

TRANSFORMASI ANGREK DENDROBIUM DENGAN GEN *gus-A* MELALUI PERANTARAAN *Agrobacterium tumefaciens*

Maftuchah¹

ABSTRACT

A series of experiment was done to obtain orchid transgenic plant were introduced *gus-A* gene to protochorm like bodies using *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 technique and pCambia 1303 vector plasmid.

The result showed that the highest number of live *protochorm likes bodies* (PLB) in antibiotic medium (VW + 250 mg/l cefotaxime and VW + 100 mg/l cefotaxime) were obtained on the 1 day co-cultivation period, where the live PLB in VW + 100 mg/l cefotaxime reached 82 %. The increasing of co-cultivation period in genetic transformation process increasing the percentage of lethal PLB. In this experiment the treatment of 2 days dan 3 days co-cultivation period produced the highest *gus-A* gene expression at PLB where the percentage of *gus* positive at orchid PLB reached 100%. But 3 days co-cultivation period increasing the *Agrobacterium* contamination in PLB (46%) and decrease percentage of live *protochorm like bodies* Dendrobium orchid (30%) in VW + 250 mg/l cefotaxime medium.

Key words : genetic transformation, transgenic, in vitro culture, vector plasmid, *Agrobacterium tumefaciens*, *gus-A* gene

1. PENDAHULUAN

Tanaman anggrek Dendrobium merupakan salah satu jenis anggrek yang memiliki nilai penting secara komersial. Pengembangan keragaman genetik pada tanaman anggrek melalui hibridisasi seksual memerlukan suatu siklus reproduksi dan waktu pertumbuhan yang relatif panjang, disamping itu sangat dibatasi oleh variasi genetik yang ada di dalam plasma nutfah. Oleh karena itu, penerapan teknologi transformasi genetik baik secara langsung maupun tidak langsung melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* diharapkan dapat membantu mengatasi permasalahan tersebut.

Teknologi transformasi genetik tanaman telah berkembang dengan memanfaatkan berbagai metode transformasi. Transformasi genetik dapat dilakukan melalui berbagai metode antara lain elektroporasi (Arencibia *et al.* 1995), *polyethylene glycol* (Rathore *et al.* 1993), menggunakan serat silicon carbide (Kaeppler *et al.* 1990), penembakan partikel DNA (Maqbool *et al.* 1998) dan melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* (Belarmino dan Mii, 2000).

Pemakaian metode *particle bombardment* telah banyak menunjukkan keberhasilan pada tanaman anggrek, akan tetapi berbagai hasil laporan menunjukkan bahwa efisiensi transformasi maupun efisiensi regenerasinya masih sangat rendah. Disamping itu dari segi ekonomis *particle bombardment* memerlukan biaya yang sangat tinggi, peralatan serta ketrampilan khusus. Studi transformasi genetik telah dilakukan pada tanaman Angrek Phalaenopsis (Anzai *et al.* 1996), anggrek Dendrobium (Kuehnle and Sugii 1992 ; Chia *et al.* 1994), anggrek Cymbidium (Yang *et al.*, 1999) dan anggrek Vanda (Chia *et al.* 1990) melalui penggunaan teknik *particle bombardment* dari protocorm. Meskipun teknik *particle bombardment* terbukti telah berhasil digunakan untuk memproduksi tanaman transgenik dengan gen *â-glucuronidase* pada anggrek Phalaenopsis namun frekwensi regenerasi dan frekwensi transformasinya masih sangat rendah (Anzai *et al.* 1996). Oleh karena itu perlu dikaji kemungkinan penggunaan *Agrobacterium tumefaciens* dalam transformasi genetik tanaman Anggrek.

Transformasi genetik merupakan salah satu metode yang dapat dimanfaatkan untuk mempelajari

¹ Maftuchah, Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Malang

regulasi gen, identifikasi fungsi gen, pengujian metabolisme, mempelajari fisiologi serta perkembangan tanaman. Keberhasilan proses transformasi gen melalui *Agrobacterium tumefaciens* sangat ditentukan oleh berbagai hal antara lain kesesuaian antara strain *Agrobacterium tumefaciens* dengan jenis tanaman dan plasmid vektor yang dipergunakan, kerapatan sel *Agrobacterium* yang digunakan pada saat proses transformasi genetik, lama waktu ko-kultivasi, tingkat kemasaman media, kondisi kultur *in vitro* dan sebagainya. Disamping itu pemanfaatan *Agrobacterium tumefaciens* pada proses transformasi genetik jenis tanaman monokotil masih memerlukan berbagai penyesuaian dalam upaya meningkatkan efisiensi transformasi. Hal ini disebabkan secara alami bakteri patogen tanah tersebut hanya menginfeksi tanaman dikotil dengan cara mengintroduksi T-DNA dari plasmid Ti bakteri ke dalam inti sel tanaman (Smith dan Hood 1995).

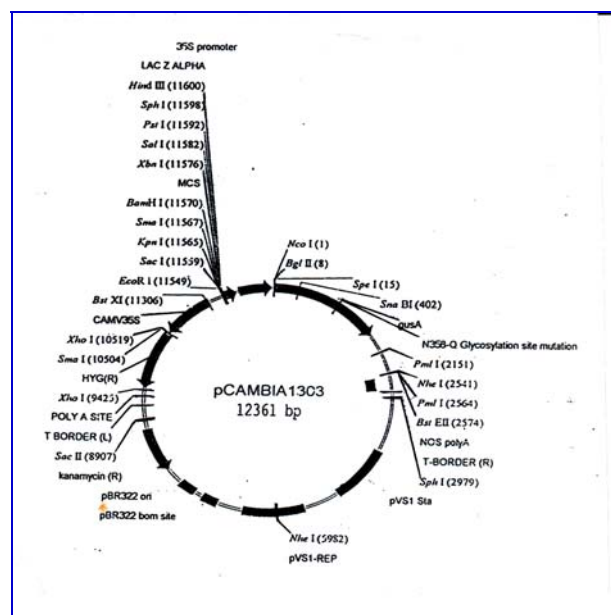
Belarmino dan Mii (2000) telah melaporkan keberhasilannya mendapatkan planlet transgenik tanaman anggrek *Phalaenopsis* melalui transformasi pada sel-sel dalam kultur suspensi anggrek *Phalaenopsis* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pTOK233) dan EHA 101 (pIG121Hm) yang membawa gen-gen α -glucuronidase serta gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin. Metode transformasi melalui *Agrobacterium* lebih banyak dipergunakan pada dikotil, namun pemanfaatannya pada monokotil masih memerlukan penyesuaian (Walden dan Wingender 1995). Salah satu hal penting dalam keberhasilan transformasi melalui *Agrobacterium* adalah spesifikasi vektor yang digunakan. Efisiensi transformasi melalui *Agrobacterium* sangat dipengaruhi pula oleh kesesuaian antara strain *Agrobacterium* dengan jenis maupun varietas tanaman (Hiei *et al.* 1994 ; Smith dan Hood 1995).

Secara keseluruhan penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan suatu paket teknologi yang sederhana dalam transformasi genetik tanaman Anggrek menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Dalam jangka panjang hasil penelitian ini diharapkan akan dapat dimanfaatkan untuk melengkapi program pemuliaan tanaman sebagai bahan persilangan serta untuk lebih membuka peluang dalam penerapan teknologi transformasi genetik khususnya pada tanaman Anggrek dengan teknik yang relatif sederhana menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (Universitas Leiden), Vektor pCambia 1303 (*Centre for Application of Molecular Biology to International Agriculture*, Canberra-Australia), Transformasi vektor pCambia 1303 dalam *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 (Maftuchah, 2004). Sebagai target transformasi genetik dipergunakan *protochorm likes bodies* anggrek hibrida *Dendrobium* yang terpilih dengan kondisi yang sehat (Sien Orchid Prigen Pasuruan).

Bahan kimia yang diperlukan antara lain : bahan untuk sterilisasi (etanol, spiritus, dll), media kultur *in vitro* anggrek (Media Vacin and Went modifikasi Lin), media ko kultivasi (Media AB + 100 μ M acetocyringone), bahan pencuci *Agrobacterium* (400 mg/l antibiotik cefotaxime), media antibiotik I (Media Vacin and Went modifikasi Lin + 250 mg/l Cefotaxime), media antibiotik II (Media Vacin and Went modifikasi Lin + 100 mg/l Cefotaxime), media regenerasi (Media Vacin and Went modifikasi Lin), serta bahan-bahan uji Gus berdasarkan metode Rueb dan Hensgens (1989) antara lain X-gluc, triton X, NaHPO₄, dll. Peralatan yang dipergunakan meliputi peralatan kultur *in vitro*, shaker inkubator, alat-alat gelas, *laminar air flow cabinet*, *analitical balance*, *autoclave*, *hot plate*, spektrometer, *microcentrifuge*, mikroskop, *gus assay plate*, *microwave*, *aluminium foil*, parafilm, dll.



2.1. Prosedur Penelitian

Dalam kultur *in vitro* anggrek, proses induksi *protochorm likes bodies* dipergunakan media Vacint and Went modifikasi Lin dengan penambahan air kelapa, gula 30 gram dan agar 8 gram untuk setiap liter media. Media dituangkan ke dalam botol kultur masing-masing 10 ml dan untuk selanjutnya disterilisasi. Kultur dipelihara di ruang kultur dengan temperatur $25\pm 3^{\circ}\text{C}$. Setelah PLB cukup besar maka dilakukan sub kultur terhadap PLB yang telah tumbuh pada media baru yang komposisinya sama dengan media induksi PLB tersebut. Untuk botol kultur dengan media padat diletak pada rak dan untuk media cair diletakan pada shaker.

Untuk persiapan proses transformasi, *Agrobacterium tumefaciens EHA 105* (yang membawa pCambia 1303) dikulturkan di media AB padat (Chilton *et al.* 1974) dengan penambahan antibiotik kanamisin dan rifampisin. Biakan tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2 malam. Dalam proses ko-kultivasi, sejumlah koloni bakteri yang telah tumbuh diambil menggunakan spatula dan disuspensikan dalam media AB cair tanpa antibiotik (Hiei *et al.* 1994) dengan $100\ \mu\text{M}$ acetocyringone. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C dengan kecepatan 200 rpm sampai mencapai $\text{OD}_{600} = 0,4 - 0,5$. Ko-kultivasi dilakukan dengan cara meginkulasikan *protochorm likes bodies* anggrek Dendrobium dalam media ko-kultivasi (AB + asetosyringone) dan diinkubasi sesuai dengan perlakuan periode ko kultivasi yang diujikan (1 hari, 2 hari, 3 hari) pada kondisi suhu 26°C di ruang gelap. Perlakuan dilaksanakan dengan menggunakan 5 ulangan, yang masing-masing ulangan menggunakan 10 PLB.

Setelah proses ko-kultivasi kalus dicuci dengan $400\ \text{mg/l}$ cefotaxime. Sebagian kalus diambil untuk uji Gus berdasarkan metode Rueb dan Hensgens (1989). Kemudian kalus yang telah dicuci ditumbuhkan pada media antibiotik I (Media Vacin and Went modifikasi Lin yang ditambah antibiotik Cefotaxime $250\ \text{mg/l}$). Inkubasi dalam media antibiotik pertama dilakukan pada suhu $25^{\circ} - 26^{\circ}\text{C}$ di ruang gelap selama 2 minggu. Kalus yang hidup dari media atibiotik pertama selanjutnya dikulturkan lagi pada media antibiotik kedua (Media Vacin and Went modifikasi Lin yang ditambah antibiotik Cefotaxime $100\ \text{mg/l}$), dan kultur diinkubasi kembali pada suhu $25^{\circ} - 26^{\circ}\text{C}$ di ruang gelap selama 2 minggu. Ekspresi enzim β -glucuronidase diuji pada tingkat

protochorm likes bodies. PLB hidup resisten hasil seleksi pertama dan kedua selanjutnya digunakan sebagai bahan uji Gus berdasarkan metode Rueb dan Hensgens (1989). Kalus direndam buffer fosfat (NaPO_4 ; pH 6,8) yang mengandung Triton X-100 pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu PLB yang diuji dicuci menggunakan buffer fosfat segar, kemudian kalus direndam larutan X-gluc dan diinkubasi semalam pada suhu 37°C . Setelah itu ditambahkan alkohol 70%. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop dan sel transgenik yang mengekspresikan β -glucuronidase akan menunjukkan biru (Rueb *et al.* 1994).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam transformasi genetik, tahap awal yang dilakukan adalah melakukan kultur *in vitro* tanaman anggrek Dendrobium dalam upaya penyediaan PLB sebagai target transformasi gen. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan ko-kultivasi selama 1 hari telah menunjukkan *protochorm likes bodies* positif GUS sebanyak 62%. Pada proses ko-kultivasi yang dilaksanakan selama 2 hari jumlah kalus positif GUS mencapai 100% dan tidak berbeda dengan waktu ko-kultivasi PLB selama 3 hari (Tabel 1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa proses ko-kultivasi *protochorm likes bodies* anggrek Dendrobium dalam proses transformasi genetik melalui *Agrobacterium tumefaciens EHA 105* cukup dilaksanakan dalam waktu 2 hari. Hal ini disebabkan semakin lama waktu ko kultivasi yang dilakukan akan semakin memacu perkembangan populasi *Agrobacterium tunefacuiens* yang semakin tinggi, sehingga hal ini akan mengganggu tahapan mematikan bakteri dalam proses transformasi tersebut.

Tabel 1. Rata-rata dan persentase jumlah protochorm likes bodies anggrek Dendrobium positif Uji Gus pada berbagai perlakuan lama waktu ko kultivasi

Lama Watu Ko Kultivasi	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5	Rata-rata (Persentase)
1 hari	5	7	8	5	6	6,2 (62 %)
2 hari	10	10	10	10	10	10 (100%)
3 hari	10	10	10	10	10	10 (100%)

Catatan : 5 ulangan (a. 10 PLB per ulangan)

Data yang diperoleh pada Tabel 2 menunjukkan bahwa semakin lama proses ko-kultivasi dilaksanakan maka jumlah PLB kontaminasi *Agrobacterium tumefaciens* setelah proses pencucian juga semakin tinggi. Pada perlakuan waktu ko-kultivasi selama 1 hari, jumlah PLB terkontaminasi *Agrobacterium* setelah proses pencucian hanya sebesar 4 persen. Dengan peningkatan periode ko-kultivasi selama 2 hari dan 3 hari, jumlah PLB kontaminasi *Agrobacterium* setelah proses pencucian meningkat hingga mencapai 24 % dan 46%.

Tabel 2. Rata-rata dan persentase PLB kontaminasi *Agrobacterium tumefaciens* di media antibiotik pertama pada berbagai perlakuan lama waktu ko- kultivasi

Lama Watu Ko Kultivasi	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5	Rata-rata (persentase)
1 hari	1	0	0	1	0	0,4 (4 %)
2 hari	2	3	1	4	2	2,4 (24 %)
3 hari	5	7	3	2	6	4,6 (46 %)

Catatan : 5 ulangan (a. 10 PLB per ulangan)

Ekspresi enzim β -glucuronidase diuji pada tingkat PLB. PLB hidup dari media antibiotik pertama, selanjutnya digunakan sebagai bahan uji Gus berdasarkan metode Rueb dan Hensgens (1989). PLB yang telah lolos dari media antibiotik pertama dan kedua selanjutnya direndam buffer fosfat (0,1 M

NaPO_4 ; pH 6,8) yang mengandung 1% Triton X-100 pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu dicuci 2 kali dengan buffer fosfat segar, masing-masing divakum selama 5 menit. Kemudian kalus direndam larutan *X-gluc*, divakum selama 5 menit, kemudian diinkubasi semalam pada suhu 37°C. Setelah itu bufer fosfat dibuang dan ditambahkan alkohol 70 %. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop (Rueb *et al.* 1994) sel transgenik yang mengekspresikan β -glucuronidase akan berwarna biru. Hasil uji GUS pada PLB anggrek Dendrobium



Gambar 2. Uji GUS PLB anggrek Dendrobium hasil transformasi melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* pada periode ko-kultivasi selama 1 hari



Gambar 3. Uji GUS PLB anggrek Dendrobium hasil transformasi melalui perantara *Agrobacterium*



Gambar 4. Uji GUS PLB anggrek Dendrobium hasil transformasi melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* pada periode ko-kultivasi selama 3 hari

Hasil pengamatan terhadap rata-rata dan persentase PLB anggrek Dendrobium hidup di media antibiotik pertama (VW + cefotaxime 250 mg/l) pada berbagai perlakuan lama waktu ko kultivasi menunjukkan bahwa pada periode ko-kultivasi selama 1 hari, PLB anggrek hidup di media antibiotik pertama mencapai 96 %. Pada perlakuan ko-kultivasi selama 2 hari, PLB anggrek hidup di media antibiotik pertama sebanyak 76 % dan perlakuan ko-kultivasi selama 3 hari PLB anggrek hidup di media antibiotik pertama hanya 50 % (Tabel 3). Rendahnya persentase PLB hidup pada perlakuan ko-kultivasi selama 3 hari antara lain disebabkan tingginya kontaminasi *Agrobacterium tumefaciens* setelah pencucian dengan antibiotik Cefotaxime 400 mg/l.

Tabel 3. Rata-rata dan persentase PLB anggrek Dendrobium hidup di media antibiotik pertama (VW + cefotaxime 250 mg/l) pada berbagai perlakuan lama waktu ko kultivasi

Lama Watu Ko Kultivasi	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5	Rata-rata (persentase)
1 hari	9	10	10	9	10	9,6 (96 %)
2 hari	8	7	9	6	8	7,6 (76 %)
3 hari	5	3	6	7	4	5,0 (50 %)

Catatan : 5 ulangan (a. 10 PLB per ulangan)

Di media antibiotik kedua (VW + cefotaxime 100 mg/l) hasil dari berbagai perlakuan lama waktu ko kultivasi menunjukkan bahwa pada ko-kultivasi selama 1 hari, PLB anggrek hidup di media antibiotik kedua sebesar 82%. Pada perlakuan ko-kultivasi selama 2 hari, PLB anggrek hidup di media antibiotik kedua adalah 72% dan perlakuan ko-kultivasi selama 3 hari, PLB anggrek hidup di media antibiotik kedua berkurang hingga 30% (Tabel 4). Semakin rendahnya persentase PLB hidup pada perlakuan ko-kultivasi selama 3 hari disebabkan masih tingginya kontaminasi *Agrobacterium tumefaciens* hingga di media

Lama Watu Ko Kultivasi	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Ulangan 4	Ulangan 5	Rata-rata (persentase)
1 hari	7	7	9	8	10	8,2 (82 %)
2 hari	8	6	9	5	8	7,2 (72 %)
3 hari	2	1	4	6	2	3,0 (30 %)

Catatan : 5 ulangan (a. 10 PLB per ulangan)

Kemampuan *Agrobacterium* untuk menjadi “genetik engineer” alami telah dimanfaatkan sebagai alat genetik yang sangat penting. Kemampuan untuk melakukan transformasi pada sel tanaman tersebut berhubungan dengan adanya plasmid penginduksi tumor. Akan tetapi untuk pemakaian *Agrobacterium* seringkali diperlukan berbagai penyesuaian terhadap tanaman monokotil maupun pada beberapa kelompok tanaman yang rekalsitran. Sheng dan Citovsky (1996) menyatakan *Agrobacterium* memiliki tiga komponen genetik yang dipergunakan untuk menginfeksi tanaman. Komponen pertama adalah T-DNA yaitu fragmen yang ditransfer ke sel tanaman dan terletak di plasmid Ti dari *Agrobacterium*. Komponen kedua adalah *virulence (vir) region*, dimana gen *vir* berekspresi jika terdapat inducer yang berupa senyawa monosiklik fenolik seperti asetosyringone serta monosakarida seperti glukosa dan galaktosa. Komponen ketiga adalah *chromosomal virulence (chv)* yang terletak di kromosom *Agrobacterium* yang berfungsi dalam pelekatan bakteri ke dalam sel tanaman dengan membentuk senyawa protein β -1,2 glukukan.

Keuntungan transformasi genetik melalui *Agrobacterium* pada tanaman adalah jumlah salinan gen yang relatif sedikit dalam kromosom sehingga mengurangi kemungkinan terganggunya fungsi gen lain, mampu mentransfer segmen DNA yang relatif besar serta menghasilkan tanaman transgenik dengan fertilitas tinggi. Disamping itu teknik transformasi melalui *Agrobacterium* relatif lebih sederhana, dalam beberapa kasus lebih efisien dan lebih ekonomis dibandingkan teknik protoplas dan penembakan DNA (De Block 1993).

Pada penelitian ini dipergunakan vektor pCambia 1303. Vektor tersebut memiliki beberapa kelebihan antara lain memiliki *multiple cloning side* (MCS), bersifat stabil di *Agrobacterium*, ukurannya relatif kecil dan jumlahnya tinggi dalam *E.coli*. Sifat khusus dari pCambia adalah rangkaiannya lengkap, memiliki pBR322 *origin of replication* untuk replikasi dalam *E.coli* dan *Agrobacterium*, memiliki pBR322 *bom site* untuk mobilisasi dari *E.coli* ke *Agrobacterium*, membawa gen *hpt* untuk ketahanan terhadap antibiotik higromisin, gen *nptII* untuk ketahanan terhadap kanamisin, gen *gusA*, serta dapat diuji dengan seleksi biru - putih karena membawa gen *lacZ* (Brown 1996). Pemakaian antibiotik kanamisin sebagai agen penyeleksi pada kultur *Agrobacterium* yang akan digunakan dalam proses transformasi dengan pertimbangan bahwa gen penyandi ketahanan terhadap antibiotik kanamisin tersebut ada pada plasmid vektor pCambia 1303. Selanjutnya satu koloni *Agrobacterium* diinokulasikan dalam media tersebut dan biakan diinkubasi selama semalam pada suhu 37°C.

T-DNA vektor pCambia mengandung gen *nptII*, gen *hpt*, dan gen *gusA*. Gen *nptII* penyandi enzim *neomycin phosphotransferase* yang digunakan sebagai penyeleksi pada bakteri. Gen *gusA* penyandi enzim β -*glucuronidase* yang secara umum dipergunakan sebagai penanda pada sistem transformasi genetik tanaman (Jefferson 1987).

4. KESIMPULAN DAN SARAN

a. Kesimpulan

Dari hasil penelitian telah berhasil diperoleh *protochorm like bodies* transgenik anggrek *Dendrobium* lokal Indonesia yang mengandung plasmid vektor pCambia 1303 (12.361 bp) yang diperoleh dari transformasi genetik melalui perantaraan *Agrobacterium tumefaciens*. Semakin lama waktu ko kultivasi akan semakin meningkatkan jumlah PLB

kontaminasi *Agrobacterium tumefaciens* setelah proses pencucian PLB. Waktu ko-kultivasi selama 2 hari menghasilkan jumlah PLB positif GUS mencapai 100% dan tidak berbeda dengan waktu ko kultivasi 3 hari. Disamping itu, dalam perlakuan waktu ko kultivasi 2 hari ekspresi gen hasil uji GUS sudah cukup merata di permukaan PLB target transformasi. Waktu ko kultivasi selama 2 hari menghasilkan jumlah PLB hidup di media antibiotik kedua sebesar 72% sedangkan ko kultivasi selama 2 hari hanya menghasilkan jumlah PLB hidup di media antibiotik kedua sebesar 30%. Oleh karena itu waktu ko kultivasi selama 2 hari dapat disimpulkan paling efisien dalam proses transformasi genetik anggrek *Dendrobium* menggunakan perantaraan *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105.

b. Saran

Hasil penelitian ini perlu dilanjutkan ke tahapan regenerasi dan aklimatisasi, sehingga diharapkan dapat diperoleh tanaman transgenik anggrek *Dendrobium* yang membawa gen *gus-A*. Dalam tahapan selanjutnya perlu dilaksanakan analisis morfologis, histokimia serta analisis molekuler tanaman anggrek transgenik yang dihasilkan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada : 1) Pimpinan Universitas Muhammadiyah Malang dan Lembaga Penelitian Universitas Muhammadiyah Malang yang telah memberikan dana penelitian dalam bentuk Program Penelitian Unggulan (P2U) Tahun 2005, 2) *Centre for Application of Molecular Biology to International Agriculture* (CAMBIA), Canberra-Australia atas bantuan plasmid vektor pCambia 1303, 3) Pimpinan Laboratorium Molekuler Tanaman, Puslit Bioteknologi – LIPI, Cibinong atas bantuan strain *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, 4) Pipit Front Rismawati, Hermida Achmad, Marry Selva Wajayanti atas bantuan teknis di laboratorium selama pelaksanaan penelitian, 5) Ir. Agus Zainudin MP atas bantuan penelusuran informasi /pustaka pendukung penelitian dan pengambilan foto

DAFTAR PUSTAKA

Anzai H, Ishii Y, Shichinohe M, Katsumata K, Nojiri C, Morikawa H. And Tanaka M. 1996. Transformation of *Phalaenopsis* by particle bombardment. *Plant Tissue Cult Lett* 13:265-271.

- Arencibia A, Molina PR, Dela Riva G and Selman-Housein G. 1995. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by intact cell electroporation. *Plant Cell Rep* 14 : 305-309.
- Belarmino MM. and Mii M. 2000. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of a phalaenopsis orchid. *Plant Cell Report* 19:435-442
- Chia TF, Chan YS, Chua NH. 1990. Genetic engineering of tolerance to cymbidium mosaic virus. In: Kernohan J., Bonham N., Bonham D., Cobb L (eds). *Proc 13th World Orchid Conf.* 1990. World Orchid Conf Trust, Auckland, New Zealand, p. 284
- Chia TF, Chan YS, and Chua NH. 1994. The firefly luciferase gene as a non-invasive reporter for *Dendrobium* transformation. *Plant J* 6:441-446.
- Chilton MD, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP and Nester EW. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PSB bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 71 : 3672-3676
- De Block M. 1993. The cell biology of plant transformation : Current state, problems, prospects and the implications for the plant breeding. *Euphytica* 71 : 1-14.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T and Kumashiro T. 1994. Efficient transformation of rice mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant J* 6 (0) : 001-011.
- Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plant : the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 55 : 387-405.
- Kaepler HF, Gu W, Somers DA, Rines HW and Cockburn AF. 1990. Silicon carbide fiber mediated DNA delivery into plant cells. *Plant Cell Report* 9 : 415-418.
- Kuehnle AR and Sugii N. 1992. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle gun bombardment of protocorms. *Plant Cell Rep* 11:484-488.
- Maftuchah, 2004. Transformasi plasmid vektor ke sel *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105. Laporan Program Penelitian Unggulan (P2U). Universitas Muhammadiyah Malang.
- Maqbool SB, Husnain T, Riazuddin S, Masson L and Christou P. 1998. Effective control of yellow stem borer and rice leaf folder in transgenic rice indica varieties Basmati 370 and M7 using the novel δ -endotoxin *cry2A Bacillus thuringiensis* gene. *J. Mol. Breed* 4 : 501-507.
- Rathore KS, Chowdhury VK and Hodges TK. 1993. Use of *bar* as a selectable marker gene and for the production of herbicide-resistant rice plants from protoplast. *Plant Mol Biol.* 21 : 871-884.
- Rueb S and Hensgens LAM. 1989. Improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monocotyledonous plants. *Rice Genet Newsl* 6 : 168-169.
- Rueb S, Leneman M, Schilperoort RA and Hensgens LAM. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Cult* 36 : 259-264.
- Sheng J. and Citovsky V. 1996. *Agrobacterium* - plant cell DNA transport : have virulence proteins will travel. *The Plant Cell* 8 : 1699-1710.
- Smith RH and Hood EE. 1995. *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons, *Transgenic Research*, 2:301-309.
- Walden R and Wingender R. 1995. Gene transfer and plants regeneration techniques. *Trends in Biotechnology. Elsevier Trends Journal, Cambridge.* 13(9) : 324