



TRANSFORMASI GEN *Hd3a* PADA TANAMAN KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) KULTIVAR IPB CP (*CHIP POTATO*) 1 MELALUI *Agrobacterium tumefaciens*

Nonozisokhi Gea¹, Karunia Gea^{2*}

^{1,2}Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Nias Raya, Nias, Indonesia

Email: geakarunia@gmail.com

*[korespondensi](mailto:geakarunia@gmail.com)

Abstract

Potato Cv IPB (*Chip Potato*) 1 is a modified potato finding from potato cv Atlantik with the irradiating dose of 15 gray in BATAN (National Atomic Energy Agency). In Indonesia, these potatoes are used as chips. Tuber is plant organ that changes by other organs in plants and serves as a storage of certain substances. There is a manner to increase the production of potato tubers with induce of tuber. Gen heading date 3a (*Hd3a*) is one of the genes that can regulate flowering time in rice. Gen *Hd3a* can also induce flowering in some plants such as *Jatropha*, *Nicotiana benthamiana*, *Saussurea involucrata* and potato. In addition to induce flowering of these genes can induce formation tuber in potato cv *Andigena*. This study aims to introduce *Hd3a* gene with promoter 35S into potato plants cv IPB CP1 to induce formation of tubers. Introductions *Hd3a* gene into potato cv IPB CP 1 were calculated by co-cultivation *A. tumefaciens*-mediated of LBA 4404. Transformation by 157 explants from Internode produce transformation efficiency, and regeneration efficiency was 16.4% and 23.1% respectively. There are six putative transgenic shoots can survive on callus induction medium containing 15 mg / L of antibiotic hygromycin. Analysis of the six putative plant transgenik have done by PCR with 35S-F and Hd-R primers. PCR analysis showed that all six of these plants are transgenic potato containing *Hd3a* gene with CaMV 35S promoter.

Keywords : *Agrobacterium tumefaciens*, *Hd3a* Gene, IPB CP 1

Abstrak

Kentang cv IPB CP (*Chip Potato*) 1 merupakan kentang hasil modifikasi dari kentang kultivar Atlantik dengan meradiasi pada dosis 15 gray di BATAN (Badan Tenaga Atom Nasional). Di Indonesia kentang ini digunakan sebagai kentang olahan seperti keripik. Umbi adalah organ tumbuhan yang mengalami perubahan bentuk dari organ lain pada tumbuhan yang berfungsi sebagai tempat penyimpanan zat tertentu. Salah satu cara untuk meningkatkan produksi umbi kentang dengan melakukan induksi pengumbian. Gen *heading date 3a* (*Hd3a*) merupakan salah satu gen yang dapat mengatur waktu pembungaan pada padi. Gen *Hd3a* juga dapat menginduksi pembungaan pada beberapa tanaman lain seperti jarak pagar, *Nicotiana benthamiana*, *Saussurea involucrata* dan kentang. Selain menginduksi pembungaan gen ini dapat menginduksi pembentukan umbi pada kentang cv *Andigena*. Penelitian ini bertujuan untuk mengintroduksi gen *Hd3a* dibawah kendali promotor 35s ke dalam tanaman kentang cv IPB CP1 untuk menginduksi pembentukan umbi. Introduksi gen *Hd3a* ke dalam kentang cv IPB CP 1 dilakukan dengan menggunakan metode kokultivasi melalui *A. tumefaciens* LBA 4404. Transformasi terhadap 157 eksplan dari internode menghasilkan efisiensi transformasi 16.4 %, efisiensi regenerasi sebesar 23.1% serta 6 tunas transgenik putatif. Keenam tunas transgenik putatif ini dapat bertahan hidup pada media induksi kalus yang mengandung 15 mg/L antibiotik higromisin. Analisis terhadap 6 tunas tanaman transgenik putatif dilakukan dengan menggunakan PCR dengan primer 35S-F dan Hd-R. Analisis PCR menunjukkan bahwa keenam tanaman tersebut merupakan kentang transgenik yang mengandung gen *Hd3a* di bawah kendali promotor 35S CaMV.

Keywords : *Agrobacterium tumefaciens*, *Hd3a* Gene, IPB CP 1

1. Pendahuluan

Kentang (*Solanum tuberosum* L.) merupakan tanaman pangan global keempat dunia setelah beras, gandum dan jagung. Umbinya kaya akan pati dan nutrisi lainnya. Kentang kultivar IPB CP1 (*Chip Potato* 1) merupakan varietas kentang baru hasil modifikasi secara fisika dari kentang cv Atlantik. Di Indonesia kentang kultivar Atlantik dikonsumsi sebagai kentang olahan seperti keripik (*chip*). Kentang Atlantik dimutasi dengan sinar radiasi pada dosis 15 gray di Badan Tenaga Atom Nasional (BATAN) dan menghasilkan kentang kultivar IPB CP1. Kentang kultivar IPB CP1 memiliki bentuk daun oval

memanjang, bentuk umbi agak bulat, warna kulit umbi putih, daging umbi putih, kandungan pati tinggi, dan kandungan gula rendah (Suharsono. et al., 2016).

Umbi adalah organ tumbuhan yang mengalami perubahan bentuk dari organ lain pada tumbuhan yang berfungsi sebagai tempat penyimpanan zat tertentu. Pembentukan umbi terdiri dari beberapa tahap proses yang kompleks dimulai dari pembentukan dan pertumbuhan stolon, induksi pengumbian, inisiasi umbi dan pertumbuhan umbi (Aksenova et al., 2012). Produksi dari tanaman kentang ditentukan oleh pembentukan umbi. Salah satu cara untuk meningkatkan produksi umbi kentang dengan melakukan induksi pengumbian (Dianawati et al., 2013).

Gen *heading date 3a* (*Hd3a*) merupakan salah satu gen yang dapat mengatur waktu pembungaan pada padi. Gen *Hd3a* ortolog gen *flowering locus T* (*FT*) pada *Arabidopsis thaliana*. Gen *Hd3a* pertama kali diidentifikasi sebagai *quantitative trait locus* (QTL) (Monna et al., 2002; Yamamoto et al., 1998). Protein dari gen ini dapat menginduksi pembungaan padi pada kondisi hari pendek (Kojima et al., 2002). Gen *Hd3a* telah diisolasi oleh (Tamaki et al., 2007) dari padi yang menunjukkan bahwa *Hd3a* disintesis di daun dan bergerak ke meristem pucuk batang untuk menginduksi pembungaan sehingga *Hd3a* merupakan signal pembungaan atau disebut florigen. Pembungkaman *Hd3a* dengan RNA *interference* (RNAi) dapat menunda pembungaan pada tanaman Japonica transgenik (Komiya et al., 2008). Gen ini telah diintroduksi pada beberapa tanaman seperti *Saussurea involucrata* (Li et al., 2011), *Jatropha curcas* L (Sulistyaningsih Y.C, 2012) dan *Nicotiana benthamiana* (Syafitri, 2012). Tanaman-tanaman transgenik tersebut berbunga lebih awal dibandingkan dengan tanaman non transgenik. Hal ini menunjukkan bahwa protein *Hd3a* dapat menginduksi pembungaan.

Tanaman kentang cv andigena berbunga dan berumbi jika ditanam di hari pendek tetapi tidak berbunga dan berumbi jika ditanam di hari panjang. Ekspresi gen *Hd3a* pada kentang andigena transgenik menyebabkan tanaman kentang tersebut berbunga di hari panjang. Hal ini menunjukkan bahwa protein *Hd3a* dapat menginduksi pembungaan pada tanaman kentang. Selain menginduksi pembungaan, kentang cv andigena transgenik yang mengekspresikan gen *Hd3a* juga menghasilkan umbi di hari panjang sedangkan kentang non transgenik tidak menghasilkan umbi. Hal ini menunjukkan bahwa protein *Hd3a* menginduksi pembentukan umbi (Navarro et al., 2011).

Teknologi terbaru yang dapat digunakan untuk menghasilkan varietas baru pada tanaman adalah melalui metode rekayasa genetika yaitu dengan transformasi genetik. Transformasi genetik merupakan proses introduksi gen dari satu organisme ke organisme lain yang memungkinkan untuk memunculkan sifat yang diharapkan tanpa mengubah sifat lain (PAMBUDI A., 2009). Introduksi gen dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* telah banyak dilakukan. Hal ini disebabkan karena metode tersebut dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium yang sederhana dan sisipan gen tunggal berpeluang lebih tinggi dibanding transformasi langsung, sehingga stabilitas ekspresi gen lebih tinggi (Dai et al., 2001; G & D, 1996; Rahmawati, 2006). Keberhasilan introduksi gen *Hd3a* melalui *A. tumefaciens* pada beberapa kultivar kentang telah banyak dilakukan seperti kultivar baraka (Bustomi, 2012), Agria (L., 2015), Jala ipam (Widiarti, 2016) dan Nooksack (H, 2016). Gen *Hd3a* yang telah berhasil diintroduksi pada Kentang cv Baraka dibawah kendali promotor rolC menghasilkan umbi pada kondisi in vitro, sedangkan non transgenik tidak berumbi pada umur yang sama (Bustomi, 2012). Penelitian ini bertujuan untuk

mengintroduksi gen *Hd3a* dibawah kendali promotor *35s* ke dalam tanaman kentang cv IPB CP1 untuk menginduksi pembentukan umbi.

2. Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2021-April 2022 di Laboratorium Biomolekuler dan Selluler Tanaman dan Laboratorium *Biotechnology Indonesia-The Netherland* (BIORIN), Pusat Penelitian Sumberdaya Dan Bioteknologi (PPSHB), Institut Pertanian Bogor.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini berupa eksplan tanaman kentang cv IPB CP 1 berumur 4 minggu yang ditanam secara *in vitro*. Bakteri yang digunakan untuk transformasi adalah *Agrobacterium tumefaciens* galur LBA4404 yang mengandung plasmid pC1300 yang membawa gen *Hd3a* di bawah kendali promotor *35S* (Sulistyaningsih Y.C, 2012) yang dipautkan dengan gen resistensi terhadap higromisin (*hpt*). Peta fisik daerah T-DNA dari plasmid pC1300-*Hd3a* disajikan pada Gambar 1. Primer 35S-F dan Hd-R digunakan untuk menganalisis integrasi *Hd3a* di dalam genom tanaman transgenik secara PCR. Bahan lain yang digunakan adalah media *Murashiage and Skoog* (MS) untuk media pertumbuhan tanaman *in vitro* dan media M4 untuk induksi kalus serta M4 yang mengandung higromisin sebagai media seleksi.



Gambar 1. Peta fisik daerah T-DNA dalam pC1300-*Hd3a*. LB: left border, RB: right border, 35S Pro: promotor 35SCaMV, CA: daerah poly A dari 35S CaMV, *Hd3a*: heading date 3a, *hpt*: hygromycin phosphotransferase

Metode penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

2.1 Persiapan Eksplan dan Perbanyakan Tanaman

Tanaman *in vitro* kentang diperbanyak dengan menggunakan stek buku tunggal, (internode) ditanam pada media MS0 (MS instan 4.33 g/l + Vitamin + Sukrosa 30 g/l + Agar powder 3 g/l) dan MS2 makro (media MS0 yang ditambah 1x stok makro) selama 4 minggu. Eksplan kemudian ditumbuhkan di ruang kultur dengan suhu 24⁰ – 25⁰ C, dengan pencahayaan 2000 – 3000 lux.

2.2 Perbanyakan *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens asal stok gliserol ditumbuhkan selama 36 jam pada media LB cair yang ditambahkan dengan *Kanamycin* 50 mg/L + *Rifamisin* 25 mg/L pada suhu 28⁰ C, dalam ruang gelap dan dishaker. Setiap melakukan transformasi, bakteri dikultur kembali dalam media LB cair selama 12 jam pada suhu 28⁰ C, di ruang gelap dan di shaker hingga OD₆₀₀ mencapai 0.5.

2.3 Transformasi genetik kentang cv IPB CP 1

Sebelum melakukan transformasi, internode ditanam di dalam media prekultur (MS instan 4.33 g/l + Myo inositol 0.1 g/l + Glukosa 16 g/l + 2,4-D 2 mg/L + BA 3 mg/l +

Vitamin MS 5 mg/l + Gelrite 2.5 g/l) selama 12 jam dalam ruang gelap. Biakkan *Agrobacterium tumefaciens* yang mempunyai OD₆₀₀ = 0.5 disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit, endapannya (pelet) di larutkan dengan media kokultivasi cair (MS instan 4.33 g/l + Myo inositol 0.1 g/l + Glukosa 16 g/l + 2,4-D 2 mg/L + BA 3 mg/l + Vitamin MS 5 mg/l + *Acetosiringon* 20 mg/L).

Transformasi dilakukan dengan metode kokultivasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Internode ukuran 0.5–1 cm direndam di dalam endapan *A. Tumefaciens* yang sudah dilarutkan dengan media kokultivasi cair selama 10 menit, kemudian digoyang pada suhu ruang. Eksplan selanjutnya dikeringkan dengan tisu steril dan ditanam pada media kokultivasi padat (MS instan 4.33 g/l + Myo inositol 0.1 g/l + Glukosa 16 g/l + 2,4-D 2 mg/L + BA 3 mg/l + Vitamin MS 5 mg/l + Gelrite 2.5 g/l + *Asetosiringon* 40 mg/L) selama 3 hari di ruang gelap. Tahapan ini bertujuan agar bakteri dapat menginfeksi eksplan.

2.4 Seleksi, regenerasi dan perbanyak tunas

Setelah ditanam 3 hari di media kokultivasi padat, eksplan dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali , dan perendaman terakhir dengan air steril yang mengandung larutan antibiotik (*cefotaxime* 200 mg/L) selama 10 menit. Ekplan dikeringkan dengan tisu steril dan ditanam di media regenerasi tunas M4 (MS instan 4.33 g/l + Sukrosa 30 g/l + Kasein hidrolisat 0.2 g/L + Myo inositol 0.1 g/l + Gelrite 3 g/L + BA 3 mg/L + IAA 2 mg/L + GA3 1 mg/L + Vitamin MS 5 mg/L + *Cefotaxime* 100 µg/L). Setelah 2 minggu eksplan ditanam di media M4 tanpa higromisin kemudian dipindahkan ke media M4 yang mengandung higromisin. Setelah tunas muncul, di sub kultur ke media MS dan diperbanyak selanjutnya dijadikan sebagai bahan isolasi genom untuk konfirmasi tanaman transgenik putatif.

2.5 Optimasi media seleksi Kentang cv IPB CP 1

Optimasi media seleksi higomisin dilakukan pada eksplan tanaman kentang cv IPB CP 1 yang telah diberikan perlakuan transformasi. Eksplan tanaman kentang cv IPB CP 1 tanpa perlakuan transformasi digunakan sebagai kontrol.

2.6 Identifikasi Tanaman Putatif Transgenik dengan PCR

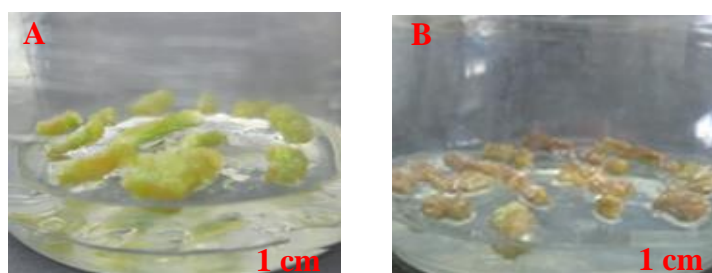
Identifikasi tanaman putatif transgenik diawali dengan mengisolasi DNA genom. Isolasi DNA genom dilakukan berdasarkan metode (Suharsono, 2002) yang dimodifikasi (CTAB 2 % 0.1 M Tris-HCL, 20 ml 0.5 EDTA, 1.4 M NaCl, PVP 1 %, pH 8.0). DNA hasil isolasi selanjutnya di amplifikasi dengan *Polimerase Chain Reaction* (PCR). PCR dilakukan menggunakan primer spesifik untuk transgen *Hd3a*, yaitu primer 35S-F (5'-CCA AGC TCT ATC TGT CAC TTC ATC-3') dan Hd-R : (5'-CTA GGG GTA GAC CCT CCT GCC-3'). Pasangan primer ini digunakan untuk analisis transgen *Hd3a* di bawah kendali promoter 35S CaMV. PCR menggunakan primer Act-F (5-'ATGGCAGATGCCGAGGATAT-3') dan Act-R (CAGTTGTGCGACCACTTGCA-3') yang dirancang berdasarkan gen aktin tanaman kedelai digunakan sebagai kontrol internal DNA tanaman kentang.

Hasil PCR diperiksa menggunakan gel agarosa konsentrasi 0.7-1 % dalam larutan buffer penyangga 1 kali TAE (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA) pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Pita DNA pada agarosa divisualisasi dengan cahaya UV setelah gel diendam pada larutan ethidium bromida (0.5 µg/ml) selama 10 menit (Fatchiyah et al., 2011). Hasil foto elektroforesis didokumentasikan dengan *gel-doc*.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Optimasi media seleksi pada kentang cv IPB CP 1

Kentang cv IPB CP 1 merupakan kentang baru hasil modifikasi secara fisik dari kentang cv atlantik sehingga diperlukan optimasi pada media induksi kalus untuk menyeleksi tanaman transgenik yang tahan terhadap antibiotik higromisin. Pada penelitian ini telah dilakukan optimasi seleksi terhadap tanaman transforman, dengan menggunakan tanaman nontransforman sebagai kontrol. Hasilnya menunjukkan bahwa kalus kentang transforman sebagian dapat bertahan hidup dan sebagian juga tidak bertahan hidup atau berwarna coklat (*browning*) pada media seleksi yang mengandung 15 mg/L higromisin (gambar 2a), sedangkan kalus kentang non transforman seluruh eksplannya tidak dapat hidup pada media seleksi yang mengandung 15 mg/L higromisin (gambar 2b). Konsentrasi dari antibiotik ini sedikit lebih tinggi dari penelitian sebelumnya pada tanaman kentang cv atlantik transgenik putatif sebesar 10 mg/L higromisin (Manguntungi, 2014). Integrasi T-DNA pC1300-*Hd3a* yang mengandung gen *hpt* ini ke dalam kentang cv IPB CP 1 telah mengekspresikan *hygromycin photosphotranferase* yang dapat resisten terhadap higromisin sehingga tanaman dapat tumbuh pada media yang mengandung higromisin. Kecoklatan kalus pada media seleksi diakibatkan karena adanya aktivitas enzim oksidase yang disintesis dan tersedia pada kondisi oksidatif ketika jaringan dilukai (Riley, 2000)



Gambar 2. Keadaan kalus tanaman yang tahan higromisin dengan kalus yang tidak tahan higromisin (*browning*) pada media seleksi. A. Kalus tanaman dengan perlakuan transformasi tahan terhadap antibiotik higromisin, B. Kalus tanaman tanpa perlakuan transformasi tidak tahan terhadap antibiotik higromisin.

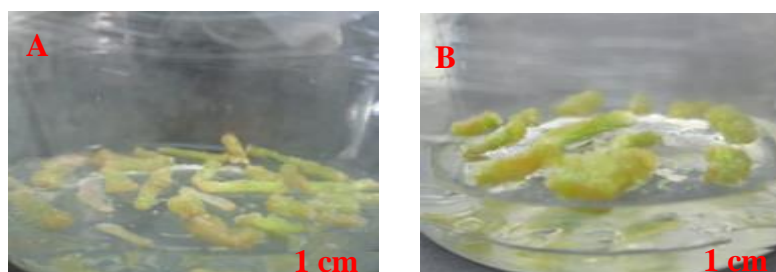
3.2 Transformasi tanaman kentang cv IPB CP 1

Transformasi dilakukan pada tanaman kentang cv IPB CP 1 yang telah berumur 4 minggu dengan menggunakan ruas (*internode*) tanaman sebagai eksplan. Sebelum melakukan transformasi, eksplan terlebih dahulu di tanam di media prekultur selama 1 hari untuk menginisiasi pembentukan kalus. Transformasi dilakukan dengan metode kokultivasi melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Internode yang berukuran 0.5-1 cm direndam didalam *Agrobacterium tumefaciens* OD₆₀₀=0.5 yang sudah dilarutkan dengan media kokultivasi cair yang mengandung *acetosiringon*. Penambahan *acetosiringon* bertujuan mengaktifkan gen *vir* untuk meningkatkan efektivitas infeksi *A. Tumefaciens* (Rashid et al., 2010). Internode di dalam campuran digoyang selama 10 menit kemudian dikeringkan dengan tisu steril. Selanjutnya, eksplan ditanam di media kokultivasi padat yang disimpan di ruang gelap selama 3 hari. Perlakuan ini bertujuan untuk memberikan kesempatan kepada *A. Tumefaciens* untuk menginfeksi tanaman.

Setelah 3 hari ditanam di media kokultivasi, eksplan dicuci dengan *cefotaxime* dan ditanam di media regenerasi dan seleksi. Kedua media tersebut mengandung zat pengatur

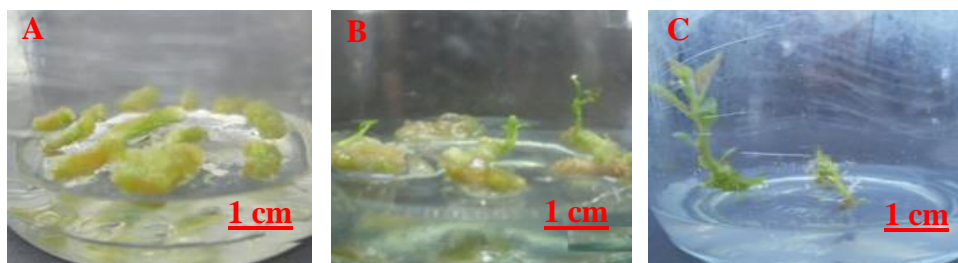
tumbuh (ZPT) yang terdiri dari *Indole Acetic Acid* (IAA), *Benziladenin* (BA) dan *Giberellic Acid* (GA₃) dengan penambahan *higromisin* pada media seleksi. Penggunaan cefotaxime baik pada saat transformasi maupun pada media induksi kalus bertujuan untuk mematikan *A. Tumefaciens* yang masih hidup di sekitar tanaman transforman.

Eksplan yang telah ditransformasikan dipindahkan setiap dua minggu pada media yang baru. Tujuannya agar ketersediaan akan hara mineral dan hormon tanaman tetap cukup untuk membantu pembentukan tunas lebih cepat. Eksplan tanaman mulai mengalami perubahan bentuk setelah ditanam pada media induksi kalus (gambar 3b). Eksplan yang telah ditanam mulai membentuk kalus sejak 2 minggu pertama pada media induksi kalus. Penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D pada media kokultivasi berperan sebagai inisiasi kalus. Selain itu, GA₃ pada media regenerasi berfungsi dalam regenerasi, proliferasi dan pemanjangan tunas tanaman (Li et al., 2011)



Gambar 3. Perubahan eksplan tanaman kentang cv IPB CP 1 pada media regenerasi setelah ditransformasikan. A. Eksplan tanaman kentang cv IPB CP 1 setelah pencucian, B. Eksplan tanaman kentang cv IPB CP 1 yang mulai membentuk kalus setelah 2 minggu pada media regenerasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kalus-kalus transgenik membentuk tunas sejak minggu ke-4 pada media induksi kalus (gambar 4a). Pada perkembangan selanjutnya di media induksi kalus yang mengandung 15 mg/L higromisin beberapa tunas yang terbentuk sebagian tumbuh membesar namun beberapa mengalami kematian (gambar 4b). Hal ini menunjukkan bahwa tunas yang bertahan hidup pada media seleksi kalus yang mengandung 15 mg/L higromisin merupakan kandidat tanaman transgenik putatif. Tunas tanaman transgenik putatif yang mencapai panjang 1-2 cm dipotong dan dipindahkan pada media MS yang mengandung 15 mg/L higromisin. Tujuannya untuk pemanjangan dan perbanyakan (gambar 4c).



Gambar 4. Perkembangan tanaman transgenik kentang IPB CP 1 putatif. A. Kalus yang terus berkembang pada media seleksi, B. Kalus yang beregenerasi membentuk tunas, C. Tunas tanaman transgenik putatif yang dipindahkan pada media MS yang mengandung higromisin.

Transformasi genetik kentang menggunakan *A tumefaciens* telah berhasil dilakukan pada 157 eksplan dari internode dengan jumlah kalus yang resistensi terhadap higromisin sebanyak 26 kalus, sehingga efisiensi transformasi yang diperoleh sebesar 16.4 %. Dari 26 kalus yang resistensi higromisin, ada 6 kalus yang beregenerasi menjadi tanaman sehingga efisiensi regenerasinya adalah sebesar 23.1 %. Efisiensi transformasi dengan menggunakan internode sebagai eksplan pada kentang cv IPB CP 1 tergolong lebih rendah dibanding efisiensi transformasi kentang atlantik 16.67 %, sedangkan efisiensi regenerasinya lebih tinggi dibandingkan dengan efisiensi regenerasi pada kentang cv atlantik sebesar 20 % (B., 2014). Perbedaan efisiensi yang sangat sedikit ini menunjukkan bahwa transformasi genetik pada kentang cv IPB CP 1 dengan menggunakan internode masih tergolong rendah (Han et al., 2015).

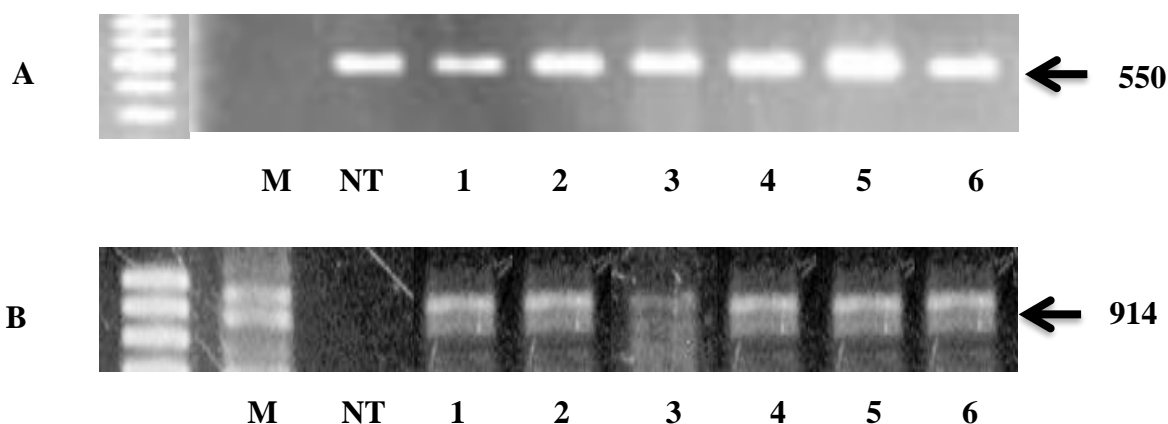
Gen *Hd3a* yang menggunakan promotor 35 S telah diintroduksi ke dalam kentang kultivar yang berbeda. Efisiensi transformasi pada tanaman kentang kultivar Nooksack sebesar 25 % sedangkan efisiensi regenerasi 10 % (H, 2016) dan pada kentang cv Jala Ipam efisiensi transformasi sebesar 7 % sedangkan efisiensi regenerasi sebesar 100 % (Widiarti, 2016). Respon regenerasi yang tidak sama dapat terjadi karena kultivar, jenis dan usia eksplan serta kombinasi hormon yang berbeda-beda (Chakravarty & Wang-Pruski, 2010).

Tabel 1. Efisiensi Transformasi dan regenerasi ruas tunas tanaman kentang cv IPB CP 1 dengan gen *Hd3a*.

Jumlah eksplan awal	Jumlah eksplan yang membentuk kalus	Jumlah kalus resisten higromisin	Jumlah kalus beregenerasi	Jumlah tanaman transgenik putatif	Efisiensi transformasi	Efisiensi regenerasi
159	110	26	6	6	16.4 %	23.1%

3.3 Identifikasi Tanaman Putatif Transgenik dengan PCR

Dari 159 internode yang telah ditransformasikan terdapat 6 internode yang membentuk kalus dan berhasil bertunas. Tunas transgenik putatif tersebut mampu bertahan hidup pada media seleksi. Keenam transgenik putatif dianalisis dengan PCR menggunakan sepasang primer (35S-F dan Hd-R). Tujuannya untuk mengetahui integrasi gen *Hd3a* di dalam genom tanaman tersebut. Hasilnya menunjukkan bahwa semua tanaman mengandung gen *Hd3a* dengan memunculkan pita yang berukuran 914 pb (gambar 5b). Fragmen DNA 914 bp terdiri dari promotor 35 S CaMV dan gen *Hd3a*. Untuk melakukan kontrol internal terhadap kualitas DNA tanaman hasil isolasi maka dilakukan PCR menggunakan primer gen aktin tanaman (gambar 5a). Gen aktin termasuk *housekeeping gene*, yaitu gen yang memiliki tingkat ekspresi yang stabil di berbagai jaringan pada semua tahapan perkembangan tanaman (Tu et al., 2007).



Gambar 5. Analisis integrasi Gen *Hd3a* pada tanaman kentang cv *CP 1* transgenik. A. Hasil PCR DNA menggunakan primer Act-F dan Act-R, B. Hasil PCR DNA Transgenik menggunakan 35-F dan HD-R. M = msrks, P= DNA Plasmid pCambia1300-*Hd3a*, NT=DNA kentang cv *CP 1* non transgenik, 1-6 = DNA kentang cv *CP 1* transgenik.

4. Simpulan

Penyisipan gen *Hd3a* dengan promotor 35S melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* ke dalam kentang cv IPB CP 1 telah berhasil dilakukan. Ada enam tanaman transgenik putatif yang bertahan hidup pada media seleksi yang mengandung 15 mg/L higromisin. Hasil analisis PCR menunjukkan bahwa keenam tanaman kentang transgenik putatif tersebut mengandung gen *Hd3a*.

Perlu dilakukan uji lebih lanjut berupa analisis ekspresi gen *Hd3a* untuk mengetahui ekspresi transgen pada tanaman transgenik. Selain itu, dilakukan analisis morfologi pada tanaman transgenik untuk mengetahui pengaruh gen *Hd3a* terhadap pembungaan dan pumbungan tanaman.

5. Referensi

- Aksenova, N. P., Konstantinova, T. N., Golyanovskaya, S. A., Sergeeva, L. I., & Romanov, G. A. (2012). Hormonal regulation of tuber formation in potato plants. In *Russian Journal of Plant Physiology* (Vol. 59, Issue 4, pp. 451–466). <https://doi.org/10.1134/S1021443712040024>
- B., M. (2014). *Transformasi genetik kentang (Solanum tuberosum L.) kultivar atlantik dengan penyandi gen lisozim melalui perantara Agrobacterium tumefaciens*. Institut Pertanian Bogor.
- Bustomi. (2012). *Transformasi genetik kentang (Solanum tuberosum L.) kultivar Baraka dengan gen pembungaan Hd3a*. Institut Pertanian Bogor.
- Chakravarty, B., & Wang-Pruski, G. (2010). Rapid regeneration of stable transformants in cultures of potato by improving factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 01(05), 409–416. <https://doi.org/10.4236/abb.2010.15054>
- Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., Beachy, R. N., & Fauquet, C. (2001). Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7(1), 25–33. <https://doi.org/10.1023/A:1009687511633>
- Dianawati, M., Ilyas, S., Wattimena, G. A., & Susila, A. D. (2013). Produksi Umbi Mini Kentang Secara Aeroponik Melalui Penentuan Dosis Optimum Pupuk Daun Nitrogen. *Jurnal Hortikultura*, 23(1), 47. <https://doi.org/10.21082/jhort.v23n1.2013.p47-55>
- Fatchiyah, E.L., A., & S., W. S. dan R. (2011). *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Erlangga.
- G, H., & D, C. M. (1996). "Agrolistic" transformation of plant cells: integration of T-strands generated in

- planta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(December), 14978–14983.
- H, N. (2016). *Perakitan tanaman kentang (Solanum tuberosum L.) kultivar Nooksack Transgenik yang mengandung gen Hd3a*. Institut Pertanian Bogor.
- Han, E. H., Goo, Y. M., Lee, M. K., & Lee, S. W. (2015). An efficient transformation method for a potato (*Solanum tuberosum L. var. Atlantic*). *Journal of Plant Biotechnology*, 42(2), 77–82. <https://doi.org/10.5010/JPB.2015.42.2.77>
- Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T., & Yano, M. (2002). Hd3a, a rice ortholog of the Arabidopsis FT gene, promotes transition to flowering downstream of Hd1 under short-day conditions. *Plant and Cell Physiology*, 43(10), 1096–1105. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf156>
- Komiya, R., Ikegami, A., Tamaki, S., Yokoi, S., & Shimamoto, K. (2008). Hd3a and RFT1 are essential for flowering in rice. *Development*, 135(4), 767–774. <https://doi.org/10.1242/dev.008631>
- L., S. (2015). *Transformasi genetik kentang (Solanum tuberosum L.) kultivar agria dengan gen pembungaan Hd3a*. Institut Pertanian Bogor.
- Li, M., Li, H., Hu, X., Pan, X., & Wu, G. (2011). Genetic transformation and overexpression of a rice Hd3a induces early flowering in *Saussurea involucreta* Kar. et Kir. ex Maxim. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(3), 363–371. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9927-5>
- Monna, L., Lin, H. X., Kojima, S., Sasaki, T., & Yano, M. (2002). Genetic dissection of a genomic region for a quantitative trait locus, Hd3, into two loci, Hd3a and Hd3b, controlling heading date in rice. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(5), 772–778. <https://doi.org/10.1007/s00122-001-0813-0>
- Navarro, C., Abelenda, J. A., Cruz-Oró, E., Cuéllar, C. A., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K., & Prat, S. (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature*, 478(7367), 119–122. <https://doi.org/10.1038/nature10431>
- PAMBUDI A. (2009). Teknik Transformasi Genetik Beberapa Tanaman Menggunakan Agrobacterium tumefaciens. In *Depertemen Biologi*. <http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/11541/G09apa1.pdf;jsessionid=A742E721B510BF933979D9C6F0647AE0?sequence=2>
- Rahmawati, S. (2006). Status Perkembangan Perbaikan Sifat Genetik Padi Menggunakan Transformasi Agrobacterium. *Jurnal AgroBiogen*, 2(1), 36. <https://doi.org/10.21082/jbio.v2n1.2006.p36-44>
- Rashid, H., Agricultural, N., Khan, M. H., Technology, I., & Malik, S. A. (2010). *Effect of bacterial culture density and acetos.pdf. January 2015*.
- Riley, P. A. (2000). Tyrosinase kinetics: A semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrates. *Journal of Theoretical Biology*, 203(1), 1–12. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1999.1061>
- Suharsono., G.A., W., N., D., D., I., I., A., A., N., & H, R. (2016). *Pendaftaran varietas kentang cv IPB CP 1*.
- Suharsono. (2002). Konstruksi pustaka genom kedelai kultivar Slamet. *Hayati*, 9(3), 67–70.
- Sulistyaningsih Y.C. (2012). *Rekayasa ekspresi gen pembungaan Hd3a pada tanaman jarak pagar (Jatropha curcas L.)*. Institut Pertanian Bogor.
- Syafitri, L. N. (2012). *Transformasi Genetik Nicotiana benthamiana Dengan Gen Pembungaan Hd3a Dari Padi*. 86.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Hann, L. W., Yokoi, S., & Shimamoto, K. (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science*, 316(5827), 1033–1036. <https://doi.org/10.1126/science.1141753>
- Tu, L., Zhang, X., Liu, D., Jin, S., Cao, J., Zhu, L., Deng, F., Tan, J., & Zhang, C. (2007). Suitable internal control genes for qRT-PCR normalization in cotton fiber development and somatic embryogenesis. In *Chinese Science Bulletin* (Vol. 52, Issue 22, pp. 3110–3117). <https://doi.org/10.1007/s11434-007-0461-0>
- Widiarti. (2016). *Transformasi genetik tanaman kentang (Solanum tuberosum L.) kultivar Jala Ipam dengan gen Hd3a*. Institut Pertanian Bogor.
- Yamamoto, T., Kuboki, Y., Lin, S. Y., Sasaki, T., & Yano, M. (1998). Fine mapping of quantitative trait loci Hd-1, Hd-2 and Hd-3, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(1–2), 37–44. <https://doi.org/10.1007/s001220050864>.