

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Deskripsi Tanaman Jamblang

Jamblang adalah tanaman tropis termasuk suku Myrtaceae yang dapat dapat ditemukan di Indonesia, Asia tropis, dan Australia. Tanaman ini sudah digunakan buah, daun, dan bijinya sebagai obat sejak ribuan tahun lalu di Indonesia dan telah diuji aktivitas farmakologinya (Hidayah dkk., 2021). Tanaman jamblang meliputi bagian buah, bunga, pohon, dan daun dapat dilihat pada Gambar 1.



(a)



(b)



(c)



(d)

Gambar 1. Tanaman Jamblang. (a) Buah; (b) Bunga; (c) Pohon dan (d) Daun (Soeroto dkk., 2018).

Jamblang dapat tumbuh di dataran rendah hingga 500 m di atas permukaan laut. Tumbuhan jamblang umumnya tumbuh mencapai 10 - 20 m.

Morfologi jamblang yaitu memiliki batang tebal dengan tangkai daun dengan ukuran 1 - 3,5 cm dan memiliki helai daun bulat telur terbalik dengan pangkal lebar berbentuk baji dengan tepi rata dan bertulang menyirip. Permukaan daun jamblang berwarna hijau mengkilap dengan lebar 5 - 9 cm dan panjang 7 - 16 cm. Bunga jamblang memiliki tipe morfologi majemuk, duduk, dan tumbuh di ketiak daun serta ujung percabangan dengan cabang yang jauh. Buah jamblang berupa berbiji satu, keras, dan memiliki bentuk lonjong dengan panjang 2 - 3 cm dengan warna hijau ketika masih muda dan berubah warna menjadi merah tua keunguan atau putih ketika matang (Soeroto dkk., 2018).

Jamblang memiliki populasi yang menurun dan sulit ditemukan di Indonesia (Sudomo dan Pieter, 2021). Tanaman jamblang sulit ditemukan keberadaannya karena upaya budidaya masyarakat yang relatif terbatas dan sedikitnya pengetahuan tentang manfaat setiap bagian dari jamblang seperti biji untuk obat diabetes, daun untuk penguat gigi dan penguat gusi, serta buah untuk antioksidan, anti-kanker, dan disentri (Sudomo dan Swestiani, 2018). Tanaman jamblang dapat diklasifikasikan sebagai berikut (*Integrated Taxonomic Information System/ITIS*, 2022).

Kerajaan : Plantae
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Bangsa : Myrtales
 Suku : Myrtaceae
 Marga : *Syzygium*
 Jenis : *Syzygium cumini* L. Skeels

Tanaman jamblang dapat berbunga setelah berumur 4 - 5 tahun (Swaminathan dan Kochhar, 2019). Jamblang memiliki periode pembungaan

sekitar minggu ke-3 pada bulan Februari hingga minggu ke-2 bulan Maret tergantung pada kondisi lingkungan. Puncak fase pembungaan total ditandai dengan munculnya buah jamblang dan pematangan buah berlangsung selama 119 - 126 hari dengan inisiasi kuncup bunga selama 45 - 50 hari. Periode pembungaan pada jamblang berlangsung selama 14 - 19 hari dengan waktu pemekaran penuh selama 5 - 8 hari setelah tahap antesis (Bajpai dkk., 2012). Oleh karena itu, percepatan fase pembungaan pada tanaman jamblang menjadi langkah penting untuk mendukung pemanfaatannya sebagai sumber senyawa yang bernilai farmakologis.

Jamblang memiliki berbagai efek farmakologis yang telah diuji meliputi kardiovaskular, anti-kolesterol, anti-diabetes, anti-inflamasi, anti-diare, antioksidan, anti-kanker, antileishmania, dan anti-jamur (Hidayah dkk., 2021). Buah jamblang mengandung flavonoid dengan kadar tinggi, resin, tanin, alkaloid serta minyak atsiri. Biji buah jamblang memiliki kandungan asam *ellagic*, korilagin, asam galat, *3,6-hexahydroxy diphenoylglucose*, *1-galloylglucose*, *3-galloylglucose*, kuersetin, β -sitoterol, dan *4,6-hexahydroxydiphenoylglucose*. Daun jamblang mengandung glikosida flavonol terasilasi dengan kadar tinggi, tanin, triterpenoid, kuersetin, *myricetin*, *myricitin 3-O-4-acetyl-L-rhamnopyranoside*, *galloyl carboxylase*, dan esterase (Kumawat dkk., 2018). Kulit batang jamblang memiliki kandungan tanin, flavonoid, asam betulunik, asam *ellagic*, friedelin, asam galat, epi-friedelanol, eugenin, ester asam lemak epi friedelanol, β -sitosterol, kuersetin kaempferol, *myricetin*, dan bergenin (Jagetia dkk., 2017).

B. Kalus Embriogenik sebagai Target Transformasi

Kalus merupakan kumpulan massa sel parenkim dengan dinding tipis yang masih aktif membelah dan dapat diinduksi dari berbagai bagian tanaman dengan sifat meristematik pada jaringan muda serta jaringan dewasa yang telah terdiferensiasi (Mastuti, 2017). Kalus embriogenik dan non-embriogenik memiliki perbedaan morfologi. Kalus embriogenik memiliki morfologi kompak, nodular, memiliki warna kekuningan hingga keputihan, dan memiliki sel yang berdekatan dan menyatu dengan erat. Kalus non-embriogenik memiliki morfologi yang memanjang, jarak antara sel yang longgar, berair, dan memiliki warna kalus yang semakin berubah menjadi kecoklatan seiring menuju fase kematian (Abiri dkk., 2017). Morfologi kalus embriogenik umumnya memiliki tekstur remah tetapi kalus embriogenik jambang memiliki tekstur intermediet, warna kalus putih kekuningan hingga sedikit kecoklatan, sel kalus embriogenik memiliki nukleus yang besar dengan vakuola kecil dan plastida dalam jumlah banyak di setiap sel (Ummah dkk., 2020).

Kalus yang memiliki sifat embriogenik digunakan dalam transformasi genetik. Kalus embriogenik dipilih karena dapat menghasilkan persentase frekuensi transformasi yang tinggi dengan waktu transformasi yang singkat (Paterson, 2013). Kalus embriogenik ideal sebagai target transformasi karena memiliki potensi regenerasi tinggi, lebih mudah diketahui genotipenya bila dibandingkan dengan bibit karena kondisi genetik yang seragam, meminimalisir terbentuknya *chimera*, dan memiliki stabilitas tinggi karena

dapat menurunkan sifat yang dibawahnya kepada regenerasi selanjutnya (Ratjens dkk., 2018).

C. *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium merupakan bakteri Gram negatif yang hidup bebas di dalam tanah dan mampu menginfeksi tanaman dengan memasukkan bagian spesifik dari genomnya untuk dimasukkan ke dalam inti sel tanaman yang rentan untuk disisipi (Darmayani dkk., 2021). *Agrobacterium tumefaciens* merupakan salah satu spesies *Agrobacterium* yang memiliki sifat patogen yang mampu menyebabkan penyakit tumor atau *crown gall* pada tanaman. *A. tumefaciens* umum digunakan sebagai vektor dalam transformasi genetik pada proses pembentukan tanaman transgenik (Handayani, 2013).

Bakteri ini mampu melakukan infeksi maupun transformasi genetik pada sel inang target transformasi karena adanya proses transpor T-DNA (*transferred DNA*) dari *A. tumefaciens* ke dalam inti sel tanaman (Handayani, 2013). Bakteri *A. tumefaciens* dipilih sebagai vektor dalam transformasi genetik karena membutuhkan teknik yang lebih mudah dan murah serta salinan gennya rendah dan stabil (Nyaboga dkk., 2014). Transformasi genetik dengan bakteri *A. tumefaciens* dilakukan melalui rekayasa dengan penggantian DNA onkogenik pada plasmid Ti dengan DNA target melalui bantuan enzim restriksi, kemudian plasmid Ti rekombinan dimasukkan ke dalam sel bakteri. Bakteri *A. tumefaciens* menginfeksi tumbuhan dengan serangkaian penangkapan sinyal tumbuhan dan regulasi gen virulensi pada bakteri setelah

proses transduksi kemudian infeksi bakteri tersebut ke dalam tanaman meliputi integrasi T-DNA dari sel bakteri ke sel tumbuhan hingga T-DNA target dapat terintegrasi dan terekspresi pada genom tumbuhan (Darmayani dkk., 2021).

Bakteri *A. tumefaciens* memiliki T-DNA di dalam plasmid Ti (*tumor inducing*) yang pada kondisi alami dapat menyebabkan tumor pada leher batang suatu tumbuhan dikotil maupun monokotil yang terluka. Plasmid Ti pada *A. tumefaciens* memiliki potensi dalam proses transformasi genetik karena dapat menggantikan T-DNA dengan DNA target untuk membuat plasmid rekombinan. Plasmid Ti secara alami tidak memiliki *marker* sehingga perlu disisipi gen resistensi antibiotik pada plasmid supaya dapat digunakan dalam tahap seleksi untuk memastikan berhasil atau tidaknya suatu proses transformasi genetik yang dilakukan (Widiarti, 2016).

Galur bakteri yang digunakan merupakan salah satu faktor keberhasilan kultur dalam transformasi genetik (Wahyuni dkk., 2015). Pemilihan galur bakteri yang digunakan dalam transformasi genetik perlu diperhatikan karena dapat mempengaruhi hasil dan ekspresi protein yang disisipkan. Bakteri *A. tumefaciens* galur EHA105 merupakan salah satu galur yang paling umum digunakan dalam proses transformasi genetik (Wang, 2006).

Penelitian yang telah dilakukan oleh Universitas Caldas pada beberapa galur *A. tumefaciens* meliputi EHA105, AGL1, MP90, dan GV3101 menunjukkan persentase laju transformasi paling tinggi dihasilkan oleh galur

GV3101 (60%) diikuti dengan EHA105 (40%), AGL1 (35%) dan MP90 (15%). Galur EHA105 memiliki sifat yang lebih efisien dalam melakukan transfer urai tunggal T-DNA ke dalam *nptII* dan *uidA* pada genom tanaman tomat bila dibandingkan dengan galur GV3101 (Acton, 2012).

D. Transformasi Genetik melalui Perantara *A. tumefaciens*

Transformasi genetik yang dilakukan pada tanaman merupakan kegiatan pemindahan dan penyisipan gen asing yang didapatkan dari bakteri, virus, hewan, manusia, atau tanaman yang telah direkayasa ke dalam gen suatu spesies tanaman target untuk memperoleh tanaman transgenik. Tanaman transgenik merupakan tanaman yang berhasil disisipi transgen atau gen asing hasil rekayasa genetika. Tanaman transgenik dibuat untuk memperoleh tanaman unggul dengan sifat dan karakteristik yang lebih baik daripada tanaman alaminya. Jumlah penduduk dunia yang semakin meningkat, adanya masalah penyakit, gulma, dan hama juga menjadi suatu alasan pembuatan tanaman transgenik supaya kualitas tanaman yang baik dapat diperoleh serta kebutuhan dapat tercukupi (Dwiyani dkk., 2016).

Prinsip transformasi genetik pada tanaman melalui serangkaian proses berupa tahap insersi transgen, integrasi transgen ke dalam genom tanaman, serta ekspresi transgen yang telah diintegrasikan ke dalam genom. Tahap insersi transgen dilakukan dengan suatu metode supaya transgen tepat terintegrasi ke dalam sel tanaman target dan harus menyatu dengan DNA kromosom dalam inti sel tanaman pada daerah yang tepat dengan proses

integrasi transgen pada genom tanaman sehingga akan terekspresi pada tanaman transgenik. Tahap selanjutnya, DNA sudah dapat melakukan transkripsi dan translasi setelah disisipi gen asing sehingga gen tersebut telah dapat dinyatakan fungsional atau memiliki fungsi di dalam tanaman (Dwiyani dkk., 2016). Transformasi genetik yang berhasil ditandai dengan tumbuhnya tanaman transgenik fertil baru yang dapat bertumbuh serta berkembang secara normal dan menunjukkan ekspresi gen target yang telah disisipkan (Nugroho dan Rahayu, 2017).

Metode *Agrobacterium-mediated transformation* dan *microprojectile bombardment* merupakan 2 metode yang sering dan banyak digunakan dalam proses transformasi genetik pada tanaman. Metode *Agrobacterium-mediated transformation* merupakan metode transformasi genetik menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* sebagai mediator atau vektor pembawa gen target ke dalam tanaman target menggunakan Ti-plasmid yang mengandung DNA target yang telah disisipkan. Kelebihan metode *Agrobacterium-mediated transformation* yaitu dapat menghasilkan tanaman transgenik yang fertil, mudah dilakukan dibandingkan dengan metode lainnya, biaya relatif lebih murah, dan transgen yang telah disisipkan ke dalam genom tanaman dapat diturunkan ke progeni selanjutnya (Dwiyani dkk., 2016).

Transformasi genetik dilakukan melalui beberapa tahap meliputi inokulasi, kokultivasi, eliminasi, dan seleksi. Tahap infeksi meliputi tahap inokulasi dan kokultivasi dilakukan dengan target transformasi dikultivasi bersama *A. tumefaciens* sehingga penyisipan gen target ke dalam genom target

transformasi terjadi. Tahap eliminasi dilakukan untuk menghilangkan *A. tumefaciens* pada target transformasi. Tahap seleksi dilakukan untuk menyeleksi eksplan transforman dengan non-transforman dengan menanam eksplan hasil transformasi pada medium seleksi yang diperkaya antibiotik. Kandidat transforman dianalisis molekuler setelah proses seleksi selesai dengan PCR dan elektroforesis sehingga transforman putatif dapat diseleksi (Dwiyani dkk., 2012). Kalus yang mampu bertahan dan berhasil diseleksi setelah dilakukan transformasi genetik menunjukkan warna kalus putih kekuningan dan berkembang menjadi kehijauan serta tumbuh dengan lambat karena adanya potensi kalus untuk menjadi stres akibat dilakukannya proses transformasi yang meliputi infeksi oleh *A. tumefaciens* dan seleksi dengan antibiotik (Iskarlia, 2013).

E. Waktu Infeksi

Infeksi adalah salah satu tahap transformasi genetik dengan melakukan inkubasi target transformasi di dalam suspensi *A. tumefaciens* dalam periode tertentu. Waktu infeksi merupakan lama waktu target transformasi diinkubasi dalam suspensi *A. tumefaciens* (Gnasekaran dkk., 2014). Waktu infeksi pada setiap target transformasi tergantung pada tumbuhan target yang digunakan karena sensitivitas target transformasi terhadap *A. tumefaciens* bervariasi sehingga waktu optimalnya berbeda (Duan dkk., 2013).

Faktor dinding sel dan genotip target transformasi dapat mempengaruhi sensitivitas target transformasi terhadap proses infeksi *A.*

tumefaciens. Dinding sel tanaman pada umumnya tersusun dari pektin, lignin, hemiselulosa, dan selulosa, bagian ini berguna dalam membentuk struktur sel dan mekanisme pertahanan sel. Komponen dinding sel dan genotipe pada setiap spesies tumbuhan sangat bervariasi sehingga afinitas serta level kerentanan spesies satu dengan yang lain terhadap *A. tumefaciens* yang menginfeksi dapat berbeda (Malinovsky dkk., 2014).

Penelitian Mishra dkk. (2014) tentang insersi gen endokitinase pada tunas apikal spesies *Psidium guajava* L. dengan perlakuan waktu infeksi 30 menit, 45 menit dan 60 menit serta waktu kokultivasi dalam keadaan gelap selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam menghasilkan frekuensi transformasi tertinggi pada perlakuan waktu infeksi 45 menit dengan kokultivasi selama 72 jam dalam keadaan gelap. Waktu infeksi yang terlalu singkat dapat menyebabkan persentase frekuensi transformasi rendah, sedangkan waktu infeksi yang terlalu panjang dapat menyebabkan *overgrowth* *A. tumefaciens* dan sel target transformasi dapat lisis akibat kondisi hipertonik (Qianru dkk., 2017). Sel target transformasi dapat mengalami nekrosis dan kematian akibat waktu infeksi yang terlalu panjang dapat menyebabkan toksisitas (Mannan dkk., 2009). Waktu infeksi terbaik perlu diketahui untuk target transformasi yang dikehendaki sehingga frekuensi transformasi tinggi dapat diperoleh (Sukanto dkk., 2017).

F. Konsentrasi dan Mekanisme Higromisin dalam Tahap Seleksi

Seleksi merupakan suatu tahapan dalam proses transformasi genetik yang dilakukan untuk menyeleksi hasil transformasi melalui uji resistensi terhadap antibiotik. Tahap seleksi penting dilakukan untuk mengetahui berhasil atau tidaknya transformasi genetik yang dilakukan (Nugroho dan Rahayu, 2017). Tahap seleksi dapat mempengaruhi naik turunnya frekuensi transformasi karena adanya perbedaan tingkat kepekaan kalus target transformasi dengan antibiotik seperti higromisin sehingga perlu dilakukan optimasi pada konsentrasi antibiotik higromisin dalam tahap seleksi kalus transforman. Target transformasi yang terseleksi sebagai transforman memiliki ciri berupa warna kalus kehijauan dan dapat beregenerasi menghasilkan tunas dan menunjukkan hasil yang positif mengandung gen resistensi antibiotik *HPT* ketika dianalisis menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) (Sisharmini dkk., 2018).

Higromisin merupakan salah satu antibiotik dengan sifat toksik terhadap kalus maupun eksplan sehingga dapat menyebabkan kematian sel. Antibiotik ini umum digunakan dalam proses transformasi genetik sebagai agen atau penanda seleksi karena kemampuannya dalam menyeleksi kandidat transforman yang berhasil atau tidak berhasil ditransformasi. Batas toleransi konsentrasi higromisin pada setiap tanaman berbeda karena dipengaruhi oleh perbedaan jenis eksplan, genotip eksplan, dan jenis antibiotik yang digunakan (Rizania dkk., 2015).

Antibiotik higromisin umum digunakan pada tahap seleksi awal transgenik yang menggunakan gen penanda *HPT* (Dwiyani dkk., 2016). Antibiotik ini sangat efektif menghambat pertumbuhan tanaman non-transgenik. Konsentrasi higromisin yang lebih rendah sebesar 5 ppm ketika dibandingkan dengan konsentrasi kanamisin yang lebih tinggi sebesar 100 ppm menunjukkan frekuensi transformasi lebih besar diperoleh pada perlakuan antibiotik higromisin. Higromisin mampu menghambat pertumbuhan sel lebih tinggi dibandingkan dengan kanamisin (Ratjens dkk., 2018). Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi higromisin dalam menghambat pertumbuhan kalus jambalang non-transgenik.

Frekuensi transformasi genetik dan kemampuan regenerasi dipengaruhi oleh jenis, umur, dan genotipe eksplan serta media dasar, kombinasi hormon, periode, dan konsisi kultur (Sisharmini dkk., 2018). Perbedaan genotipe antar tanaman menyebabkan kemampuan regenerasi yang berbeda sehingga membutuhkan rekayasa *in vitro* yang berbeda pada setiap genotipe. Konsentrasi higromisin yang terlalu rendah tidak mampu untuk menyeleksi target transforman, sedangkan konsentrasi higromisin yang terlalu tinggi akan menyebabkan munculnya sifat toksisitas higromisin terhadap target transformasi sehingga menyebabkan kematian target transformasi yang tidak tertransformasi maupun tertransformasi karena adanya cekaman antibiotik (Rizania dkk., 2015). Konsentrasi higromisin yang paling baik dalam menyeleksi kalus transforman ditandai dengan seluruh kalus yang tetap

hidup pada medium dengan campuran antibiotik higromisin dan terbukti mengandung gen target setelah dianalisis dengan PCR (Htwe dkk., 2014).

Penelitian Ouyang dan Li (2016) melakukan transformasi genetik *aiiA* (resistensi penyakit) pada tanaman *E. camaldulensis* yang termasuk suku Myrtaceae dengan hasil konsentrasi antibiotik higromisin pada tahap seleksi induksi tunas adventif transgenik sebesar 9 ppm dan pemilihan perakaran transgenik sebesar 15 ppm pada tanaman. Penelitian Mursyanti (2017) melakukan transformasi genetik *AtRKD4* pada protokorm tanaman anggrek *Phalaenopsis* “Sogo Vivien” berumur 21 hari dengan variasi konsentrasi higromisin sebesar 0, 10, 20, 30, dan 40 ppm dengan waktu inkubasi 0, 1, 2, 3, dan 4 minggu menghasilkan 10 ppm sebagai konsentrasi higromisin terbaik dengan waktu inkubasi selama 1 minggu. Konsentrasi higromisin 10 ppm mampu menghambat pertumbuhan protokorm *P. “Sogo Vivien”* sebesar 56,83% dan kematian protokorm meningkat seiring dengan semakin lama waktu inkubasi dan semakin besar konsentrasi higromisin ditunjukkan dengan semakin cepat perubahan warna menjadi kecoklatan hingga hitam akibat nekrosis yang dapat diakhiri dengan kematian protokorm.

G. Plasmid p2K1 dan Gen *Hd3a*

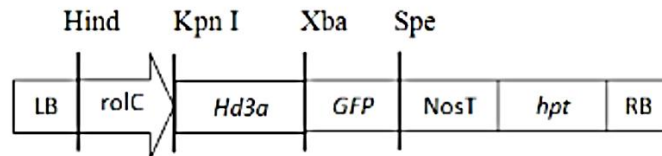
Plasmid adalah DNA ekstrakromosomal yang mampu melakukan replikasi secara autonom pada organisme eukariot maupun prokariot dengan bentuk sirkuler dan memiliki ukuran yang bervariasi antara 1-200 kb. Plasmid dalam proses transformasi genetik dapat digunakan sebagai vektor atau

kendaraan molekuler untuk memasukkan gen dari luar ke dalam genom yang ditargetkan. Komponen plasmid terdiri dari 3 bagian utama meliputi *origin of replication* (ORI) yang memiliki fungsi bagi plasmid untuk dapat bereplikasi secara autonom, daerah unik berupa *multiple cloning site* (MCS) sebagai area pemotongan enzim endonuklease, serta bagian penanda seleksi sebagai label molekuler yang dapat menandai sel inang yang mengandung atau tidak mengandung plasmid yang ditargetkan umumnya ditandai dengan gen resistensi terhadap antibiotik tertentu (Hardianto dkk., 2015).

Heading date 3a (Hd3a) adalah gen pembungaan (*mobile florigen*) dalam tanaman padi yang homolog dengan *flowering locus T* (FT) dari *Arabidopsis* (Zhao dkk., 2015). Gen *Hd3a* berhubungan dengan *Quantitative Trait Locus* (QTL) yang berfungsi memicu pembungaan hari pendek (Purwestri dkk., 2015). Penelitian transformasi genetik *Hd3a* sebagai gen pembungaan selain pada padi (*O. sativa*) dilakukan pada kentang (*S. tuberosum* L.) (Gea dkk., 2017), Tianshan snow lotus (*S. involucrata*) (Li dkk., 2011), dan padi hitam (*O. sativa* L. cv. Cempo Ireng) (Purwestri dkk., 2015).

Ekspresi berlebih gen *Hd3a* dapat menginduksi pembungaan dan pengumbian. Promotor spesifik floem (promotor *rolC*) memiliki aktivitas tinggi dalam mengekspresikan *Hd3a* (Widiarti, 2016). Plasmid p2K1 dengan modifikasi konstruksi T-DNA dengan promotor dan gen *rolC::Hd3a-GFP* dan gen target target *Hd3a* serta gen penanda *HPT* yang telah direkayasa ke dalam *A. tumefaciens* yang digunakan dalam penelitian ini seperti yang dilakukan

oleh Purwestri dkk. (2015) dengan pita DNA *Hd3a* berukuran 177 bp. Daerah T-DNA dari pada plasmid p2K1-*Hd3a* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Daerah T-DNA pada p2K1-*Hd3a* (Widiarti, 2016).

H. Hipotesis

1. Kalus embriogenik jambang sebagai target transformasi memiliki morfologi kalus putih kekuningan hingga kehijauan, bertekstur intermediet (sebagian kalus kompak dan lainnya remah) dan anatominya terdiri dari sel berukuran kecil, rapat dengan inti sel besar.
2. Waktu infeksi *A. tumefaciens* EHA105 yang paling tepat untuk menghasilkan frekuensi transformasi yang paling tinggi pada kalus embriogenik jambang adalah 30-45 menit.
3. Konsentrasi higromisin yang paling tepat untuk menghasilkan frekuensi transformasi paling tinggi pada kalus embriogenik jambang adalah 9-15 ppm.