

**PROSIDING**

Seminar Nasional

# Bioteknologi & Pemuliaan Tanaman 2006

Auditorium Thoyib Hadiwijaya, Faperta  
Institut Pertanian Bogor, 1-2 Agustus 2006



Departemen Agronomi dan Hortikultura

Fakultas Pertanian IPB

Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga 16680

telp/fax. +62 251 629353

## “Sinergi Bioteknologi dan Pemuliaan Dalam Perbaikan Tanaman”

dalam rangka purnabakti

**Prof. Dr. G.A. Wattimena  
dan**

**Prof. Dr. Sarsidi Sastrosumarjo**

Departemen Agronomi dan Hortikultura  
Fakultas Pertanian  
Institut Pertanian Bogor  
2006

# TRANSFORMASI BEBERAPA KLON TEBU MELALUI *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 DENGAN PLASMID pBIN1-ECS DAN PMA YANG MEMBAWA GEN FITASE

Susiyanti<sup>1</sup>); Reuy H. Zui<sup>1</sup>); Ade Nena N.<sup>1</sup>); G.A. Wattimena<sup>2</sup>); M. Surahman<sup>2</sup>); A. Purwito<sup>2</sup>); S. Anwar<sup>3</sup>); dan D.A. Santosa<sup>3\*</sup>)

<sup>1</sup>)Mahasiswa SPS IPB, Bogor

<sup>2</sup>) Staf Pengajar Departemen Agronomi dan Hortikultura, IPB, Bogor

<sup>3</sup>)Staf Pengajar Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan, IPB, Bogor

\*)Principle Investigator dalam proyek RAPID dan kerjasama bilateral Indonesia-Jerman

\*)Alamat koresponden: Dwi Andreas Santosa, Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan, Fakultas Pertanian, IPB, Bogor;Telp : 0251-422372; fax: 0251-629358. E-mail: dsantosa@indo.net.id

## Abstrak

Rekombinasi genetik dengan teknik rekayasa genetika melalui penyisipan gen yang dikehendaki (gen fitase) ke dalam tebu, mempunyai prospek yang menjanjikan. Penyisipan gen fitase diharapkan dapat meningkatkan ketersediaan P dalam jaringan maupun di sekitar perakaran, sehingga pemakaian pupuk P lebih efisien. Selain itu penyisipan gen fitase akan meningkatkan laju fotosintesis yang akhirnya dapat meningkatkan produksi tebu. Transformasi tebu dilakukan melalui bantuan *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 dengan plasmid pMA dan pBIN pada kalus beberapa klon tebu Triton, PA 175, PSJT 9441, CB 6979; PA 183; PS 851; dan PA198. Persentase kalus hasil transformasi yang tumbuh pada media seleksi kanamisin sekitar 80 %. Integrasi gen fitase dideteksi dengan menggunakan teknik PCR: menunjukkan pita ukuran 750 bp (pMA) dan 900 bp (pBIN1-ECS). Kalus transgenik diregenerasikan dengan menggunakan media MS + BAP 0,5 ppm selama 6 minggu. Secara morfologi, tanaman transgenik yang dihasilkan menunjukkan penampilan warna daun yang berbeda yaitu: albino, kuning, hijau muda, hijau, bergaris hijau-kuning. Perbedaan warna pada daun tersebut diduga karena penyisipan gen fitase yang bersifat acak, yang menyebabkan terjadinya perubahan pada pembentukan klorofil.  
Kata kunci: Transformasi, gen fitase, tebu

## PENDAHULUAN

Tanaman tebu *Sacharum officinarum* L. merupakan tanaman industri yang telah lama dikenal oleh manusia dan memiliki peranan penting, sekitar 65% produksi gula dunia berasal dari tebu. Tebu juga digunakan untuk industri farmasi, sebagai sumber bahan bakar dan produksi beberapa bahan kimia seperti furfural, dekstran dan alkohol. Selain itu tanaman tebu juga merupakan sumber alternatif bagi pakan ternak dan industri selulosa.

Prospek pasar gula di Indonesia cukup baik karena permintaan gula dalam negeri cukup tinggi. Hal ini dapat diketahui dari semakin tingginya impor gula yang dilakukan pemerintah. Sebenarnya produksi gula nasional mengalami peningkatan 22.9% dari 1.63 juta ton pada tahu 2003 menjadi 2.01 juta ton hingga akhir giling 2004. Sementara kebutuhan gula nasional sekitar 3.4 juta ton. Dengan demikian, impor gula tidak dapat dihindari agar kebutuhan gula dalam negeri terpenuhi (Wiliarto, 2005).

Rendahnya produksi tebu di Indonesia selain karena rendahnya pasokan tebu dari petani dan mutu bibit yang buruk, juga konversi lahan tebu dari lahan basah ke lahan kering. Pada lahan kering umumnya P dalam bentuk tidak tersedia (P terikat). Penggunaan lahan kering ini membawa konsekuensi kebutuhan pupuk P yang lebih banyak.

Fitat merupakan bentuk penyimpanan fosfat dalam tanaman yang merupakan bentuk P terikat yang sukar untuk digunakan tanaman (Greiner, 2005). P yang terikat pada asam fitat dapat dilepaskan bila ada aktivitas enzim fitase. Namun tidak semua tanaman dapat menghasilkan fitase sedangkan pada tanaman tebu (varietas PSJT 94-33, PA 183, dan Triton) secara alami aktivitas fitasanya sangat rendah yaitu kurang lebih 0.01 U/ml ((Kyriakidis *et al.*, 1998 ; Wulandari, 2005).

Rekombinasi genetik dengan teknik rekayasa genetika melalui penyisipan gen yang dikehendaki (gen fitase) ke dalam tebu, mempunyai prospek yang menjanjikan. Gen fitase yang disisipkan ini diharapkan mampu menghasilkan enzim yang dapat mengubah fitat (yaitu senyawa organik yang menyimpan unsur fosfat dalam sel tanaman) menjadi fosfat yang dapat digunakan tumbuhan. Hal ini memberikan pengaruh positif dalam proses pembentukan klorofil yang akan meningkatkan fotosintesis dan metabolisme tumbuhan. Gen fitase akan secara tidak langsung

Makalah Oral Pengelolaan Keragaman Genetik

memberikan andil dalam pembentukan forfirin sebagai komponen yang sangat diperlukan dalam pembentukan klorofil. Pelepasan fitase ke lingkungan sekitar perakaran juga akan meningkatkan ketersediaan berbagai mineral sehingga efisiensi pemupukan meningkat.

Untuk mendapatkan tanaman tebu yang mengandung gen fitase dapat dilakukan dengan menyisipkan gen fitase tersebut ke dalam genom tanaman melalui teknik transformasi. Transfer gen secara langsung biasanya menggunakan teknik elektroforasi dan partikel *bombardment*, yang memiliki kemampuan berproduksi dan jumlah salinan yang rendah. Untuk teknik transformasi tidak langsung, *Agrobacterium tumefaciens* umum dilakukan yang memiliki tingkat keberhasilan dan kestabilan gen yang tinggi.

Banyak faktor yang mempengaruhi keberhasilan transformasi genetik, selain penggunaan metode dan media regenerasi yang tepat juga dipengaruhi oleh kemampuan eksplan bergenerasi menjadi plantlet. Sejalan dengan perkembangan teknik biologi molekuler, maka dapat dideteksi secara dini integrasi gen yang disisipkan ke dalam genom tanaman dengan menggunakan teknologi molekuler seperti PCR.

## BAHAN DAN METODA

### *Tempat dan waktu*

Penelitian dilakukan selama 24 bulan di laboratorium Bioteknologi - Kultur Jaringan-BDP, IPB; Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Lingkungan, Pusat Penelitian Lingkungan Hidup (PPLH), IPB; serta Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi ICBB Situgede, Bogor.

### *Metode Kerja*

#### Transformasi

Transformasi dilakukan berdasarkan metode Santosa *et al.* (2004) yang sedikit dimodifikasi. Kalus dimasukkan ke dalam botol steril dan diinokulasi dengan 0,5 ml kultur suspensi *Agrobacterium* ( $OD_{578} = 0.2$ ) dan dibiarkan 5-10 menit pada suhu ruang yang kemudian dikeringkan dengan kertas saring steril untuk mengurangi cairan suspensi bakteri. Kalus tersebut kemudian dimasukkan ke dalam 30 ml MS yang mengandung 500 mg/l kasein hidrolisat, 100 mg/l asetosirongon dan 50 mg/l kanamisin, inkubasi pada kondisi gelap suhu 28 °C selama 2 hari. Jika ada pertumbuhan *Agrobacterium* maka media diganti dengan media baru. Setelah ko-kultivasi jaringan tanaman yang ditransformasi dicuci dengan air steril sebanyak 2 kali lalu dikeringkan pada kertas saring steril; kemudian kalus tersebut dipindahkan pada media 25 ml MS yang mengandung 500 mg kasein hidrolisat, cefotaxime 1000 mg/l dan diinkubasi pada kondisi gelap suhu 28 °C sambil dishaker 60 rpm selama 2 jam. Selanjutnya kalus yang telah ditransformasi ditransfer ke dalam 30 MS padat yang mengandung 0,5mg/l kasein hidrolisat, cefotaxime 500 mg/l dan diinkubasi pada kondisi gelap suhu 28 °C selama 2 hari. Selanjutnya kalus yang telah ditransformasi tersebut ditanam pada media yang ditambahkan kanamisin 150 ppm. Dua minggu kemudian dipindahkan pada media regenerasi (MS + kinetin 0,1 ppm dan BAP 0,5 ppm) selama 6 minggu.

#### Analisis integrasi gen *fitase* secara molekuler dengan teknik PCR

##### Ekstraksi DNA

DNA total tanaman diisolasi dari kalus *putative* transgenik dengan menggerus 0.5 - 2 g kalus dengan nitrogen cair hingga berupa serbuk halus. Serbuk tersebut dipindahkan ke dalam tabung corning dan ditambahkan dengan buffer ekstraksi (100 mM Tris HCl pH 7,4; 50 mM EDTA pH 8; 500 mM NaCl; 2 Mercaptoethanol; 20 % SDS; 1 % PVP). Campuran tersebut digoyang perlahan dan disimpan dalam *waterbath* 65°C selama 15 menit. Ekstraksi dilanjutkan dengan menambahkan campuran kloroform dan ethanol dengan perbandingan 24:1 sebanyak volume larutan, dicampur merata dan disimpan pada suhu -20 °C selama 10 menit. Larutan DNA dipisahkan dari debris lainnya dengan sentrifus 4000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipisahkan dengan saringan filter dan dipindahkan ke tabung corning yang baru. Presipitasi DNA dilakukan dengan penambahan isopropanol dingin dan secara perlahan tabung digoyang, setelah homogen tabung disimpan pada suhu -20°C selama 30 menit. Pelet DNA kemudian dipisahkan dan dilakukan pencucian dengan ethanol 70 %. Setelah dikeringkan, selanjutnya DNA dilarutkan dalam larutan TE (50 mM Tris

HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8). Pemurnian dilakukan dengan isopropanol dingin. Pelet DNA kemudian dipisahkan dan dicuci lagi dengan ethanol 70 % lalu dikeringkan dan pelet DNA dilarutkan dalam 500  $\mu$ L buffer TE.

### Amplifikasi DNA

Hasil ekstraksi DNA tanaman tebu digunakan sebagai template untuk amplifikasi DNA dengan teknik PCR. Primer spesifik untuk gen fitase yang digunakan adalah EC1: 3'GCT AAT CGC CTA TCT CGG AC-5'; dan EC3: 3'-CTA ATA ACG GGG TGG CGC GG-5'. Reaksi diatur sebagai berikut: denaturasi awal pada 95°C selama 10 menit, denaturasi pada 95°C selama 30 detik, annealing pada 54°C selama 30 detik, extension pada 72°C selama 30 detik, final extension pada 72°C selama 15 menit. Volume setiap campuran reaksi mengandung 25  $\mu$ L yang terdiri dari 12,5  $\mu$ L Master mix; 1,25  $\mu$ L masing-masing primer spesifik untuk gen fitase; 15  $\mu$ L DNA dari tanaman transgenik dan kontrol dan 8,5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O. Reaksi dijalankan sebanyak 40 siklus.

### Elektroforesis dan visualisasi hasil PCR

DNA hasil amplifikasi sebanyak 2  $\mu$ L DNA dimasukkan ke dalam sumur gel agarose 2 %. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit menggunakan buffer 1X TAE pada tegangan listrik 90 volt. Hasil elektroforesis diamati dengan merendam gel pada larutan *etidium bromid* 10  $\mu$ g/ml selama beberapa menit dan dipapar di bawah sinar UV menggunakan UV transiluminator. Untuk dokumentasi gel difoto menggunakan film polaroid. Keberhasilan transformasi ditunjukkan oleh adanya pita DNA hasil amplifikasi dengan primer spesifik gen *fitase*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan proses transformasi pada tebu selain dipengaruhi oleh kemampuan *Agrobacterium tumefaciens* juga dipengaruhi oleh klon tebu yang digunakan. Masing-masing klon tebu mempunyai karakteristik pertumbuhan kalus yang berbeda-beda karena klon tebu yang digunakan berasal dari persilangan yang masing-masing tetua mempunyai kualitas dan karakteristik yang berbeda.

Kalus transgenik diregenerasikan dengan menggunakan media MS + BAP 0,5 ppm selama 6 minggu. Secara morfologi, tanaman transgenik yang dihasilkan menunjukkan penampilan warna daun yang berbeda yaitu; albino, kuning, hijau muda, hijau, bergaris hijau-kuning (Gambar 2). Perbedaan warna pada daun tersebut diduga karena penyisipan gen fitase yang bersifat acak yang menyebabkan terjadinya perubahan pada pembentukan klorofil. Diduga terjadi kelainan genetik pada kromosom setelah introduksi gen fitase. Kemungkinan lain pada saat introduksi transgen, transgen tersebut menyisip dalam kloroplas sehingga gen penyandi pembentukan klorofil menjadi terganggu.

Persentase kalus hasil transformasi yang tumbuh pada media seleksi kanamisin sekitar 80 % (Tabel 1). Kalus yang tumbuh tersebut menunjukkan kaset gen yang disisipkan ke dalam *Agrobacterium* telah terintegrasi ke dalam genom tanaman tebu. Kaset gen tersebut memiliki promotor, gen fitase, gen resisten terhadap kanamisin sebagai marka seleksi; dan terminator (Gambar 1). Integrasi gen fitase dideteksi dengan analisis PCR yang menggunakan primer spesifik gen fitase. Hasil PCR menunjukkan bahwa primer EC1 dan EC3 dapat mengamplifikasi gen fitase yang diintroduksi pada kalus transforman (Gambar 3). Hal ini dibuktikan dengan adanya pita ukuran 900 yang pada kalus transforman CB 6979; PA 183 seperti halnya kontrol positif (K+) yang berasal dari plasmid *pBIN1-ECS* yang mengandung gen fitase. PCR pada kalus transforman Triton, FA 175, PSJT 9441; PS 851; dan PA198 menunjukkan pita ukuran 750 bp juga terdapat pada kontrol positif (K+) yang berasal dari plasmid *pMA*. Kontrol negatif berasal dari tebu non transforman pada masing-masing klon. Dari hasil penelitian sebelumnya aktivitas fitase meskipun sangat rendah, ditemukan juga pada tebu non transforman tetapi primer EC1 dan EC3 terbukti tidak dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA gen penyandi fitase pada tebu tersebut, karena kemungkinan perbedaan sekuens antara fitase tebu dan fitase yang disisipkan.

## KESIMPULAN

1. Transformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 dapat berhasil memasukan gen fitase pada kalus beberapa klon tebu Triton, PA 175, PSJT 9441, CB 6979; PA 183; PS 851; dan PA198
2. Integrasi gen fitase dideteksi dengan menggunakan teknik PCR; menunjukkan pita ukuran 750 bp (*pMA*) dan 900 bp (*pBIN1-ECS*).

## DAFTAR PUSTAKA

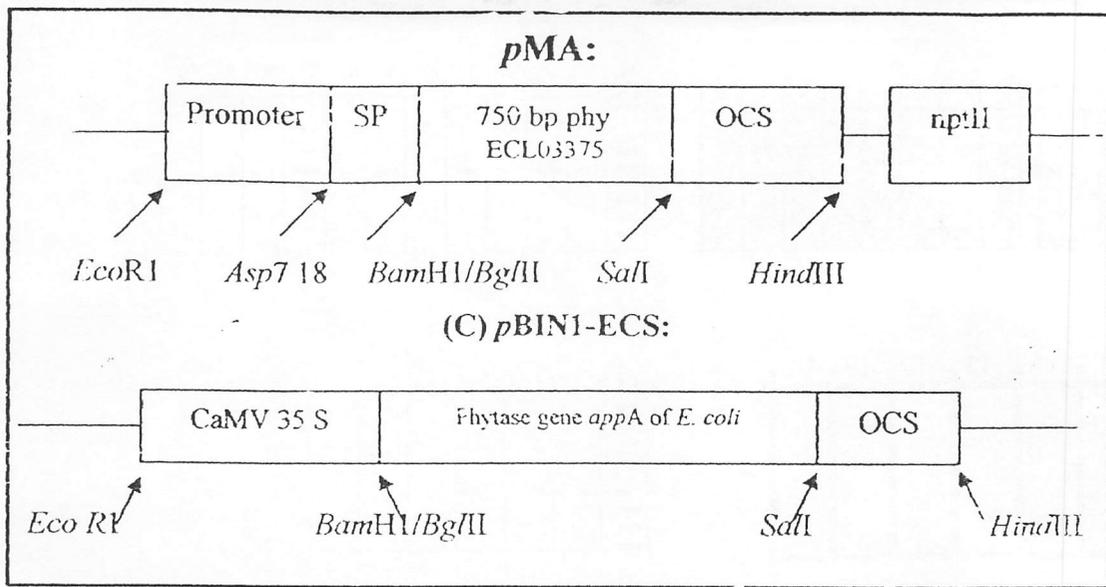
- Greiner, R. 2005. Current biochemistry research on phytase genes in microorganism and plant. [http : /striweb. su. edu/inositol\\_conference/ program/ PDFs/ monday\\_afternoon/ Greiner.pdf](http://striweb.su.ac.id/inositol_conference/program/PDFs/monday_afternoon/Greiner.pdf). 15 Mei 2006
- Kyriakidis, N. B., M. Galtou, Payanatou, A. Stavropoulou, dan P. Achanasopoulous., 1998. Increase in phytase activity and decrease in phytase during germination of four common in legumes. *Biotechnol. Lett.* 20 : 475-478.
- Santosa, D.A., R. Hendroko, A. Farouk and Ralf Greiner. 2004. A rapid and highly efficient method for transformation of sugarcane callus. *Research protocol. Molecular Biotechnology.* 28: 113- 118
- \_\_\_\_\_. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) with bacterial phytase gene. *In press.*
- Wiliarto, B. 2005. Sebagai Importir Gula Indonesia Sulit Kendalikan Harga, Bali Pos.
- Wulandari, I. 2005. Studi beberapa metode transformasi genetik tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) dengan gen fitase melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260. Tesis. Sekolah Pascasarjana. IPB. Bogor.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kepada Tete Tati, Mas Putra, Salmah, W.U. Ananda, A. Pesik, I. Wulandari, Ibu Ika dan semua pihak yang terkait dalam proyek RAPID

Tabel 1. Persentase rata-rata kalus yang tetap hidup pada media seleksi kanamisin

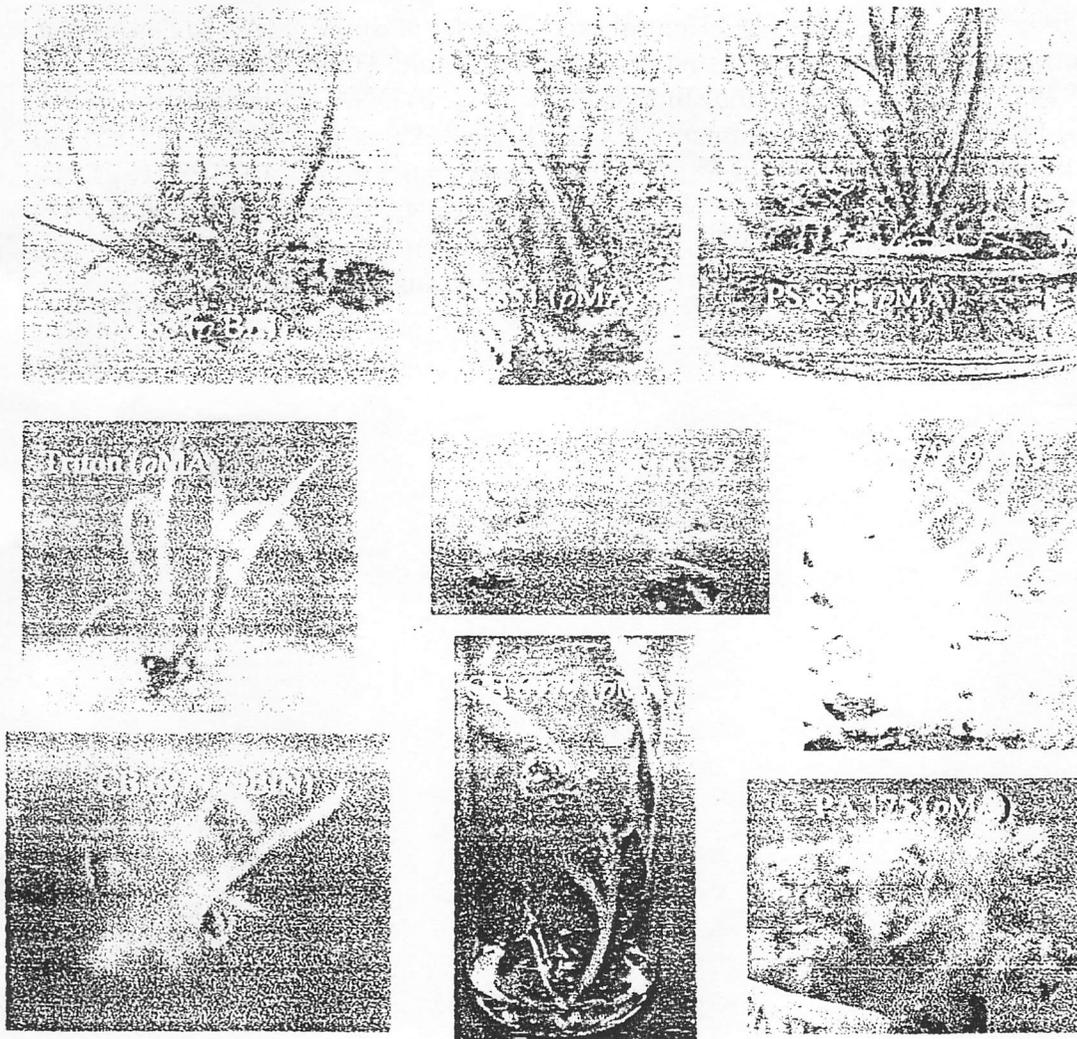
Klon tebu	Kalus tetap hidup (%)
Triton,	85
PA 175	75
PSJT 9441	75
CB 6979	80
PA 183	80
PS 851	85
PA198	80



Gambar 1. Konstruksi gene cassette pMA, (Santosa *et al. in press*)

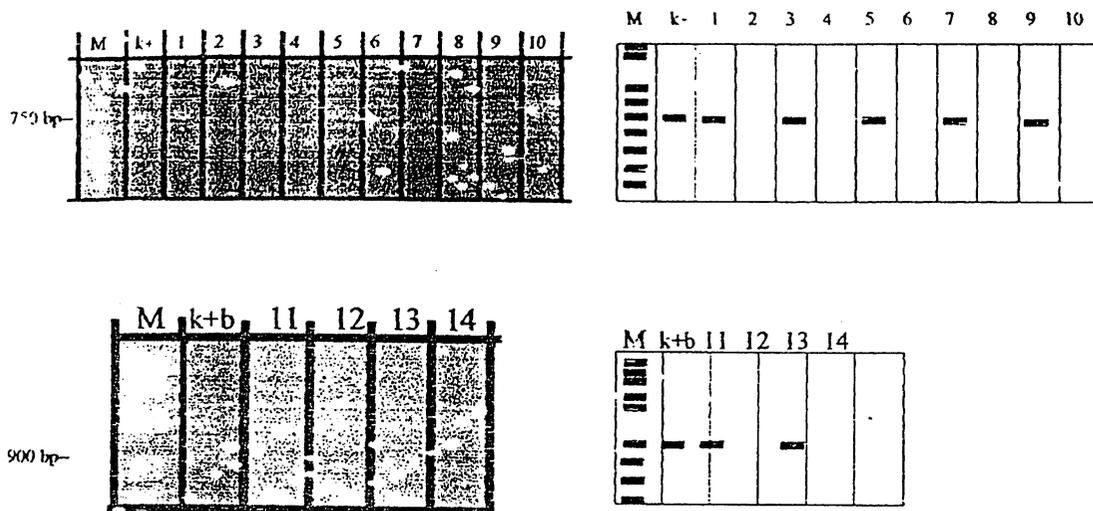
Keterangan:

SP = protein inhibitor signal peptide



Gambar 2. Variasi penampilan plantlet tebu transgenik

Catatan: Gambar di-dokumentasi berdasarkan plantlet tebu transforman hasil Hartati, Susiyanti, Reny Hayaty Zul, Ade Nena Nurhasanah (2006)



Gambar 3. PCR kalus tebu transforman dan non transforman

Keterangan:

M) Marker 1 kb DNA ladder; k+) Kontrol positif (DNA plasmid *pMA*); 1) DNA kalus transforman Triton; 2) DNA kalus non transforman triton; 3) DNA kalus transforman PSJT 9441; 4) DNA kalus non transforman PSJT 9441; 5) DNA kalus transforman PA 175; 6) DNA kalus non transforman PA 175; 7) DNA kalus transforman PS 851; 8) DNA kalus non transforman PS 851; 9) DNA kalus transforman PS 198; 10) DNA kalus non transforman PA198; k+b) Kontrol positif (DNA plasmid *pBin1-ECS*); 11) DNA kalus transforman CB 6979; 12) DNA kalus non transforman CB 6979; 13) DNA kalus transforman PA 183; 14) DNA kalus non transforman PA183