

# Transfer Gen Penanda Pada Kentang (*Solanum tuberosum* L.) CV Panda dan Atlantik dengan Bantuan *Agrobacterium*

Noor Aini Habibah<sup>1)</sup> dan Sri Nanan B. W<sup>2)</sup>

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang 50221<sup>1)</sup>

Program Studi Biologi FMIPA Institut Teknologi Bandung<sup>2)</sup>

## Abstract

This research was carried out to evaluate the efficiency of marker gene transfer of potato (*Solanum tuberosum* L.) explant tissues, which were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 carrying binary vector pBI121. Nodes and leaf segments from shoot cultures of Panda and Atlantic cultivars were used as explants. The marker gene transfer procedure was initiated with explant pre-conditioning, followed with co-cultivating and selecting of putative transformant cells. Explants were pre-conditioned over-night in callus induction medium containing basal medium of MS (Murashige & Skoog, 1962) supplemented with 5 mg/l naphthalene acetic acid (NAA) and 0.1 mg/l benzyl adenine. After 10 min. inoculation in *A. tumefaciens* suspension, explants were co-cultivated for 1, 3, 5, 7 and 9 days. After co-cultivation, explant tissues were placed on callus induction medium added with 150 mg/l kanamycin. Successful marker gene transfer was calculated as the percentage of total explants producing callus on selection medium. Results showed that more co-cultivated nodal explants became resistant to kanamycin than co-cultivated leaf explants. The highest efficiency of transformation (45%) of nodal explants was observed in Panda cultivar whereas that in Atlantik was only 30%. The most efficient transformation of leaf explants was observed in Panda cultivar (20%) whereas that in Atlantik was 15%. The PCR analysis detected the presence of NPTII gene in transgenic tissues.

**Keywords :** *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, *Solanum tuberosum*, pBI121; marker gene, kanamycin

## Pendahuluan

Pemuliaan tanaman secara konvensional mempunyai keterbatasan pada sumber genetik yang dapat disilangkan. Perbaikan kualitas secara nonkonvensional dapat dilakukan dengan rekayasa genetik. Rekayasa genetik merupakan metode perbaikan tanaman yang tidak mempunyai keterbatasan pada sumber genetik. Gen yang diintroduksi dapat berasal dari genera lain, biasanya mikroorganisme, atau mungkin diisolasi dan diklon dari genera lain (Graham *et al.*, 1990). Rekayasa genetik antara lain dapat dilakukan dengan transfer gen, untuk mendapatkan tanaman dengan komposisi genetik yang baru. Transfer gen dapat dilakukan dengan metode transfer gen langsung atau melalui vektor. Metode transfer gen melalui vektor dapat dilakukan dengan vektor *A. tumefaciens* (Chan *et al.*, 1995) dan *A. rhizogenes* (Jaffe dan Rojas, 1994). Hasil penelitian menunjukkan bahwa transfer gen dengan menggunakan *Agrobacterium* sangat dipengaruhi oleh tipe eksplan (Chabaud *et al.*, 1988; Muthukumar *et al.*, 1996) dan waktu kokultivasi (Chabaud *et al.*, 1988; Muthukumar *et al.*, 1996; Geetha *et al.*, 1997).

Transformasi genetik memerlukan gen penanda untuk pengenalan sel-sel yang tertransformasi. Penanda dapat dibedakan menjadi dua tipe yaitu penanda *selectable* dan penanda *screenable*. Penanda *selectable* merupakan penanda yang menyeleksi sel tertransformasi atau jaringan eksplan dari kemampuannya untuk tumbuh dalam medium dengan kehadiran antibiotik atau herbisida (Walden, 1993). Antibiotik meliputi kanamisin, streptomisin dan higromisin. Herbisida meliputi produk seperti glifosat, glufosinat ammonium, bromoxynil dan sulfonil urea. Tidak semua penanda *selectable* bekerja pada semua kultivar tanaman dan harus ditest dosis yang digunakan dan responnya pada spesies tertentu. Penanda *selectable* yang paling sering digunakan adalah kanamisin dan

higromisin (Walden, 1993). Penanda *screenable* merupakan gen yang mengkode produk berupa enzim yang aktivitasnya dapat dengan mudah di assay (Walden, 1993).

Tujuan penelitian ini adalah mengevaluasi efisiensi transfer gen penanda pada potongan jaringan kentang dengan *A. tumefaciens* sebagai perantara.

## **Bahan dan Metode**

### **Sumber Eksplan**

Sumber eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur pucuk kentang kultivar Panda dan Atlantik yang dikultur secara *in vitro* dalam medium multiplikasi pucuk (MP), berupa medium Murashige & Skoog, 1962 (MS) dasar dengan penambahan 100 ml/l air kelapa tanpa zat pengatur tumbuh. Eksplan diambil dari kultur berumur 5 minggu. Daun yang diambil adalah daun kedua sampai ketujuh yang berwarna hijau tua. Nodus juga diambil pada bagian tersebut.

### **Kultur Bakteri**

Kultur bakteri *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 dengan *binary* vektor pBI121 (Life technologies, GibcoBRL) membawa gen *GUS* sebagai reporter yang diregulasi promoter CaMV 35S dan gen *NPT II* sebagai marker seleksi digunakan dalam penelitian ini. Plasmid pBI121 ditransfer ke dalam *A. tumefaciens* "disarmed" strain LBA4404 (Electromax<sup>TM</sup> product) melalui metode "freeze-thaw" (Holsters *et al.*, 1978) yang dimodifikasi. Kultur bakteri dipelihara pada medium Yeast Extract Peptone (YEP) dengan penambahan kanamisin 50 ppm dan rifampisin 20 ppm dan disubkultur tiap 1 bulan sekali.

### **Uji Toleransi terhadap kanamisin**

Penelitian dilakukan dengan menggunakan eksplan potongan nodus dan daun yang ditanam pada medium induksi kalus (MK) dengan berbagai konsentrasi kanamisin (0, 25, 50, 75, 100, 125, dan 150 ppm). Medium MK terdiri dari medium MS (Murashige & Skoog, 1962) ditambah 5 mg/l naftalene asetat dan 0.1 mg/l benzil adenin. Pengamatan dilakukan sekitar 2 minggu setelah penanaman pada medium MK.

### **Tahap Transformasi**

#### **Persiapan Sel Bakteri**

Satu koloni *A. tumefaciens* ditumbuhkan dalam medium YEP yang ditambah 50 mg/l kanamisin dan 20 mg/l rifampisin "overnight" pada suhu 28(C dengan agitasi 150 rpm. Kemudian kultur bakteri disubkultur pada medium dengan komposisi yang sama dan diinkubasi sampai mencapai fase log.

#### **Pengkondisian, Inokulasi dan Kokultivasi**

Potongan nodus dan daun ditanam pada medium MK selama 1 hari. Kultur *Agrobacterium* dalam fase log ditambahkan ke dalam medium MK berisi potongan jaringan lalu diinkubasi selama 5-10 menit. Setelah dikeringkan, eksplan dikokultivasi pada medium MK selama 1, 3, 5, 7 dan 9 hari. Setelah ko-kultivasi, jaringan dicuci dengan larutan amoksisilin 4 ppm. Eksplan yang telah dikokultivasi ditanam di medium seleksi (medium MK + 150 mg/l kanamisin). Setelah 1 bulan, kalus yang terbentuk diamati.

### **Tahap evaluasi**

#### **Tahap isolasi DNA**

Metode yang digunakan untuk isolasi DNA adalah modifikasi metode CTAB-Doyle & Doyle (1990). Sebanyak 1 g kalus digerus dengan menambahkan nitrogen cair dan larutan bufer ekstraksi (50 mM Tris-Cl pH 8 + 0,5 mM EDTA + 0,35% sorbitol + 0,1% BSA + 10% polyethylene glycol) 4 ml selama penggerusan pada suhu ruangan. Filtrat disaring melalui satu lapis Miracloth ke dalam tabung sentrifuga steril. Kemudian filtrat yang telah disaring disentrifugasi selama 5 menit (15000 g) pada mikrosentrifuga. Supernatan dibuang dan sisa filtrat ditambahkan ke tabung yang berisi pelet, lalu disentrifugasi lagi selama 5 menit dan supernatan dibuang. Pelet diresuspensi dalam 400 µl buffer pencuci dan ditambah 100 µl sarkosil 5%, diinkubasi sekitar 15 menit pada suhu ruangan.

Kemudian suspensi pelet ditambah 1 ml buffer CTAB (0,5 M CTAB + 1 M Tris-Cl pH 8 + 0,5 M EDTA + 5 M NaCl), dicampur dengan cara dibalik dan kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit. Sampel disentrifugasi selama 5 menit dan dialiquot sebanyak 700 µl dan supernatan dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifuga. Kemudian supernatan ditambah dengan kloroform : isoamil alkohol (24:1), dicampur dan disentrifugasi selama 1 menit. Supernatan ditransfer ke tabung baru. DNA diendapkan dengan 1/10 volume 7,5 M ammonium asetat dan etanol 100%. Sampel disentrifugasi selama 15 menit pada 4°C untuk mendapatkan pelet. Pelet DNA kemudian diresuspensi dalam 50 µl buffer TE (10 mM Tris-Cl + 1 mM EDTA pH 8).

#### *Polymerase Chain Reaction dan elektroforesis*

Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *NPTII* adalah F : GAG GCT ATT CGG CTA TGA CT dan R : ATT CTC GTG ATG GCA GGT TG (Lakshmi-Sita, 1998). Reaksi PCR untuk mengamplifikasi gen *NPTII* yang terintegrasi pada genom tanaman dilakukan dengan cara : pada tabung amplifikasi ditambahkan 2 µl DNA; 2 µl buffer PCR 10x; 0,1 µl 250 U AmpliTaq DNA polimerase; 2 µl untuk setiap primer; 1,6 µl untuk setiap 2,5 mM dNTP. Semua campuran diatas ditambah air deion steril sampai volume total 20 µl. Amplifikasi gen dilakukan mengikuti prosedur berikut : denaturasi awal pada suhu 95°C selama 120 detik dilanjutkan dengan 35 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, annealing pada suhu 56°C selama 60 detik, dan pemanjangan pada suhu 71°C selama 120 detik dan kemudian selama 5 menit pada suhu 71°C untuk melengkapi pemanjangan. Sedangkan. Produk PCR dielektroforesis dengan menggunakan metode Sambrook *et al* (1989).

## **Hasil dan Pembahasan**

### **Pengaruh kanamisin terhadap pembentukan kalus**

Pengujian dilakukan terhadap kedua kultivar kentang. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini digunakan untuk menentukan konsentrasi kanamisin yang dapat digunakan sebagai seleksi pada masing-masing kultivar eksplan. Hasil penelitian pengaruh kanamisin terhadap pembentukan kalus dapat dilihat pada Tabel 1. Pengamatan dilakukan setelah 2 minggu eksplan di tanam pada medium yang ditambah dengan kanamisin. Mula-mula daun dan nodus yang berwarna hijau akan memudar warnanya sedikit demi sedikit dan akhirnya menjadi putih. Meskipun terjadi penghambatan pembentukan kalus dan sintesis klorofil namun eksplan masih tetap hidup meskipun tidak mengalami pertumbuhan atau dalam keadaan stagnan. Hasil pengamatan yang sama juga dilaporkan oleh Anggraini (2002) pada eksplan daun tembakau. Selain menghambat pembentukan kalus, kanamisin juga dapat menghambat sintesis klorofil (Goodman, 1966; Kamilah, 2000 dan Anggraini, 2002). Menurut Jones dan Sutton, 1998 kanamisin mempengaruhi fungsi ribosom 70S dan 80S yang terlibat dalam sintesis protein pada kloroplast dan mitokondria. Adanya gangguan pada ribosom dalam kedua organel tersebut menyebabkan terjadinya hambatan pada pembentukan kalus dan sintesis klorofil. Besarnya pengaruh kanamisin terhadap pembentukan kalus dan sintesis klorofil pada sel yang berbeda akan berbeda tingkatannya. Perbedaan ini menurut Goodman (1966) tergantung pada sensitivitas kultivar.

Hasil penelitian pada kedua kultivar kentang yaitu Panda dan Atlantik menunjukkan bahwa kanamisin pada konsentrasi tertentu dapat menghambat pertumbuhan kalus baik pada jaringan nodus maupun daun. Besarnya konsentrasi kanamisin yang dapat menghambat pertumbuhan kalus pada tiap kultivar eksplan bervariasi. Hal ini terjadi karena sel yang berbeda mempunyai tingkat toleransi yang berbeda terhadap kanamisin (An *et al.*, 1988). Hasil penelitian menunjukkan bahwa nodus mempunyai daya toleransi yang lebih tinggi daripada daun. Hal ini kemungkinan disebabkan daun lebih tipis dan lebar di dibandingkan nodus sehingga selnya lebih banyak yang terdedah secara langsung pada kanamisin. Hasil penelitian di atas menunjukkan bahwa kedua kultivar di atas tidak resisten terhadap kanamisin, oleh karena itu maka kanamisin dapat digunakan dalam seleksi hasil transfer gen penanda pada kedua kultivar kentang tersebut. Besarnya

konsentrasi kanamisin yang digunakan untuk seleksi pada masing-masing kultivar berbeda-beda tergantung pada daya toleransinya. Semakin tinggi daya toleransi eksplan tersebut maka konsentrasi yang digunakan untuk seleksi semakin tinggi, sehingga nantinya dapat dibedakan antara tanaman yang telah tersisipi gen resistensi terhadap kanamisin dan yang tidak tersisipi gen tersebut. Secara ringkas penggunaan konsentrasi kanamisin yang dapat digunakan untuk seleksi jaringan transforman pada dua kultivar kentang dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Pengaruh kanamisin terhadap pembentukan kalus  
Table 1. The effects of kanamycine on callus formation

Konsentrasi (ppm)	Jumlah eksplan yang membentuk kalus (%)			
	Kultivar kentang			
	Panda		Atlantik	
	nodus	daun	nodus	daun
0	100	100	100	100
25	100	100	100	100
50	0	100	100	0
75	0	0	100	0
100	0	0	30	0
125	0	0	20	0
150	0	0	0	0

Ket: Data diambil dari 4 x 5 pengulangan (dalam satu botol terdapat 5 eksplan)

Tabel 2. Konsentrasi kanamisin yang dapat digunakan untuk seleksi  
Table 2. Concentration of kanamycine which could be used for selection

Konsentrasi kanamisin (ppm)			
Kultivar kentang			
Panda		Atlantik	
Nodus	daun	nodus	Daun
75	100	175	75

### Hasil Transformasi

Keberhasilan transformasi dihitung berdasarkan presentase eksplan yang dapat membentuk kalus pada medium seleksi MK mengandung kanamisin. Hasil penghitungan efisiensi transformasi dapat dilihat pada Tabel 3. Efisiensi yang terbesar ditunjukkan dengan masa kokultivasi selama 7 hari. Pembentukan kalus terjadi 7 hari setelah penanaman pada medium seleksi. Mula-mula kalus terbentuk pada bagian-bagian luka dan akhirnya merata pada seluruh permukaan eksplan. Nodus lebih cepat membentuk kalus daripada daun. Kalus yang terbentuk berbeda dengan kalus pada jaringan yang ditanam pada medium bukan seleksi (medium tanpa penambahan kanamisin).

Kalus yang terbentuk pada medium bukan seleksi merupakan kalus meremah dan berwarna hijau kekuning-kuningan, sedangkan kalus yang terbentuk dari eksplan hasil transformasi bentuknya kompak dan berwarna kecoklatan. Kanamisin menghambat pembentukan kalus, sehingga jaringan yang tidak tersisipi gen resistensi kanamisin tidak akan dapat membentuk kalus pada medium seleksi yang ditambah kanamisin. Hasil transformasi yang negatif tidak dapat membentuk kalus pada medium seleksi, mengalami klorosis dan mati.

Venkatachalam *et al.* (1998) menyatakan bahwa prosedur kokultivasi merupakan

faktor penting dalam transformasi menggunakan *A. tumefaciens*. Optimalisasi waktu kokultivasi merupakan salah satu faktor yang dapat memperbaiki efisiensi transformasi. Hasil penelitian Venkatachalam *et al.* (1998) menunjukkan bahwa waktu kokultivasi yang paling baik untuk transformasi *Arachis hypogaea* dengan eksplan hipokotil, kotiledon dan nodus kotiledon adalah 4 hari. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa waktu kokultivasi sangat mempengaruhi efisiensi transformasi pada *Vigna mungo* dan *Vigna unguiculata* (Chabaud *et al.*, 1988; Muthukumar *et al.*, 1996; Geetha *et al.*, 1997). Orlikowska *et al.* (1995) melaporkan bahwa interval waktu antara inokulasi eksplan dengan bakteri dan penanaman pada medium seleksi tidak berpengaruh pada efisiensi transformasi *Carthamus tinctorius* L. Kultivar Centennial. Waktu kokultivasi yang cukup menyebabkan kontak antara sel bakteri dan sel tanaman akan lebih lama sehingga kemungkinan terjadinya proses transformasi lebih besar (Venkatachalam *et al.*, 1998). Waktu kokultivasi yang cukup juga memungkinkan sel yang telah tertransformasi dapat melakukan pembelahan lebih dahulu sebelum dilakukan seleksi. Sel-sel yang tidak tertransformasi akan mengeluarkan senyawa yang meracuni sel-sel tertransformasi jika kontak dengan kanamisin. Dengan waktu kokultivasi 7 hari dapat diperoleh kalus transforman dari semua kultivar eksplan. Proses transformasi dengan waktu kokultivasi 1, 3, dan 5 hari menunjukkan efisiensi yang rendah. Hal ini kemungkinan disebabkan karena interaksi antara sel tanaman dan sel bakteri belum cukup untuk terjadinya transformasi. Waktu kokultivasi yang terlalu lama akan meningkatkan jumlah kematian eksplan. Hal ini terjadi pada eksplan yang dikokultivasi selama 9 hari. Sel-sel bakteri yang tumbuh mengelilingi eksplan akan mengambil makanan dari eksplan dan dari medium di sekitar tempat tumbuh eksplan tersebut.

Pada sumber eksplan nodus efisiensi transfer gen terbesar terlihat pada kultivar Panda (45%). Pada sumber eksplan daun efisiensi transfer gen terbesar terlihat pada kultivar Panda (20%) diikuti kultivar Atlantik (15%). Hasil tersebut menunjukkan bahwa efisiensi transformasi bervariasi tergantung pada sumber eksplan. Ini sesuai dengan pernyataan Venkatachalam *et al.* (1998) yang menyatakan bahwa efisiensi transformasi antara lain dipengaruhi oleh faktor genotipe dan sumber eksplan.

Tabel 3. Hasil transformasi  
Table 3. Transformation results

Perlakuan	Jumlah eksplan yang membentuk kalus (%)			
	Kultivar kentang			
	Panda		Atlantik	
	Nodus	daun	nodus	Daun
kontrol 1	0	0	0	0
kontrol 2	0	0	0	0
kontrol 3	100	100	100	100
Kokultivasi				
1 hr	0	0	0	5 (0,25±0,5)
3 hr	15 (0,75±0,5)	0	5 (0,25±0,5)	5 (0,25±0,5)
5 hr	40 (2±0,82)	10 (0,5±0,57)	20 (1±0,82)	10 (0,5±0,57)
7 hr	45 (2,25±0,5)	20 (1,0±0,7)	30 (1,5±0,43)	15 (0,75±0,5)
9 hr	5 (0,25±0,5)	0	0	0

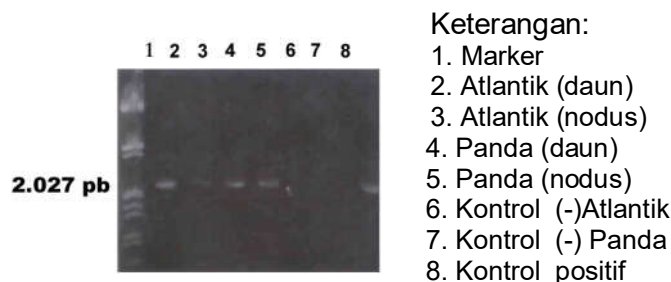
Ket :K 1 (kontrol 1) : eksplan tanpa perlakuan transformasi ditanam pada medium seleksi  
K 2 (kontrol 2): eksplan dengan transformasi tanpa *Agrobacterium* pada medium seleksi  
K 3 (kontrol 3) : eksplan tanpa transformasi ditanam pada medium bukan seleksi  
( ) : jumlah rata-rata eksplan dalam 1 botol yang membentuk kalus  
Data diambil dari 4 x 5 pengulangan (dalam satu botol terdapat 5 eksplan)

Penelitian Jaffe dan Rojas (1994) menunjukkan bahwa efisiensi transformasi pada

537 klon kentang bervariasi tergantung pada genotip klon kentang. Pada beberapa tanaman lain juga dilaporkan hal serupa, antara lain pada gandum (Hess *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 1999 dalam Janakiraman *et al.*, 2002), *Vigna mungo* (Chabaud *et al.*, 1988), *Vigna unguiculata* (Muthukumar *et al.*, 1996), *Arachis hypogaea* (Venkatachalam *et al.*, 1998) dan *Solanum lycopersicum* (Davis *et al.*, 1991). Pada gandum dilaporkan bahwa efisiensi transformasi pada kultivar yang sama bervariasi tergantung sumber eksplan yang digunakan. Venkatachalam *et al.* (1998) yang melakukan penelitian dengan menggunakan hipokotil, kotiledon dan nodus kotiledon *Arachis hypogaea* juga melaporkan hal yang sama. Efisiensi transformasi *Solanum lycopersicum* dilaporkan bervariasi tergantung pada kultivar (Davis *et al.*, 1991). Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa *A. tumefaciens* dapat digunakan sebagai vektor untuk memasukkan gen asing ke dalam jaringan dua kultivar kentang yang diteliti. Penelitian-penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa *A. tumefaciens* dapat digunakan untuk transfer gen pada jaringan kentang (Chan *et al.*, 1995; Canedo *et al.*, 1998; Pehu, 1996 dan Torres *et al.*, 2000).

### Hasil analisis PCR

Sebagian hasil transformasi yang positif digunakan untuk analisis kehadiran gen *NPT II*. Hasil transformasi yang digunakan dalam evaluasi ini meliputi kalus transforman dari kedua kultivar. Kalus transforman diekstraksi DNANYa dan untuk mendapatkan gen *NPTII* yang cukup banyak maka dilakukan amplifikasi gen *NPT II* menggunakan PCR. Hasil PCR dapat dilihat pada Gambar 1. Pita hasil analisis PCR dari DNA kalus hasil transformasi yang sama dengan gen *NPTII* pada kontrol positif yaitu kontrol yang berasal dari pBI121. Hal ini menunjukkan bahwa pada kalus hasil transformasi yang diuji terdapat gen *NPT II*. Pada kontrol negatif yang diambil dari tanaman yang tidak ditransformasi tidak menunjukkan adanya pita gen *NPT II*.



Gambar 1. Image gel agarose dengan pewarnaan Et-Br dari hasil PCR gen *NPTII* dengan primer *NPT II F* : GAG GCT ATT CGG CTA TGA CT dan *NPT II R* : ATT CTC GTG ATG GCA GGT TG.

Figure 1. Image of agarose gel with Et-Br coloring from PCR gen *NPTII* with primer *NPT II F* : GAG GCT ATT CGG CTA TGA CT dan *NPT II R* : ATT CTC GTG ATG GCA GGT TG.

### Kesimpulan

Efisiensi transformasi bervariasi tergantung pada sumber eksplan, prosedur transformasi dan kompatibilitas *Agrobacterium* terhadap jaringan target.

### Acknowledgment

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Sel Departemen Biologi ITB. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Team Peneliti Bioteknologi Jati Departemen Biologi ITB yang telah memberikan fasilitas dan dana untuk penelitian ini.

## Daftar Pustaka

- Anggraini, R. 2002. Transfer Gen Penanda pada Tembakau dengan Bantuan *Agrobacterium*. *Skripsi Sarjana Biologi*. ITB
- An, G., Ebert, P.R., Mitra, A. dan Ha, S.B. 1988. Binary Vektor. *Plant Molecular Biology Manual A3*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Belgium. pp. 1-19.
- Chabaud, M., Passiatore, J.E., Cannon, F. Dan Buchanan Wollaston, V. 1988. Parameters Affecting the Frequency of Kanamycin Resistant Alfalfa Obtained by *Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation. *Plant Cell Rep.* 15:512-516.
- Chan, M., Chen, L. Dan Chang, H. 1995. Expression of *Bacillus thuringiensis* (B.t.) Insecticidal Crystal Protein Gene in Transgenic Potato. *Botanical Bulletin of Academica Sinica.* 37:17-23.
- Canedo, V., Benavides. J., Golmirzaie. A., Cisneros. F., Ghislain. M., dan Lagnaoui, A. 1998. *Assesing Bt-Transformed Potatoes for Potato Tuber Moth, Phthorimaea operculella (Zeller), Management*. CIP Progress Report 1997-1998. pp. 161-169.
- Davis, M.E., Lineberger, R.D., dan Miller, A.R. 1991. Effects of Tomato Cultivar, Leaf Age, and Bacterial Strain on Transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.24: 115-121.
- Doyle, J.J. dan Doyle, J.L. 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus.* 12:13-15
- Geetha, N., Venkatachalam, P. dan Rao, G.R. 1997. Factors Influencing Production of *Agrobacterium* Mediated Genetically Transformed Calli and Plant Regeneration in Blacgram (*Viga mungo* L. Hepper). *Plant Tiss. Cult.* 7:149-152.
- Goodman, R.N. 1959. The Influence of Antibiotics on Plants and Plant Disease Control. Dalam : *Antibiotics their Chemistry and Non-Medical Uses*. Ed. Golberg, H.S., D. Van. Nostrand Company, Inc. New York. pp. 357.
- Graham, J., McNicol, R.J. dan Kumar, A. 1990. Use of the GUS Gene as a Selectable Marker for *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Rubus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 20:35-39.
- Jaffe, W., dan Rojas, M. 1994. Transgenic Potato Tolerant to Freezing. *Biotechnology and Development Monitor.* 18:10-15.
- Janakiraman, V., Steinau, M., McCoy, S.B., dan Trick, H.N. 2002. Recent Advances in Wheat Transformation. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 38:404-414.
- Jones, P.G. dan Sutton, J.M.. 1997. *Plant Molecular Biology. Essential Technigues*. John Wiley & Sons Ltd. Inggris. pp. 178-179.
- Kamilah, H. 2000. Pengaruh Antibiotik terhadap Potongan Daun Jati (*Tectona grandis*, L.F) secara *in Vitro*. *Skripsi Sarjana Biologi ITB*. Bandung.
- Lakshmi-Sita, G., G.L. Sreenivas, and Anirban Bhattacharya. 1998. *Agrobacterium*-mediated Transformation of Sandalwood (*Santalum album* L.) a Tropical Forest Tree. *Plant. Tiss. Cult. & Biotech.* 4: 189-195.

- Muthukumar, B., Mariamma, M., Veluthambi, K. dan Gnanam, A. 1996. Genetic Transformation of Cotyledon Explants of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 15:980-985.
- Orlikowska, T.K, Cranston, Harwood J, dan Dyer, W.E. 1995. Factors Influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation and Regeneration of the Safflower Cultivar 'Centennial'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 40: 85-91.
- Sambrook, J., E.F. Fritschel, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition. CSH Laboratory Press. New York. pp. 6.3-6.15.
- Torres, C.A., Ferreira, A.T., Melo, E., Romano, E., Campos, I.E., Peters, A., Buso, J.A., dan Monte, D.C. Transgenic Potato. Transgenic Plants of Achat Potato Resistent to the Mosaic Virus (PVY). *BiotechnologiaCiencia & Desenvolvimento* No. 7.
- Venkatachalam, P., Geetha, N., Jayabalan, N., Saravanababu, Sita, L. 1998. *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation of Groundnut (*Arachis hypogaea* L): An Assessment of Factors Affecting Reperation of Transgenic Plants. *J. Plant. Res.* 111:565-572.
- Walden, R. 1993. Cell Culture, Transformation and Gene Technology. Dalam *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley & Sons Ltd.