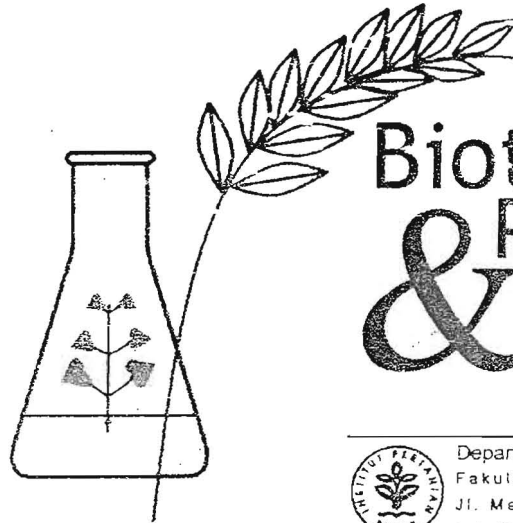


ISBN 979-15649-0-6

ISBN 979-15649-0-6



PROSIDING

Seminar Nasional

Bioteknologi & Pemuliaan Tanaman 2006

Auditorium Thoyib Hadwijaya, Faperta
Institut Pertanian Bogor, 1-2 Agustus 2008



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

Penyunting:

Sriani Sujiprihati, Sudarsono,
Sobir, Agus Purwito, Yudiwanti, Desta Wirnas

**Departemen Agronomi dan Hortikultura
Fakultas Pertanian
Institut Pertanian Bogor
2006**

PENGARUH PENAMBAHAN BAP DAN KINETIN
PADA MEDIA TERHADAP REGENERASI DAN PERTUMBUHAN
KALUS TRANSGENIK TEBU VAR. CB 6979

Reny H. Zul¹, A. Purwito², D.A. Santosa^{3*}

(23)

¹Mahasiswa PS Agronomi SPS IPB, Bogor

²Departemen Agronomi & Hortikultura IPB, Bogor

³Departemen Ilmu Tanah & Sumber Daya Lahan IPB, Bogor

*Principle Investigator dalam Proyek RAPID dan Kerjasama Bilateral Indonesia-Jerman

*) Alamat korespondensi : Dwi Andreas Santosa

Departemen Ilmu Tanah dan Sumber Daya Lahan, Fakultas Pertanian, IPB, Bogor; Telp 0251-

422372, Fax : 0251-629358

dsantosa@indo.net.id

ABSTRAK

Usaha untuk mendapatkan varietas tebu yang unggul terutama ditujukan untuk perbaikan kuantitas dan kualitas dapat dilakukan dengan perbaikan genetik tanaman melalui teknik rekayasa genetika. Gen fitase dipilih untuk disisipkan ke dalam tanaman tebu karena gen ini menghasilkan enzim yang dapat mengubah senyawa fitat yaitu senyawa organik yang menyimpan unsur fosfat di dalam sel tanaman. Kemampuan regenerasi kalus transgenik sangat rendah, penggunaan zat pengatur tumbuh yang tepat sangat menentukan keberhasilan regenerasi kalus transgenik. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan komposisi BAP dan kinetin yang sesuai untuk pertumbuhan tunas kalus transgenik tebu var. CB 6979. Kalus tebu var. CB 6979 ditransformasi menggunakan metode Santosa dengan plasmid pMA yang membawa gen fitase, marka seleksi kanamisin melalui *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260. Kalus transgenik dikultur pada media regenerasi MS yang ditambah dengan BAP (0 mg/L; 0.5 mg/L; 1.0 mg/L) dan kinetin (0 mg/L; 0.2 mg/L; 0.4 mg/L). Media regenerasi MS dengan penambahan BAP 0.5 mg/L dan kinetin 0.2 mg/L memberikan hasil yang terbaik 5 minggu setelah tanam untuk regenerasi dan pertumbuhan kalus transgenik tebu var. CB 6979 dengan jumlah tunas yang terbentuk 19.20 dan rata-rata jumlah daun 28.80.

Kata kunci : BAP, kinetin, regenerasi, kalus transgenik, tebu

PENDAHULUAN

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan salah satu tanaman perkebunan yang paling tua dikenal oleh manusia dan memiliki peranan penting, dimana 65% produksi gula dunia berasal dari tebu. Beberapa komponen alami pada industri farmasi berasal dari tebu. Di bidang pertanian dan industri, produk dari industri gula digunakan untuk pakan ternak, pabrik kertas dan sebagai sumber bahan bakar.

Produksi gula di dalam negeri tahun 1998 adalah 1.5 juta ton, dan pada tahun 2002 sebesar 1.8 juta ton (Dewan Gula Nasional, 2003). Produksi gula sebesar ini belum bisa mencukupi konsumsi masyarakat Indonesia karena konsumsi gula lebih tinggi dibanding dengan produksi, hingga untuk mencukupi kebutuhan dalam negeri pemerintah mengimpor 1.49 juta ton setiap tahun. Pada tahun 2005 Indonesia mengimpor gula sebesar 1,6 juta ton dan menduduki peringkat kedua sebagai negara pengimpor gula sesudah Rusia (Khudori, 2005). Hal ini memperlihatkan bahwa terdapat peluang untuk pengembangan tanaman tebu guna memenuhi kebutuhan.

Usaha untuk mendapatkan varietas tebu yang unggul terutama ditujukan untuk perbaikan kuantitas (bobot tebu per hektar) dan kualitas (rendemen gula) dapat dilakukan dengan perbaikan genetik tanaman melalui teknik rekayasa genetika yang terbukti manfaatnya dalam memperbaiki sifat.

Gen fitase dipilih untuk disisipkan ke dalam tanaman tebu karena gen ini menghasilkan enzim yang dapat mengubah senyawa fitat yaitu senyawa organik yang menyimpan unsur fosfat di dalam sel tanaman. Unsur fosfat yang tersimpan di dalam fitat ini tidak dapat dimanfaatkan oleh tanaman. Jika senyawa fitat di hidrolisis akan menghasilkan ester yang berfosfat rendah dan melepaskan unsur fosfat anorganik. Fosfat anorganik yang tersedia di dalam sel tanaman memberikan pengaruh positif pada proses pembentukan klorofil, meningkatkan fotosintesis dan metabolisme tanaman tebu sehingga rendemen tebu meningkat. Fitase juga meningkatkan ketersediaan mineral-mineral lainnya, seperti kalsium, magnesium, dan kalium di dalam jaringan tanaman sehingga tanaman dapat mengurangi kebutuhan pupuk.

Transformasi gen secara *in vitro* akan berhasil dan bermanfaat apabila sudah diperoleh protokol regenerasi tanaman yang efisien dan stabil. Perubahan-perubahan yang terjadi pada eksplan menuju pembentukan tumbuhan baru (planlet), sangat tergantung pada medium tempat tumbuhnya, bahan eksplan, penggunaan zat pengatur tumbuh yang seimbang dan kondisi lingkungan kultur.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan komposisi BAP dan kinetin yang sesuai untuk pertumbuhan tunas kalus transgenik tebu var. CB 6979.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu

Penelitian dilakukan selama 8 bulan di Laboratorium Bioteknologi Tanaman, Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian IPB.

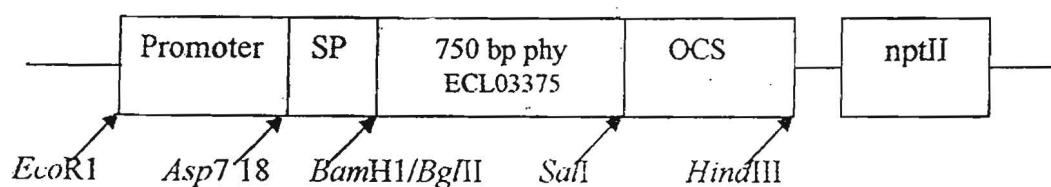
Metode Kerja

Perbanyakan Kalus

Varietas tebu yang digunakan adalah CB6979. Eksplan yang digunakan adalah bagian daun muda yang masih menggulung dari pucuk tebu berumur 4 – 6 bulan serta mempunyai jaringan yang sehat. Pucuk tebu tersebut dipotong sepanjang 20 cm tepat di atas meristem. Sterilisasi dengan cara pencelupan ke dalam alkohol 70% dan dibakar di atas nyala api spiritus. Sterilisasi diulang sampai 3 kali sambil membuka dan membuang lapisan daun pucuk hingga diperoleh daun muda yang masing-masing menggulung. Eksplan dipotong berukuran 2 – 3 mm sebanyak 10 potong. Eksplan selanjutnya ditanam pada media MS yang ditambah dengan 3 mg/L 2,4-D dan 0.1 mg/L kinetin kemudian disimpan dalam ruang inkubasi selama 1 bulan sampai diperoleh kalus yang mempunyai struktur kompak dan mampu berproliferasi. Setelah satu bulan kalus disubkultur pada media MS-I.

Transformasi Kalus Tebu dengan Gen Fitase (Santosa *et al*, 2004)

Kalus tebu dimasukkan kedalam 2 mL eppendorf dan diinokulasi dengan 0.5 mL kultur suspensi *Agrobacterium* ($OD_{578} = 0.2$) dan dibiarkan 5 – 10 menit pada suhu ruang setelah itu kalus dikeringkan dengan kertas steril untuk mengurangi cairan suspensi bakteri. Kalus yang telah dikeringkan tadi dimasukkan ke dalam 30 mL MS yang mengandung 0.5 g/L kasein hidrolisat, 100 mg/L asetosirongon dan 50 mg/L kanamisin, inkubasi dengan kondisi gelap pada 28°C sambil digoyang 60 rpm selama 2 hari, jika ada pertumbuhan *Agrobacterium* media diganti dengan media baru. Setelah ko-kultivasi kalus dicuci dengan air steril sebanyak 2 kali lalu dikeringkan pada kertas saring steril, kemudian kalus dipindahkan pada media MS sebanyak 25 ml yang mengandung 0.5 g/L kasein hidrolisat, cefotaksim 1000 mg/L dan diinkubasi pada kondisi gelap 28°C sambil digoyang pada 60 rpm selama 2 jam. Selanjutnya kalus ditransfer ke dalam 30 mL media MS yang mengandung 0.5 mg/L kasein hidrolisat, 500 mg/L cefotaksim lalu diinkubasi dengan kondisi gelap pada 28°C sambil digoyang 60 rpm selama 2 hari selanjutnya ganti media dengan media MS yang mengandung 0.5 mg/L kasein hidrolisat, 500 mg/L cefotaksim, 100 mg/L kanamisin dan kultur selama seminggu untuk memastikan tidak ada pertumbuhan bakteri. Setelah seminggu kalus dikeringkan lagi dengan kertas saring steril dan dipindahkan ke media padat MS yang mengandung 0.5 mg/L kasein hidrolisat, 500 mg/L cefotaksim, 150 mg/L kanamisin, dengan kondisi gelap 28°C selama 2 minggu atau lebih. Selanjutnya kalus ditanam pada media MS I dengan kanamisin 150 mg/L untuk mendapatkan struktur yang kompak dan mampu berproliferasi, setelah sebulan kalus disubkultur dan selanjutnya dapat diregenerasikan pada media dasar MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP dan kinetin.



Gambar 1. Konstruksi plasmid rekombinan pMA (Santosa *et.al.*, 2006, in press)

Regenerasi Tanaman Tebu

Tahap regenerasi kalus pada media optimasi regenerasi dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap Faktorial 3 x 3 dengan 5 ulangan. Yang terdiri dari faktor A adalah konsentrasi BAP yang terdiri dari 3 taraf, yaitu :

A1. 0.0 mg/L

A2. 0.5 mg/L

A3. 1.0 mg/L

Faktor B adalah konsentrasi Kinetin yang terdiri dari 3 taraf, yaitu :

B1. 0.0 mg/L

B2. 0.2 mg/L

B3. 0.4 mg/L

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kalus ditransformasi dengan menggunakan metode Santosa *et al.*, 2004 dan kalus yang berhasil tumbuh pada media seleksi kanamisin dipindahkan pada media kalus dan media regenerasi.

Rata-rata jumlah tunas kalus transgenik CB 6979 yang diamati pada minggu ke-5 dapat dilihat pada tabel 1. Dari tabel dapat dilihat bahwa penambahan BAP dan kinetin berpengaruh nyata terhadap rata-rata jumlah tunas. Penambahan BAP 0.5 mg/L dan kinetin 0.2 mg/L memberikan hasil rata-rata jumlah tunas yang terbanyak. Sedangkan interaksi antara penambahan BAP dan kinetin berpengaruh nyata terhadap rata-rata jumlah tunas. Rata-rata jumlah tunas tertinggi dihasilkan dari media dengan konsentrasi BAP 0.5 mg/L dan kinetin 0.2 mg/L. BAP dan kinetin merupakan sitokinin, sitokinin meningkatkan pembelahan sel dan menstimulasi inisiasi dan pertumbuhan tunas *in vitro* (Beyl, 2005). BAP merupakan jenis dari sitokinin yang memiliki peran fisiologis, dapat mendorong pembelahan sel, morfogenesis, pertunasan, pembenuaan kloroplas, pemecahan dormansi, pembentukan stomata, menghambat senescence dan absisi (Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, 1991; Gunawan 1987; dan Pierik, 1987). Penambahan sitokinin terutama BAP 0.5 mg/L pada media digunakan untuk inisiasi tunas yang lebih bagus (Naik, 2001)

Tabel 1. Rata-rata Jumlah Tunas Kultur *In Vitro* Kalus Transgenik Tebu Varietas CB 6979 pada minggu ke-5

| BAP (mg/L) | Minggu ke-5 Kinetin (mg/L) | | | Rata-rata |
|---------------|-------------------------------|--------|--------|-----------|
| | 0.0 | 0.2 | 0.4 | |
| 0.0 | 4.80c | 7.05c | 4.95c | 5.60c |
| 0.5 | 8.25bc | 19.20a | 18.35a | 15.26a |
| 1.0 | 11.50b | 17.65a | 6.95c | 12.03b |
| Rata-rata | 8.18b | 14.63a | 10.08b | |

Ket : nilai-nilai yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda nyata pada taraf 0.05 uji Duncan

Rata-rata jumlah daun tebu varietas CB 6979 pada minggu ke-5 dapat dilihat dalam tabel 2. Pada tabel 2 dapat diamati bahwa pengamatan pada minggu ke-5, penambahan BAP dan kinetin berpengaruh nyata terhadap rata-rata jumlah daun. Interaksi antara penambahan BAP dan kinetin berpengaruh nyata terhadap rata-rata jumlah daun. Rata-rata jumlah daun tertinggi dihasilkan dari media dengan konsentrasi BAP 0.5 mg/L dan kinetin 0.2 mg/L.

Tabel 2. Rata-rata Jumlah Daun Kultur *In Vitro* Kalus Transgenik Tebu Varietas CB 6979 pada minggu ke-5

| BAP (mg/L) | Minggu ke-5 Kinetin (mg/L) | | | Rata-rata |
|---------------|-------------------------------|---------|--------|-----------|
| | 0.0 | 0.2 | 0.4 | |
| 0.0 | 5.70d | 8.00cd | 4.75d | 6.15b |
| 0.5 | 12.40c | 28.80a | 19.55b | 20.25a |
| 1.0 | 22.65b | 24.40ab | 7.60d | 18.21a |
| Rata-rata | 13.58b | 20.40a | 10.63c | |

Ket : nilai-nilai yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda nyata pada taraf 0.05 uji Duncan

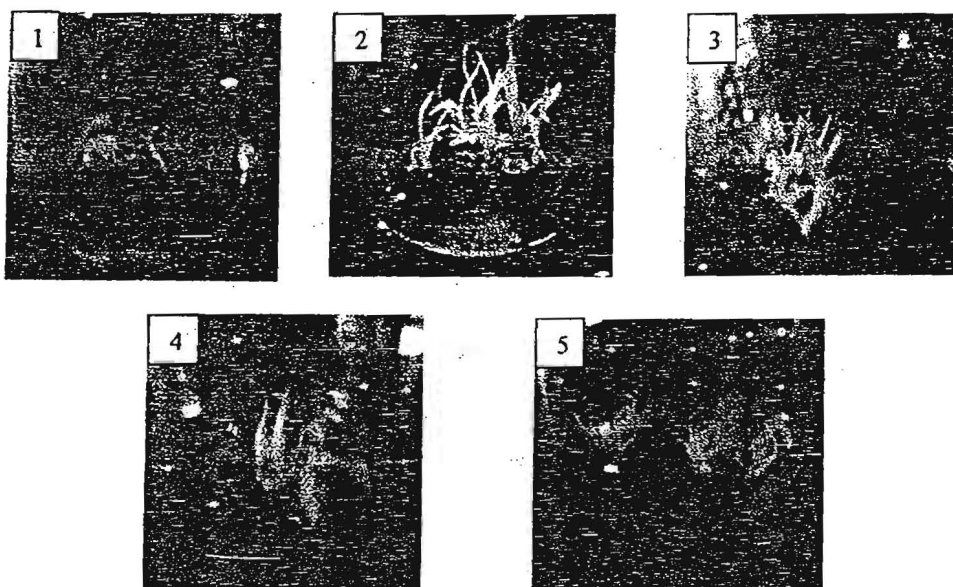
Dari data yang dihasilkan untuk mendapatkan jumlah tunas dan daun yang tinggi harus ada keseimbangan antara konsentrasi BAP dan kinetin yang ditambahkan pada media. Menurut Gaba, 2005 penambahan konsentrasi sitokinin pada media yang terlalu tinggi dapat menyebabkan sedikitnya tunas yang tumbuh, yang mana mengakibatkan kegagalan dalam perkembangannya.

Daftar Pustaka

- Beyl A. Caula. 2005. Getting started with tissue culture, media preparation, sterile technique, and laboratory equipment. In Trigiano, N.Robert and Gray, J. Dennis (ed). Plant Development and Biotechnology. CRC Press. P : 19 – 38.
- Dewan Gula Nasional. 2003. Statistik perkembangan Gula Indonesia 2002-2003. Direktorat Jenderal Bina Produksi Perkebunan. Deptan. Jakarta.
- Gaba.P. Victor. 2005. Plant Growth Regulators in Plant Tissue Culture and Development. In Trigiano, N.Robert and Gray, J. Dennis (ed). Plant Development and Biotechnology. CRC Press. P : 19 – 38.
- Gunawan, L.W. 1987. Teknik kultur Jaringan. Lab Kultur jaringan tanaman. PAU Bioteknologi IPB. Bogor. 244 hal.
- Khudori. 2005. Posisi Indonesia di pertemuan WTO. Koran Tempo. 13 Desember 2005.
- Naik, G. R. 2001. Sugarcane biotechnology. Science Publisher, Inc. Enfield (NH), USA.
- Pierik, M.L.R. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martins Nijhoff Publishers. Dordrecht. The Netherlands. 344 pp.
- Santosa. A, Hendroko. Roy, Farouk. Abdelazim and Greiner. Ralf. 2004. A rapid and highly efficient method for transformation of sugarcane callus. Molecular Biotechnology. Vol.24. P. 113 – 119.
- Santosa. A, Hendroko. Roy, Farouk. Abdelazim and Greiner. Ralf. 2006. *Agrobacterium-mediated* Transformation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) with Bacterial Phytase Gene. In Press.
- Tim Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. 1991. Bioteknologi tanaman. Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. 507 hal.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh RAPID dan terima kasih kepada teman-teman dan semua pihak yang terkait yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat berjalan sebagaimana mestinya.



Gambar 2. Regenerasi Kalus Transgenik Var. CB 6979 pada beberapa komposisi media 1) BAP 0.5 mg/L, kinetin 0.0 mg/L; 2) BAP 0.5 mg/L, kinetin 0.2 mg/L; 3) BAP 0.5 mg/L, kinetin 0.4 mg/L; 4) BAP 1.0 mg/L, kinetin 0.0 mg/L; 5) BAP 1.0 mg/L, kinetin 0.2 mg/L