

JURNAL ILMIAH SAINS & TEKNOLOGI

Popy Hartatie Hardjo, Win Darmanto, Bambang Sugiharto
SKRINING TRANSFORMASI GENETIK TANAMAN TEBU (*Saccharum* spp. hybrids)
DENGAN PERANTARA *Agrobacterium tumefaciens*

Mariana Wahjudi, Lutfia Lukman Algadrie, Ruth Chrisnasari
ISOLASI BAKTERI DARI TANAH GUNUNG KAPUR DAN PENGUJIAN AKTIVITAS
ANTIBAKTERI ISOLAT TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli*
DAN *Staphylococcus aureus*

Wina Dian Savitri
UPAYA PEMBENTUKAN TUNAS ADVENTIF DARI DAUN PHALERIA
MACROCARPA (SCHEFF.) BOERL.

Ernest Suryadjaja
EVALUASI AWAL BUDIDAYA KAKAP PUTIH (*Lates calcarifer*)
PADA SISTEM RESIRKULASI (RAS) SKALA KECIL

Ruth Chrisnasari, Wandy Yuwono, Monika Selvira Puspitasari, Tjandra Pantjajani
OPTIMASI PEMODELAN KONSENTRASI GLUKOAMILASE DAN AMONIUM
SULFAT PADA PRODUKSI BIOETANOL DARI ONGGOK DENGAN METODE
SEPARATE HYDROLYSIS FERMENTATION (SHF) DAN SIMULTANEOUS
SACCHARIFICATION FERMENTATION (SSF)

Theresia Desy Askitosari
PRODUKSI NEMATODA PATOGEN SERANGGA SKALA LABORATORIUM HASIL
ISOLASI SAMPEL TANAH TRAWAS, MOJOKERTO

Mangihot Tua Goeltom, Tjie Kok, Dian Kumalasari
INDUKSI KULTUR KALUS DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN
ANGGREK MERPATI (*Dendrobium crumenatum* Swartz.)

Maria Goretti M. Purwanto
PERBANDINGAN ANALISA KADAR PROTEIN TERLARUT DENGAN BERBAGAI
METODE SPEKTROSKOPI UV-VISIBLE

Lembaga Penelitian dan
Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Surabaya

Jl. Raya Kalirungut,
Surabaya-Indonesia

phone: +62 31 298 1360 atau

+62 31 298 1365 fax:+62 31 298 1373

e-mail: lppm@ubaya.ac.id
<http://lppm.ubaya.ac.id>

JURNAL ILMIAH SAINS & TEKNOLOGI

ISSN 0216-1540

Terbit dua kali setahun pada bulan Juni dan Desember. Berisi tulisan yang berasal dari hasil penelitian, kajian atau karya ilmiah di bidang Sains dan Teknologi.

Ketua Penyunting

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Penyunting Pelaksana

Benny Lianto

Nani Parfati

Staf Pelaksana

Tang Hamidy, Hadi Krisbiyanto, Sukono

Penerbit

Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat

Universitas Surabaya

Alamat Penerbit/Redaksi

Gedung Perpustakaan Lt.IV, Universitas Surabaya

Jalan Raya Kalirungkut, Surabaya, 60293

Telp. (031) 2981360, 2981365

Fax. (031) 2981373

Website : <http://lppm.ubaya.ac.id>

Email : lppm@ubaya.ac.id

Jurnal Ilmiah Sains dan Teknologi pernah terbit dengan nama Unitas (pertama kali terbit tahun 1992) oleh Lembaga Penelitian Universitas Surabaya.

Isi di luar tanggung jawab Percetakan.

JURNAL ILMIAH
SAINS & TEKNOLOGI

ISSN 0216-1540

Volume 7 Nomor 2, Juni 2014

Halaman 1-71

Popy Hartatie Hardjo, Win Darmanto, Bambang Sugiharto
SKRINING TRANSFORMASI GENETIK TANAMAN TEBU (*Saccharum* spp. hybrids) DENGAN
PERANTARA *Agrobacterium tumefaciens*
(hal: 1-6)

Mariana Wahjudi, Lutfia Lukman Algadrie, Ruth Chrisnasari
ISOLASI BAKTERI DARI TANAH GUNUNG KAPUR DAN PENGUJIAN AKTIVITAS
ANTIBAKTERI ISOLAT TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli*
DAN *Staphylococcus aureus*
(hal: 7-17)

Wina Dian Savitri
UPAYA PEMBENTUKAN TUNAS ADVENTIF DARI DAUN *PHALERIA MACROCARPA*
(SCHEFF.) BOERL.
(hal: 18-30)

Ernest Suryadjaja
EVALUASI AWAL BUDIDAYA KAKAP PUTIH (*Lates calcarifer*)
PADA SISTEM RESIRKULASI (RAS) SKALA KECIL
(hal: 31-35)

Ruth Chrisnasari, Wandy Yuwono, Monika Selvira Puspitasari, Tjandra Pantjajani
OPTIMASI PEMODELAN KONSENTRASI GLUKOAMILASE DAN AMONIUM SULFAT PADA
PRODUKSI BIOETANOL DARI ONGGOK DENGAN METODE *SEPARATE HYDROLYSIS*
FERMENTATION (SHF) DAN *SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION FERMENTATION* (SSF)
(hal: 36-45)

Theresia Desy Askitosari
PRODUKSI NEMATODA PATOGEN SERANGGA SKALA LABORATORIUM HASIL ISOLASI
SAMPel TANAH TRAWAS, MOJOKERTO
(hal: 46-51)

Mangihot Tua Goeltom, Tjie Kok, Dian Kumalasari
INDUKSI KULTUR KALUS DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN ANGGREK
MERPATI (*Dendrobium crumenatum* Swartz.)
(hal: 52-63)

Maria Goretti M. Purwanto
PERBANDINGAN ANALISA KADAR PROTEIN TERLARUT DENGAN BERBAGAI METODE
SPEKTROSKOPI *UV-VISIBLE*
(hal: 64-71)

SKRINING TRANSFORMASI GENETIK TANAMAN TEBU (*Saccharum* spp. hybrids) DENGAN PERANTARA *Agrobacterium tumefaciens*

Popy Hartatie Hardjo¹⁾, Win Darmanto²⁾, Bambang Sugiharto³⁾

¹Faculty of Biotechnology, University of Surabaya, Surabaya

²Biology Department, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, Surabaya

³Biology Department, Faculty of Mathematics and Science, University of Jember, Jember

Abstract

The plants characteristics after transforming intended to show that the success of transforming, therefore, screening methods of transformed population is needed. Selection methods had been done 5 cycles for 3 weeks at the medium of hygromycin. This methods was preliminary methods which could be used to identify the transformed plants which carried *SoSUT1* gene, which was transformed in the plants because that gene was bound together with *hpt* gene which expressed phosphotransferase enzyme for endurance towards hygromycin antibiotic. The hygromycin concentration used to do transformed screening was determined by growing non-transformant sugarcane shoot at the MS medium with several hygromycin concentrations (0-40 mg/l). Hygromycin concentration, which was capable to kill the sugarcane shoot, was used further for selecting the result of *Agrobacterium tumefaciens* GV 3010 mediated transformed genes in the sugarcane shoot. The 15 mg/l hygromycin concentration was used to do transformed screening for 2 cycles of selection, and it would be done further on 3, 4 and 5 cycles of selection using hygromycin 20, 25 and 30 mg/l. From the result of 500 explants shoot transformation, 41 shoots was able to grow at the selection medium with the transformation effective of 8.2 %.

Keywords: screening, transformant, sugarcane, *Agrobacterium tumefaciens*

PENDAHULUAN

Tebu (*Saccharum officinarum* L.) merupakan tanaman penghasil gula utama di Indonesia, tetapi saat ini produksi gulanya masih rendah dan belum mencukupi kebutuhan gula nasional. Banyak faktor yang menyebabkan rendahnya produksi gula tebu di antaranya produktivitas tebu yang menurun. Usaha meningkatkan mutu tanaman tebu bisa dilakukan dengan metode pemuliaan konvensional melalui persilangan tanaman, tetapi memerlukan waktu yang lama dan relatif mahal. Oleh karena itu diperlukan

pengembangan bioteknologi tebu untuk memperoleh tanaman yang sesuai dengan harapan peneliti dalam waktu yang lebih efektif dibandingkan dengan pemuliaan konvensional.

Peningkatan konsentrasi sukrosa di batang merupakan kunci program pengembangan tebu. Akumulasi sukrosa pada tanaman dipengaruhi oleh tingkat asimilasi karbon, sintesis dan degradasinya, serta distribusi sukrosa. Distribusi sukrosa dalam tanaman tebu difasilitasi oleh protein *sucrose*

transporter (SUT) (Rae *et al.*, 2005; Slewinski *et al.*, 2009).

Sugiharto (2009) telah melakukan isolasi dan kloning gen *SoSUTI* dari tebu (*Saccharum officinarum* L.) dan ternyata mempunyai homologi tinggi dengan *ShSUTI* (Rae *et al.*, 2005) yang memiliki afinitas tinggi terhadap sukrosa. Lebih lanjut *SoSUTI* telah ditransformasikan pada eksplan kotiledon tomat dan terbukti dapat meningkatkan kandungan sukrosa pada buah tomat (Dewanti, 2011). Pada penelitian ini gen *SoSUTI* ditransformasikan pada basal tunas *in vitro* tebu (*Saccharum* spp. hybrids) menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*.

Dasar keberhasilan transformasi genetik adalah kemampuan sel target untuk berkembang menjadi tanaman utuh yang identik dengan induknya, kecuali dalam hal sifat baru dari gen yang disisipkan. Teknik kultur jaringan membuka peluang untuk menyediakan sel target yang diinginkan. Sel-sel ini dapat diinduksi untuk berkembang menjadi tanaman baru melalui insiasi pembentukan tunas baru atau melalui embryogenesis.

Seleksi terhadap sel-sel transforman merupakan faktor kunci dalam keberhasilan metode yang dikembangkan untuk transformasi genetik, oleh karena itu diperlukan penerapan metode skrining populasi tanaman transgenik. Dalam proses transformasi telah disisipkan gen yang memiliki ketahanan terhadap antibiotik sebagai marka penyeleksi yaitu gen yang umum digunakan adalah *hygromycin fosfotransferase (hpt)*.

Metode seleksi *hygromycin* adalah skrining awal yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi tanaman yang diduga membawa gen *SoSUTI* yang ditransformasikan ke dalam basal tunas *in vitro* tebu, karena gen tersebut dirangkaikan bersama dengan gen *hpt*. Penelitian ini

bertujuan mencari konsentrasi lethal *hygromycin* yang mampu menyeleksi eksplan tunas *in vitro* tebu hasil transformasi dan sekaligus memperoleh tunas *putative transformant* yang membawa gen *SoSUTI*.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bibit pucuk tebu (*Saccharum* spp. hybrids) diperoleh dari PTPN XI (Kebun Jatiroto, Jember). Eksplan tunas *in vitro* yang ditransformasi genetik adalah bagian basal tunas *in vitro* tebu. *Agrobacterium* yang digunakan adalah *A. tumefaciens* strain GV 3101 yang membawa plasmid pAct:*SoSUTI* (Sugiharto, 2009).

Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dua tahap, yaitu tahap optimasi konsentrasi *hygromycin* untuk seleksi transforman, dan tahap transformasi gen *SoSUTI* ke dalam eksplan basal tunas *in vitro* tebu.

Tahap 1. Optimasi konsentrasi *hygromycin* untuk seleksi transforman.

Tunas *in vitro* tebu setinggi 2.0 cm ditumbuhkan dalam medium MS yang mengandung BAP 2.5 mg/l + Kinetin 1 mg/l + Glutamin 100 mg/l dengan berbagai variasi konsentrasi *hygromycin* 0, 10, 20, 30 dan 40 mg/l. Parameter yang diamati adalah jumlah tunas *in vitro* yang mati.

Tahap 2. Transformasi gen *SoSUTI* pada eksplan basal tunas *in vitro* tebu.

A. tumefaciens yang membawa plasmid pAct::*SoSUTI* (Sugiharto, 2009) ditumbuhkan pada media YEP (*yeast extract pepton*) yang mengandung (per liter) 10 g *yeast extract*, 10 g bacto pepton, dan 5 g NaCl. Eksplan basal tunas diko-kultivasi dengan suspensi *A. tumefaciens* + asetosiringon 100 mg/l selama 3 hari kondisi gelap. Eksplan yang telah diko-kultivasi dicuci tiga kali dengan *cefotaxime* 500 mg/l,

kemudian dikeringkan di atas kertas saring steril dalam *laminar air flow*. Eksplan diinkubasi di medium MS + BAP 2.5 mg/l + Kinetin 1 mg/l + Glutamin 100 mg/l yang mengandung *hygromycin* 15 mg/l dan *cefotaxime* 500 mg/l. Tunas resisten antibiotik yang tumbuh disubkultur ke medium seleksi yang mengandung *hygromycin* 15 mg/l dan *cefotaxime* 500 mg/l selama 3 minggu. Tunas yang tumbuh kemudian disubkultur pada medium seleksi yang mengandung *hygromycin* 20, 25 dan 30 mg/l berturut-turut setiap 3 minggu. Setelah 5 siklus seleksi subkultur, tanaman kemudian dipindahkan ke medium MS tanpa zat pengatur tumbuh untuk pembentukan akar selama 3 minggu. Parameter yang diamati adalah jumlah tunas yang hidup dan berakar.

Planlet yang diperoleh ditetapkan sebagai *putative transformant*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Antibiotik *hygromycin* digunakan sebagai agen seleksi, karena dalam konstruk gen target *SoSUT1* terdapat gen ketahanan terhadap *hygromycin* (*hptII*). Untuk melihat efektivitas *hygromycin* sebagai agen seleksi, eksplan tunas *in vitro* tebu dikulturkan selama 28 hari pada media MS ditambah *hygromycin* dengan konsentrasi 0, 10, 20, 30, dan 40 mg/l. Optimasi konsentrasi *hygromycin* untuk seleksi keberhasilan transformasi gen dilakukan dengan menghitung persentase eksplan tunas yang mati pada berbagai konsentrasi *hygromycin* disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase kematian eksplan tunas *in vitro* tebu pada media MS dengan berbagai konsentrasi *hygromycin*

Eksplan	Konsentrasi <i>hygromycin</i> (mg/l)	Persentase tunas mati minggu ke-			
		1	2	3	4
Tunas non transforman	0	0	0	0	0
	10	40	50	54	70
	20	76	80	98	100
	30	100	-	-	-
	40	100	-	-	-

Ket.: tanda - artinya eksplan mati

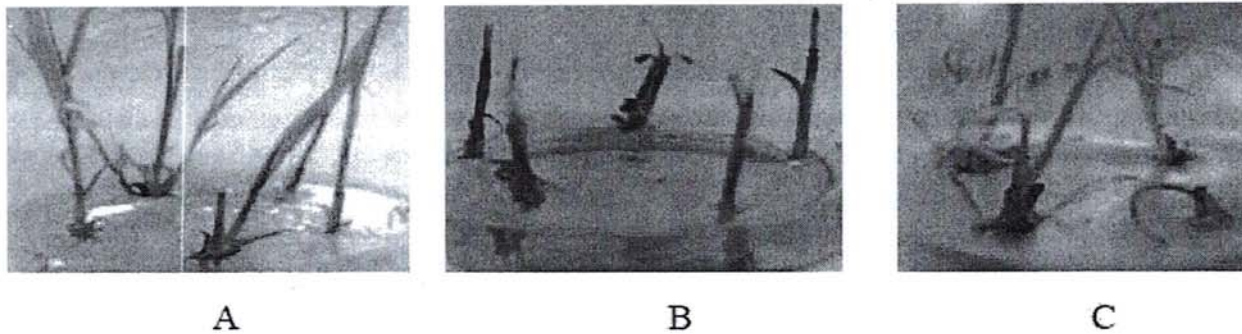
Tabel 1 menunjukkan bahwa pemberian *hygromycin* 20 mg/l selama 28 hari mengakibatkan kematian pada semua eksplan kalus non transforman sebesar 100%. Dengan demikian konsentrasi *hygromycin* 20 mg/l cukup efektif untuk seleksi eksplan tunas tebu, dan digunakan pada siklus seleksi ke-3. Tekanan seleksi menggunakan *hygromycin* 15 mg/l pada tunas hasil transformasi genetik pada awal seleksi selama dua siklus seleksi bertujuan memberi

kesempatan pada tunas transforman untuk mensintesis enzim *hygromycin phosphotransferase* yang dapat menonaktifkan *hygromycin*, dan selanjutnya pada seleksi ke 3, 4, dan 5 digunakan *hygromycin* 20, 25 dan 30 mg/l.

Skrining hasil transformasi gen *SoSUT1* dengan perantara *A. tumefaciens* dalam medium seleksi mengandung *hygromycin* terlihat pada Gambar 1. Pertumbuhan tunas non transforman di

media MS tanpa *hygromycin* terlihat normal berwarna hijau (Gambar 1A), sebaliknya pada media MS dengan *hygromycin* 15 mg/l sebagian besar tunas non transforman mengalami kematian (Gambar 1B) karena *hygromycin* merupakan antibiotik yang toksik bagi tanaman. Tunas *in vitro* yang ditransformasi dan ditumbuhkan di media MS dengan *hygromycin* 15 mg/l terlihat hijau dan mampu tumbuh (Gambar 1C), berarti

tunas tertransformasi sehingga resisten terhadap *hygromycin*. Tunas yang resisten *hygromycin* dapat tumbuh dengan baik dan mampu berakar. Tanaman transforman yang membawa gen *hpt* akan mampu menghasilkan enzim *hygromycin phosphotransferase*, yaitu kinase yang akan memfosforilasi *hygromycin* sehingga menjadi tidak toksik bagi tanaman (Holme *et al.*, 2008).



Gambar 1. Pertumbuhan eksplan tunas *in vitro* pada beberapa konsentrasi *hygromycin*.
 A: tunas tanpa ditransformasi pada media tanpa *hygromycin*;
 B: tunas tanpa transformasi pada media MS mengandung *hygromycin* 15 mg/l;
 C: tunas transforman pada media MS mengandung *hygromycin* 15 mg/l

Keberhasilan transformasi gen *SoSUT1* pada eksplan tunas *in vitro* tebu dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Jumlah eksplan tunas *in vitro* tebu yang hidup dan tumbuh setelah ditransformasi gen *SoSUT1* pada media seleksi yang juga merupakan media regenerasi

Transformasi genetik ke-	Jumlah eksplan saat kokultivasi	Jumlah eksplan hidup dan tumbuh				
		S1	S2	S3	S4	S5
1	100	60	50	25	10	5
2	100	65	52	36	18	8
3	100	71	50	30	20	12
4	100	79	48	28	16	10
5	100	73	58	25	15	6
Jumlah tanaman putatif transforman		348	258	144	79	41
Rata-rata eksplan yang tumbuh		70	52	29	16	8±2,86

Ket: S1 dan S2: medium seleksi mengandung *hygromycin* 15 mg/l
 S3: media seleksi mengandung *hygromycin* 20 mg/l
 S4: media seleksi mengandung *hygromycin* 25 mg/l
 S5: media seleksi mengandung *hygromycin* 30 mg/l
 Semua media seleksi mengandung *cefotaxime* 500 mg/l

Efektivitas transformasi tanaman *putative transformant* 8,2% (41 tanaman *putative transformant* per 500 eksplan tunas saat kokultivasi). Eksplan tunas *in vitro* yang tumbuh dan mampu bertahan pada media seleksi diduga karena konstruk T-DNA yang mengandung gen ketahanan terhadap *hygromycin* telah terintegrasi pada genom tanaman, tetapi perlu dibuktikan lebih lanjut dengan uji molekuler lainnya yaitu analisis PCR dan ekspresi gen target *SoSUT1* di tingkat transkripsi dan translasi.

KESIMPULAN

Eksplan tunas tebu terhambat pertumbuhannya pada medium seleksi mengandung *hygromycin* 15 mg/l, sedangkan pada *hygromycin* 20, 25 dan 30 mg/l eksplan

tidak tumbuh dan menunjukkan gejala kematian.

Efektivitas transformasi sebesar 8.2% dari hasil transformasi 500 eksplan tunas diperoleh 41 tanaman *putative transformant* yang mampu tumbuh pada medium seleksi.

Ucapan terima kasih:

Penelitian ini didanai oleh PTPN XI (PT. Perkebunan Nusantara XI) dan MP3EI (Masterplan Percepatan dan Perluasan Pembangunan Ekonomi Indonesia) 2012-2014 (a/n Prof. Bambang Sugiharto, Ph.D).

DAFTAR PUSTAKA

- Dewanti, P. 2011. Peningkatan kandungan sukrosa dan hasil tomat (*Lycopersicum esculentum* L.) melalui over ekspresi gen *SoSPS1* dan *SoSUT1*. *Disertasi* (non publikasi), Universitas Brawijaya, Malang.
- Holme, I.B., Brinch-Pedersen, H., Lange, M, Holm, PB. 2008. Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) Cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. *Plant Cell Rep.* 27:1833-1840.
- Rae, AL., JM. Perroux, CPL. Grof. 2005. Sucrose partitioning between vascular bundles and storage parenchyma in the sugarcane stem. A potential role for the *ShSUT1* sucrose transporter. *Planta*, 220:817-825.
- Slewinski, T.L., R. Meeley and D.M. Braun. 2009. Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves, *J. of Experiment. Bot.*, 60(3):881-892.
- Sugiharto, B. 2009. Isolasi *full length SoSUT1*, Laporan Penelitian Hibah Kompetensi (non publikasi).