 %) diperoleh pada medium yang mengandung 150 mg/L asetosiringon.

Medium dasar MS + 5 mg/L BAP + 0 mg/L IAA menghasilkan kalus embrioid dan rata-rata jumlah embrio per kalus dengan persentase tertinggi, masing-masing sebesar 43,1% dan 8,8±3. Dari penelitian ini telah berhasil diregenerasi 28 planlet kopi robusta putatif transgenik. Analisis PCR menunjukkan bahwa dari 12 planlet putatif transgenik yang diuji, 7 planlet terbukti positif membawa gen kitinase.

**Daftar Pustaka**

- Castillo, O.C., K.J. Chalmers, R. Waugh & W. Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, **87**, 332-339.
- Datta, K., Z.K. Nicola, N. Baisakh, N. Oliva & S.K. Datta (2000). Agrobacterium-mediated engineering for sheath blight resistance of indica rice cultivars from different ecosystems. *Theor. Appl. Genet.*, **100**, 832-839.
- Gamborg, O.L., R.A. Miller & K. Ojima (1968). Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, **50**, 151-158.
- Hatanaka, T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida & T. Yamaguchi (1991). Effect of plant growth regulator on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep.*, **10**, 179-182.
- Hatanaka, T., Y.E. Choi, T. Kusano & H. Sano (1999). Transgenic plants of coffee (*Coffea canephora*) from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.*, **19**, 106-110.
- Hiei, Y., T. Komari & T. Kubo (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.*, **35**, 205-218.
- Jach, G., B. Gornhardt, J. Mundy, J. Logemann, E. Pinsdorf, R. Leah, J. Schell & C. Maas (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression on different barley anti fungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant J.*, **8** (1), 97-109.
- James, D.J., S. Uratsu, J. Cheng, P. Negri, P. Viss & A.M. Dandekar (1993). Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance Agrobacterium-mediated transformation of apple. *Plant Cell Rep.*, **12**, 559-563.
- Jefferson, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plant, the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **5**, 387-465.
- Leroy, T., A.M. Henry, M. Royers, I. Altosaar, R. Frutos, D. Duris & R. Philippe (2000). Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep.*, **19**, 382-389.
- Lin, W., C.S. Anuratha, K. Datta, I. Potrykus, Muthukrishnan & S.K. Datta (1995). Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Biotechnol.*, **13**, 686-691.
- Lopez, M., M.H. Jaime, R. Roberto & J.O. Roberto (2000). Factor involved in *Agrobacterium tumefaciens* - mediated gene transfer into *Pinus nigra* Arn. Spp. *Salzmannii* (Dunal) Franco. *Euphytica*, **114**, 195-203.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.

- Ogita, S., H. Uefuji, Y. Choi, T. Hatanaka, M. Ogawa, Y. Yaamaaguchi, N. Koizumi & H. Sano (2002). Genetic modification of coffee plants. *J. Plant Biotech.*, **4** (3), 91-94.
- Orlikowska, T.K., H.J. Cranston & W.E. Dyer (1995). Factor influencing *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation and regeneration of the sunflower cultivar contennial. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.*, **40**, 85-91.
- Otani, M., T. Shimada, T. Kimura & A. Saito (1998). Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato *Ipomea batatas* (L) Lam using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotech.*, **15** (1), 11-16.
- Ren, Y. & C.A. West (1992). Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiol.*, **99**, 1169-1178.
- Sano, H. & T. Kusano (2002). *Method for producing the transformants of coffee plants and transgenic coffee plant*. USA, United States Patent.
- Sri-Sukamto & Y.D. Julianto (1997). *Evaluasi Jamur akar pada tanaman kopi di Kabupaten Aceh Tengah*. Jember, Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember, 27p. Laporan Intern.
- Tabei, Y., S. Kitade, Y. Nishizawa, N. Kikuchi, T. Kayano, T. Hibi & K. Akutsu (1998). Transgenic cucumber plants harbouring a rice chitinase gene exhibit enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Cell Rep.*, **17**, 159-164.
- Terekawa, N., N. Takaya, H. Horiuchi & M. Koike (1997). A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Rep.*, **16**, 439-443