

PERBAIKAN METODE INTRODUKSI GEN PADA *Kappaphycus alvarezii*

IMPROVEMENT METHOD OF GENE TRANSFER IN *Kappaphycus alvarezii*

St. Hidayah Triana^{1,2,3}, Alimuddin^{2*}, Utut Widyastuti^{3,4}, Suharsono^{3,4},
Emma Suryati⁵, dan Andi Parenrengi⁵

¹Jurusan Budidaya Perairan, FPIK, Universitas Muslim Indonesia, Makassar

²Departemen Budidaya Perairan, FPIK, IPB. Kampus IPB Dramaga, Bogor

³Pusat Studi Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi. Kampus IPB Dramaga, Bogor

⁴Departemen Biologi, FMIPA IPB. Kampus IPB Dramaga, Bogor

⁵Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau, Maros

*E-mail: alimuddin@ipb.ac.id

ABSTRACT

Method of foreign gene transfer in red seaweed *Kappaphycus alvarezii* has been reported, however, limited number of transgenic F0 (broodstock) was obtained. This study was conducted to improve the method of gene transfer mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in order to obtain high percentage of *K. alvarezii* transgenic. Superoxide dismutase gene from *Melastoma malabatricum* (MmCu/Zn-SOD) was used as model towards increasing adaptability of *K. alvarezii* to environmental stress. The treatments were the culture media and recovery duration, and each treatment consisted of three replications. The best method was co-cultivation using liquid media, then recovery was conducted in liquid media for 10 days. That treatment allowed higher transformation percentage (90%), regeneration efficiency (90%), putative bud efficiency (100%), number of buds and explants sprouted (100%) and transgenic explants (100%). The transgenic explants showed an amplification PCR product of MmCu/Zn-SOD gene fragment, whereas the non-transgenic explants showed no amplification product. All results revealed that suitable method of transgenesis for *K. alvarezii* has been developed.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, culture media, *Kappaphycus alvarezii*, recovery duration, transformation

ABSTRAK

Metode introduksi gen asing pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii* telah dilaporkan, namun jumlah transgenik F0 (induk) yang diperoleh sedikit. Penelitian ini dilakukan untuk memperbaiki metode transfer gen yang dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens* untuk mendapatkan *K. alvarezii* transgenik yang banyak. Gen penyandi superoksida dismutase dari *Melastoma malabatricum* (MmCu/Zn-SOD) digunakan sebagai model untuk meningkatkan ketahanan *K. alvarezii* terhadap stres lingkungan. Perlakuan terdiri atas jenis media kultur dan lama pemulihan, dan setiap perlakuan diberi 3 ulangan. Metode terbaik adalah kombinasi perlakuan antara kokultivasi dilakukan pada media cair dan kemudian dilakukan pemulihan juga pada media cair dengan durasi pemulihan selama 10 hari. Pada perlakuan tersebut diperoleh hasil tertinggi pada persentase transformasi (90%), efisiensi regenerasi (90%), efisiensi tunas putatif (100%), dan eksplan transgenik (100%). Eksplan transgenik menunjukkan adanya fragmen gen MmCu/Zn-SOD produk amplifikasi PCR, sedangkan eksplan non-transgenik tidak menunjukkan produk amplifikasi. Dengan demikian metode transfer gen yang sesuai untuk *K. alvarezii* telah berhasil diperoleh.

Kata kunci: *Agrobacterium tumefaciens*, media kultur, *Kappaphycus alvarezii*, lama pemulihan, introduksi

I. PENDAHULUAN

Rumput laut *Kappaphycus alvarezii* merupakan salah satu komoditas budidaya

laut andalan Indonesia. Masalah serius yang masih sering dihadapi dalam budidaya *K. alvarezii* adalah penurunan hasil panen disebabkan oleh penyakit *ice-ice* (bercak putih).

Penyakit ini diduga penyebab utamanya adalah perubahan lingkungan yang ekstrim yang berlangsung dalam waktu lama sehingga menyebabkan rumput laut mengalami stres (Ari-sandi *et al.*, 2011). Strain rumput laut tahan stres lingkungan merupakan salah satu alternatif pemecahan masalah penyakit *ice-ice*.

Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim yang mengkatalisis dismutase radikal anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan molekul oksigen (O_2). Enzim ini memegang peranan penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama aktivitas senyawa oksigen reaktif yang dapat menyebabkan stres. Transfer gen superoksida dismutase yang berasal dari tanaman *Melastoma malabathricum* (*MmCu/Zn-SOD*) meningkatkan daya tahan tanaman *Nicotiana benthamiana* dan *Nicotiana tabacum* terhadap cekaman aluminium (Hannum, 2012). Tanaman transgenik *MmCu/Zn-SOD* lainnya seperti tanaman jarak dan padi baru sampai pada tahap keberhasilan introduksi gen ke dalam genom tanaman. Peningkatan daya tahan *K. alvarezii* terhadap stres lingkungan diharapkan dapat diperoleh melalui transfer gen *MmCu/Zn-SOD*.

Transfer gen asing pada *K. alvarezii* telah dilakukan menggunakan metode yang dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens* dengan gen *PaCS* (Daud *et al.*, 2013), gen lisozim (Handayani *et al.*, 2014), dan gen *Mamt2* sebagai model (Fajriah *et al.*, 2015). Kedua peneliti yang pertama menggunakan media *Prevasoli's enriched seawater* (PES) padat, sedangkan Fajriah *et al.* (2015) menggunakan PES cair. Efisiensi regenerasi dan transformasi yang diperoleh Daud *et al.* (2013) dan Handayani *et al.* (2014) yang menggunakan PES padat sangat rendah dibandingkan dengan menggunakan PES cair (Fajriah *et al.*, 2015). Demikian juga efisiensi regenerasi yang diperoleh pada penelitian Triana (2016) tahap pertama relatif rendah, yakni 6,67% bila menggunakan OD_{600} 0,5 dengan lama inokulasi 60 menit dan kokultivasi 3 hari, dan 26,67% dengan menggunakan OD_{600} 0,4 dengan lama inokulasi 30 me-

nit dan kokultivasi 4 hari. Hal ini yang mendasari untuk memperbaiki metode introduksi gen pada *K. alvarezii*.

Keberhasilan transfer gen pada tanaman tergantung pada keberhasilan regenerasi tanaman (Purnamaningsih, 2006). Media kultur merupakan salah satu faktor yang berpengaruh terhadap keberhasilan regenerasi pada kultur *in vitro* tanaman (Wattimena, 1992; Wetter dan Constable, 1991). Media kultur dapat berbentuk cair dan padat. Pemilihan jenis media tergantung pada jenis tanaman, faktor aerasi, bentuk pertumbuhan dan diferensiasi yang diinginkan (Pierik, 1987). Selanjutnya, tahap kokultivasi juga mempengaruhi keberhasilan introduksi gen pada tanaman (Wu *et al.*, 2006; Islam *et al.*, 2015). Tahap kokultivasi adalah tahap dimana bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dan eksplan rumput laut hidup bersama dalam satu media. Selain itu, lama waktu pemulihan (*duration of recovery*) diperhatikan agar diperoleh kelangsungan hidup tinggi bagi eksplan setelah kokultivasi di ruang gelap untuk beregenerasi di media seleksi. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan metode yang memberikan keberhasilan tinggi dalam pembuatan *K. alvarezii* transgenik, dengan membandingkan efektivitas penggunaan media kultur cair, padat dan kombinasi keduanya, pada tahap kokultivasi dan pemulihan, dengan lama waktu pemulihan yang berbeda.

II. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei 2014 sampai dengan Juli 2015 di Laboratorium Biotechnology Research Indonesia-The Netherland (BIORIN), dan Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Tanaman, Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Biologi (PPS HB) IPB, Bogor.

2.2. Rancangan Percobaan

Penelitian dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap dengan pola faktori-

al yang terdiri atas dua faktor. Faktor pertama adalah jenis media kultur, yakni: A1) media cair, baik pada tahap kokultivasi maupun pada tahap pemulihan (disingkat KP: CC); A2) media padat pada tahap kokultivasi, dan media cair pada tahap pemulihan (KP: PC); dan A3) media padat, baik pada tahap kokultivasi maupun pada tahap pemulihan (KP: PP). Faktor kedua adalah perlakuan lama pemulihan (LP), yaitu: B1) 10 hari, B2) 20 hari, dan B3) 30 hari. Dari kedua faktor diperoleh sembilan kombinasi perlakuan dengan tiga kali ulangan. Setiap unit perlakuan menggunakan 10 eksplan rumput laut.

2.3. Rumput Laut dan Preparasi Eksplan

Rumput laut *K. alvarezii* yang digunakan dalam penelitian merupakan koleksi Balai Penelitian dan Pengembangan Budi daya Air Payau (BPPBAP) Maros, yang berasal dari Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan. Selanjutnya, eksplan disiapkan dengan cara memotong talus rumput laut sehingga berukuran 0,5-0,8 cm, kemudian disterilkan mengikuti metode Suryati dan Mulyaningrum (2009).

2.4. Penyiapan Bakteri *Agrobacterium tumefaciens*

Penyiapan bakteri *A. tumefaciens* dilakukan mengikuti metode Hannum (2012). Isolat *A. Tumefaciens* LB 4404 membawa plasmid pGWB5 dan mengandung gen penyandi enzim superoksida dismutase dari

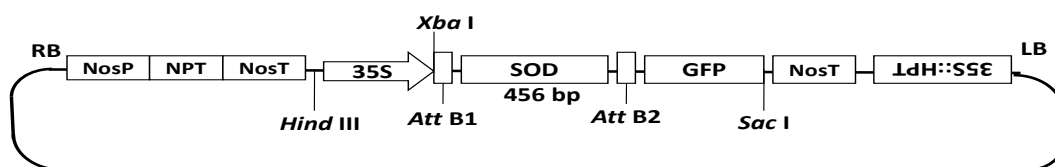
tanaman *Melastoma malabathricum* (*MmCu/Zn-SOD*) yang dikendalikan oleh promoter 35S CaMV (Gambar 1). Subkultur bakteri dilakukan selama 18 jam. Endapan *A. Tumefaciens* diresuspensi menggunakan larutan media PES cair sampai OD mencapai 0,4 (Triana, 2016).

2.5. Inokulasi dan Kokultivasi

Inokulasi dan kokultivasi dilakukan menggunakan metode yang dilaporkan oleh Triana (2016), yaitu inokulasi selama 30 menit dengan kokultivasi selama 4 hari. Dengan lama inokulasi dan kokultivasi tersebut, diperoleh efisiensi regenerasi dan persentase transformasi yang tinggi.

2.6. Pemulihan dan Seleksi Eksplan

Sebelum eksplan ditumbuhkan pada media pemulihan [PES cair atau padat 0,4% (berdasarkan perlakuan media kultur), air laut 28 g/L], terlebih dahulu direndam selama 15-20 menit di dalam media air laut yang mengandung cefotaksim (100 mg/mL) dan dikultur di media pemulihan berdasarkan perlakuan LP. Eksplan yang hidup di media pemulihan selanjutnya dikultur pada media seleksi (PES cair atau padat 0,4%, air laut 28 g/L + higromisin 10 mg/L) selama 14 hari. Selanjutnya, eksplan dipindahkan ke media pemulihan [PES cair atau padat 0,4% sesuai perlakuan media kultur, air laut 280 g/L] selama 10 hari, kemudian dipindahkan ke media PES cair. Semua kultur *in vitro* diinkubasi dalam ruangan dengan suhu 20-25 °C.



Gambar 1. Konstruksi plasmid biner pGWB-*MmCu/Zn-SOD* yang membawa gen penyandi enzim superoksida dismutase (SOD, berukuran 456 bp) dari tanaman *Melastoma malabathricum* (Hannum, 2012). RB: right border, NosP: promoter Nos, NPT: gen *neomycin phosphotransferase* II penyandi resistensi antibiotik neomisin, NosT: terminator Nos, HPT: gen *hygromycin phosphotransferase* penyandi resistensi antibiotik higromisin, 35S: promoter 35S CaMV, LB: left border.

2.7. Identifikasi Transgenik Menggunakan PCR

2.7.1. Ekstraksi DNA Genom Rumput Laut

Ekstraksi DNA genom rumput laut dilakukan mengikuti metode Wattier *et al.* (2000). Jumlah tunas yang diperiksa sebanyak lima tunas setiap kombinasi perlakuan.

2.7.2. Reaksi PCR dan Elektroforesis

Rumput laut transgenik diidentifikasi menggunakan PCR dengan primer spesifik gen penyandi *MmCuZn-SOD* (*MmSOD-F1*: 5'-ATGGTGAAGGCTGTGGTTGT-3' dan *MmSOD-R2*: 5'CATCTCCAACGGTGACA TTG-3') untuk deteksi keberadaan gen *Mm-CuZn-SOD*. Selanjutnya, konfirmasi keutuhan konstruksi gen dalam genom rumput laut dilakukan dengan menggunakan primer 35S-F2 : 5'-AAACCTCCTCGGATTCATT-3' dan *MmSOD-R2*: CATCTCCAACGGTGAC ATTG-3'. Ketiga set primer tersebut didesain oleh Hannum (2012). Komposisi dan proses PCR yang digunakan mengikuti Triana (2016).

Elektroforesis hasil PCR dilakukan pada gel agarosa 1% (b/v) pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Gel diwarnai dalam larutan etidium bromida (0,5 mg/L) dan visualisasi hasil PCR diamati dengan UV transiluminator. Dokumentasi fotografi dilakukan dengan perangkat *gel doc*.

2.8. Parameter Uji dan Analisis Data

Kriteria keberhasilan transformasi dapat ditinjau dari persentase transformasi, efisiensi regenerasi, dan efisiensi tunas putatif. Persentase transformasi diperoleh dari jumlah eksplan yang tahan antibiotik higromisin dibandingkan dengan jumlah eksplan seluruhnya (Daud *et al.*, 2013; Handayani *et al.*, 2014). Efisiensi regenerasi diperoleh dari jumlah eksplan yang menghasilkan tunas dibandingkan dengan jumlah eksplan seluruhnya. Efisiensi tunas putatif dihitung dari jumlah eksplan yang menghasilkan tunas dibandingkan dengan jumlah tunas tahan antibiotik higromisin (Handayani *et al.*, 2014). Data

persentase transformasi, efisiensi regenerasi dan efisiensi tunas putatif dianalisis menggunakan ANOVA dengan bantuan program SPSS versi 18, dan perbedaan antar perlakuan dianalisis menggunakan uji lanjut Duncan's pada $p=0,05$. Uji korelasi antar faktor perlakuan dilakukan menggunakan uji regresi, sedangkan antar parameter menggunakan uji Pearson. Data hasil PCR dianalisis secara deskriptif.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Hasil

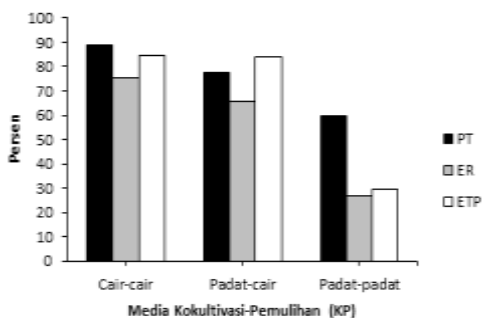
3.1.1. Pengaruh Media Kultur

Persentase transformasi (PT), efisiensi regenerasi (ER) dan efisiensi tunas putatif (ETP) *K. alvarezii* menggunakan media kokultivasi (K) dan pemulihan (P) berbeda disajikan pada Gambar 2. PT tertinggi ($P < 0,05$) diperoleh pada perlakuan media K cair dan P cair (KP cair-cair: $88,89 \pm 5,5\%$), diikuti oleh perlakuan KP padat-cair ($77,78 \pm 7,5\%$), dan terendah adalah KP: padat-padat ($60,00 \pm 45,1\%$). Begitu juga nilai PT untuk KP padat-cair ($77,78 \pm 7,5\%$) lebih tinggi daripada yang menggunakan KP padat-padat ($60,00 \pm 45,1\%$).

Efisiensi regenerasi (ER) perlakuan KP cair-cair ($75,55 \pm 12,6\%$) lebih tinggi ($P < 0,05$) daripada perlakuan KP padat-cair ($65,56 \pm 11,3\%$) dan perlakuan KP padat-padat ($26,67 \pm 21,2\%$). ETP perlakuan KP cair-cair ($84,78 \pm 11,5\%$) sama dengan KP padat-cair ($84,0 \pm 5,3\%$), dan KP padat-padat ($29,56 \pm 22,3\%$), tetapi keduanya lebih tinggi ($P < 0,05$) daripada ETP perlakuan KP padat-padat.

3.1.2. Pengaruh Lama Waktu Recovery (Pemulihan)

Setelah kokultivasi selama empat hari dibutuhkan waktu pemulihan sebelum eksplan diseleksi menggunakan antibiotik higromisin. Masa pemulihan ini berfungsi untuk mengembalikan eksplan ke kondisi normal secara berangsur setelah diinokulasi dan di kokultivasi di ruang gelap.



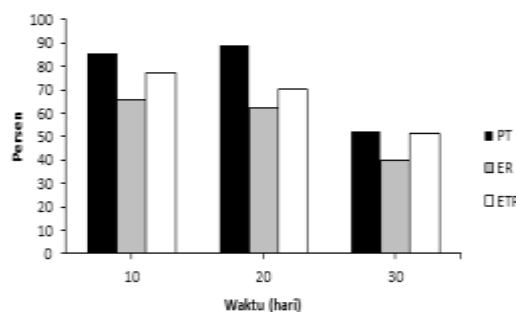
Gambar 2. Persentase transformasi (PT), efisiensi regenerasi (ER) dan efisiensi tunas putatif (ETP) pada media kokultivasi dan pemulihan (KP) berbeda. Cair-cair (media kokultivasi cair dan pemulihan cair), padat-cair (media kokultivasi padat dan pemulihan cair) dan padat-padat (media kokultivasi padat dan pemulihan padat).

Persentase transformasi (PT), efisiensi regenerasi (ER) dan efisiensi tunas putatif (ETP) *K. alvarezii* dengan lama waktu pemulihan (LP) berbeda disajikan pada Gambar 3. PT dan ER perlakuan 10 dan 20 hari adalah sama ($P > 0,05$), tetapi lebih tinggi daripada perlakuan 30 hari ($P < 0,05$). PT pada perlakuan LP 10 hari, 20 hari dan 30 hari masing-masing adalah $85,56 \pm 8,1\%$, $88,89 \pm 6,9\%$, $52,22 \pm 39,5\%$. ER pada perlakuan 10, 20 dan 30 hari berturut-turut adalah $65,56 \pm 23,5\%$, $62,22 \pm 18,0\%$ dan $40,0 \pm 30,4\%$. Sementara itu, ETP tertinggi ($P < 0,05$) terdapat pada perlakuan LP 10 hari, diikuti 20 hari dan terendah adalah perlakuan 30 hari. Nilai ETP masing-masing adalah $77,0 \pm 25,3\%$ (LP 10 hari), $70,22 \pm 19,9\%$ (LP 20 hari), dan $51,11 \pm 38,4\%$ (LP 30 hari).

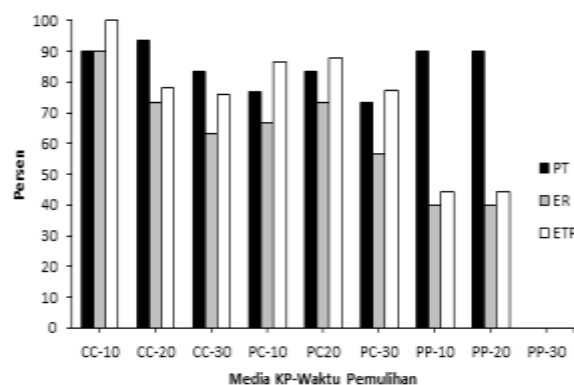
3.1.3. Pengaruh Interaksi Media Kultur dan Lama Waktu Pemulihan

Interaksi pengaruh faktor media kokultivasi-pemulihan (KP) dan lama pemulihan (LP) disajikan pada Gambar 4. Interaksi antara jenis media (KP) dan (LP) berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap parameter PT, ER, dan ETP. Koefisien korelasi KP dan

LP untuk parameter PT sebesar 0,88; ER sebesar 0,99 dan ETP 0,97. Selanjutnya koefisien korelasi antara PT dengan ER nilai sebesar 0,73; PT dengan ETP sebesar 0,72. Koefisien korelasi tertinggi adalah antara ER dan ETP sebesar 0,95.



Gambar 3. Persentase transformasi (PT), efisiensi regenerasi (ER) dan efisiensi tunas putatif (ETP) pada waktu pemulihan 10, 20 dan 30 hari.



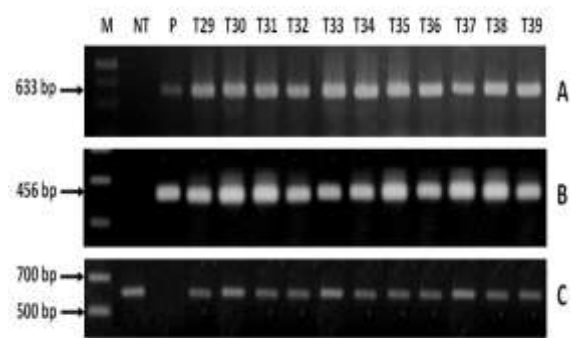
Gambar 4. Interaksi antara pengaruh jenis media kokultivasi dan pemulihan (KP), dan lama waktu pemulihan terhadap persentase transformasi (PT), efisiensi regenerasi (ER) dan efisiensi tunas putatif (ETP). Dua huruf pertama pada sumbu X adalah jenis media KP. Jenis media kokultivasi dan pemulihan (KP): cair-cair (CC), padat-cair (PC), padat-padat (PP). Angka setelah 2 huruf pada sumbu X adalah lama waktu pemulihan, yakni 10, 20 dan 30 hari.

PT tertinggi didapatkan dengan menggunakan media KP: CC-20 ($93,33 \pm 5,8\%$), KP: CC-10 ($90 \pm 0\%$), KP: PP-10 ($90 \pm 5,0\%$) dan KP: PP-20 ($90 \pm 5,0\%$), sedangkan perlakuan terendah adalah KP: PP-30 (0%). Nilai efisiensi regenerasi tertinggi diperoleh menggunakan media KP: CC-10 ($90 \pm 0\%$), disusul KP: CC-20 ($73,33 \pm 7,6\%$) dan KP: PC-20 ($73,33 \pm 5,7\%$), sedangkan yang terendah adalah KP: PP-30 (0%). Efisiensi tunas putatif tertinggi diperoleh menggunakan media KP: CC-10 ($100 \pm 0\%$), disusul KP: PC-20 ($88,0 \pm 1,0\%$) dan KP: PC-10 ($86,67 \pm 2,5\%$), yang terendah adalah KP: PP-30 (0). Berdasarkan hasil interaksi yang diperoleh tersebut, maka yang terbaik adalah media ko-kultivasi cair dan pemulihan cair dengan lama pemulihan 10 hari (KP: CC-10) dengan nilai PT 90%, ER 90% dan ETP 100%.

3.1.4 Analisis PCR

Hasil analisis PCR untuk konfirmasi rumput laut transgenik disajikan pada Gambar 5. PCR menggunakan primer *35S-F2* dan *MmSOD-R2* menghasilkan pita DNA dengan ukuran sebesar 633 pb (Gambar 5A kolom P, T29, T30, T31, T32, T33, T34, T35, T36, T37, T38 dan T39), sedangkan dengan primer *MmSOD-F1* dan *MmSOD-R2* adalah sebesar 456 pb (Gambar 5B kolom P, T29, T30, T31, T32, T33, T34, T35, T36, T37, T38 dan T39). Pada kontrol non-transgenik (Gambar 5A dan 5B, kolom NT) tidak ada produk PCR. Dengan menggunakan primer aktin, diperoleh produk PCR berukuran sekitar 600 pb (Gambar 5 C kolom NT dan kolom T29-T39), tetapi tidak ada produk PCR pada kontrol positif plasmid pGWB5-*MmCu/Zn-SOD* (Gambar 5B kolom P, T29, T30, T31, T32, T33, T34, T35, T36, T37, T38 dan T39). Dengan demikian, tunas rumput laut pada kolom T29, T30, T31, T32, T33, T34, T35, T36, T37, T38 dan T39 adalah transgenik yang membawa gen *MmCu/Zn-SOD*. *MmCu/Zn-SOD* sebanyak 75% (30 dari 40 tunas putatif yang diperiksa PCR. Jenis media yang menghasilkan eksplan positif PCR terbaik adalah KP-CC yang menghasil-

kan 86,67% (13 dari 15 eksplan yang dianalisis), disusul KP-PC menghasilkan 60,0% dan KP-PP menghasilkan 53,3%. Secara umum media KP: CC dan LP 10 hari adalah terbanyak menghasilkan eksplan bertunas (27), jumlah tunas (33) dan positif membawa gen *MmCu/Zn-SOD* 100%.



Gambar 5. Elektroforegram produk PCR dengan DNA genom dari rumput laut *Kappaphycus alvarezii* hasil introduksi gen penyandi *MmCu/Zn-SOD* dan nontransgenik. PCR dilakukan dengan 3 set primer berbeda, yaitu A: primer *35SF-MmSODR2*; B: primer *MmSODF-MmSODR2*, dan C: primer aktin kedelai, M= marker 1 kb DNA; NT adalah kontrol negatif (non-transgenik rumput laut); P adalah produk PCR dengan templat berupa plasmid pGWB5-*MmCu/Zn-SOD*; T29-T39 adalah rumput laut transgenik.

3.2. Pembahasan

Penelitian transgenik pada rumput laut, khususnya *K. alvarezii* masih sangat terbatas. Pada penelitian ini dilakukan modifikasi metode transfer gen untuk meningkatkan keberhasilan transgenesis pada *K. alvarezii*. Keberhasilan transgenesis pada rumput laut ditentukan oleh jumlah eksplan (persentase transformasi) yang hidup pada media seleksi mengandung antibiotik, efisiensi regenerasi, dan jumlah eksplan transgenik yang diperoleh. Hasil penelitian ini menunjukkan bah-

Tabel 1. Jumlah eksplan bertunas, jumlah tunas, dan tunas positif PCR pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii*.

Perlakuan		Jumlah		Persentase eksplan membawa transgen
Jenis Media (KP)	Waktu Pemulihan (hari)	Eksplan Bertunas	Tunas	
CC	10	27	33	100 (5/5)
	20	22	32	80 (4/5)
	30	19	19	80 (4/5)
	Total	68	84	86,7 (13/15)
PC	10	20	22	80 (4/5)
	20	22	30	60 (3/5)
	30	17	17	40 (2/5)
	Total	59	69	60,0 (9/15)
PP	10	12	18	60 (3/5)
	20	12	31	100 (5/5)
	30	0	0	0
	Total	24	49	53,3 (8/15)

CC: media kokultivasi cair, media pemulihan cair; PC: media kokultivasi padat, media pemulihan cair; PP: media kokultivasi padat, media pemulihan padat. Eksplan yang membawa transgen (*MmCu/Zn-SOD*) dianalisis menggunakan metode PCR.

wa persentase transformasi tertinggi didapatkan pada perlakuan media KP CC-20 (93,3%). Hasil ini sekitar 3 kali lebih tinggi daripada hasil riset sebelumnya (30,0%). Capaian tersebut juga lebih tinggi daripada yang dilaporkan oleh Fajriah *et al.* (2015) yang menggunakan media cair (27,4%), dan Handayani *et al.* (2014) yang menggunakan media padat (23,6%). Persentase transformasi menggunakan media padat pada riset ini (60,0%) juga lebih tinggi daripada hasil Handayani *et al.* (2014).

Persentase transformasi rendah pada perlakuan media KP padat-padat (60,0%) diduga karena banyaknya jumlah eksplan yang mati pada tahap pemulihan di media padat sehingga eksplan yang lolos higromisin makin sedikit. Efisiensi regenerasi paling rendah juga terjadi pada perlakuan media KP padat-padat (26,7%), sedangkan yang tertinggi terdapat pada media KP cair-cair (75,6%). Jumlah eksplan sedikit yang hidup di media padat diduga karena kemampuan eksplan untuk bertahan hidup dan beregenerasi di media padat lebih sulit dibandingkan di media cair,

bahkan pada perlakuan media KP padat-padat dengan LP 30 hari semua eksplan mati. Hal ini diduga karena kadar air rendah dan berlangsung dalam waktu yang lama, eksplan tidak mampu mempertahankan struktur selnya.

Efisiensi regenerasi tertinggi terjadi pada perlakuan media KP cair-cair (75,6%). Tingginya efisiensi regenerasi di media KP: cair-cair diduga disebabkan karena rumput laut merupakan tanaman yang hidup di perairan sehingga jumlah eksplan yang hidup di media cair baik pada tahap kokultivasi maupun pemulihan lebih sesuai dibandingkan perlakuan di media padat. Efisiensi regenerasi eksplan di media KP cair-cair juga lebih tinggi dibandingkan dengan hasil Fajriah *et al.* (2015) yang menggunakan media cair (27,6%). Hal tersebut diduga karena perbedaan dosis higromisin yang digunakan; pada riset ini digunakan dosis yang lebih rendah (10 mg/mL), sedangkan Fajriah *et al.* (2015) menggunakan dosis 20 mg/mL. Hal tersebut sejalan dengan yang dilaporkan oleh Sumarni (2008) bahwa dosis higromisin berkorelasi

negatif dengan eksplan yang lolos higromisin. Pucuk *Melastoma malabathricum* mengalami kematian 89% bila menggunakan higromisin 10 mg/mL, sedangkan pada konsentrasi 25 mg/mL pucuk mengalami kematian 100% (Sumarni, 2008).

Efisiensi tunas putatif terendah terjadi pada eksplan di media KP: padat-padat (29,6%). Rendahnya efisiensi tunas putatif diduga juga disebabkan banyaknya jumlah eksplan yang mati pada tahap pemulihan di media padat sehingga eksplan yang bertunas juga makin sedikit. Untuk efisiensi tunas putatif tertinggi didapatkan pada perlakuan media KP cair-cair (84,8%), diikuti oleh KP padat-cair (84,0%). Efisiensi tunas putatif pada perlakuan media cair dan media padat pada penelitian ini lebih baik dibandingkan dengan Fajriah *et al.* (2015) yang menggunakan media cair (27,6%) dan Handayani *et al.* (2014) yang menggunakan media padat (11,3%). Hal ini diduga karena konsentrasi cefotaksim yang digunakan lebih rendah (100 mg/mL) sehingga regenerasi pada penelitian ini lebih baik dibandingkan Handayani *et al.* (2014) dan Fajriah *et al.* (2015) yang menggunakan cefotaksim 200 mg/mL. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Pipatpanukul *et al.* (2004) bahwa konsentrasi cefotaksim 250 mg/mL dapat menghambat regenerasi kalus pada cv. RD6.

Untuk waktu pemulihan diperoleh data persentase transformasi terendah terjadi pada eksplan yang dikultur dengan masa pemulihan 30 hari (52,22%), dan yang terbaik adalah yang 20 hari (88,89%) dan 10 hari (85,56%). Hal ini disebabkan jumlah eksplan yang lolos higromisin sangat tinggi karena kemampuan daya hidupnya yang cukup besar terutama yang dikultur pada media cair, sedangkan yang dikultur di media padat persentase transformasinya berkorelasi negatif dengan lama waktu pemulihan.

ER regenerasi perlakuan lama pemulihan 10 hari (65,56%) sama dengan perlakuan lama pemulihan 20 hari (62,22%). Hal ini menandakan bahwa kemampuan eksplan beregenerasi setelah transformasi mengguna-

kan waktu pemulihan 10 hari sama saja dengan 20 hari. Akan tetapi, kedua nilai ER tersebut lebih tinggi daripada ER dengan lama pemulihan 30 hari (40,0%). Hal ini disebabkan eksplan tidak mampu beregenerasi dengan baik pada LP 30 hari terutama pada media KP: padat-padat bahkan eksplan tidak mampu bertahan hidup (keseluruhannya mati). ETP perlakuan lama pemulihan 10 hari lebih tinggi daripada lama pemulihan 20 hari dan 30 hari, begitu juga perlakuan lama pemulihan 20 hari lebih tinggi daripada ETP perlakuan lama pemulihan 30 hari. Hal ini didukung oleh Hiei *et al.* (1997) bahwa faktor yang dapat meningkatkan persentase transformasi, salah satu diantaranya adalah kondisi kultur *in vitro* dan kondisi kokultivasi. Pada penelitian ini efek tersebut terlihat jelas karena perbedaan jenis media media kokultivasi, media pemulihan, media seleksi, waktu kokultivasi dan pemulihan.

Ditinjau dari interaksi antar jenis media dan waktu pemulihan, maka eksplan yang memiliki nilai efisiensi regenerasi dan efisiensi tunas putatif terbaik adalah KP: CC-10 dengan nilai masing-masing 90% dan 100%, sedangkan untuk persentase transformasi terbaik adalah KP: CC-20 (93,33%) dan yang terendah secara keseluruhan adalah KP: PP-30 (0%). Nilai korelasi antara faktor media KP dan LP di atas 87%, menandakan hubungan di antara keduanya sangat erat khususnya pada ER (99%) dan ETP (97%). Dengan kata lain bahwa faktor KP dan LP sangat kuat dalam mempengaruhi ER dan ETP. Korelasi antara parameter efisiensi regenerasi (ER) dengan ETP lebih erat yaitu 95% dibandingkan dengan persentase transformasi (PT) 73%. Hal ini diduga disebabkan faktor utama yang berpengaruh pada ER dan ETP adalah jumlah eksplan yang bertunas. Korelasi antara PT dengan ETP sebesar 72%.

Keberadaan gen *Mmcu/Zn-SOD* pada eksplan rumput laut hasil transformasi dikonfirmasi dengan PCR. Hasilnya memperlihatkan bahwa rumput laut hasil transformasi terbukti sebagai rumput laut transgenik, sedangkan rumput laut non-transgenik tidak

menunjukkan amplifikasi fragmen tersebut. Analisis PCR ini juga mendukung hasil seleksi tanaman transgenik di media selektif mengandung agen seleksi higromisin. Kombinasi primer ini juga digunakan untuk analisis integrasi gen pada *Nicotiana benthamiana* dan *Nicotiana tabaccum* (Hannum, 2012), tanaman jarak (*J. curcas*) (Theresia, 2012) dan padi *Oryza sativa* L. sub spesies Japonica (Davis, 2012).

Berdasarkan jumlah tunas putatif yang dihasilkan, maka perlakuan terbaik adalah KP: CC-10, KP: CC-20, KP: PC-20 dan KP: PP-20 masing sebesar 33, 32, 30 dan 31. Akan tetapi, berdasarkan jumlah sampel tunas transgenik, maka perlakuan terbaik adalah media KP: cair-cair dan LP 10 dan 20 hari (persentase transgenik 100%). Hal tersebut sejalan dengan Cortina dan Macia (2004) bahwa makin tinggi persentase tunas positif PCR, maka makin tinggi keberhasilan transfenesis pada tanaman. Selanjutnya, persentase transgenik pada perlakuan KP: PP-20 juga 100%, namun tetapi efisiensi regenerasi (40,0%) dan efisiensi tunas putatifnya (44,3%) lebih rendah dibandingkan dengan KP CC-10 (ER 90%; ETP 100%). Dengan demikian, berdasarkan jumlah tunas putatif dan tunas transgenik serta pertimbangan waktu, maka perlakuan terbaik pada riset ini adalah KP CC-10.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan persentase transformasi, efisiensi regenerasi, dan persentase eksplan yang membawa gen *Mmcu/Zn-SOD*, maka keberhasilan tertinggi dalam transfer gen pada *Kappaphycus alvarezii* diperoleh pada kombinasi perlakuan kokultivasi dilakukan menggunakan media cair, kemudian pemulihan dilakukan menggunakan media cair dengan lama waktu pemulihan 10 hari.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Pusat Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air

Payau Maros, Sulawesi Selatan yang telah mendanai dan memfasilitasi penelitian ini melalui kerjasama dengan Pusat Penelitian dan Sumberdaya Hayati dan Biologi (PPS-HB) IPB Bogor a.n. Dr. Ir. Utut Widyastuti, MS. Terima kasih juga kepada Laboratorium Biotechnology Research Indonesia The Netherland (BIORIN) dan Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Tanaman (BM ST) yang telah menyediakan fasilitas selama penelitian. Tidak lupa kami mengucapkan terima kasih kepada mitra bestari yang telah banyak memberikan masukan dan komentar untuk memperbaiki kualitas paper ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Arisandi, A., H. Marsoedi, A. Nursyam, dan Sartimbul. 2011. Kecepatan dan prosentase infeksi penyakit *ice-ice* pada *Kappaphycus alvarezii* di Perairan Bluto Sumenep. *J. Ilmu Perikanan dan Kelautan*, 3(1):47-51.
- Cortina, C., and F.A.C. Macia. 2004. Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 76:269-275.
- Daud, R.F., U. Widyastuti, Suharsono, E. Suryati, dan A. Parenrengi. 2013. Introduksi gen sitrat sintase ke dalam rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Riset Akuakultur*, 8(2):201-208.
- Davis, L.M.M. 2012. Transformasi genetik padi (*Oryza sativa* L) sub spesies Japonica dengan gen penyandi superoksida dismutase dari *Melastoma malabathricum* menggunakan perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 46hlm.
- Fajriah, U., E. Suryati, A. Parenrengi, Suharsono, dan U. Widyastuti. 2015. Introduksi gen metallothionein tipe II ke dalam rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Riset Akuakultur*, 9(3):377-385.

- Handayani T., Alimuddin, U. Widyastuti, E. Suryati and A. Parenrengi. 2014. Binary vector construction and *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of *Lysozyme* gene in seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Biotropia*, 21(2):80-90.
- Hannum, S. 2012. Isolasi, pengklonan, dan analisis ekspresi gen penyandi *Copper/Zinc Superoxide Dismutase (CuZn-SOD)* dari *Melastoma malabathricum* L. Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 106hlm.
- Hiei, Y., T. Komari, and T. Kubo. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 35:205-218.
- Islam, M.M., Z.Y. Roly, M.Z. Naim, and M. Khalekuzzaman. 2015. *Agrobacterium* mediated gene transformation and regeneration in elite rice (*Oryza sativa* L.) cultivar BRR1 dhan56. *African J. of Biotechnology*, 14(31): 2415-2423.
- Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff. Dordrecht. 344p.
- Pipatpanukul, T., S. Bunnag, P. Theerakulpisut, and M. Kossitrakul. 2004. Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivar RD6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Songklanakarin J. Science Technology*, 26 (1):1-13.
- Purnamaningsih, R. 2006. Introduksi gen *DefH9-iaaM* dan *DefH9-RI-iaaM* melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* untuk meningkatkan potensi produksi tanaman tomat. Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 148hlm.
- Sumarni, N. 2008. Pertumbuhan dan toleransi *Melastoma* terhadap antibiotik kanamisin dan higromisin secara *in vitro*. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. 34hlm.
- Suryati, E., dan R.H. Mulyaningrum. 2009. Regenerasi rumput laut *Kappaphycus alvarezii* (Doty) melalui induksi kalus dan embrio dengan penambahan hormon perangsang tumbuh secara *in vitro*. *J. Riset Akuakultur*, 4(1):39-45.
- Theresia, A. 2012. Transformasi genetik jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) dengan gen *MmCuZn-SOD* penyandi superoksida dismutase melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 30hlm.
- Triana, S.H. 2016. Introduksi gen dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* dan performa rumput laut *Kappaphycus alvarezii* Transgenik *MmCu/Zn-SOD*. Disertasi. Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 67hlm.
- Wattier, R.A., P.A. Prodohl, and C.A. Maggs. 2000. DNA isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta). *Plant Molecular Biology Reporter*, 18:275-281.
- Wattimena, G.A. 1992. Bioteknologi tanaman. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. Pusat Antar Universitas IPB. Bogor. 145hlm.
- Wetter, L.R. and F. Constabe. 1991. Metode kultur jaringan tanaman. Edisi kedua. ITB. Bandung. 19hlm.
- Wu, Y.F., Y. Chen, X.M. Liang, and X.Z. Wang. 2006. An experimental assessment of the factors influencing *agrobacterium*-mediated transformation in tomato. *Russian J. Plant Physiology*, 53(2):252-256.

Diterima : 24 Januari 2016

Direview : 12 Juni 2016

Disetujui : 27 Juni 2016