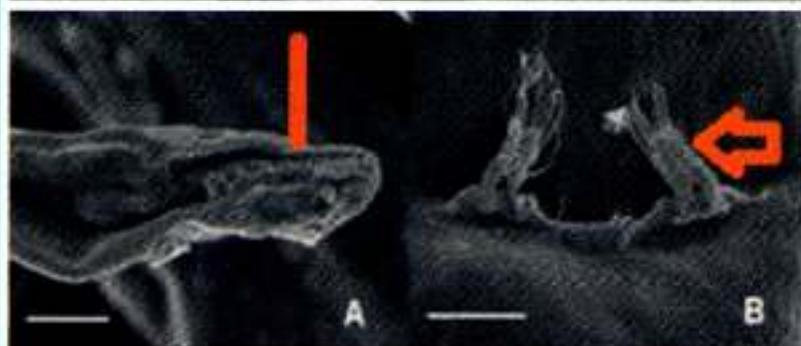
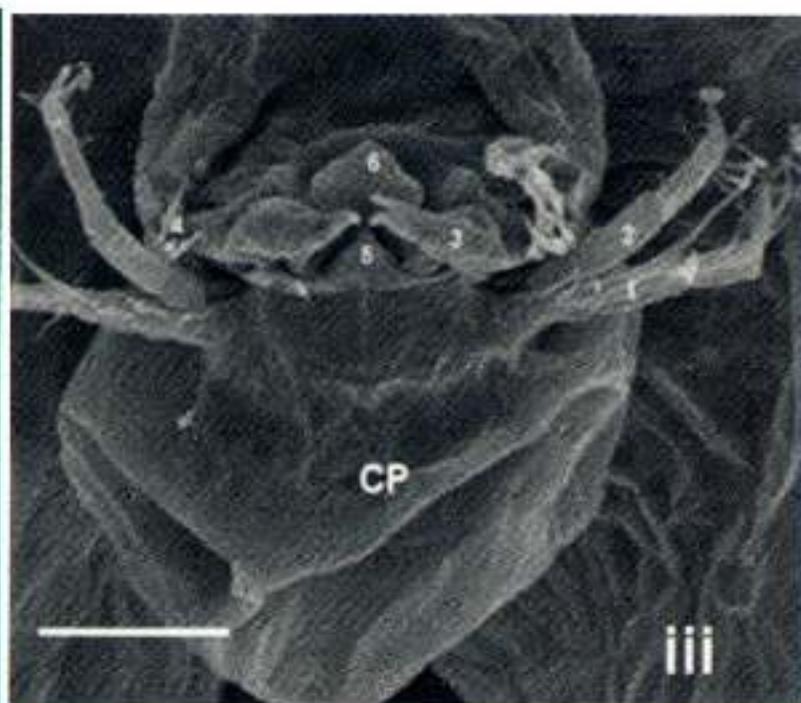


Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati



Diterbitkan oleh
Pusat Penelitian Biologi - LIPI

Berita Biologi merupakan Jurnal Ilmiah ilmu-ilmu hayati yang dikelola oleh Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), untuk menerbitkan hasil karya-penelitian (original research) dan karya-pengembangan, tinjauan kembali (review) dan ulasan topik khusus dalam bidang biologi. Disediakan pula ruang untuk menguraikan seluk-beluk peralatan laboratorium yang spesifik dan dipakai secara umum, standard dan secara internasional. Juga uraian tentang metode-metode berstandar baku dalam bidang biologi, baik laboratorium, lapangan maupun pengolahan koleksi biodiversitas. Kesempatan menulis terbuka untuk umum meliputi para peneliti lembaga riset, pengajar perguruan tinggi maupun pekarya-tesis sarjana semua strata. Makalah harus dipersiapkan dengan berpedoman pada ketentuan-ketentuan penulisan yang tercantum dalam setiap nomor.

Diterbitkan 3 kali dalam setahun yakni bulan April, Agustus dan Desember. Setiap volume terdiri dari 6 nomor.

Surat Keputusan Ketua LIPI

Nomor: 1326/E/2000, Tanggal 9 Juni 2000

Dewan Pengurus

Pemimpin Redaksi

B Paul Naiola

Anggota Redaksi

Andria Agusta, Dwi Astuti, Hari Sutrisno, Iwan Saskiawan

Kusumadewi Sri Yulita, Edi Mirmanto

Redaksi Pelaksana

Marlina Ardiyani

Desain dan Komputerisasi

Muhamad Ruslan, Yosman

Sekretaris Redaksi/Korespondensi **Umum**
(berlangganan, surat-menyurat dan kearsipan)

Enok, Ruswenti, Budiarjo

Pusat Penelitian Biologi-LIPI

Kompleks Cibinong Science Center (CSC-LIPI)

Jln Raya Jakarta-Bogor Km 46,

Cibinong 16911, Bogor - Indonesia

Telepon (021) 8765066 - 8765067

Faksimili (021) 8765059

e-mail: berita.biologi@mail.lipi.go.id

ksama_p2biologi@yahoo.com

herbogor@indo.net.id

Keteranganfoto cover depart: Cephalothorax semispherical dan bagian tubuh dari *Lernaea cyprinacea*, merupakan ektoparasit ikan yang dieksplorasi dan difoto dengan SEM, sesuai makalah di halaman 807
(Foto: koleksi Kementerian Kelautan dan Perikanan RI dan Universitas Gadjah Mada - Dikry N Shatrie)



LIPI

Berita Biologi

Jurnal Ilmu-ilmu Hayati

ISSN 0126-1754

Volume 10, Nomor 6, Desember 2011

Terakreditasi A

Nomor 180/AU1/P2MBI/08/2009

**Diterbitkan oleh
Pusat Penelitian Biologi - LIPI**

Ketentuan-ketentuan untuk Penulisan dalam Jurnal Berita Biologi

1. Makalah berupa karangan ilmiah asli, berupa hasil penelitian (original paper), komunikasi pendek atau tinjauan ulang (review) dan belum pernah diterbitkan atau tidak sedang dikirim ke media lain.
2. Bahasa: Indonesia baku. Penulisan dalam bahasa Inggris atau lainnya, dipertimbangkan.
3. Makalah yang diajukan tidak boleh yang telah dipublikasi di jurnal manapun ataupun tidak sedang diajukan ke jurnal lain. Makalah yang sedang dalam proses penilaian dan penyuntingan, tidak diperkenankan untuk ditarik kembali, sebelum ada keputusan resmi dari Dewan Redaksi.
4. Masalah yang diliput berisikan temuan penting yang mengandung aspek 'kebaruan' dalam bidang biologi dengan pembahasan yang mendalam terhadap aspek yang diteliti, dalam bidang-bidang:
 - Biologi dasar (*pure biology*), meliputi turunan-turunannya (mikrobiologi, fisiologi, ekologi, genetika, morfologi, sistematik/ taksonomi dan sebagainya).
 - Ilmu serumpun dengan biologi: pertanian, kehutanan, peternakan, perikanan air tawar dan biologi kelautan, agrobiologi, limnologi, agrobioklimatologi, kesehatan, kimia, lingkungan, agroforestri.
 - *Aspek/pendekatan biologi* harus tampak jelas.
5. Deskripsi masalah: harus jelas adanya tantangan ilmiah (*scientific challenge*).
6. Metode pendekatan masalah: standar, sesuai bidang masing-masing.
7. Hasil: hasil temuan harus jelas dan terarah.
8. Tipe makalah
 - Makalah Lengkap Hasil Penelitian (original paper)*.
Makalah lengkap berupa hasil penelitian sendiri (original paper). Makalah ini tidak lebih dari 15 halaman termasuk gambar dan tabel. Pencantuman lampiran seperlunya. Redaksi berhak mengurangi atau meniadakan lampiran.
 - Komunikasi pendek (short communication)*
Komunikasi pendek merupakan makalah pendek hasil riset yang oleh penelitiannya ingin cepat dipublikasi karena hasil temuan yang menarik, spesifik dan baru, agar lebih cepat diketahui umum. Berisikan pembahasan yang mendalam terhadap topik yang dibahas. Artikel yang ditulis tidak lebih dari 10 halaman. Dalam Komunikasi Pendek Hasil dan Pembahasan boleh disatukan.
 - Tinjauan kembali (Review)*
Tinjauan kembali yakni rangkuman tinjauan ilmiah yang sistematis-kritis secara ringkas namun mendalam terhadap topik riset tertentu. Segala sesuatu yang relevan terhadap topik tinjauan sehingga memberikan gambaran "state of the art" meliputi kemajuan dan temuan awal hingga terkini dan kesenjangan dalam penelitian, perdebatan antarpeneliti dan arah ke mana topik riset akan diarahkan. Perlihatkan kecerdasanmu dalam membuka peluang riset lanjut oleh diri sendiri atau orang lain melalui review ini.
9. Format makalah
 - a. Makalah diketik menggunakan huruf Times New Roman 12 point, spasi ganda (kecuali abstrak dan abstract 1 spasi) pada kertas A4 berukuran 70 gram.
 - b. Nomor halaman diletakkan pada sisi kanan bawah
 - c. Gambar dan foto maksimum berjumlah 4 buah dan harus bermutu tinggi. Gambar manual pada kertas kalkir dengan tinta cina, berukuran kartu pos. Foto berwarna akan dipertimbangkan, apabila dibuat dengan computer harus disebutkan nama programnya.
 - d. Makalah diketik dengan menggunakan program Word Processor.
10. Urutan penulisan dan uraian bagian-bagian makalah
 - a. Judul
Judul harus ringkas dan padat, maksimum 15 kata, dalam dwibahasa (Indonesia dan Inggris). Apabila ada subjudul tidak lebih dari 50 kata.
 - b. Nama lengkap penulis dan alamat koresponden
Nama dan alamat penulis(-penulis) lengkap dengan alamat, nomor telpon, fax dan email. Pada nama penulis(-penulis), diberi nomor superskrip pada sisi kanan yang berhubungan dengan alamatnya; nama penulis korespondensi (*correspondent author*), diberi tanda envelop (E1) superskrip. Lengkapi pula dengan alamat elektronik.
 - c. Abstrak dan Kata kunci

Abstrak dan kata kunci ditulis dalam dwibahasa (Indonesia dan Inggris), maksimum 200 kata, spasi tunggal, tanpa referensi.

- d. Pendahuluan
Berisi latar belakang, masalah, hipotesis dan tujuan penelitian. Ditulis tanpa subheading.
 - e. Bahan dan cara kerja
Apabila metoda yang digunakan sudah baku dan merupakan ulangan dari metoda yang sudah ada, maka hanya ditulis sitiran pustakanya. Apabila dilakukan modifikasi terhadap metoda yang sudah ada, maka dijelaskan bagian mana yang dimodifikasi.
Apabila terdapat uraian lokasi maka diberikan 2 macam peta, peta besar negara sebagai inset dan peta detil lokasi.
 - f. Hasil
Bagian ini menyajikan hasil utama dari penelitian. *Hasil* dipisahkan dari *Pembahasan*
 - g. Pembahasan
Pembahasan dibuat terpisah dari hasil tanpa pengulangan penyajian hasil penelitian. Dalam Pembahasan hindari pengulangan subjudul dari Hasil, kecuali dipandang perlu sekali.
 - h. Kesimpulan
Kesimpulan harus menjawab pertanyaan dan hipotesis yang diajukan di bagian pendahuluan.
 - i. Ucapan Terima Kasih
Ditulis singkat dan padat.
 - j. Daftar pustaka
Cara penulisan sumber pustaka: tuliskan nama jurnal, buku, prosiding atau sumber lainnya secara lengkap, jangan disingkat. Nama inisial pengarang tidak perlu diberi tanda titik pemisah.
 - i. Jurnal
Premachandra GS, H Saneko, K Fujita and S Ogata. 1992. Leaf Water Relations, Osmotic Adjustment, Cell Membrane Stability, Epicuticular Wax Load and Growth as Affected by Increasing Water Deficits in Sorghum. *Journal of Experimental Botany* 43, 1559-1576.
 - ii. Buku
Kramer PJ. 1983. *Plant Water Relationship*, 76. Academic, New York.
 - iii. Prosiding atau hasil Simposium/Seminar/Lokakarya dan sebagainya
Hamzah MS dan SA Yusuf. 1995. Pengamatan Beberapa Aspek Biologi Sotong Buluh (*Sepioteuthis lessoniana*) di Sekitar Perairan Pantai Wokam Bagian Barat, Kepulauan Am, Maluku Tenggara. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XI*, Ujung Pandang 20-21 Juli 1993. M Hasan, A Mattimu, JG Nelwan dan M Litaay (Penyunting), 769-777. Perhimpunan Biologi Indonesia.
 - iv. Makalah sebagai bagian dari buku
Leegood RC and DA Walker. 1993. Chloroplast and Protoplast. In: *Photosynthesis and Production in a Changing Environment*. DO Hall, JMO Scurlock, HR Bohlar Nordenkamp, RC Leegood and SP Long (Eds), 268-282. Chapman and Hall. London.
11. Lain-lain menyangkut penulisan
- a. Gambar.
Lebar gambar maksimal 8,5 cm. Judul gambar menggunakan huruf Times New Roman ukuran 8 point.
 - b. Grafik
Untuk setiap perhitungan rata-rata, selalu diberikan standar deviasi. Penulis yang menggunakan program Excell harus memberikan data mentahnya.
 - c. Foto
Untuk setiap foto, harap diberikan skala bila perlu, dan berikan anak panah untuk menunjukkan suatu objek.
 - d. Tabel
Judul tabel harus ringkas dan padat. Judul dan isi tabel diketik menggunakan huruf Times New Roman ukuran 8 point. Seluruh penjelasan mengenai tabel dan isinya harus diberikan setelah judul tabel.
 - e. Gunakan simbol:

- f. Semua nama biologi pada makhluk hidup yang dipakai, pada Judul, Abstrak dan pemunculan pertama dalam Badan teks, harus menggunakan nama yang valid disertai author/descriptor. (Burung Maleo - *Macrocephalon maleo* S. Miiller, 1846; Cendana - *Santalum album* L.), atau yang tidak memiliki nama author *Escherichia coli*. Selanjutnya nama-nama biologi disingkat (*M. maleo*, *S. album*, *E. coli*).
 - g. Proofreading
Proofreading akan dikirim lewat e-mail/fax, atau bagi yang berdinasi di Bogor dan Komplek Cibinong Science Center (CSC-LIPI) dan sekitarnya, akan dikirim langsung; dan harus dikembalikan kepada dewan redaksi paling lambat dalam 3 hari kerja.
 - h. Reprint/ cetak lepas
Penulis akan menerima satu copy jurnal dan 3 reprint/cetak lepas makalahnya.
12. Seluruh makalah yang masuk ke meja redaksi Berita Biologi akan dinilai oleh dewan editor untuk kemudian dikirim kepada reviewer/mitra bestari yang tertera pada daftar reviewer BB. Redaksi berhak menjajagi pihak lain sebagai reviewer undangan.
 13. Kirimkan 2 (dua) eksemplar makalah ke Redaksi (lihat alamat pada cover depan-dalam). Satu eksemplar tanpa nama dan alamat penulis (-penulis)nya. Sertakan juga softcopy file dalam CD untuk kebutuhan Referee/Mitra bestari. Kirimkan juga filenya melalui alamat elektronik (e-mail) resmi Berita Biologi: berita.biologi@mail.lipi.go.id dan di-Cc-kan kepada: ksama_p2biologi@yahoo.com, herbogor@indo.net.id
 14. Sertakan alamat Penulis (termasuk elektronik) yang jelas, juga meliputi nomor telepon (termasuk HP) yang dengan mudah dan cepat dihubungi.

Anggota Referee / Mitra Bestari

Mikrobiologi

Dr Bambang Sunarko (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Prof Dr Feliatra (*Universitas Riau*)
Dr Heddy Julistiono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr I Nengah Sujaya (*Universitas Udayana*)
Dr Joko Sulistyono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Joko Widodo (*Universitas Gajah Mada*)
Dr Lisdar I Sudirman (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Ocky Kama Radjasa (*Universitas Diponegoro*)

Mikologi

Dr Dono Wahyuno (*BB Litbang Tanaman Rempah dan Obat-Kemtan*)
Dr Kartini Kramadibrata (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Genetika

Prof Dr Alex Hartana (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Warid Ali Qosim (*Universitas Padjadjaran*)
Dr Yuyu Suryasari Poerba (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Taksonomi

Dr Ary P Keim (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Daisy Wowor (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Prof (Ris) Dr Johanis P Mogeia (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Rosichon Ubaidillah (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Biologi Molekuler

Prof (Ris) Dr Eni Sudarmonowati (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)
Dr Endang Gati Lestari (*BB Litbang Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian-Kemtan*)
Dr Hendig Winarno (*Badan Tenaga Atom Nasional*)
Prof (Ris) Dr I Made Sudiana (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Nurlina Bermawie (*BB Litbang Tanaman Rempah dan Obat-Kemtan*)
Dr Yusnita Said (*Universitas Lampung*)

Bioteknologi

Dr Nyoman Mantik Astawa (*Universitas Udayana*)
Dr Endang T Margawati (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)
Dr Satya Nugroho (*Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI*)

Veteriner

Prof Dr Fadjar Satrija (*FKH-IPB*)

Biologi Peternakan

Prof (Ris) Dr Subandryo (*Pusat Penelitian Ternak-Kemtan*)

Ekologi

Dr Didik Widyatmoko (*Pusat Konservasi Tumbuhan-LIPI*)
Dr Dewi Malia Prawiradilaga (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Frans Wospakrik (*Universitas Papua*)
Dr Herman Daryono (*Pusat Penelitian Hutan-Kemhul*)
Dr Istomo (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr Michael L Riwu Kaho (*Universitas Nusa Cendana*)
Dr Sih Kahono (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Biokimia

Prof Dr Adek Zamrud Adnan (*Universitas Andalas*)
Dr Deasy Natalia (*Institut Teknologi Bandung*)
Dr Elfahmi (*Institut Teknologi Bandung*)
Dr Herto Dwi Ariesyadi (*Institut Teknologi Bandung*)
Dr Tri Murningsih (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Fisiologi

Prof Dr Bambang Sapto Purwoko (*Institut Pertanian Bogor*)
Prof (Ris) Dr Gono Semiadi (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Irawati (*Pusat Konservasi Tumbuhan-LIPI*)
Dr Nuril Hidayati (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)
Dr Wartika Rosa Farida (*Pusat Penelitian Biologi-LIPI*)

Biostatistik

Ir Fahren Bukhari, MSc (*Institut Pertanian Bogor*)

Biologi Perairan Darat/Limnologi

Dr Cynthia Henny (*Pusat Penelitian Limnologi-LIPI*)
Dr Fauzan Ali (*Pusat Penelitian Limnologi-LIPI*)
Dr Rudhy Gustiano (*Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar-KKP*)

Biologi Tanah

Dr Rasti Saraswati (*BB Sumberdaya Lahan Pertanian-Kemtan*)

Biodiversitas dan Iklim

Dr Rizaldi Boer (*Institut Pertanian Bogor*)
Dr. Tania June (*Institut Pertanian Bogor*)

Biologi Kelautan

Prof Dr Chair Rani (*Universitas Hasanuddin*)
Dr Magdalena Litaay (*Universitas Hasanuddin*)
Prof (Ris) Dr Ngurah Nyoman Wiadnyana (*Pusat Riset Perikanan Tangkap-KKP*)
Dr Nyoto Santoso (*Lembaga Pengkajian dan Pengembangan Mangrove*)

Berita Biologi menyampaikan terima kasih
kepada para Mitra Bestari/ Penilai (Referee) nomor ini
10(6)-Desember 2011

Dr. Chyntia Henny - *Pusat Penelitian Limnologi - LIPI*
Prof. Dr. Feliatra - Universitas Riau
Dr. Dewi Malia Prawiradilaga - *Pusat Penelitian Biologi - LIPI*
Dr. Nuril Hidayati - *Pusat Penelitian Biologi - LIPI*
Dr. Yuyu Suryasari Poerba - *Pusat Penelitian Biologi - LIPI*

Referee/ Mitra Bestari Undangan

Dr. Achmad Dinoto - *Pusat Penelitian Biologi - LIPI*
Dr. Darman M. Arsyad, APU - *Balai Besar Pengkajian &
Pengembangan Teknologi Pertanian - Kementan*
Dr. Diah Iswantini - *FMIPA - IPB*
Dr. Diah Ratnadewi - *FMIPA - IPB*
Drs. Haryono, M.Si - *Pusat Penelitian Biologi - LIPI*
Dr. Iman Hidayat - *Pusat Penelitian Biologi - LIPI*
Dr. Ingrid S. Surono - *Fak. Kedokteran Universitas Indonesia*
Dr. Lazarus Agus Soekamto - *Pusat Penelitian Biologi - LIPI*
Dr. Puspita Lisdiyanti - *Puslit Bioteknologi - LIPI*
Dr. Syahromah Husni Nasution - *Pusat Penelitian Limnologi - LIPI*

DAFTAR ISI

MAKALAH HASIL RISET (ORIGINAL PAPERS)

- KEEFEKTIFAN BAHAN PELINDUNG ALAMI DALAM MEMPERTAHANKAN INFEKTIVITAS *Spodoptera exigua* NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (SeNPV)**
 [The Effectiveness of Natural Protectant to Maintain the *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (SeNPV) Infectivity]
 Samsudin, Teguh Santoso, Aunu Rauf dan Yayi Munara Kusumah_____689
- PENGARUH PEMUPUKAN BEREMBANG TERHADAP PERTUMBUHAN DAN HASIL TANAMAN KENTANG {*Solatum tuberosum* L.} VARIETAS GRANOLA**
 [Effect of Balanced Fertilizer on the Growth and Yield of Potato (*Solatum tuberosum* L.) Granola Variety]
 Syafri Edi dan Endrizal.....699
- KORELASIANTAR-KARAKTER DAN SIDK LINTAS ANTARA KARAKTER AGRONOMI DENGAN HASIL KEDELAI {*Glycine max* (L.) Merrill}**
 [Correlation Among Characters and Path Analyses Between Agronomic Traits with Grain Yield on Soybean {*Glycine max* (L.) Merrill}]
 Lukman Hakim.....709
- HIDROLISIS KITES MELALUI FERMENTASI SEMI PADAT UNTUK PRODUKSI N-ASETILGLUKOSAMINA**
 [Production of N-acetyl-D-glucosamine by Submerged Fermentation from Chitin]
 Iwan Saskiawan dan Rini Handayani.....721
- SIMTOMATOLOGI DAN WAKTU KEMATIAN RAYAP *Macrotermes gilvus* Hagen (ISOPTERA: FAMILI TERMITIDAE) SETELAH INFEKSI CENDAWAN *Metarhizium brunneum* Petch**
 [Symptomatology and Lethal Time of Termite *Macrotermes gilvus* Hagen (Isoptera: Family Termitidae) after Fungus Infection of *Metarhizium brunneum* Petch]
 Muhammad Sayuthi, Teguh Santoso, Idham Sakti Harahap dan Utomo Kastosuwondo_____729
- REKAYASA EKSPRESI GEN PEMBUNGAAN Hd3a DIBAWAH KENDALI PROMOTER ROL C PADA JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* L.)**
 [Engineering of Expression of Hd3a Flowering Gene driven by rol C Promoter on Physic nut (*Jatropha curcas* L.)]
 Yohana C Sulistyarningsih, Alex Hartana, Utut Widyastuti, Hamim dan Suharsono.....737
- ANALISIS TINGKAT PENCEMARAN AIR DENGAN METODE INDEKS PENCEMARAN DI TELUK YOUTEFA, JAYAPURA, PROVINSI PAPUA**
 [Analyze of Water Pollution Level in Youtefa Bay Jayapura, Papua Using Pollution Indeks Method]
 Janviter Manalu, I Wayan Nurjaya, Surjono HS dan Kholil.....749
- SIFAT PROTEKSI EKSTRAK AIR PANAS TEH {*Camellia sinensis* (LJ Kuntze)} HIJAU PADA KHAMER *Candida tropicalis* YANG DEPERLAKUKAN DENGAN PARACETAMOL**
 [Protection Property of Hot Water Extract of Green Tea {*Camellia sinensis* (LJ Kuntze)} on Yeast *Candida tropicalis* Treated with Paracetamol]
 Heddy Julistiono.....763

<p>INFEKSI <i>Salmonella enteritidis</i> PADA TELUR AYAM DAN MANUSIA SERTA RESISTENSINYA TERHADAP ANTIMIKROBA <i>[Salmonella enteritidis</i> infection in chicken eggs and human and its antimicrobial resistance profiles] <i>Anni Kusumaningsih dan M Sudarwanto</i>.....</p>	771
<p>IDENTIFIKASI GEN PENYANDI PIREN DIOKSIASENASE PADA ISOLAT BAKTERIPENDEGRADASI PIREN <i>[Identification of the Piren Dioxygenase Encoding Gene in Bacteria Isolates Degrading Piren]</i> <i>FA Febria, Jamsari, N Nasir dan N Nurhidayat</i>.....</p>	781
<p>KAJIAN OZONISASI (O₃) TERHADAP KARAKTERISTIK KUBIS BUNGA (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>) SEGAR SELAMA PENYIMPANAN PADA SUHU DINGIN <i>[Evaluation of Ozonization (O₃) on the Characteristics of Fresh Cauliflower (Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>) during Cold Storage] <i>AliAsgar, A TSugiarto, Sumartini dan D Ariani</i>.....</p>	787
<p>POLA KECENDERUNGAN PENANGKAPAN BURUNG-BURUNG LIAR BERNILAI EKONOMIS DAN IMPLIKASI KONSERVASINYA: STUDI KASUS DITANAH GROGOT, KABUPATEN PASER, PROVINSI KALIMANTAN TIMUR <i>[Capture Trend of Economically Wild Birds and its Conservation Implication: Case Study in Tanah Grogot, Paser District, East Kalimantan Province]</i> <i>Rachmat Budiwijaya Suba, Aditya Rakhman dan Rustam</i>.....</p>	797
<p>IDENTIFIKASI <i>Lernaea</i> sp. YANG MENGINFEKSI IKAN ARWANA IRIAN (<i>Scleropages jardinii</i> (Saville-Kent, 1892)) DI MERAUKE, JAKARTA, BOGOR DAN DEPOK <i>[Identification of Lernaea</i> sp. which infected Anwana irian fish (<i>Scleropages jardinii</i> (Saville-Kent, 1892)) in Merauke, Jakarta, Bogor and Depok] <i>Dikry N Shatrie, Kurniasih Imamudin, Wisnu Nurcahyo dan Triyanto</i>.....</p>	807
<p>KERAGAMAN GENETIK HIBRIDA BEBERAPA STRAIN IKAN NILA (<i>Oreochromis niloticus</i> Bleeker) <i>[Genetic Variability of Tilapia (Oreochromis niloticus</i> Bleeker) Hybrid] <i>Rudhy Gustiano, Dinar Soelistyowati, Agung Luthfl Fauzan, dan Otong Zenal Arifin</i>.....</p>	819
<p>HETEROSIS, HETEROBELTIOSIS DAN TINDAK GEN KARAKTER AGRONOMIK KEDELAI (<i>Glycine max</i> (L.) Merrill) <i>[Heterosis, Heterobeltiosis and Gene Action of the Agronomic Characters in Soybean (Glycine max</i> (L.) Merrill) <i>Ayda Krisnawati dan MM Adie</i>.....</p>	827

REKAYASA EKSPRESI GEN PEMBUNGAAN Hd3a DIBAWAH KENDALI PROMOTER ROL C PADA JARAK PAGAR (*Jatropha curcas* L.)¹ [Engineering of Expression of Hd3a Flowering Gene driven by rol C Promoter on Physic nut (*Jatropha curcas* L.)]

Yohana C Sulistyaningsih^{2,3} \ Alex Hartana², Utut Widayastuti^{2,3}
Hamim² dan Suharsono^{2,3**}

²Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam-Institut Pertanian Bogor,
Jln Agathis Darmaga, Bogor 16680;

³Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Gedung PAU,
Jln Kamper, Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

* e-mail: sony.suharsono@yahoo.com

ABSTRACT

Flowering in jatropha (*Jatropha curcas* L.) was considered as one of major factors that contribute to its productivity. Small number of female flowers produced in each inflorescence was believed as the main cause of low seed production. Introduction of *Hd3a* flowering gene driven by rol C promoter was supposed to improve total number of flowers including female flower. The objective of this research was to optimize cell proliferation and regeneration medium in *Jatropha* transformation method mediated by *Agrobacterium*, to obtain transgenic *Jatropha* containing *Hd3a* flowering gene as well as to understand the effect of this transgene on *Jatropha* flowering character. Callus induction medium containing 0.5 mg/l IBA added with 3 g/l PVP produced the highest frequency of shoot formation. We obtained 26.67% to 33.33% putative transgenic plantlets that were able to grow in 40mg/l hygromycin selection medium. PCR analysis revealed that seven out of 10 putative transgenic plantlets were positively transgenic. Extremely early flowering character that was confirmed by histological analysis was also shown by some transgenic plantlets.

Key words: Engineering of expression Genetic transformation, *Hd3a*, rol C promoter, *Jatropha curcas* L.

ABSTRAK

Pembungaan pada jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) merupakan salah satu faktor yang turut berperan dalam produktivitas tanaman ini. Jumlah bunga betina yang rendah dalam setiap karangan bunga dipercaya sebagai penyebab utama rendahnya produktivitas biji. Introduksi gen pembungaan *Hd3a* di bawah kendali promoter rol C diduga dapat meningkatkan total jumlah bunga yang dihasilkan sehingga meningkatkan pula total jumlah bunga betina. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan media proliferasi sel serta regenerasi dalam transformasi genetik jarak pagar dengan bantuan *Agrobacterium*, memperoleh jarak pagar transgenik yang mengandung gen pembungaan *Hd3a* di bawah kendali promoter rol C serta mengetahui pengaruh gen *Hd3a* dalam pembungaan jarak pagar. Regenerasi dengan frekuensi tertinggi diperoleh dari media induksi kalus mengandung 0,5 mg/l IBA ditambah dengan 3 g/l PVP. Kami memperoleh 26,67% hingga 33,33% planlet transgenik putatif yang mampu tumbuh pada medium seleksi mengandung 40 mg/l higromisin. Hasil PCR menunjukkan bahwa tujuh dari 10 planlet putatif transgenik merupakan planlet transgenik. Sifat pembungaan dini yang dikonfirmasi dengan pengamatan histologi diamati pada beberapa planlet transgenik.

Kata kunci: Rekayasa ekspresi Transformasi genetik, gen *Hd3a*, promoter rol C, jarak pagar, *Jatropha curcas* L.

PENDAHULUAN

Jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) merupakan tanaman yang sangat cocok untuk dikembangkan sebagai penghasil bahan bakar nabati. Selain kandungan minyak pada biji yang cukup tinggi, tanaman ini mampu beradaptasi pada lingkungan dengan iklim yang relatif kering dengan tingkat kesuburan rendah sehingga memungkinkan pengembangannya pada lahan-lahan marginal (Openshaw, 2000). Tanaman ini tersebar luas di berbagai daerah di Indonesia, namun karena peranannya yang kurang penting sela-

ma ini jarak pagar belum banyak mendapat perhatian. Dewasa ini berbagai penelitian mulai dilakukan, namun upaya pemuliaan tanaman ini masih sangat terbatas. Kultivar-kultivar jarak pagar yang ada sekarang baru merupakan hasil seleksi dari plasma nutfah yang tersedia sehingga produktivitas tanaman masih tergolong rendah.

Karakter pembungaan pada jarak pagar merupakan salah satu faktor pembatas produktivitas tanaman ini (Hartati, 2006). Menurut Camellia *et al.* (2011) keberhasilan pembentukan buah pada

tanaman ini cukup tinggi, sebab sekitar 92% dari bunga betina mampu berkembang menjadi buah. Namun jumlah bunga betina yang sedikit mengakibatkan total produksi buah rendah. Pada jarak pagar, bunga tersusun dalam karangan berupa anak payung menggarpu. Bunga jantan dan bunga betina terdapat pada karangan bunga yang sama, umumnya bunga betina berada pada bagian tengah dikelilingi sejumlah bunga jantan. Jumlah bunga dalam tiap karangan dapat mencapai 100 sampai 200, bunga jantan lebih banyak daripada bunga betina dengan rasio 22:1 hingga 29:1 (Raju da Ezradanam 2002; Chang-wei *et al.*, 2007; Camellia *etal.*, 2011).

Pembungaan merupakan rangkaian proses yang diawali dengan perubahan pucuk vegetatif menjadi pucuk reproduktif. Induksi untuk terjadinya perubahan tersebut pada sebagian besar tanaman dipengaruhi oleh faktor lingkungan, meliputi panjang hari (fotoperiod), suhu serta ketersediaan air. Tumbuhan yang tidak memerlukan panjang hari atau kondisi suhu tertentu sebagai penginduksi pembungaan disebut tanaman yang berbunga secara otonom. Tanaman demikian umumnya sensitif terhadap penyinaran (Bernier *etal.*, 1993).

Pengetahuan tentang induksi pembungaan melalui lintasan panjang hari telah mengalami kemajuan pesat sejak ditemukan gen-gen yang berperan penting dalam pengaturan proses tersebut. Penelitian pada *Arabidopsis thaliana* telah mendapatkan gen *Flowering locus T (FT)* yang memacu pembungaan pada tanaman hari panjang. Selain itu dikenal pula gen *CONSTANS (CO)* yang mengatur ekspresi *FT* melalui regulasi transkripsi (Suarez-Lopez *et al.* 2001). Pada padi dikenal gen *Hd3a* yang berperan memacu pembungaan pada tanaman hari pendek. Percobaan rekayasa ekspresi berlebih (*overexpression*) gen *Hd3a* maupun *FT* menyebabkan pembungaan dini pada padi serta

Arabidopsis. Kemiripan sekuen serta fungsi ke dua gen tersebut menegaskan bahwa *Hd3a* merupakan ortolog dari *FT* (Kojima *et al.*, 2002). Dari poplar yang merupakan tanaman tahunan, gen *FT2* yang memacu pembungaan dengan memperpendek masa juwana telah berhasil diisolasi. Gen *FT2* memiliki kesamaan sekuen asam amino 81% dengan *Hd3a* dan 78% dengan *FT*. Rekayasa ekspresi berlebih dengan menggunakan promoter konstitutif 35S CaMV menghasilkan tanaman yang berbunga pada umur 7 bulan. Secara alami tanaman poplar berbunga setelah berumur 10 tahun (Hsu *et al.*, 2006). Introduksi gen pembungaan pada jarak pagar diharapkan dapat menghasilkan tanaman yang berbunga lebih awal dengan frekuensi pembungaan lebih tinggi, sehingga total bunga yang dihasilkan lebih banyak, sebagai akibatnya total bunga betina yang dihasilkan juga lebih banyak.

Introduksi gen ke dalam genom tanaman merupakan suatu upaya perbaikan sifat yang terarah karena langsung mengenai karakter yang diinginkan. Introduksi gen melalui transformasi dengan bantuan *Agrobacterium* merupakan metode yang banyak digunakan karena dianggap paling efektif serta memiliki efisiensi transformasi yang tinggi (Newell, 2000). Keberhasilan transformasi genetik jarak pagar dengan bantuan *Agrobacterium* pertama kali dilaporkan oleh Li *et al.* (2007), yang menggunakan kotiledon sebagai eksplan. Sifat kultur jarak pagar yang sangat sensitif terhadap beberapa agen seleksi seperti kanamisin dan higromisin merupakan kendala dalam penggunaan teknik ini. Upaya untuk mengatasi masalah ini terus dilakukan antara lain oleh He *et al.* (2009) dan Mazumdar *et al.* (2010) yang menggunakan kanamisin sebagai agen seleksi serta oleh Trivedi *et al.* (2009) yang menggunakan agen seleksi higromisin, namun dalam beberapa penelitian tersebut belum dihasilkan tanaman transgenik. Dewasa ini tanaman jarak pagar

transgenik berhasil diperoleh dari eksplan daun muda (Zong *et al.*, 2010) serta kotiledon (Pan *et al.*, 2010) dengan penundaan pemberian agen seleksi kanamisin pada tahap induksi kalus.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kondisi proliferasi sel dan regenerasi yang sesuai untuk transformasi jarak pagar dengan bantuan *Agrobacterium*, memperoleh tanaman transgenik jarak pagar yang mengandung gen pembungaan *Hd3a* dengan promoter rol C serta mengetahui pengaruh gen pembungaan *Hd3a* terhadap pembungaan jarak pagar.

BAHAN DAN METODE

Bahan penelitian berupa biji jarak pagar kultivar IP-2P yang berasal dari Kebun Percobaan Pakuwon, Sukabumi. Plasmid p2K1 mengandung gen *Hd3a* dengan promoter rol C yang terdapat dalam bakteri *Escherichia coli* diperoleh dari Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Jepang. Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 disediakan oleh National Taiwan University, Taiwan.

Media dasar berupa media MS (Murashige & Skoog, 1962) yang mengandung 100 mg/l mioinositol, 10 mg/l tiamine-HCl, dan 3% sukrose, dengan pH 5,8 serta dipadatkan dengan 3 g/l *phytagel*. Untuk memperoleh kalus yang mampu membentuk tunas dengan frekuensi yang tinggi, dalam penelitian ini dilakukan pengujian kombinasi media induksi kalus. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan lima perlakuan media yaitu *indole butyric acid* (IBA) 0,05 mg/l (P1-1), 0,25 mg/l (P2-1) dan 0,5 mg/l (P3-1) masing-masing dengan penambahan *polyvinyl pyrrolidone* (PVP) 1 g/l, serta IBA 0,5 mg/l dengan PVP 3 g/l (P3-3) dan PVP 5 g/l (P3-5). Percobaan menggunakan 30 eksplan dengan tiga ulangan.

Frekuensi pembentukan kalus diamati pada

minggu ke-3 dan pembentukan tunas diamati pada minggu ke-6, hasil pengamatan dinyatakan dalam persen. Data yang diperoleh dikonversi dengan transformasi akar (Vx) sebelum dilakukan analisis. Kuantitas kalus diukur berdasarkan luasan area kotiledon tertutup kalus. Kriteria kuantitas kalus, meliputi kategori kalus sedikit bila area kotiledon tertutup kalus kurang dari 35%, sedang bila area tertutup kalus 35-70% serta banyak bila area kotiledon tertutup kalus lebih dari 70%.

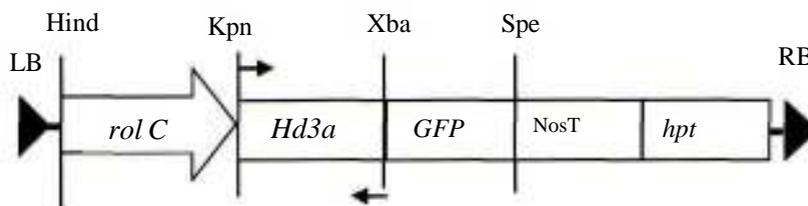
Analisis data menggunakan program *SPSS 17.0 for Windows*, keragaman diuji dengan *analysis of variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada α 5%.

Transformasi *Agrobacterium tumefaciens* dengan gen *Hd3a*

Gen yang akan diintroduksi ke dalam tanaman jarak pagar adalah gen pembungaan *Hd3a*. Gen *Hd3a* yang dikendalikan oleh promoter rol C dilengkapi dengan gen penanda *GFP* serta gen resistensi terhadap higromisin (*hpt*) yang terdapat pada pita T-DNA dan telah disisipkan pada vektor ekspresi p2K1. Posisi gen *Hd3a* pada T-DNA disajikan pada Gambar 1. Vektor p2K1 yang digunakan juga mengandung gen resisten kanamisin (*npt*) yang digunakan sebagai agen seleksi. Vektor ini diklon pada bakteri *E. coli*. Plasmid p2K1 lalu diisolasi dari bakteri *E. coli* dengan menggunakan Plasmid Mini Prep Kit (Gene Mark). Plasmid selanjutnya diintroduksi pada bakteri *A. tumefaciens* strain LBA 4404 dengan elektroporasi menggunakan Micropulser (Bio-Rad), dan ditumbuhkan pada medium LB (Luria Bertani) padat yang mengandung 25 ppm rifampisin dan 50 ppm kanamisin.

Transformasi genetik pada tanaman jarak pagar

Transformasi menggunakan kotiledon sebagai eksplan dilakukan mengikuti metode Li *et al.* (2007) dengan beberapa modifikasi. Transformasi jarak



Gambar 1. Gen *Hd3a* pada T-DNA, LB: left border, RB: right border, rol C: promotor dari *A. rhizogenes*, *Hd3a*: gen *Hd3a* dari padi, *GFP*: gen penanda *Green Fluorescent Protein*, NosT: terminator Nos *hpt*: gen resistensi terhadap higromisin. Anak panah menunjukkan arah primer dalam PCR.

pagar meliputi beberapa tahap, yaitu penyiapan kotiledon, infeksi, ko-kultivasi, induksi kalus, induksi tunas (regenerasi), dan pemanjangan tunas. Untuk penyediaan eksplan, biji jarak pagar steril ditanam pada media 1/2 MS dan dipelihara sampai umur 12 hari. Kotiledon dipisahkan dari kecambah dan dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm, selanjutnya digunakan sebagai eksplan. *A. tumefaciens* tertransformasi dikulturkan pada medium LB cair yang mengandung 50 mg/l kanamisin dan 25 mg/l rifampisin, diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam dengan penggoyangan 100 rpm. Sel bakteri dipisahkan dari medium cair dengan disentrifusi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit, selanjutnya pelet dilarutkan pada medium MS cair yang mengandung 20 mg/l asetosiringon hingga diperoleh konsentrasi 0,5 pada OD 600. Proses infeksi dilakukan dengan merendam potongan kotiledon pada suspensi bakteri *Agrobacterium* selama 10 menit dengan penggoyangan 50 rpm. Potongan kotiledon selanjutnya dikeringkan dengan kertas tisu steril dan ditanam pada medium MS padat mengandung 20 mg/l asetosiringon tanpa antibiotik. Kultur dipelihara di ruang gelap selama 3 hari. Tahap ini merupakan kokultivasi yang bertujuan memberi kesempatan *Agrobacterium* tumbuh dan menginfeksi lebih banyak sel kotiledon. Setelah kokultivasi kotiledon dicuci dengan air steril dan direndam dalam larutan 500 mg/l cefotaxim untuk mematikan bakteri *Agrobacterium*. Untuk induksi

kalus, kotiledon tadi ditanam pada medium MS yang mengandung 0,05 mg/l BAP dengan variasi konsentrasi IBA (0,05-0,5 mg/l) dan PVP (1-5 g/l) serta 500 mg/l cefotaxim dan 1,5 mg/l higromisin selanjutnya diinkubasi pada kondisi gelap selama 3 minggu. Tahap regenerasi dilakukan dengan memindahkan kotiledon berkalus pada medium MS yang mengandung 0,05 mg/l IBA, 3 mg/l BAP dan 1 g/l PVP serta 250 mg/l cefotaxim dan 1,5 mg/l higromisin. Setelah 2 minggu kalus disub-kultur pada media regenerasi yang sama tanpa higromisin. Planlet hasil regenerasi ditumbuhkan pada medium MS yang mengandung higromisin 40 mg/l, pertumbuhan diamati selama 2 minggu. Tanaman yang tumbuh baik merupakan transgenik putatif.

Isolasi DNA genom jarak pagar

Isolasi DNA genom menggunakan metode CTAB dengan sedikit modifikasi. Sekitar 100 mg daun jarak pagar digerus dengan bantuan pasir kuarsa, DNA diekstraksi dengan 600 µl larutan CTAB yang mengandung 2% PVP ditambah 0,2 % merkaptoetanol sebagai anti oksidan, lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Pemurnian dari kandungan lemak dan protein dilakukan dengan ekstraksi menggunakan kloroform-isoamil alkohol 24:1, dilanjutkan ekstraksi dengan fenol-kloroform-isoamil alkohol 25:24:1. Pengendapan DNA dilakukan dengan menambahkan etanol absolut dan NaO-asetat pH 5,2 masing-masing 2 kali dan 0,1 kali volume supernatan, kemudian

diinkubasi pada suhu -20°C selama 1 malam. Larutan disentrifusi pada 10.000 rpm selama 15 menit sehingga diperoleh DNA padatan (pelet), yang kemudian dicuci dengan 500 μl etanol 70 % dan disentrifusi pada kecepatan 10000 rpm selama 5 menit. Pelet DNA selanjutnya dikering anginkan dan dilarutkan dalam 30 μl ddH₂O. Kandungan RNA dihilangkan dengan pemberian RNase 0,2 kali volume larutan, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 10 menit. Aktivitas RNase dihentikan dengan pemanasan pada suhu 70°C selama 10 menit.

Analisis tanaman transgenik

Penyisipan transgen *Hd3a* pada genom tanaman tertransformasi dideteksi dengan PCR. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen *Hd3a* adalah Hd-F: 5'CCTTCAGGGTTTTTTGCA 3' dan Hd-R: 5'CTAGGGGTAGACCCTCCTG 3'. Kondisi PCR yang digunakan adalah pra-PCR 95°C 5 menit, denaturasi 95°C 1 menit, penempelan primer 55°C 1 menit, dilanjutkan dengan ekstensi pada 72°C 1 menit dan pasca-PCR 72°C 5 menit. Siklus PCR dilakukan sebanyak 40 kali. Hasil dari PCR dimigrasikan pada gel *agarose* 1% dengan tegangan 100 Volt selama 28 menit. Gel diwarnai dengan *ethidium bromide*, selanjutnya diperiksa di bawah sinar UV.

Analisis fenotip tanaman transgenik putatif pada kultur *in vitro*

Tanaman transgenik putatif pada kultur *in vitro* diamati secara morfologi maupun histologi. Pengamatan struktur histologi dilakukan pada meristem pucuk, meristem pada struktur yang menyerupai karangan bunga serta organ-organ yang mirip bunga. Untuk pembuatan sediaan mikroskopis, organ difiksasi dalam larutan FAA (formalin alkohol asam asetat), proses dehidrasi dan penjernihan menggunakan tersier butil alkohol, selanjutnya ditanam (*embedding*) dalam parafin mengikuti metode Johansen (1940). Organ yang telah disayat

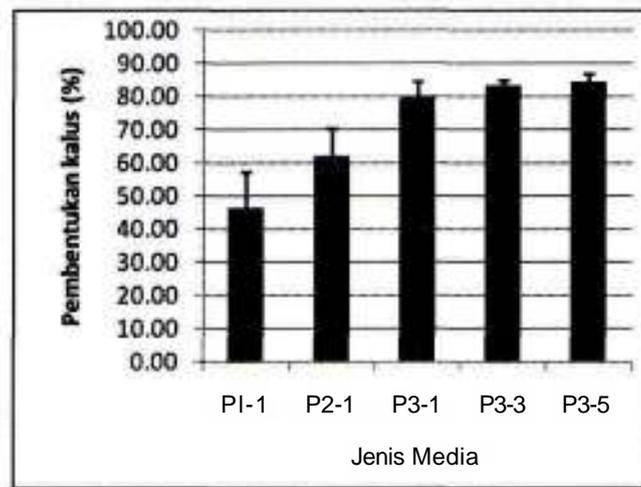
dengan ketebalan 8-10 μm diwarnai dengan safranin 2% dan *aniline blue* 1%.

HASIL

Pembentukan kalus

Eksplan berupa potongan kotiledon yang ditanam pada media induksi kalus mula-mula mengalami penebalan serta tumbuh melebar, selanjutnya pada hari ke-7 sampai ke-10 mulai terbentuk kalus pada tepian bekas potongan serta pada permukaan bawah yang melekat pada medium. Kalus yang dikulturkan pada ruang gelap ini warnanya bervariasi dari putih, kuning pucat hingga kuning kehijauan. Umumnya kalus yang terbentuk berupa kalus kompak. Pengamatan terhadap pembentukan kalus menunjukkan bahwa penambahan IBA hingga 0,5 mg/l meningkatkan keberhasilan pembentukan kalus. Media dengan kandungan IBA 0,05 mg/l (P1-1) menunjukkan frekuensi kalus terendah, sedangkan media dengan kandungan IBA 0,5 mg/l menunjukkan frekuensi pembentukan kalus yang tertinggi (P3-1, P3-3 dan P3-5). Berbeda dengan peningkatan kadar IBA, penambahan kandungan PVP tidak berpengaruh terhadap frekuensi pembentukan kalus. Pada media dengan kandungan IBA 0,5 mg/l kadar PVP 1, 3 maupun 5 g/l tidak memberikan hasil yang berbeda (Gambar 2)

Selain variasi dalam hal keberhasilan pembentukan kalus, terlihat pula keragaman kuantitas kalus yang terbentuk di antara kelima jenis media yang diuji. Pada kandungan IBA rendah (P1-1), sebagian besar eksplan membentuk kalus dalam jumlah sedikit, hanya beberapa eksplan membentuk kalus dalam jumlah sedang. Peningkatan kadar IBA menunjukkan peningkatan kuantitas kalus yang terbentuk. Namun berbeda dengan frekuensi pembentukan kalus, kuantitas kalus yang terbentuk pada eksplan dipengaruhi pula oleh penambahan PVP.



Gambar 2. Frekuensi pembentukan kalus pada media dengan variasi kandungan IBA dan PVP pada umur kultur 3 minggu. Medium induksi kalus mengandung 0,05 mg/l IBA dan 1 g/l PVP(P1-1), 0,25 mg/l IBA dan 1 g/l PVP (P2-1), 0,5 mg/l IBA dan 1 g/l PVP (P3-1), 0,5 mg/l IBA dan 3 g/l PVP(P3-3), 0,5 mg/l IBA dan 5 g/l PVP (P3-5)

Pada Gambar 3 dapat dilihat bahwa penambahan PVP 5 g/l (P3-5) maupun 3 g/l (P3-3) berhasil meningkatkan proporsi jumlah kalus terhadap eksplan dibandingkan perlakuan dengan kadar IBA yang sama namun kandungan PVP lebih rendah (P3-1).

Pembentukan Tunas

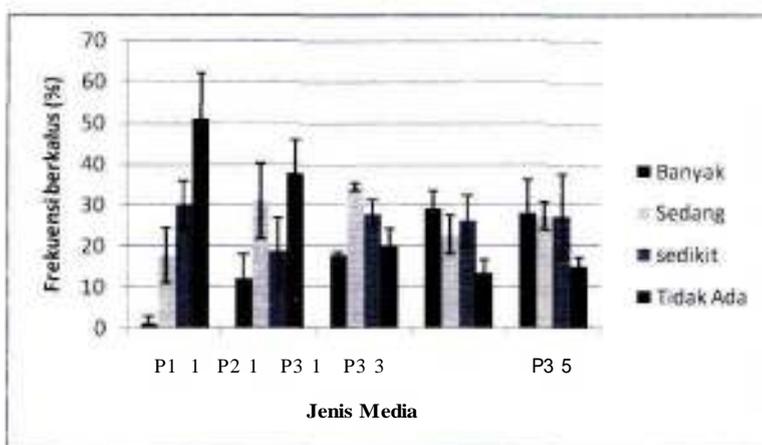
Setelah inkubasi selama 3 minggu, kalus dipindahkan ke media regenerasi berupa media dasar MS dengan penambahan 0,05 mg/l IBA, 3 mg/l BAP serta 1 g/l PVP yang mengandung 250 mg/cefotaxim dan 1,5 mg/l higromisin. Mula-mula kalus berubah warna menjadi kebijauan, setelah inkubasi selama 2 minggu pada media regenerasi mulai terbentuk tonjolan-tonjolan calon tunas. Tunas lengkap mulai terbentuk pada umur 3-5 minggu. Frekuensi pembentukan tunas serta jumlah tunas yang terbentuk pada setiap eksplan berkalus diamati pada minggu ke 6. Frekuensi regenerasi tertinggi diperoleh dari kalus yang berasal dari media induksi kalus dengan kandungan IBA 0,5 mg/l dan PVP 3 g/l (P3-3). Jumlah tunas yang terbentuk bervariasi di antara perlakuan, namun perbedaan jenis media tidak memberikan hasil yang berbeda nyata (Tabel 1).

Planlet yang diperoleh selanjutnya ditumbuhkan pada media seleksi berupa media dasar MS tanpa zat pengatur tumbuh yang mengandung 40 mg/l higromisin. Planlet yang mampu bertahan pada media seleksi ini merupakan tanaman transgenik putatif. Planlet transgenik putatif yang diperoleh dari semua perlakuan berkisar antara 26,67% hingga 33,33% dari planlet yang dihasilkan (Tabel 1)

Pengamatan terhadap planlet yang diperoleh memperlihatkan adanya dua macam fenotip, yaitu planlet dengan ciri pertumbuhan vegetatif dan planlet yang menunjukkan karakter pertumbuhan reproduktif. Planlet dengan ciri pertumbuhan vegetatif tersusun oleh batang yang mendukung daun-daun, sedangkan planlet dengan ciri pertumbuhan reproduktif, mendukung struktur menyerupai karangan bunga (Gambar 4). Planlet dengan ciri pertumbuhan reproduktif demikian tidak pernah dihasilkan dari kultur tanaman non transgenik.

Analisis tanaman transgenik

DNA genom yang diisolasi dari tanaman transgenik putatif selanjutnya digunakan dalam PCR untuk mengetahui keberadaan transgen *Hd3a* pada



Cambar 3. Sebaran kuantitas kalus yang terbentuk pada media induksi dengan variasi kandungan IBA dan PVP. Medium induksi kalus mengandung 0,05 mg/1 IBA dan 1 g/1 PVP(P1 1), 0,25 mg/1 IBA dan 1 g/1 PVP (P2 1), 0,5 mg/1 IBA dan 1 g/1 PVP (P3 1), 0,5 mg/1 IBA dan 3 g/1 PVP(P3 3), 0,5 mg/1 IBA dan 5 g/1 (P3 5) ((P3 5)

Tabel 1. Pembentukan kalus dan tunas serta frekuensi tunas transgenik putatif pada media perlakuan. Media induksi kalus mengandung 0,05 mg/1 IBA dan 1 g/1 PVP(P1 1), 0,25 mg/1 IBA dan 1 g/1 PVP (P2 1), 0,5 mg/1 IBA dan 1 mg/1 PVP (P3 1), 0,5 mg/1 IBA dan 3 mg/1 PVP(P3 3), 0,5 mg/1 IBA dan 5 mg/1 mg/1 PVP (P3 5)

	Jenis Media				
	P1 1	P2 1	P3 1	P3 3	P3 5
Pembentukan Kalus (%)	46,67a	62,22ab	80b	83,33b	84,72b
Frekuensi Regenerasi (%)	54,61a	67,06ab	69,83ab	76,56b	67,56ab
Jumlah Tunas per eksplan	1,75 a	2,17a	2,25a	2,47a	2,11a
Frekuensi Transgenik putatif (%)	26,67a	26,67a	30,00a	33,33a	33,33a

* Angka yang diikuti dengan huruf berbeda menunjukkan beda nyata pada uji BNT dengan 5%

tanaman hasil transformasi. Hasil PCR menunjukkan amplifikasi gen *Hdia* yang berukuran 564 bp pada tanaman transgenik putatif yang dianalisis. Gen *Hdia* teramplifikasi pada tanaman dengan ciri pertumbuhan vegetatif maupun pertumbuhan reproduktif (Gambar 5). Pemeriksaan terhadap 10 planlet transgenik putatif yang diambil secara acak menghasilkan 7 planlet mengandung gen *Hdia*.

Analisis Histologi

Untuk mengetahui tingkat perkembangan planlet transgenik, dilakukan pengamatan histologi terhadap meristem pucuk pada planlet dengan ciri vegetatif maupun reproduktif. Dari hasil pengamatan mikroskopis, pada pucuk planlet dengan pertumbuhan vegetatif terlihat meristem apikal yang dicirikan dengan meristem berbentuk kubah pendek

dengan zona aktif pada daerah sentral (Gambar 6a). Pucuk tanaman dengan ciri pertumbuhan reproduktif menunjukkan adanya meristem pembungaan dengan zona aktif pada daerah perifer. Meristem pembungaan yang diamati berada pada fase diferensiasi (Gambar 6b).

Pengamatan struktur jaringan pada individu bunga memperlihatkan adanya bunga jantan dan bunga betina pada tahap awal perkembangan. Pada bunga betina terlihat ovarium yang sedang berkembang, sedangkan pada bunga jantan dapat dilihat stamen pada tahap diferensiasi (Gambar 7)

PEMBAHASAN

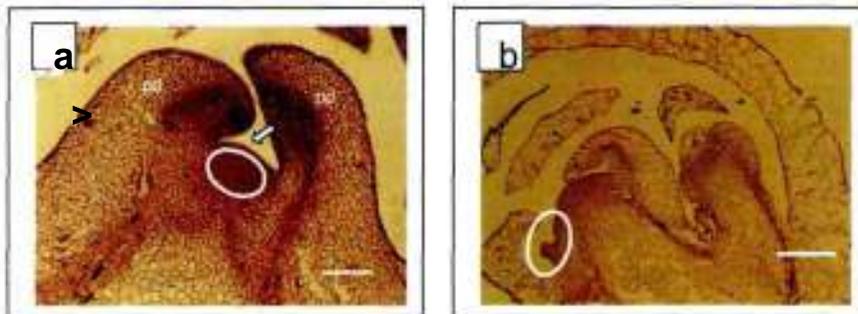
Pada penelitian ini kotiledon dipilih sebagai sumber eksplan, karena pada tanaman jarak pagar



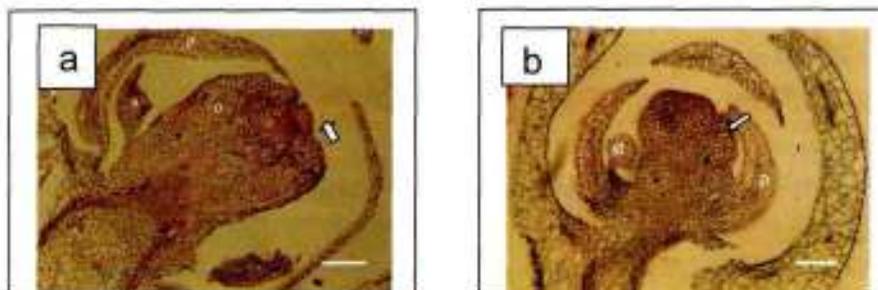
Gambar 4. Morfologi tanaman transgenik putatif berusia 5 minggu dengan pertumbuhan vegetatif (a) dan ciri pertumbuhan reproduktif (b). Bar berukuran 1 cm. Anak panah menunjukkan struktur menyerupai bunga.



Gambar 5. Hasil amplifikasi gen *Hd3a* melalui PCR dari planlet jarak pagar transgenik. Lajur 1 adalah tanaman jarak pagar non transgenik, lajur 2 plasmid mengandung gen *Hd3a*, lajur 3 dan 4 merupakan planlet transgenik dengan pertumbuhan vegetatif, lajur 5 dan 6 adalah planlet transgenik dengan ciri pertumbuhan reproduktif.



Gambar 6. Struktur jaringan pada pucuk planlet transgenik; meristem apikal pada pucuk vegetatif (a), pd, primordia daun; anak panah menunjukkan meristem apikal; dan meristem pembungaan pada pucuk reproduktif (b). Zona aktif ditunjukkan dengan daerah yang dilingkari. Bar berukuran 100 μ m



Gambar 7. Struktur jaringan pada bunga betina (a), anak panah menunjukkan ovul yang sedang berkembang; dan struktur jaringan pada bunga jantan (b), s, sepal; p, petal; o, ovarium n, kelenjar nektar; st, stamen; anak panah menunjukkan stamen yang sedang berkembang. Bar pada a dan b masing-masing berukuran 200 μ m dan 100 μ m

organ ini mampu menghasilkan kalus yang mudah diinduksi untuk pembentukan tunas (Ajay *et al.*, 2008). Selain itu, kotiledon lebih responsif terhadap infeksi *Agrobacterium* dibandingkan dengan bagian embrio lain seperti petiol, hipokotil dan epikotil, serta mudah disediakan dalam waktu singkat (Trivedi *et al.*, 2009).

IBA merupakan salah satu jenis auksin yang banyak digunakan dalam kultur *in-vitro* jarak pagar. Beberapa jenis auksin pernah dicoba untuk menumbuhkan kalus dari berbagai bagian tanaman jarak pagar. Sujatha dan Mukta (1996) mengkulturkan daun muda jarak pagar dengan penambahan *indole-3-acetic acid* (IAA), *α-naphthaleneacetic acid* (NAA) dan IBA secara tunggal maupun dikombinasikan dengan sitokinin. Penambahan IAA secara tunggal pada media tidak memunculkan respon, namun penambahan IBA 49 μM dikombinasikan dengan BA 0.44 μM sampai 4.44 μM menghasilkan kalus dengan pertumbuhan yang baik. Menurut Li *et al.* (2007) penambahan 1 mg/l *2,4-dichlorophenoxy-acetic acid* (2,4-D) atau 1 mg/l NAA pada media juga dapat menginduksi kalus dari kotiledon jarak pagar, namun kalus yang dihasilkan tidak dapat beregenerasi membentuk tunas. Kalus yang mampu beregenerasi diperoleh dari media dengan penambahan 0,05 mg/l IBA yang dikombinasikan dengan 1,5 mg/l BA. Berbeda dengan hasil tersebut, dalam penelitian ini penambahan IBA dengan kadar 0,05 mg/l tidak memberikan hasil yang baik. Perbedaan kultivar jarak pagar yang digunakan diduga merupakan penyebab perbedaan kandungan zat pengatur tumbuh endogen, sehingga diperoleh respon yang berbeda.

Eksplan berupa potongan kotiledon yang diinfeksi dengan *Agrobacterium* umumnya mengalami pencoklatan, serta menunjukkan pertumbuhan kalus yang lebih lambat dibandingkan eksplan tanpa perlakuan infeksi. Hal ini diduga berkaitan dengan ter-

jadinya infeksi oleh *Agrobacterium*. Sel-sel kotiledon memproduksi senyawa fenol sebagai respon pertahanan terhadap infeksi bakteri tersebut, sehingga menyebabkan pencoklatan serta menghambat pertumbuhan kalus. Senyawa fenol merupakan metabolit yang lazim dijumpai pada tumbuhan. Senyawa ini memiliki peranan penting dalam mekanisme pertahanan tumbuhan. Beberapa jenis cekaman abiotik, pelukaan serta infeksi mikroorganisme dapat menginduksi peningkatan produksi senyawa ini (Lattanzio *et al.*, 2006). Tanguy dan Martin (1972) melaporkan terjadinya akumulasi senyawa fenol pada daun tembakau setelah infeksi oleh virus TMV. Pemberian PVP pada medium dalam penelitian ini dimaksudkan untuk menghambat akumulasi senyawa fenol. Pemberian senyawa anti oksidan seperti asam sitrat dan asam askorbat atau absorben seperti arang aktif serta PVP merupakan upaya yang lazim dilakukan untuk mengurangi pencoklatan akibat oksidasi senyawa fenol (George dan Sherington, 1984). Dalam penelitian ini peningkatan kadar PVP dalam media meningkatkan kuantitas kalus yang dihasilkan. Pada kultur kalus dari endosperm *Cycas revolute* pemberian PVP 1g/l pada media dapat mencegah terjadinya nekrosis sehingga meningkatkan produksi kalus (Kiong *et al.*, 2008). Penambahan PVP dengan kadar lebih tinggi (5 g/l) pada kultur tanaman *Myrica esculenta* dapat meningkatkan persentase eksplan yang bertahan hidup, serta memberikan hasil lebih baik daripada penggunaan asam askorbat 50 mg/l yang dicampur dengan asam sitrat 75 mg/l atau arang aktif (Bhatt dan Dhar, 2004).

Untuk memperoleh tunas dari kultur kotiledon yang telah diinfeksi dengan *Agrobacterium*, Li *et al.* (2007) memindahkan kalus yang diperoleh ke medium regenerasi yang mengandung 0.05 mg/l IBA dan 1.5 mg/l BAP, namun dalam penelitian ini komposisi tersebut tidak memberikan hasil. Tunas dapat diperoleh pada medium regenerasi dengan

penambahan BAP 3 mg/l. Shrivastava dan Banerjee (2008) melaporkan kultur tunas dalam medium MS dengan penambahan BAP 3 mg/l dapat menghasilkan tunas banyak.

Tunas yang diperoleh pada tahap regenerasi merupakan hasil perkembangan dari kalus, sehingga pada perlakuan IBA 0,5 mg/l yang menghasilkan kalus dengan kuantitas tinggi diperoleh tunas dengan frekuensi regenerasi relatif tinggi. Namun frekuensi regenerasi tertinggi diperoleh dari perlakuan inisiasi kalus P3-3, dengan penambahan PVP 3 g/l. Berkaitan dengan perannya sebagai absorbent yang menjerap senyawa fenol, PVP dilaporkan mampu meningkatkan kemampuan pembentukan tunas pada kultur *in vitro* beberapa tanaman. Menurut Vasanth *et al.* (2006) penambahan 25 mM PVP pada media regenerasi dapat meningkatkan jumlah tunas pada kultur kotiledon kacang tanah. Senyawa fenol juga merupakan masalah serius pada kultur *Vicia faba* L, karena merupakan penyebab kematian eksplan serta kegagalan regenerasi. Namun masalah tersebut dapat diatasi dengan merendam eksplan selama 1 jam dalam larutan PVP 1 g/l diikuti dengan penanaman pada media MS dengan 1 mg/l asam askorbat atau 10 g/l arang aktif. Perlakuan demikian dapat mengurangi kematian eksplan serta meningkatkan frekuensi regenerasi pada tanaman tersebut (Abdelwahd *et al.*, 2008). Meskipun penambahan 3 g/l PVP mampu meningkatkan frekuensi regenerasi, namun pada penambahan PVP 5 g/l (P3-5) ternyata frekuensi regenerasi lebih rendah. Hal ini diduga berkaitan dengan kandungan zat pengatur tumbuh yang kurang optimal pada media tersebut. Sebagai absorbent PVP tidak hanya menjerap senyawa fenol namun juga menjerap zat pengatur tumbuh dalam media, sehingga menyebabkan penurunan ketersediaan zat pengatur tumbuh pada media (Kiong *et al.*, 2008).

Planlet transgenik yang diperoleh dalam penelitian ini memiliki dua macam fenotip, yaitu planlet dengan pertumbuhan vegetatif, serta planlet yang menunjukkan ciri pertumbuhan reproduktif. Analisis PCR terhadap DNA genom telah menunjukkan insersi gen Hd3a pada genom kedua tipe planlet tersebut. Pengamatan histologi pada pucuk planlet tersebut menunjukkan adanya perbedaan tahap perkembangan antara keduanya. Planlet dengan pertumbuhan vegetatif memiliki pucuk yang berupa meristem vegetatif apikal, dengan meristem berbentuk kubah pendek yang diapit oleh primordia daun. Kumpulan sel-sel berbentuk membulat dengan inti berukuran besar menunjukkan zona aktif pada bagian sentral meristem tersebut. Menurut Esau (1977) meristem berbentuk kubah pendek dengan zona aktif pada bagian sentral merupakan ciri dari meristem vegetatif apikal, sedangkan pada planlet transgenik yang menunjukkan struktur menyerupai bunga, pucuknya berupa meristem pembungaan yang ditandai dengan aktivitas pembelahan yang rendah pada zona sentral, sebaliknya pada zona perifer terdapat aktivitas pembelahan yang tinggi (Steeves dan Sussex 1989; Esau 1977). Tahap ini selanjutnya diikuti dengan tahapan diferensiasi, membentuk primordia bagian-bagian bunga yang meliputi sepal, petal, dan karpel. Pengamatan histologi terhadap individu bunga menunjukkan bunga jantan dan bunga betina pada tahap perkembangan. Pada bunga jantan maupun bunga betina telah dijumpai sepal dan petal, namun stamen serta ovarium sedang berada pada fase perkembangan dini.

Hasil pengamatan struktur jaringan pada pucuk planlet serta bunga membuktikan bahwa telah terjadi transisi dari pucuk vegetatif menjadi pucuk reproduktif pada planlet jarak pagar transgenik yang mengandung gen *Hd3a* dengan promoter rol C. Hal ini menunjukkan bahwa gen *Hd3a* berperan dalam

memacu pembungaan jarak pagar. Pada penelitian Kojima *et al.* (2002) rekayasa ekspresi berlebih dari gen *Hd3a* dengan promoter konstitutif 35S berhasil mempercepat pembungaan pada padi, suatu tanaman hari pendek (SDP) dan *Arabidopsis* yang merupakan tanaman hari panjang (LDP). Mekanisme pemacuan pembungaan melibatkan peranan gen *Hdl* yang ekspresinya memerlukan kondisi hari panjang (Kojima *et al.*, 2002). Jarak pagar merupakan tanaman netral yang tidak memerlukan kondisi panjang hari tertentu untuk induksi pembungaan. Kemampuan gen *Hd3a* memacu pembungaan pada tanaman ini diduga terjadi melalui mekanisme aktivasi gen-gen pembungaan yang berperan dalam penentuan identitas meristem oleh protein yang diekspresikan oleh *Hd3a*. Beberapa penelitian belakangan ini mengungkap bahwa gen *FT* bersama dengan gen *SOC1* terlibat dalam integrasi signal berbagai lintasan induksi pembungaan, meliputi lintasan melalui fotoperiod, otonom maupun regulasi melalui kandungan giberelin (Lee *et al.*, 2006). Ekspresi *FT* mengaktifkan gen pembungaan *Apetalal* dan *LFY* yang bertanggung jawab dalam penentuan identitas meristem, yakni transisi meristem vegetatif menjadi reproduktif. Protein *FT* yang dibentuk pada jaringan vaskuler daun dikirim ke jaringan meristem apikal kemudian bergabung dengan protein *FD* berperan sebagai faktor transkripsi dalam proses ekspresi gen-gen tersebut (Abe *et al.*, 2005). Fenomena kemampuan florigen memacu pembungaan pada sistem induksi yang berbeda pernah ditunjukkan oleh Lifschitz dan Eshed (2006). Rekayasa ekspresi berlebih dari gen *SFT*, suatu ortholog dari gen *FT* yang memacu pembungaan pada *Arabidopsis* (LDP) dan tembakau kultivar Maryland Mammoth (SDP) ternyata dapat menyebabkan pembungaan dini pada tanaman tomat dan tembakau kultivar Samsun yang merupakan tanaman netral. Pada tanaman tomat ekspresi gen

SFT menggantikan rangsang intensitas cahaya yang diperlukan untuk induksi pembungaan.

KESIMPULAN

Modifikasi tahap proliferasi sel dan regenerasi dengan kandungan *indole butyric acid* (IBA) 0.5mg/l dan penambahan 3 g/l *polyvinyl pyrrolidone* (PVP) pada media induksi kalus, serta penambahan 3 mg/l *6-benzylaminopurine* (BAP) dan 1 g/l PVP pada media regenerasi telah menghasilkan tanaman transgenik jarak pagar yang mengandung gen pembungaan *Hd3a*. Gen *Hd3a* yang diketahui memacu pembungaan pada tanaman hari pendek (SDP) dan tanaman hari panjang (LDP) terbukti dapat memacu pembungaan pada tanaman jarak pagar yang merupakan tanaman netral (DNP).

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Proyek Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi tahun 2009, Program Sandwich Dikti tahun 2008 yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan sebagian penelitian di National Taiwan University (NTU), Taiwan, Profesor Yuh Cyang Charng dari NTU atas penyediaan fasilitas laboratorium serta Profesor Ko Shimamoto (NAIST, Jepang) atas gen *Hd3a* yang diberikan serta Dr Kajikawa atas diskusi tentang regenerasi jarak pagar yang bermanfaat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe M, Y Kobayashi, S Yamamoto, Y Daimon, A Yamaguchi, Y Ikeda, H Ichinoki, M Notaguchi, K Goto and T Araki. 2005. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309,1052-1056.
- Abdelwahd R, N Hakam, M Labhilili and SM Udupa. 2008. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *Af. J. Biotech.* 7(8), 997-1002.
- Ajay C, T Deore, and J Sudhakar. 2008. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L: an important biodiesel plant. *Plant Biotechnol Rep* 2, 7-11

- Bernier G, A Havelange, C Houssa, A Patitjean and P Lejeune. 1993. Physiological signal that induce flowering. *Plant Cell* 5,1147-1155.
- Bhatt ID and U Dhar. 2004. Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* buch. - Ham. ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya. *Af. J. Biotech.* 3 (10), 534-540.
- Camellia NNA, LA Thohlah and NAP AbduUah, 2011. Flowering and fruit set under Malaysian climate of *Jatropha curcas* L. *Am. J. Agri. & Biol. Sci.* 6(1), 142-147.
- Chang-wei L, L Kun, C You and S Yongyu. 2007. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. *For. Stud. China* 9(2), 114-119.
- Esau K. 1977. *Anatomy of Seed Plants 2*. John Wiley & Son, New York.
- George EF and PD Sherrington. 1984. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Eastern Press, Reading.
- Hartati SR. 2006. Persentase bunga betina sebagai salah satu faktor penentu produksi benih jarak pagar. *InfoTek Jarak Pagar* 1(5), 17.
- He Y, V Pasapula, X Li, R Lu, B Niu, P Hou, Y Wang, Y Xu and F Chen. 2009. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Jatropha curcas*: factors affecting transient transformation efficiency and morphology analysis of transgenic calli. *Silvae Genetica* 58, 123-128.
- Hsu CY, Y Liu, DS Luthe and C Yuceer. 2006. Poplar *FT2* shortens the juvenile phase and promotes seasonal flowering. *Plant Cell* 18,1846-1861
- Johansen DA, 1940. *Plant Microtechnique*. 1. McGraw-Hill. New York.
- Kiong APL, YS Thing, JA Gansau and S Hussein. 2008. Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revolute*. *Af. J. Biotech.* 7(23), 4279-4284.
- Kojima S, Y Takahashi, Y Kobayashi, L Monna, Ti Sasaki, T Araki and M Yano. 2002. *Hd3a* a rice ortholog of the *Arabidopsis FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hdl* under short-day conditions. *Plant Cell Physiol.* 43,1096-1105.
- Lattanzio V, VMT Lattanzio and A Cardinal!. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. In: F Imperato (Ed.) *Phytochemistry: Advances in Research*, 23-67. Research Signpost. Kerala.
- Lee JH, SM Hong, SJ Yoo, OK Park, JS Lee and JH Ann. 2006. Integration of floral inductive signals by flowering locus T and suppressor of overexpression of Constans I. *Physiol. Plant.* 126,475-183.
- Li M, H Li, H Jiang, X Pan and G Wu. 2007. Establishment of an *Agrobacterium* mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 92,173-181.
- Lifschitz E and Y Eshed. 2006. Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *J Exp Bot* 57, 3405-3414.
- Mazumdar P, A Basu, A Paul, C Mahanta and L Sahoo. 2010. Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of de novo plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in *Jatropha curcas* L. *South Afr. J. Bot.* 76,337-344
- Murashige T and F Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15,473-497.
- Newell C. 2000. Plant transformation technology. *Molecular Biotechnol.* 16, 53-65.
- Openshaw K. 2000. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. *Biomass & Bioenergy* 19 (1), 1-15
- Pan J, Q Fu and ZF Xu. 2010. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of biofuel plant *Jatropha curca* using kanamycin selection. *Afr J Biotechnol.* 9, 6477-6481
- Raju AJS and V Ezradanam. 2002. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *CurrSci.* 83, 11.
- Shrivastava S and M Banerjee. 2008. In vitro clonal propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): Influence of additives. *IJIB* 3(1), 73-79.
- Steeves TA and IM Sussex. 1989. *Pattern in Plant Development 2*. Cambridge Univ Press, Cambridge.
- Suarez-Lopez P, K Wheatley, F Robson, H Onouchi, F Valverde and G Coupland. 2001. CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* 410,1116-1120.
- Sujatha M and N Mukta. 1996. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 44,135-141
- Tanguy J and C. Martin. 1972. Phenolic compounds and the hypersensitivity reaction in *Nicotiana tabacum* infected with tobacco mosaic virus. *Phytochemistry* 11,19 - 28
- Trivedi S, H Gaudani, M Gupta, N Gupta, P Paril, G Gupta, V Krishna and MP Reddy. 2009. Establishment of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Jatropha curcas* L. *Int. J. Agric. Sci.* 1(2), 11-20
- Vasanth K, A Lakshmiprabha and N Jayabalan. 2006. Amino acids enhancing plant regeneration from cotyledon and embryonal axis of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Indian J. Crop Science* 1(1-2), 79-83.