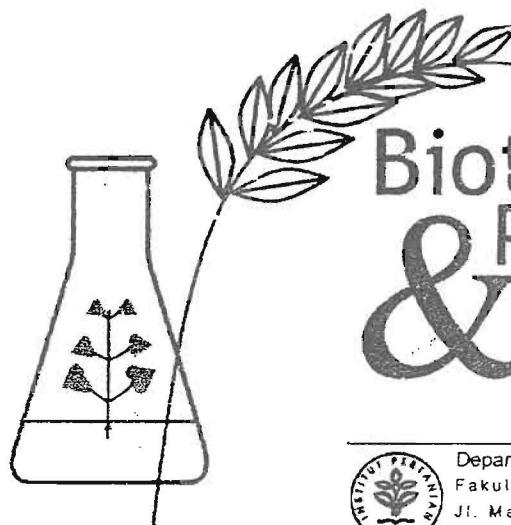


800 TB 06.

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

Penyunting:

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

Departemen Agronomi dan Hortikultura
Fakultas Pertanian
Institut Pertanian Bogor
2006

TRANSFORMASI GEN FITASE DAN OPTIMASI MEDIA REGENERASI PADA
TANAMAN TEBU (*SACCHARUM OFFICINARUM*)
VARIETAS PS 851

Ade Nena Nurhasanah¹⁾, Agus Purwito²⁾ dan Dwi Andreas Santosa^{3)*}

2ey

¹⁾Mahasiswa PS Agronomi SPS IPB Bogor

²⁾Staf Pengajar Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB Bogor

³⁾Staf Pengajar Departemen Tanah dan Sumber Daya Lahan IPB Bogor

*)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

Ketidakseimbangan konsumsi dari produksi gula nasional memacu para produser gula untuk meningkatkan produksi. Peningkatan produksi ini dapat dilakukan melalui peningkatan bobot tebu dan rendemen gula, produktifitas lahan dan perakitan varietas unggul. Transformasi gen fitase pada tebu diharapkan mampu meningkatkan rendemen gula dan menekan penggunaan pupuk P. Selain itu jaringan lainnya dapat digunakan untuk pakan ternak. Transformasi dengan *Agrobacterium* ini dilakukan pada kalus embriogenik tebu dengan metode modifikasi. Keberhasilan transformasi tidak lepas dari tahap regenerasi. Optimasi media regenerasi menggunakan MS dengan penambahan auxin (2,4-D dan NAA dengan konsentrasi yang sama : 1 dan 2 ppm) dan BAP (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 ppm). Dengan metode modifikasi ini kalus yang mampu tumbuh pada media seleksi kanamisin 150 mg/l sekitar 80%. Dan untuk media regenerasi yang cocok adalah MS dengan penambahan NAA 1 ppm dan BAP 1 ppm.

Key word : transformasi, tebu, gen fitase

PENDAHULUAN

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 tahun 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).

Adanya ketidakseimbangan antara konsumsi dan produksi gula disebabkan oleh rendahnya produktifitas tebu dan ketidakefisienan industri gula nasional serta peningkatan jumlah penduduk yang mengkonsumsi gula. Akibat lain dari peningkatan jumlah penduduk adalah terjadinya pergeseran pertanaman tebu dan pertanaman lainnya. Penanaman tebu pada lahan yang produktifitasnya rendah menimbulkan ketidakefisienan pemupukan terutama P.

Gen fitase menghasilkan suatu enzim yang mampu merombak fitat – senyawa organik yang menyimpan unsur fosfat dalam sel tanaman – menjadi ester yang berfosfat rendah dan melepaskan unsur fosfat anorganik. 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 (Santosa *et al.*, 2004).

Proses transfer gen fitase ke dalam tanaman tebu dilakukan secara tidak langsung dengan menggunakan vektor, yaitu: *Agrobacterium tumefaciens*. Cara ini banyak dilakukan karena tingkat keberhasilan dan kestabilan gen yang tinggi.

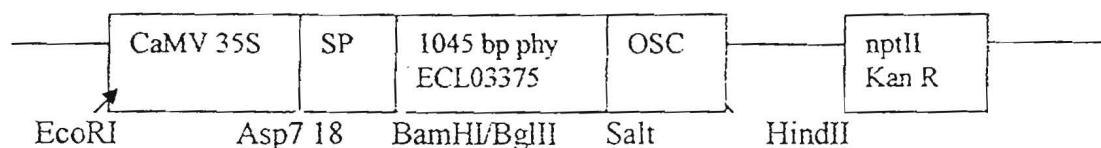
Dalam proses transformasi genetik penumbuhan jaringan tanaman tebu secara *in-vitro* untuk memperoleh kalus dan meregenerasikan kalus menjadi planlet merupakan hal yang penting. Dalam metode kultur *in-vitro* ini terdapat beberapa hal yang perlu diperhatikan diantaranya komposisi media tumbuh, eksplan (genotipe tanaman) dan perimbangan zat pengatur tumbuh.

Dari penelitian ini diharapkan mampu mendapatkan tebu transforman yang mengandung gen fitase dan media yang sesuai untuk regenerasi tebu baik yang transforman ataupun non transforman.

BAHAN DAN METODE

Konstruk Vektor Plasmid

Konstruksi plasmid rekombinan pMA (Santosa, 2006 *in press*) sebagai berikut :



Plasmid ini diamplifikasi *Escherichia coli* ECL03375, yang dikendalikan oleh promotor kimera CaMV 35S dan OCS enhancer agar terekspresi di seluruh bagian tanaman. Selain itu vektor tersebut dilengkapi dengan *protease inhibitor II signal peptide*. Setelah konstruk vektor tersedia dilanjutkan dengan menyisipkan vektor tersebut ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 dan kemudian digunakan untuk transformasi tebu.

Transformasi Tebu

Kalus embriogenik dipotong menjadi 2-3 mm, inkubasi pada media 15 ml MS_{cd}, dalam kondisi gelap, shaker pada kecepatan 60 rpm selama 1 minggu. Tujuh jam sebelum kokultivasi, 75 µl antioksidan ditambahkan pada media. Selanjutnya mempersiapkan satu koloni *Agrobacterium* dalam plate agar dan menumbuhkan bakteri tersebut pada media LB dan 1 ml/l rif (100 mg/l) sampai diperoleh OD₆₂₀ = 0.6 kemudian didapatkan peletnya dengan cara melakukan sentrifugasi pada 900 g selama 5 menit. Pelet yang didapatkan dicuci dengan MS cair yang ditambah antioksidan. Kalus yang telah disiapkan diinokulasi dengan 0.5 – 0.75 ml suspensi bakteri (OD₅₇₈ = 0.2) selama 5-10 menit pada suhu ruang kemudian kalus dipindahkan ke kertas saring untuk menghilangkan suspensi bakteri dan transfer kalus pada 30 ml MS yang mengandung 0.5 mg/l casein hydrolisate, 100 mg/l acetosyringone, dan 50 mg/l kanamisin pada 250 ml erlenmeyer, inkubasi pada 28 °C, ruang gelap, dan 60 rpm selama 2 hari, jika terdapat pertumbuhan *Agrobacterium* ganti dengan media baru. Setelah proses kokultivasi kalus dicuci dengan air steril sebanyak 2 kali dan dikeringkan pada kertas saring steril, kemudian transfer pada 25 ml MS yang mengandung 0.5 g/l casein hydrolisate dan 1000 mg/l cefotaxime, inkubasi pada suhu 28 °C, ruang gelap, dan shaker selama 2 jam pada kecepatan 60 rpm, selanjutnya kalus ditransfer kembali pada 30 ml MS yang mengandung 0.5 mg/l casein hydrolisate dan 500 mg/l cefotaxime, inkubasi pada suhu 28 °C, ruang gelap, dan shaker selama 2 hari pada kecepatan 60 rpm (bila terdapat pertumbuhan bakteri media diganti dengan media yang baru sampai tidak ada pertumbuhan bakteri yang teramat) (Santosa *et al.*, 2004). Kalus ditransfer langsung pada media MS-I padat yang mengandung 500 ppm cefotaxime dan 50 ppm kanamisin selama 2 minggu. Kemudian kalus ditumbuhkan pada media MS-I dengan kanamisin 150 mg/l untuk seleksi. Kalus yang tetap tumbuh pada media dengan kanamisin akan di sub kultur atau diregenerasikan. Prosedur ini merupakan metode modifikasi berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya (Ananda. 2004).

Regenerasi Kalus Tebu

Regenerasi kalus yang dilakukan pada penelitian ini disusun secara faktorial dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Optimasi media regenerasi tunas PS 851 menggunakan faktorial 4 x 4 dengan 5 ulangan. Macam perlakuan kombinasi dari auksin dan sitokinin pada media. Auksin terdiri dari 4 taraf, yaitu 2,4-D (1 ppm, 2 ppm) dan NAA (1 ppm, 2 ppm). Sitokinin yang digunakan adalah BAP yang terdiri dari 4 taraf (0,5 ppm, 1 ppm, 1,5 ppm dan 2 ppm) sehingga pada tahap ini terdapat 16 kombinasi dan 80 satuan percobaan. Kalus diinkubasi pada kondisi terang dengan suhu 28 °C selama 5 minggu. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah kalus yang membentuk tunas dan pun. Media yang paling sesuai untuk PS 851 ini akan digunakan untuk meregenerasikan kalus tebu hasil transformasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses transformasi pada tebu sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah *peruma*, varietas tebu yang digunakan. Setiap varietas tebu memiliki kemampuan yang berbeda-beda dalam membentuk kalus. Pencoklatan pada kalus dapat menghambat pertumbuhan dan berpengaruh pada saat kalus mengalami transformasi. Kedua, proses sub-kultur. Kalus yang dihasilkan dari eksplan harus mendapat media baru setelah tiga minggu penanaman. Namun kalus yang mengalami sub-kultur beberapa kali akan memiliki kemampuan pertumbuhan yang rendah (Santosa *et al.*, 2004).

Varietas PS 851 termasuk varietas yang mudah membentuk kalus dan jarang mengalami pencoklatan (Gambar 1.). Hasil transformasi pada kalus dari varietas ini menunjukkan hasil yang baik jika transformasi dilakukan pada kalus yang hanya mengalami dua kali sub kultur. Hal ini diduga karena produksi kalus dari eksplan tidak seragam.

Plasmid yang digunakan dalam transformasi ini membawa gen penyeleksi antibiotik *nptII* yang menyandikan enzim neomycin phosphotransferase yang bersifat resisten terhadap kanamisin. Untuk menyeleksi kalus yang telah ditransformasi digunakan media yang mengandung kanamisin. Hanya kalus yang dilengkapi dengan gen ketahanan kanamisin yang terdapat dalam vektor yang dapat memperbanyak diri sedangkan kalus yang tidak mengandung gen ketahanan kanamisin akan mati.

Kalus varietas PS 851 setelah ditanam dalam media seleksi kanamisin yang mampu hidup dan tumbuh sekitar 80% dari jumlah kalus yang ditransformasi (Gambar 2). Sebagian kalus mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan pada pengamatan minggu ke-2. Pada pengamatan minggu ke-4 kematian kalus mulai terlihat yang ditandai dengan perubahan warna kalus menjadi hitam. Kalus yang telah terseleksi pada media kanamisin selanjutnya ditanam pada media regenerasi.

Optimasi media regenerasi dilakukan terlebih dahulu pada kalus yang belum ditransformasi. Sehingga kalus hasil transformasi dapat langsung diregenerasikan pada media optimum untuk varietas tersebut. Jumlah tunas varietas PS 851 yang diamati pada minggu ke-5 dapat dilihat pada Tabel 1. Penambahan auksin, BAP dan interaksi dari keduanya berpengaruh nyata terhadap pembentukan tunas.

Tabel 1. Rata-rata Jumlah Tunas Kultur *In-Vitro* Tebu Varietas PS 851 minggu ke-5

BAP (ppm)	Auksin				Rata-rata
	2,4D (1 ppm)	2,4D (2 ppm)	NAA (1 ppm)	NAA (2 ppm)	
0,5	8,4 f	3,30 h	19,80 b	16,95 b	12,11
1,0	16,20 b	9,00 f	55,70 a	14,85 b	23,94
1,5	10,50 d	2,65 i	17,80 b	18,65 b	12,40
2,0	11,00 c	4,35 g	18,20 b	16,70 b	12,56
Rata-rata	11,52	4,82	27,87	16,79	

Ket : nilai-nilai yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 0,05 uji Duncan

Penambahan auksin terutama 2,4 D dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari BAP akan menghambat pembentukan tunas dan memacu pertumbuhan kalus. Sedangkan penambahan BAP lebih dari 1 ppm menunjukkan pertumbuhan tunas yang kurang baik. Pada media dengan penambahan NAA 1 ppm dan BAP 1 ppm kalus mampu menghasilkan jumlah tunas yang tinggi dan menunjukkan pertumbuhan yang baik.

Tabel 2. Rata-rata Jumlah Daun Kultur *In-Vitro* Tebu Varietas PS 851 minggu ke-5

BAP (ppm)	Auksin				Rata-rata
	2,4D (1 ppm)	2,4D (2 ppm)	NAA (1 ppm)	NAA (2 ppm)	
0,5	1,38 b	1,26 b	1,66 a	1,26 b	1,39
1,0	1,64 a	1,01 c	2,00 a	1,12 c	1,44
1,5	1,36 b	1,00 c	1,29 b	1,13 c	1,19
2,0	1,25 b	0,95 c	1,28 b	1,30 b	1,19
Rata-rata	1,41	1,05	1,56	1,20	

Ket : nilai-nilai yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 0,05 uji Duncan

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa penambahan auksin, BAP dan interaksi dari keduanya menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap pembentukan daun. Jumlah daun tertinggi terlihat pada media dengan penambahan NAA 1 ppm dan BAP 1 ppm. Pada media dengan penambahan BAP lebih dari 1 ppm daun menjadi keriting.

Menurut Sugiyanta (2005) hormon yang baik digunakan untuk pembentukan tunas adalah BAP dengan konsentrasi 0,2 – 1,0 mg/L. Sementara Naik (2001) menyatakan untuk pembentukan tunas dalam kultur *in-vitro* tebu dapat digunakan NAA dengan konsentrasi 2 mg/L.

Dari pengamatan rata-rata jumlah tunas dan daun pada media regenerasi diperoleh media optimum untuk varietas PS 851 adalah media MS dengan penambahan NAA 1 ppm dan BAP 1 ppm.

Regenerasi kalus tebu hasil transformasi dilakukan pada media optimum menghasilkan pertumbuhan yang baik. Kalus mampu berkembang dan menumbuhkan tunas. Pertumbuhan tunas yang baik diikuti dengan pertumbuhan daun dengan warna yang berbeda-beda, yaitu ; albino, kuning, hijau muda, hijau, bergaris hijau-kuning (Gambar 4.).

Perbedaan warna ini terjadi karena degradasi klorofil yang diduga sebagai akibat penyisipan gen fitase pada kalus tebu tersebut bersifat acak sehingga mengganggu proses pembentukan klorofil.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan :

1. Dengan metode modifikasi ini kalus yang mampu tumbuh pada media seleksi kanamisin 150 mg/l sekitar 80%. Kalus yang lolos dari media seleksi ini diduga merupakan kalus transforman.
2. Media regenerasi yang sesuai untuk varietas PS 851 baik non transforman maupun transforman adalah MS dengan penambahan NAA 1 ppm dan BAP 1 ppm.

Saran :

Untuk mengetahui bahwa gen fitase yang disisipkan pada tanaman tebu varietas PS 851 telah terintegrasi dalam genom tanaman perlu dilakukan uji lebih lanjut dengan menggunakan PCR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dapat dilaksanakan dengan menggunakan dana dari RAPID (Riset Andalan Perguruan Tinggi dan Industri).

DAFTAR PUSTAKA

- Ananda RR. W.U. 2004. Studi Transformasi Pada Tebu Dengan Perantara *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (pMA) serta Regenerasi Kalus Transgenik. Tesis. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. 63 hal.
- Naik, G.R. 2001. Sugarcane Biotechnology. Science Publisher, Inc. Enfield (NH), USA; Plymouth, UK. Pp: 165.
- Santosa D. A., R. Hendroko, A. Farouk dan Ralf Greiner. 2004. A Rapid and Highly Efficient Method for Transformation of Sugarcane Callus. Molecular Biotechnology. Humana Press. Vol. 28: 113-119.
- Santosa D.A., R. Hendroko, A. Farouk dan Ralf Greiner. 2006. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of Sugarcane (*Saccharum officinarum*) With Bacterial Phytase Gene. *in press*.
- Santosa D. A. 2004. Konstruksi tebu transgenic budidaya hasil tinggi dan efisien dalam memanfaatkan hara P melalui transfer gen fitase asal bakteri. Laporan tahun I 2004 Riset Andalan Perguruan Tinggi dan Industri (RAPID). IPB. November 2004. 42 hlm.
- Sugiharta E. Mei 2005. Komunikasi Secara Pribadi Mengenai Media Regenerasi Tebu. Bogor.
- Wiliarto B. 2005. Sebagai Importir Gula, Indonesia Sulit Kendalikan Harga. Bali Pos.

Lampiran 1. Komposisi media LB

Tripton	10 g/l
Ekstrak yeast	5 g/l
NaCl	5 g/l
Sucrosa	5 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	20 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	10 g/l
H ₂ O	sampai tera.

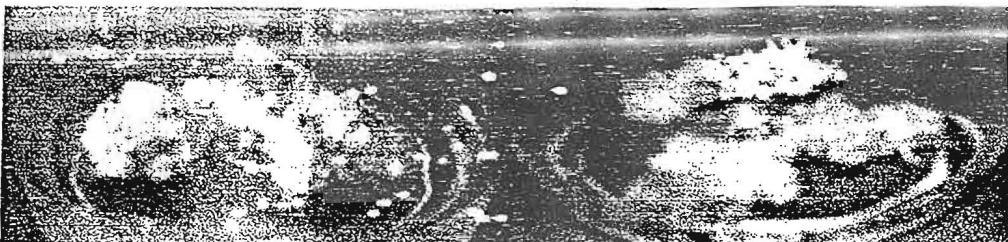
Lampiran 2. Komposisi media transformasi metode modifikasi

Media	Komposisi
MS	MS salt; 1 mg/l asam nicotinat; 0.8 mg/l vitamin B1; 0.5 mg/l vitamin B6; 100 mg/l myo-inositol dan 20 g/l sukrosa
MS Induksi kalus	MS salt; 1 mg/l asam nicotinat; 0.8 mg/l vitamin B1; 0.5 mg/l vitamin B6; 100 mg/l myo-inositol dan 20 g/l sukrosa; 500 mg/l casein hydrolisate; 5 mg/l 2.4-D
MS Anti Oksidan	MS induksi kalus ditambah dengan 15 mg/l asam askorbat; 40 mg/l cysteine; 2 mg/l silver nitrate
MS Seleksi	MS salts; 1 mg/l asam nicotinat; 0.8 mg/l vitamin B1; 0.5 mg/l vitamin B6; 100 mg/l myo-inositol dan 20 g/l sukrosa; 150 mg/l kanamycin; 5 mg/l 2.4-D

Lampiran 3. Komposisi media MS untuk induksi kalus dan regenerasi

Senyawa	Induksi Kalus	Regenerasi Planlet
	MS I mg/l	MS II mg/l
A. NH ₄ NO ₃	1650	1650
B. KNO ₃	1900	1900
C. CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440
D. H ₃ BO ₃	6.2	6.2
KH ₂ PO ₄	170	170
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025
Na ₂ Mo ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25
KI	0.83	0.83
E. MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370
ZnSO ₄ .2H ₂ O	8.6	8.6
F. Na ₂ EDTA	37.3	37.3
FeSO ₄ .2H ₂ O	27.8	27.8
Myo-inositol	1	1
G. Thiamine HCl	0.1	0.1
Pyridoxine HCl	0.5	0.5
Glycine	2	2
Niacin	0.5	0.5
Sukrosa	30000	45000
Gelrite	2.5	2.5
2.4-D	3	
Kinetin	0.1	
NAA		1
BAP		1

Lampiran 4.



Gambar 1. Kalus tebu dengan sub kultur yang berbeda. A. Kalus hasil sub kultur 2 kali dan akan digunakan sebagai bahan transformasi. B. Kalus hasil sub kultur lebih dari 2 kali



Gambar 2. Kalus tebu yang telah ditransformasi pada media kanamisin dengan konsentrasi 150 mg/L



Gambar 3. Media regenerasi kalus tebu varietas PS 851 dengan media dasar MS dan penambahan NAA 1 ppm dan BAP 1 ppm



Gambar 4. Planlet tebu transforman pada media regenerasi optimum untuk varietas PS 851