

PROSPEK REKAYASA GENETIKA PADA TANAMAN KELAPA SAWIT

Condro Utomo dan Daisy Tambajong *

Rekayasa genetika pada tanaman kelapa sawit dititik-beratkan untuk menghasilkan bahan tanaman tahan *Ganoderma*, minyak kelapa sawit dengan nilai tambah tinggi maupun produk baru berupa plastik ramah lingkungan. Ketahanan bahan tanaman terhadap *Ganoderma* diharapkan diperoleh melalui introduksi gen stilbene synthase berasal dari tanaman anggur atau gen kitinase yang berasal dari jamur *Trichoderma harzianum*. Target penting di bidang asam lemak mengacu pada perubahan komposisi asam lemak dengan jalan meningkatkan kandungan asam oleat dan menurunkan kandungan asam palmitat. Metoda pendekatan molekuler yang digunakan untuk mengubah komposisi tersebut mengarah pada lebih diaktifkannya enzim -ketoacyl-ACP synthase II (KAS II) ataupun dengan jalan menghambat fungsi gen pengendali enzim palmitoyl-ACP thioesterase. Pembentukan senyawa polihidroksibutirat (PHB) pada kelapa sawit merupakan salah satu produk baru yang diharapkan dari tanaman transgenik kelapa sawit. Senyawa PHB merupakan bahan pembuat plastik ramah lingkungan yang disintesa melalui proses fermentasi bakteri. Introduksi gen bakteri penghasil PHB ke dalam kelapa sawit memungkinkan kelapa sawit berpotensi menghasilkan senyawa PHB yang efisien.

Kata kunci: rekayasa genetika, kelapa sawit, Ganoderma, asam lemak dan polihidroksi butirat (PHB).

PENDAHULUAN

Kelapa sawit merupakan salah satu komoditas andalan di sektor pertanian dan pangan. Beberapa indikator mendukung argumen ini, antara lain dari peningkatan luas areal, peningkatan produksi minyak sawit mentah (*crude palm oil*, CPO) dan produk derivatif lainnya, peningkatan kontribusi terhadap produk domestik bruto, maupun secara tidak langsung peningkatan kesejahteraan pekebun dan pelaku bisnis kelapa sawit. Dari sisi luas areal, perkebunan kelapa sawit di Indonesia yang pada 1970 hanya 133.000 ha meningkat menjadi 295.000 ha pada

tahun 1980. Pada akhir tahun 1990, luas perkebunan kelapa sawit mencapai 1.127.000 ha, dan pada tahun 2000 diperkirakan mendekati 3.134.000 ha. Seiring dengan peningkatan luas areal perkebunan, produksi CPO juga mengalami peningkatan yang sangat signifikan. Bila pada tahun 1978, tingkat produksi CPO di Indonesia hanya 501.284 ton, maka pada tahun 2000 tingkat produksi CPO diperkirakan mencapai lebih dari 6.000.000 ton (37).

Genetically modified organisms (GMOs) dan *genetically modified micro-organisms* (GMMs) didefinisikan sebagai organisme (dan mikroorganisme) yang

* Universitas Sumatera Utara

materi genetiknya (asam nukleat) telah diubah sedemikian rupa sehingga perubahan tersebut tidak akan terjadi secara alami melalui perkembang-biakan atau rekombinasi alami. Teknologi ini sering kali dinamakan bioteknologi modern atau teknologi gen, kadang-kadang juga dinamakan teknologi asam nukleat rekombinan atau rekayasa genetika dimana mengutamakan pemindahan gen-gen individu terpilih pengendali sifat tertentu yang diinginkan dari suatu organisme ke organisme lain baik dalam satu species ataupun berlainan species.

Berbagai kendala utama dalam pemuliaan konvensional untuk memperoleh bahan tanaman kelapa sawit tahan *Ganoderma* terbentur pada kenyataan bahwa (i) siklus pemuliaan kelapa sawit memerlukan waktu yang cukup lama (10 - 13 tahun) dan (ii) sumber gen yang resisten terhadap *Ganoderma* tidak tersedia diantara plasma nutfah kelapa sawit. Untuk itu salah satu strategi untuk mendapatkan tanaman kelapa sawit tahan *Ganoderma* adalah dengan jalan menyisipkan gen-gen (transgenik) yang menghasilkan zat-zat yang berfungsi sebagai anti jamur. Dalam rekayasa genetika tanaman kelapa sawit, gen-gen yang akan disisipkan diharapkan dapat diekspresikan secara terus-menerus sepanjang hidup tanaman kelapa sawit terutama pada bagian perakaran, untuk itu pemilihan promoter yang bersifat konstitutif dan cocok untuk kelapa sawit

sangatlah penting demi keberhasilan dalam pengendalian *Ganoderma*.

Aplikasi rekayasa genetika yang memberi harapan di bidang industri kelapa sawit adalah yang berkaitan dengan pengembangan tanaman penghasil asam lemak bernilai tinggi dan produk baru yang berhubungan dengan bahan plastik yang dapat dikomposkan. Komposisi asam lemak minyak kelapa sawit terdiri dari 44 % asam palmitat, 39 % asam oleat, 10 % asam linoleat, 5 % asam stearat dan sebagian kecil asam miristat, asam linoleat, asam laurat serta asam palmitoleat (44).

Tingginya kandungan asam palmitat pada minyak kelapa sawit ini merupakan titik kelemahan minyak kelapa sawit jika dibandingkan dengan minyak nabati lainnya karena asam palmitat diklaim sebagai penyumbang utama peningkatan kolesterol dalam darah dan sebagai konsekuensinya pengguna akan beresiko lebih besar terkena serangan penyakit jantung. Dalam upaya mengatasi kelemahan ini perlu dilakukan usaha terobosan di bidang rekayasa genetika tanaman kelapa sawit dengan cara menghasilkan tanaman transgenik rendah asam palmitat tinggi asam oleat. Polihidroksibutirat (PHB) merupakan bahan pembuatan plastik ramah lingkungan karena dapat dikomposkan (*biodegradable plastic*) yang diproduksi secara komersial dengan menggunakan teknologi fermentasi bakteri. Kendala utama pembuatan plastik jenis ini terletak

pada mahalnnya biaya untuk mensintesa PHB. Untuk itu melalui transfer gen pengkode PHB dari bakteri ke dalam genom kelapa sawit, nantinya tanaman hanya memerlukan karbon dioksida, sinar matahari dan air sebagai bahan baku untuk memproduksi PHB.

Pada prinsipnya ada dua metoda yang digunakan untuk mentransfer gen yang diinginkan kedalam genom tanaman yaitu (1) transformasi langsung (penembakan partikel/*particle bombardment*) dimana penerapannya tidak dibatasi oleh jenis tanaman, jenis eksplan dan dapat menggunakan beberapa plasmid sekaligus, dan (2) transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens* dengan kelebihanannya adalah lebih sederhana dalam pelaksanaannya, relatif lebih murah dan bersifat dapat direproduksi (43, 46). Percobaan transformasi gen penanda *gus* pada sel tanaman kelapa sawit telah dilakukan oleh beberapa peneliti baik melalui penembakan partikel (13) maupun melalui *A. tumefaciens* (8) dan hasilnya menunjukkan bahwa kedua cara tersebut berhasil mengintegrasikan gen tersebut kedalam genom kelapa sawit. Hasil kedua metoda transformasi tersebut menunjukkan bahwa tanaman kelapa sawit mampu beregenerasi selama proses transformasi dan gen *gus*nya terekspresi sehingga transformasi tersebut dianggap berhasil.

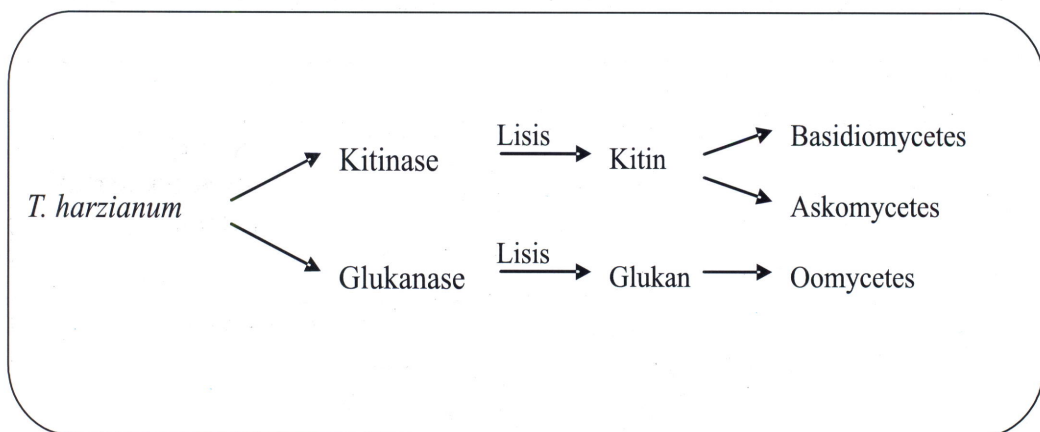
Tulisan ini akan mengulas aplikasi rekayasa genetika yang mempunyai prospek untuk masa mendatang pada perkelapasawitan dengan titik-berat pada tiga aspek yang menyangkut pengembangan tanaman transgenik tahan *Ganoderma*, berasam oleat tinggi dan penghasil PHB.

PENGEMBANGAN TANAMAN TRANSGENIK KELAPA SAWIT TAHAN GANODERMA

Secara alami tanaman kelapa sawit telah mempunyai gen-gen tertentu yang berfungsi sebagai sistem pertahanan diri untuk menghambat atau meminimalkan serangan jamur *Ganoderma* dengan menghasilkan zat-zat yang bersifat anti jamur seperti dari golongan pitoalexin, sebagai contohnya adalah resveratrol (merupakan sekunder metabolit/non-protein) atau patogenesis related protein (PR protein) seperti enzim kitinase dan glukukanase, tetapi karena konsentrasinya secara alami relatif rendah di dalam tanaman kelapa sawit sehingga tidak mampu menahan serangan jamur *Ganoderma*. Untuk meningkatkan kandungan zat-zat tersebut diatas didalam tanaman kelapa sawit diperlukan introduksi gen-gen asing yang berpotensi tinggi penghasil zat anti jamur tersebut. Gen pengendali resveratrol yang memberi harapan untuk disisipkan kedalam genom

tanaman kelapa sawit adalah yang berasal dari tanaman anggur dimana tanaman transgenik yang disisipi gen tersebut tahan terhadap serangan jamur patogen (52), sedangkan gen PR protein yang akan disisipkan ke genom kelapa sawit adalah gen kitinase yang berasal dari jamur *Trichoderma harzianum* dimana gen tersebut telah ditransfer ke beberapa spesies tanaman untuk menginduksi

ketahanan terhadap jamur patogen (34). *T. harzianum* mengeluarkan dua komponen enzim yaitu kitinase dan glukukanase dimana enzim kitinase dapat melisis dinding hifa jamur patogen dari kelas *Basidiomycetes* dan *Ascomycetes* (Gambar 1), karena itu gen kitinase dari *T. harzianum* cocok untuk pengendalian jamur *Ganoderma* yang berasal dari kelas *Basidiomycetes*.



Gambar 1. Jenis enzim yang dihasilkan *T. harzianum* dan Klas jamur yang dapat dilisis

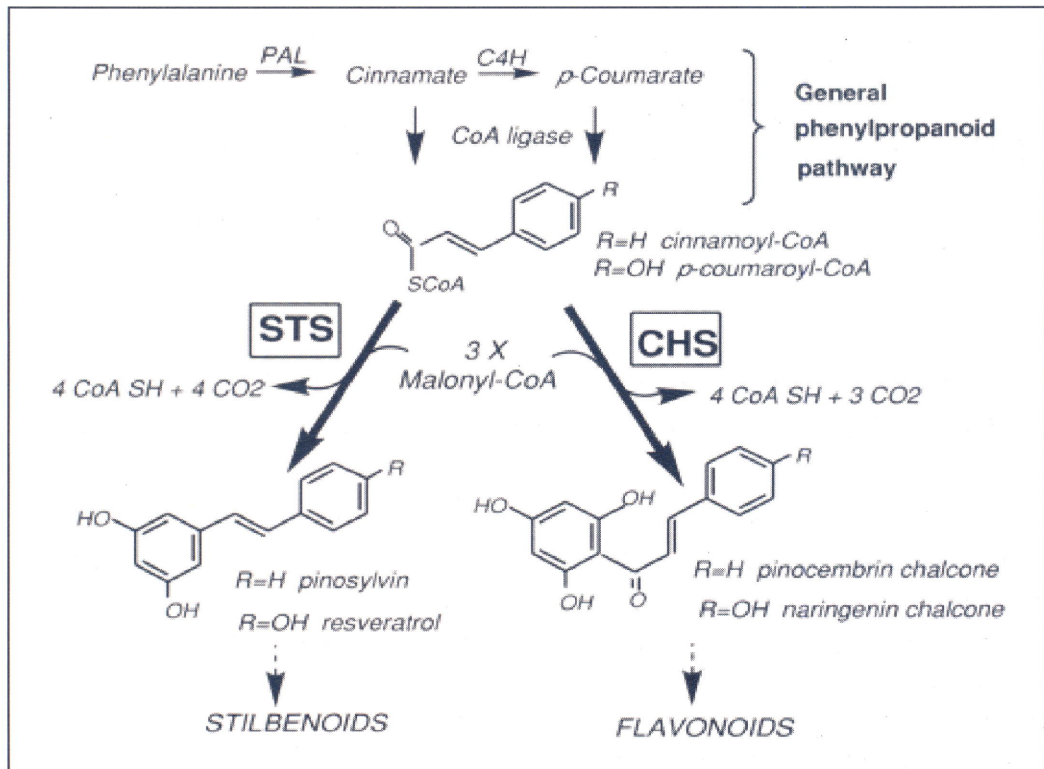
GEN STILBENE SYNTHASE

Di alam tanaman dapat menghasilkan berbagai sekunder metabolit yang bersifat antimikrobia yang dikenal sebagai pitoaleksin (21, 3), dan zat tersebut berfungsi sebagai pertahanan tanaman terhadap serangan patogen. Diantara berbagai pitoaleksin yang pernah diteliti selama ini, resveratrol merupakan pitoaleksin yang paling lama dan intensif

diteliti dalam hubungannya dengan mekanisme ketahanan suatu tanaman terhadap serangan patogen jamur (18). Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) merupakan pitoaleksin dengan berat molekul rendah dan bersifat non-protein yang terbentuk bila tanaman terinfeksi oleh patogen. Beberapa varietas tanaman diketahui mempunyai kandungan resveratrol tinggi secara alami seperti

anggur, kacang tanah dan pinus dengan kandungan resveratrol di daun sebesar 400 g g⁻¹ per berat segar, konsentrasi sebesar ini menyebabkan tanaman anggur resisten terhadap serangan jamur *Botrytis. cinerea* (42). Biosintesa stilbene (termasuk resveratrol) dapat berlangsung bila tersedia enzim stilbene synthase dimana reaksi pembentukan stilbene hidroksi berasal dari malonyl-CoA dan p-coumaroyl-CoA (26), lihat Gambar 2. Tanaman transgenik tembakau, tomat,

alfalfa dan varietas anggur rentan yang diintroduksi dengan gen tersebut terbukti resisten terhadap berbagai patogen jamur di lapang (17, 19, 15, 50). Transfer gen *stilbene synthase* dari spesies tanaman lain ke dalam genom kelapa sawit diharapkan akan meningkatkan aktivitas enzim stilbene synthase sehingga terjadi akumulasi resveratrol yang cukup tinggi di dalam jaringan kelapa sawit sebagai mekanisme resistensi kelapa sawit terhadap serangan jamur *Ganoderma*.



Gambar 2. Diagram biosintesa pembentukan stilbenoid dan flavonoid.

GEN KITINASE

Sistem pertahanan tanaman lainnya terhadap serangan patogen jamur adalah yang berhubungan dengan enzim penghancur dinding sel atau yang dikenal dengan enzim kitinase (47). Meskipun di dalam genom tanaman terdapat gen pengkode kitinase tetapi ekspresi gen untuk menghasilkan enzim ini di dalam tanaman kurang efektif atau bila terekspresi konsentrasinya relatif rendah sehingga sampai saat ini belum ada tanaman yang resisten terhadap patogen jamur secara alami karena kandungan enzim kitinase dalam tanaman (6, 22). Berbagai kemungkinan enzim kitinase yang dihasilkan tanaman kurang efektif sebagai alat pertahanan diri terhadap serangan patogen jamur, antara lain 1) kitinase tanaman hanya efektif untuk ujung hifa yang relatif lebih lunak dan tidak mampu menghancurkan kitin yang lebih keras, 2) aktifitas sebagai zat anti jamur secara alamiah lemah, 3) hanya mampu menghambat perkembangan jamur-jamur tertentu, 4) tidak mempunyai efek terhadap beberapa patogen jamur penting (24, 35).

Upaya untuk mengatasi ketidak-efektifan gen kitinase pada tanaman untuk menghasilkan zat anti jamur dapat dilakukan dengan transfer gen kitinase yang berasal dari jamur pengendali biologis seperti *Trichoderma*. Gen jamur pengkode enzim kitinase tersebut dapat

menghasilkan enzim yang aktivitasnya setara dengan daya racun fungisida kimiawi (29, 31, 32, 33). Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa tak satupun dinding kitin hifa jamur patogen tahan terhadap enzim kitinase yang berasal dari jamur *Trichoderma* (30), khususnya jamur patogen yang berasal dari klas

Ascomycetes dan Basidiomycetes (10, 11, 16, 34). Berbeda dengan gen tanaman, gen kitinase *Trichoderma* yang diklasifikasikan sebagai endokitinase, eksokitinase (N-acetyl- β -D-glucosaminidase), dan kitobiosidase (51) aktivitasnya 100 kali lebih aktif jika dibandingkan dengan gen kitinase tanaman (31, 34). Gen kitinase dari *T. harzianum* telah ditransfer ke beberapa tanaman untuk menginduksi resistensi tanaman terhadap jamur patogen, gen yang ditransfer dapat berfungsi dengan baik di dalam genom tanaman dan tanaman dapat beregenerasi tanpa hambatan. Tanaman transgenik yang terbukti tahan terhadap serangan patogen jamur adalah tembakau dan kentang (34), brokoli (36) dan apel (5). Dengan demikian gen kitinase *T. harzianum* mempunyai potensi untuk diekspresikan di dalam genom kelapa sawit untuk memberikan ketahanan terhadap *Ganoderma*. Hal yang perlu diingat bahwa *Ganoderma* menyerang sistem perakaran kelapa sawit, karena itu untuk mengekspresikan gen tersebut di jaringan perakaran kelapa sawit merupakan bagian

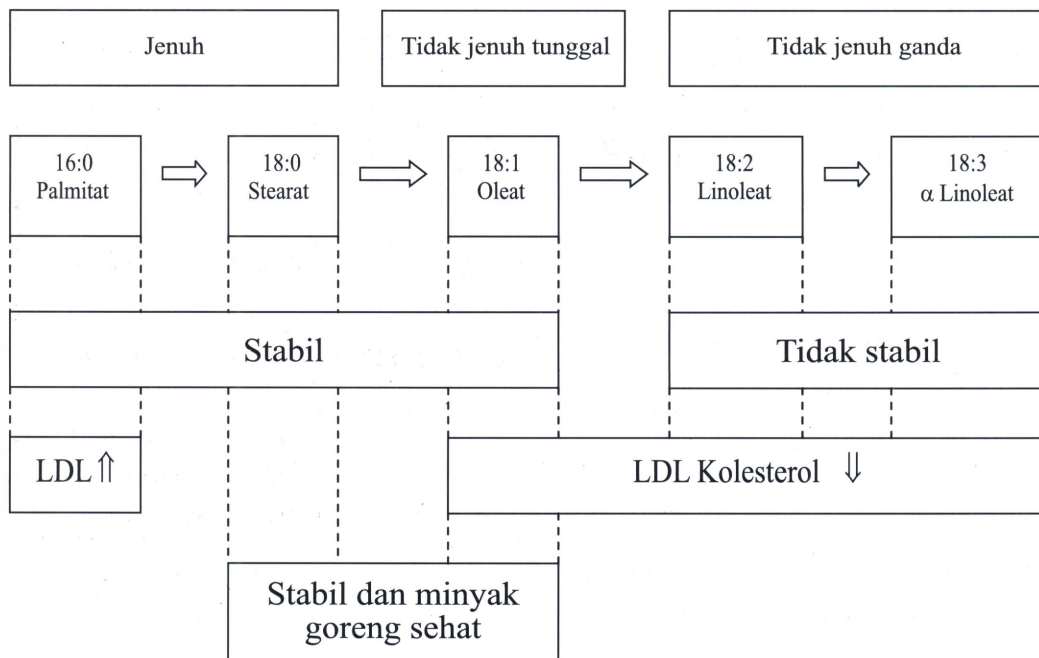
penelitian yang tersulit dan memerlukan promotor spesifik akar.

PENGEMBANGAN TANAMAN TRANSGENIK KELAPA SAWIT BEROLEAT TINGGI

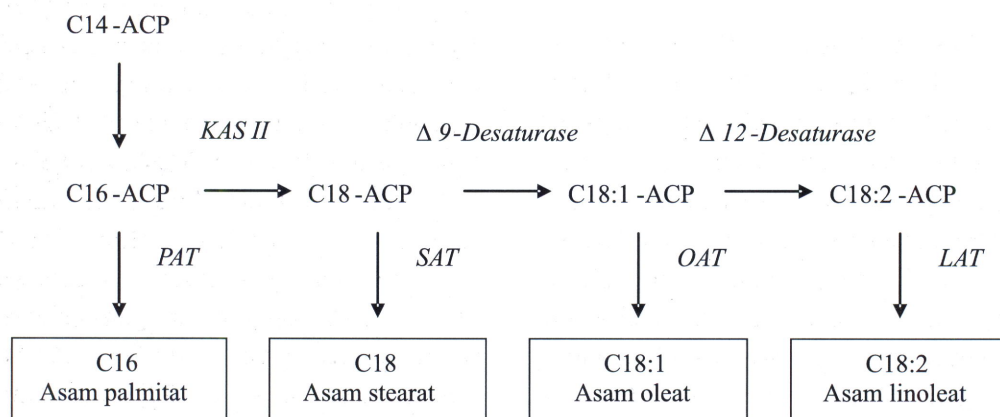
Rekayasa genetika di bidang minyak kelapa sawit dititik-beratkan untuk meningkatkan mutu dengan mengubah komposisi kandungan asam lemak guna memenuhi persyaratan minyak goreng stabil dan sehat (28), lihat skema Gambar 3. Tingginya kandungan asam palmitat dalam minyak kelapa sawit merupakan kendala utama dalam persaingan global dengan minyak yang berasal dari biji-bijian seperti kedele, bunga matahari, canola, biji kapas dan kacang tanah dimana kandungan asam palmitat pada level di bawah asam oleat (2). Persaingan menuju minyak goreng stabil dan sehat semakin kurang seimbang dengan diterapkannya rekayasa genetika pada biji-bijian tersebut yang merupakan tanaman semusim sehingga dalam waktu relatif singkat telah diciptakan varietas-varietas komersial dengan kandungan asam oleat di atas 75 % (27, 49, 25, 28).

Sejak dicanangkan bahwa tujuan utama rekayasa genetika pada tanaman kelapa sawit adalah untuk meningkatkan kandungan asam oleat dan menurunkan kandungan asam palmitat, untuk itu perlu

dikaji dan dipertimbangkan dua pendekatan guna mencapai tujuan tersebut yaitu 1) meningkatkan aktifitas enzim KAS II (*-ketoacyl-acyl carrier protein (ACP) synthase II*) dan 2) mengurangi aktifitas enzim palmitoyl-ACP thioesterase (9). Untuk mengetahui diagram alur sintesa asam lemak terutama asam oleat dan palmitat pada kelapa sawit dapat dilihat pada Gambar 4 berdasarkan uraian Corley dan Stratford (14). Urgensi menstimulasi peningkatan aktifitas KAS II terkait dengan perkiraan terjadinya penumpukan asam palmitat karena keterbatasan aktifitas KAS II, sedangkan aktifitas enzim *palmitoyl-ACP thioesterase* dianggap terlalu aktif sehingga perlu dihambat aktifitasnya. Teknik penghambatan fungsi gen atau yang dikenal sebagai “*gene silencing*” merupakan harapan untuk diterapkan pada kelapa sawit dalam rangka mengurangi aktifitas enzim *palmitoyl-ACP thioesterase*. Konstruksi “*gene silencing*” yang sering digunakan untuk memodifikasi kandungan asam lemak tertentu adalah dalam bentuk “antisense” atau gen yang disusun berlawanan arah dengan promotor. Berbagai konstruksi “*gene silencing*” dapat dilihat pada Gambar 5 dan ini merupakan contoh modifikasi tanaman *Arabidopsis thaliana* untuk meningkatkan kandungan asam oleat dengan jalan men”silencing” gen asam lemak desaturase (FAD), khususnya gen 12 desaturase (45).



Gambar 3. Skematik diagram biosintesa asam lemak jenuh, tak jenuh tunggal dan tak jenuh ganda beserta nilai nutrisinya



Gambar 4. Alur sintesa asam lemak pada tanaman. PAT: palmitoyl-ACP thioesterase, SAT: stearoyl-ACP thioesterase, OAT: oleoyl-ACP thioesterase, LAT: linoleoyl-ACP thioesterase

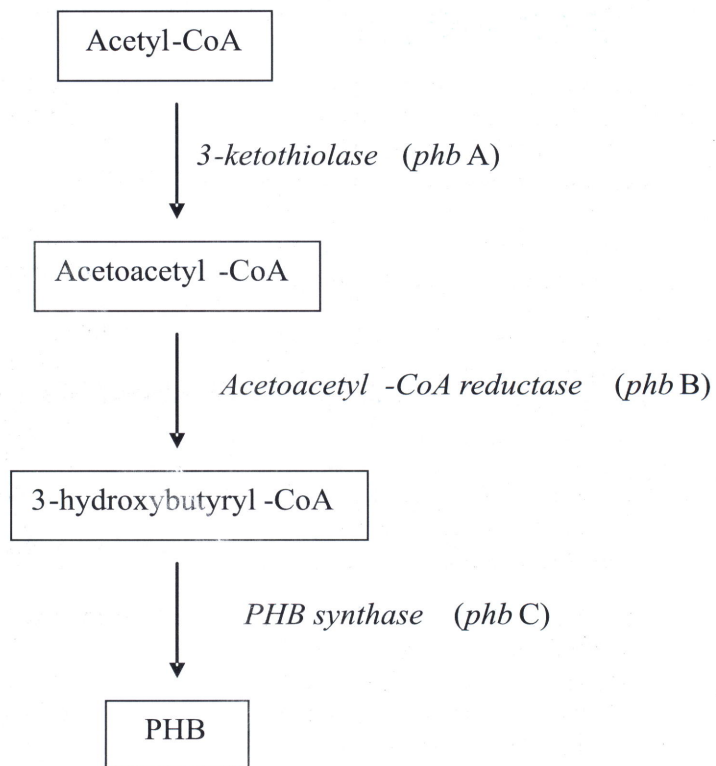
Construct	DNA structure	PTGS
Cosuppression		10%
Antisense		15%
Inverted Repeat		69%
Intron-spliced Inverted Repeat		100%

Gambar 5. Berbagai konstruksi gen “silencing” untuk menghambat fungsi gen. PTGS: Post-transcriptional gene silencing

PENGEMBANGAN TANAMAN TRANSGENIK KELAPA SAWIT PENGHASIL PLASTIK RAMAH LINGKUNGAN

Polihidroksibutirat (PHB) merupakan bahan baku pembuatan plastik (polimer) yang dapat dikomposkan, pertama kali diproduksi pada tahun 1980an (merek dagang Biopol™) dengan menggunakan teknik fermentasi bakteri pada media yang mengandung glukosa dan asam propionik. Kendala utama dalam komersialisasi plastik PHB sebagai pengganti plastik konvensional dari minyak bumi adalah tingginya biaya produksi untuk proses fermentasi guna menghasilkan senyawa PHB (7, 12). Untuk menghasilkan polimer jenis ini

dengan menggunakan teknologi fermentasi bakteri memerlukan biaya 2-4 US \$/Kg atau 5-10 kali lebih mahal daripada polimer dari minyak bumi (40). Tanaman berpotensi besar sebagai penghasil PHB berbiaya murah melalui introduksi gen bakteri penghasil PHB ke dalam genom tanaman. Meskipun belum pada tarap komersialisasi, sejumlah tanaman transgenik telah dapat mensintesa dan mengakumulasi senyawa PHB setelah diintroduksi gen bakteri, antara lain *Arabidopsis thaliana* (39, 4), canola (120) dan kapas (23). Di bidang mikrobiologi sendiri telah dilakukan seleksi bakteri penghasil PHB dan beberapa spesies bakteri telah diidentifikasi sebagai penghasil senyawa



Gambar 6. Sintesa PHB melalui tiga tahap reaksi enzim pada bakteri

PHB yang efisien, antara lain *Ralstonia eutropha* (48), *Alcaligenes latus* (41), *Azotobacter vinelandii* (38) dan *Paracoccus denitrificans* (53).

PHB disintesa dari senyawa acetyl-CoA dimana senyawa tersebut juga merupakan substrat untuk sintesa asam lemak, yang ketersediaannya pada kelapa sawit berlimpah. Sintesa PHB pada bakteri melibatkan tiga tahap reaksi enzim beruntun. Tahap pertama, substrat acetyl-CoA dengan katalisator enzim 3-ketothiolase (ekspresi gen *phbA*)

membentuk acetoacetyl-CoA. Tahap kedua, dengan katalisator enzim acetoacetyl-CoA reductase (ekspresi gen *phbB*) menghasilkan 3-hydroxybutyryl-CoA dan terakhir dengan enzim PHB synthase (ekspresi gen *phbC*) menghasilkan senyawa PHB (1), lihat Gambar 6. Introduksi ketiga gen bakteri dengan kendali promotor yang tepat untuk ekspresi gen-gen tersebut ke dalam genom kelapa sawit memungkinkan tanaman kelapa sawit menghasilkan senyawa PHB dalam skala komersial.

DAFTAR PUSTAKA

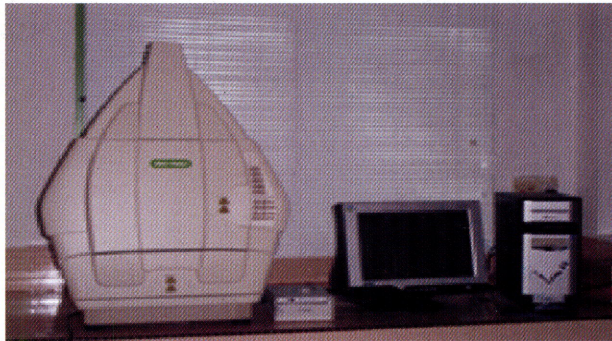
1. Anderson, A.J. and E.A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54: 450-472.
2. Anonymous. 1997. Biotechnology developments in the oilseed sector. FAO conference, Rome 10-12 December 1997.
3. Bailey, J.A. and J.W. Mansfield. 1982. *Phytoalexins*. Glasgow: Blackie and Son.
4. Bohmert, K., I. Baibo, J. Kopka, V. Mittendorf, C. Nawrath, Y. Poirier, G. Tischendorf, R.N. Trethewey and W. Willmitzer. 2000. Transgenic *Arabidopsis* plant can accumulate polyhydroxy-butyrate to up 4 % of their fresh weight. *Planta* 211: 841-845.
5. Bolar, J.P., J.L. Norelli, G.E. Harman, S.K. Brown and H.S. Aldwinckle. 2001. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res.* 10, 533-543.
6. Broglie, K., I. Chet, M. Holliday, R. Cressman, P. Biddle, S. Kowltun, C. Mauvais and Broglie R. 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.
7. Byrom, D. 1987. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. *Trends Biotechnol.* 5: 246-250.
8. Chaidamsari, T., J.S. Tahardi and J. Santoso. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation in leaf explant oil palm. Proc. 1998 Int. Oil Palm conference: Commodity of the past, today, and the future, Bali, September 23-25.
9. Cheah, S.C., R. Sambanthamurthi, A. Siti Nor Akmar, O. Abrizah, M.A.A. Manaf, R. Umi Salamah dan G.K.A. Parveez. 1995. Towards genetic engineering of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) In: J.C. Kader and P. Mazliak (eds). *Plant Lipid Metabolism*. Netherland: Kluwer Academic Publishers, pp. 570-572.
10. Chet, I. 1987. *Trichoderma*: application, mode of action and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi, p. 137-160. In I. Chet (ed.), *Innovative approaches to plant disease control*. Wiley, New York, N.Y.
11. Chet, I., N. Benhamou and S. Haran. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes, p. 153-171. In G. E. Harman, and C. P. Kubicek (ed.), *Trichoderma*

- and *Gliocladium*, vol. 2. Taylor and Francis Ltd., London, United Kingdom.
12. Choi, J. and S.Y. Lee. 1997. Process analysis and economic evaluation for poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. *Bioprocess. Eng* 17: 335-342.
13. Corley, R.H.V., S.G. Hedges, P.L. Jack, N.P. Batty and S. Mayes. 1992. Future prospects for oil palm breeding: new strategies, new products. Symp. Science of oil palm breeding, Int. Soc. Oil Palm Breeders, Montpellier, 1-3 July.
14. Corley, R.H.V. and R. Stratford. 1998. Biotechnology and oil palm: opportunities and future impact. International Oil Palm Conference, Bali, 23-25 September 1998.
15. Coutos-Thévenot, P., B. Poinssot, A. Bonomelli., H. Yean, C. Breda and D. Buffard. 2001 *In vitro* tolerance to *Botrytis cinerea* of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase *Vst1* gene under the control of a pathogen-inducible PR10 promoter. *J Exp Bot* 52, 901-910.
16. Elad, Y., I. Chet and Y. Henis 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microbiol.* 28:719-725.
17. Hain, R., H. J. Reif, E. Krausse, R. Langebartels, H. Kindl, B. Vornam, W. Wiese, E. Schmelzer, P. H. Schreier and S. K. Stocker. 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153-156.
18. Hammerschmidt, R. 1999. Phytoalexins: What have we learned after 60 years. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 785-30
19. Hipskind, J.D., and N.L. Paiva. 2000. Constitutive accumulation of aresveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 13, 551-562.
20. Houmiel, K.L.; S. Slater, D. Broyles, L. Casagrande, S. Colburn, K. Gonzales, T.A. Mitsky, S.E. Reiser, D. Shah, N.B. Taylor, M. Tran, H.E. Valentin and K.J. Gruys. 1999. Poly (beta-hydroxybutyrate) production in oilseed leukoplasts of *Brassica napus*. *Planta* 209: 547-550.
21. Ingham, J.L. 1973 Disease resistance in higher plants: The concept of pre-infectional and post-infectional resistance. *Phytopathol* Z 78: 314-335.
22. Jach, G., Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leach, R., Schell, J. and Maas, C. 1995. Enhanced quantitative

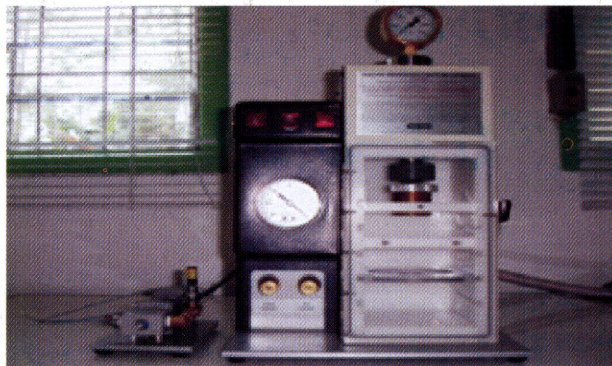
- resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 97-109
23. John, M.E. and G. Keller. 1996. Metabolic pathway engineering in cotton biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12768-12773.
24. Joosten, M. H. A., J., Verbakel, H. M., Nettekoven, M. E., van Leeuwen, J., vander Vossen, R. T. M. and de Wit P. J. G. M. 1995. The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and beta-1,3-glucanase defense proteins of its host, tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46, 45-49
25. Kinney, A.J., E.B. Cahoon and W.D. Hitz. 2002. Manipulating desaturase activities in transgenic crop plants. *Biochemical Society Transactions* 30: 1099-1103.
26. Kodan, A., H. Kuroda and F. Sakai. 2002. A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): Implications for Phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 3335-3339.
27. Liu, Q., S. Singh and A. Green 2000. Genetic modification of cotton seed oil using inverted-repeat gene-silencing techniques. *Biochemical Society Transactions* 28: 927-929.
28. Liu, Q., S. Singh and A. Green 2002. High-oleic acid and high-stearic cottonseed oils: Nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. *Journal of the American College of Nutrition* 21: 205S-211S.
29. Lorito, M., A. Di Pietro, C. K. Hayes, S. L. Woo and G. E. Harman. 1993a. Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* 83, 721-728.
30. Lorito, M., G. E. Harman, C. K. Hayes, R.M. Broadway, A. Tronsmo, S.L. Woo and A. Di Pietro 1993b. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302-307.
31. Lorito, M., C. K. Hayes, A. Di Pietro, S. L. Woo and G. E. Harman. 1994a. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-beta-glucosidase and an N-acetyl-beta-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84, 398-405.
32. Lorito, M., C. Peterbauer, C. K. Hayes and G. E. Harman. 1994b. Synergistic interaction

- between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* 140, 623-629.
33. Lorito, M., S. L. Woo, M. D'Ambrosio, G. E. Harman, C. K. Hayes, C. P. Kubicek, and F. Scala. 1996. Synergistic interaction between cellwall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9, 206-213.
 34. Lorito, M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes, p. 73-99. In G. E. Harman, and C. P. Kubicek (ed.), *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2. Taylor and Francis Ltd., London, United Kingdom.
 35. Mauch, F., B. Mauch-Mani and T. Boller. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. 2. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3 glucanase. *Plant Physiol.* 88, 936-942.
 36. Mora, A. and E. D. Earle. 2001. Combination of *Trichoderma harzianum* endochitinase and a membrane-affecting fungicide on control of *Alternaria* leaf spot in transgenic broccoli plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 306-310.
 37. Pamin, K. 1998. A hundred and fifty years of oil palm development in Indonesia. *From the Bogor Botanical Garden to the industry*. 1998 International Oil Palm Conference. Pp. 3-23.
 38. Page, W.J., J. Manchak and B. Rudy. 1992. Formation of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2866-2873.
 39. Poirier, Y., D. E., Dennis, K. Klomprens and C. Somerville. 1992. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. *Science* 256: 520-523.
 40. Poirier, Y., C. Nawrath and C. Somerville. 1995. Production of polyhydroxy-alkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers in bacteria and plant. *Biotechnology* 13: 142-150.
 41. Ramsay, B.A., K. Lomaliza, C. Chavaric, B. Dube, P. Bataille and J.A. Ramsay. 1990. Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2093-2098.
 42. Sbaghi, M., P. Jeandet, B. Faivre, R. Bessis and J.C. Fournioux. 1995. Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assessment as a selection criterion to screen grapevine *in vitro* cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). *Euphytica* 86, 41-47.

43. Siemens, J. and O. Schieder. 1996. Transgenic plants: genetic transformation-recent developments and the state of the art. *Plant Tissue Culture Biotechnol.* 2, 66-75.
44. Singh, G. 1991. *Ganoderma* the scourge of oil palm in the coastal areas. *Planter* 67, 421-444.
45. Singh, S., A. Green, P. Stoutjesdijk dan Q. Liu. 2000. Inverted-repeat DNA: a new gene-silencing tool for seed lipid modification. *Biochemical Society Transactions* 28: 925-927.
46. Songstad, D.D., D.A. Somers and R. J. Grusbach. 1995. Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 40, 1-15.
47. Staskawicz, B. J., F. M Ausubel, B. J Baker, J. G Ellis and J. D.G Jones. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268, 661-667
48. Steinbuchel, A. and U. Pieper. 1992. Production of copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 1-6.
49. Stoutjesdijk, P.A., C. Hurlestone, S. P. Singh and A Green. 2000. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. Juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous 12-desaturases. *Biochemical Society Transactions* 28: 938-940.
50. Thomzik, J.E., K. Stenzel, R. Stocker, P.H. Schreier, R. Hain and D.J. Stahl. 1997. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol Mol Plant Pathol* 51, 265-278.
51. Tronsomo, A. and G.E Harman. 1993. Detection and quantification of N-acetyl- β -D glucosaminidase, chitobio-sidase, and endochitinase in solutions and on gels. *Anal. Biochem.* 208:74-79.
52. Turner, P.D. 1981. *Oil Palm Diseases and Disorders*. Oxford University Press, Kuala Lumpur, 281 pp.
53. Yamane, T., X.F. Chen and S.Ueda. 1996. Polyhydroxyalkanoate synthesis from alcohols during the growth of *Paracoccus denitrificans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 135: 207-211.



Gambar 7. GelDoc untuk dokumentasi hasil elektroforesis



Gambar 8. Gene Gun digunakan untuk transformasi gen

