

REGENERASI RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii* HASIL TRANSFORMASI GEN *Sitrat Sintase* MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens* SECARA IN VITRO

Emma Suryati^{*)}, Ristanti Frinra Daud^{**)}, Utut Widyastuti^{**)}, Andi Tenriulo^{*)}, dan Andi Parenrengi^{*)}

^{*)} Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau
Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan
E-mail: emmasuryati@yahoo.com

^{**)} Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, IPB, dan
Departemen Biologi, FMIPA IPB
Jl. Lingkar Akademik, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 20 Januari 2014; Disetujui publikasi: 19 Juni 2014)

ABSTRAK

Introduksi gen *sitrat sintase* pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* telah dilakukan secara in vitro. Introduksi gen *sitrat sintase* ke dalam genom rumput laut dapat mengurangi cekaman oksidatif terutama perubahan yang disebabkan oleh perubahan suhu, salinitas dan cemaran logam di perairan. Penelitian ini bertujuan dalam rangka perbanyakan rumput laut hasil introduksi gen *sitrat sintase* melalui teknik kultur jaringan pada media cair dan media semi solid. Regenerasi tunas dilakukan berdasarkan eksplan yang tahan pada media seleksi higromisin serta evaluasi transgenik dilakukan menggunakan teknik PCR, di bawah kendali promoter 35S CaMV. Hasil penelitian memperlihatkan efisiensi transformasi pada media selektif sebanyak 30%, efisiensi regenerasi thalus transgenik pada media seleksi 85%, dan efisiensi regenerasi thalus non transgenik sebesar 95% pada media non selektif. Media *recovery* dengan penambahan pupuk PES memperlihatkan sintasan yang paling baik pada regenerasi thalus transgenik. Hasil analisis PCR memperlihatkan *K. alvarezii* transgenik putatif mengandung transgen *PaCS* di bawah kendali promoter 35S CaMV.

KATA KUNCI: *Kappaphycus alvarezii*, rumput laut, gen PaCs, transformasi

ABSTRACT: *Regeneration of seaweed Kappaphycus alvarezii resulting from citrate synthase gene transformation with Agrobacterium tumefaciens by in vitro methode. By: Emma Suryati, Ristanti Frinra Daud, Utut Widyastuti, Andi Tenriulo, and Andi Parenrengi*

Introduction of citrate synthase gene in seaweed Kappaphycus alvarezii using Agrobacterium tumefaciens has been done in vitro. Introduction of citrate synthase gene into the genome of seaweed can reduce oxidative stress changes which are, caused primarily by changes in temperature, salinity and metal contamination in the waters. The aim of this research was to propagate the seaweed resulting from introduction of citrate synthase gene through tissue culture techniques on liquid media and semi-solid media. Regeneration of the bud was done by explants which were resistant to the hygromycin selection media and the evaluation of performed transgenic using PCR techniques, under the control of the CaMV 35S promoter. The results demonstrated that the efficiency of the transformation on selective media

was 30%, the efficiency of regeneration of the transgenic thalus on selection media was 85%, while the non-transgenic thalus regeneration efficiency was 95% on non-selective media. Recovery media with the addition of PES fertilizer showed the best survival in transgenic thalus regeneration. PCR analysis results showed the putative transgene of *K. alvarezii* containing PaCS transgenic under control of 35S CaMV promoter.

KEYWORDS: *Kappaphycus alvarezii*, seaweed, PaCs gene, transformation

PENDAHULUAN

Perubahan mutu lingkungan yang ekstrim dapat menyebabkan pertumbuhan rumput laut terganggu dan memicu serangan penyakit *ice-ice* sehingga dapat menurunkan produksi. Penyakit *ice-ice* seringkali disebabkan oleh perubahan mutu lingkungan antara lain pergantian musim, serta masuknya limbah pemukiman, pertanian, limbah pabrik, kegiatan perikanan ke perairan sehingga mempengaruhi kondisi ekologis perairan (Collen, 1995). Penyakit tersebut lebih mengindikasikan stres daripada serangan patogen. Hal ini didukung dengan ditemukan fakta bahwa penyakit *ice-ice* lebih menonjol pada lingkungan yang kualitas airnya rendah, pergantian air sedikit, salinitas rendah dan tinggi rendahnya suhu air serta kandungan logam berat yang tinggi di perairan (Mtolera *et al.*, 1995). Cemaran logam yang sering dijumpai pada sedimen dan perairan pantai antara lain Bp, Cd, Cu, Zn, Mn, dan Al (Jickells, 1955; De Baar & La Roche, 2003, dan Rochyatun & Rozak, 2007).

Dalam rangka meningkatkan dan mempertahankan produksi rumput laut nasional perlu dilakukan upaya-upaya dalam mengatasi permasalahan dalam budidaya, seperti menurunnya mutu genetik rumput laut akibat permasalahan penyakit dan lingkungan (Largo *et al.*, 1997; Vairappan, 2006) melalui beberapa pendekatan teknologi, antara lain rekayasa genetik melalui transformasi gen potensial yang dapat meningkatkan ketahanan serta memperbaiki gen dari rumput laut.

Rumput laut *K. alvarezii* dan *Eucheuma spinosum* merupakan alga yang mampu mengabsorpsi logam (Diantariani *et al.*, 2008), namun pada konsentrasi tertentu jaringan rumput laut tidak mampu lagi untuk bertahan sehingga cekaman logam berat berupa Aluminium (Al) menyebabkan perubahan struktur sel yang meliputi reduksi jumlah butir pati dalam nukleoplas, inti sel tersegmentasi, dan adanya kondensasi kromosom pada inti (Nagy *et al.*, 2004), serta kerusakan pada membran

plasma. Cekaman Al mengakibatkan membran plasma kehilangan integritasnya (Yamamoto *et al.*, 2001), yang selanjutnya dapat memicu gangguan penyerapan hara dan air sehingga menyebabkan defisiensi unsur hara. Untuk mengatasi hal tersebut, perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan ketahanan rumput laut terhadap cekaman logam berat melalui peningkatan produksi asam sitrat pada rumput laut *K. alvarezii*.

Asam sitrat dihasilkan dari siklus Krebs atau siklus asam sitrat. Pada siklus ini, diawali dengan pengubahan piruvat menjadi asetil KoA dengan melepaskan CO₂. Asetil KoA akan bereaksi dengan oksaloasetat yang berkarbon empat menjadi senyawa berkarbon enam sitrat. Enzim yang berperan dalam reaksi ini adalah sitrat sintase (Taiz & Zeiger, 2002). Beberapa spesies dari genus *Pseudomonas* dimanfaatkan sebagai pelarut fosfat, yaitu dengan mensekresikan asam organik terutama sitrat (Buch *et al.*, 2008). Gen *sitrat sintase* asal *Pseudomonas aeruginosa* (PaCs) yang berukuran 1.287 bp dan menyandikan 428 asam amino telah berhasil diisolasi dan diintroduksi ke dalam tanaman *Nicotiana tabacum* dan *Jatropha curcas* melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Hasil uji tantang tembakau transgenik dengan cekaman Al menunjukkan bahwa tanaman transgenik yang mengandung gen PaCs lebih toleran dibandingkan dengan tanaman non transgenik (Tistama, 2012).

Beberapa peneliti telah menggunakan *A. tumefaciens* sebagai perantara transformasi, seperti yang dilakukan oleh Cheng *et al.* (2011) pada mikroalga *Schizochytrium*. Pengembangan teknologi kultur jaringan merupakan salah satu teknologi yang mendukung rekayasa genetik pada tanaman. Teknik kultur jaringan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* telah dikembangkan oleh Suryati & Mulyaningum (2009).

Tujuan penelitian ini adalah melakukan regenerasi dan perbanyak rumput laut hasil

transformasi gen *PaCS* menggunakan bakteri *A. tumefaciens* secara in vitro.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan, di laboratorium Bioteknologi Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP) Maros, Laboratorium Biotechnology Research Indonesia-Netherland (BIORIN), dan Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB), Institut Pertanian Bogor.

Rumput laut *K. alvarezii* yang digunakan sebagai tanaman yang akan diintroduksi dengan gen *sitrat sintase* diperoleh dari hasil budidaya rumput laut di Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan.

Bakteri *A. tumefaciens* LBA4404 yang membawa plasmid pMSH-*PaCs* digunakan untuk menginokulasi rumput laut *K. alvarezii*. Peta fisik daerah T-DNA yang terdapat gen *PaCs* di bawah kendali promoter 35S CaMV disajikan pada (Gambar 1). Primer spesifik *PaCS-F* (5'ATGGCTG-ACAAAAAGCGCAG3'), *PaCs-R* (5'TCAGCCGCGATCCTTGAG GGC3') dan 35S-F (5'AAACCTCCTCGATTCC-ATT3') digunakan untuk mengetahui keberadaan gen *PaCs* di bawah kendali promoter 35S CaMV.

Persiapan Eksplan

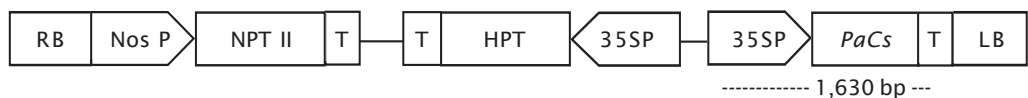
Thalus *K. alvarezii* yang akan digunakan diseleksi dengan seksama, dipilih thalus yang sehat berwarna cerah dan tidak berlumut, dipotong sepanjang 2 cm dan dibersihkan dengan air laut yang disaring dengan filter UV. Thalus dibersihkan dengan sikat di bawah mikroskop, kemudian disterilisasi dengan betadin 1% di dalam air laut steril selama satu menit, kemudian disterilisasi menggunakan campuran antibiotik (penisilin-Meiji, kanamisin-Meiji, streptomisin-Phytotech, ripamfisin-Biobasic.inc) masing-masing dengan konsentrasi 0,05%) untuk menghilangkan mikroba permukaan. Thalus yang telah dipotong dikultur pada air laut steril yang diperkaya dengan *provasoly enriched seawater* (PES) dengan foto periode 12 jam. Untuk inisiasi dan penyesuaian pada kondisi laboratorium.

Kultur *A. tumefaciens*

A. tumefaciens yang membawa gen *PaCs* dikultur dalam 3 mL media LB (20% *Bacto tryptone* (Difco), 10% *Bacto yeast* (Difco), 20% NaCl (Merck) yang mengandung antibiotik 50 µg/mL streptomycin-phytotech, 50 µg/mL kanamycin-Meiji, 50 µg/mL hygromycin-phytotech dan diinkubasi dengan pengocok (IKA-shaker) dengan kecepatan 250 rpm, suhu 28°C selama 48 jam di ruang gelap. Biakan disubkultur lagi setelah 48 jam di dalam 20 mL LB selama 16 jam dengan kondisi yang sama. Kultur *A. tumefaciens* selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung masing-masing 1,5 mL disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm (*Mikro 22R Hettich*) selama lima menit, kemudian endapannya diresuspensi dengan 20 mL media kokultivasi cair (20 mL/L PES; 20 *part per thousand* (ppt) air laut steril; 100 µM asetosiringon-phytotech; 0,05 g/100 mL glukosa-Merck) hingga nilai *optical density* (OD₆₀₀) 0,5.

Transformasi Genetik *K. alvarezii*

Prosedur transformasi pada rumput laut ini dilakukan dengan menggunakan thalus rumput laut yang dipotong-potong dengan ukuran 0,5 cm dan diadaptasikan terlebih dahulu pada media padat PES 0,8% (20 mL/L PES; 30 ppt air laut steril; 0,8% *bacto agar-difco*) selama 3-5 hari. Transformasi dimulai dengan mencuci potongan thalus menggunakan air laut steril 30 ppt, kemudian dikeringkan pada tisu steril. Thalus rumput laut *K. alvarezii* disiapkan sebanyak 400 eksplan yang tidak diinokulasi/transformasi, dan 400 eksplan yang akan diinokulasi/transformasi, transformasi dilakukan dengan cara direndam dalam biakan *A. tumefaciens* LBA4404 yang membawa plasmid pMSH-*PaCs* dalam media inokulasi (20 ppt air laut steril; 20 mL/L PES; 100 µM asetosiringon-phytotech; 0,05 g/100 mL glukosa-Merck) selama 15 menit. Thalus selanjutnya dikeringkan, pada tisu steril dan dipindahkan dalam media ko-kultivasi padat (25 ppt air laut; 0,3% *gelrite*; 100 µM asetosiringon; 0,05 g/100 mL glukosa) dan diinkubasi dalam



Gambar 1. Konstruksi gen *PaCs* di dalam vektor ekspresi pMSH (Tistama, 2012)

Figure 1. Construction of *PaCs* gene in pMSH expressing vector (Tistama, 2012)

ruangan gelap selama 2-3 hari. Thalus selanjutnya direndam di dalam air laut steril yang mengandung 200 mg/L cefotaxim selama sepuluh menit, setelah itu thalus dibersihkan dan ditanam dalam media *recovery* (30 ppt air laut steril; 20 mL/L PES; 0,4% *bacto agar*-Difco). Thalus yang tidak diinokulasi dengan bakteri *A. tumefaciens* LBA4404 yang membawa plasmid pMSH-*PaCs* disiapkan sebagai pembanding. Setelah 1-2 minggu, thalus dipindahkan ke media seleksi padat (air laut steril 30 ppt; PES 20 mL/L; *bacto agar* 0,5%; higromisin-phytotech 10 mg/L). Thalus tersebut dibiakkan di media PES cair tanpa antibiotik (20 mL/L PES; 30 ppt air laut steril) di ruang kultur jaringan hingga beregenerasi membentuk tunas 1-2 minggu. Kandidat transgenik rumput laut yang membawa gen *PaCS* selanjutnya akan diperbanyak melalui teknik kultur jaringan menggunakan media cair dan media semi solid.

Analisis Integrasi Gen *PaCs* di dalam *K. alvarezii*

Analisis integrasi gen *PaCs* di dalam genom *K. alvarezii* transgenik dilakukan dengan PCR. DNA genom diperoleh dari tunas putatif yang dihasilkan dari proses regenerasi hasil transformasi, diisolasi yang menggunakan teknik isolasi Wattier *et al.* (2000). Reaksi PCR dilakukan dengan mencampurkan 100 ng DNA genom, 0,5 mM kombinasi primer gen spesifik *sitrat sintase PaCs-F* dan *PaCs-R*, serta 0,5 mM kombinasi primer *35s-F* dan *PaCs-R*, 5 µL PCR mix, ditambah dengan ddH₂O hingga volume 10 µL. Kondisi PCR adalah denaturasi selama 30 detik pada suhu 95°C, *annealing* selama 30 detik pada suhu 55°C, dan ekstensi pada suhu 72°C selama dua menit sebanyak 35 siklus. Sebanyak 5 mL hasil PCR dielektroforesis menggunakan gel agarose 1% dengan voltase 100 volt selama 30 menit dan selanjutnya gel direndam dalam *etidium bromide* 0,5 mg L⁻¹ selama 20 menit, direndam 20 menit dengan air kemudian divualisasi dengan UV transiluminator. Keberhasilan integrasi gen *PaCs* pada rumput laut *K. alvarezii* ditandai dengan pita pada 1.300 bp pada gel elektroforesis hasil PCR.

Regenerasi Rumput Hasil Transformasi Gen *PaCs* pada Media Cair dan Semi Solid

Eksplan rumput laut hasil transformasi yang mengandung gen *PaCs*, dipindahkan pada media semi solid yang diperkaya dengan pu-

puk PES. Regenerasi dan pemeliharaan eksplan rumput laut hasil transgenik, dilakukan pada labu yang dilengkapi dengan aerasi, diletakkan di dalam *culture chamber* pada suhu 20°C dengan media cair yang diperkaya dengan pupuk PES, Grund, dan SSW sebagai kontrol. Pengkayaan dengan pupuk tersebut merupakan perlakuan yang diulang masing-masing tiga kali menggunakan desain RAL. Dalam rangka memacu pertumbuhan tunas dan cabang rumput laut, selanjutnya media terbaik pada tahapan regenerasi diperkaya dengan kombinasi Indol Acetic Acid (IAA) dan Benzyl Amino Purin (BAP) dengan beberapa konsentrasi antara lain 1:1, 1:2, dan 2:1, serta diamati pengaruh derajat keasaman (pH) dengan kisaran 4, 6, dan 8, sedangkan ratio gelap terang (*photoperiod*) antara lain dengan perbandingan 18:6, 12:12, dan 6:18 pada pemeliharaan anakan rumput laut transgenik.

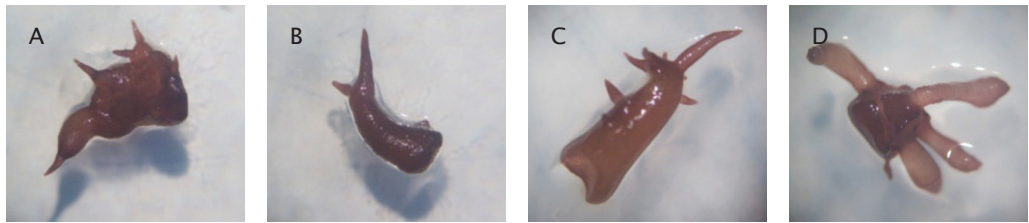
Keberhasilan regenerasi ditandai dengan pertumbuhan dan perkembangan tunas serta cabang rumput laut hasil transgenik serta sintasan dari eksplan yang dipelihara pada media kultur yang disediakan.

HASIL DAN BAHASAN

Transformasi Genetik *K. alvarezii* dengan Gen *Sitrat Sintase*

Hasil transformasi gen *PaCS* ke dalam genom *K. alvarezii* melalui perantara *A. tumefaciens* memperlihatkan pertumbuhan yang baik pada media seleksi, media ko-kultivasi dan media *recovery* pada tahapan transformasi gen pada rumput laut (Gambar 2). Thalus yang digunakan untuk transformasi dipilih yang sehat dan berkualitas baik, serta stabil pada media adaptasi di laboratorium. Eksplan yang dapat mendukung keberhasilan transformasi adalah eksplan yang segar dan sehat karena kerusakan pada jaringan thalus mengakibatkan thalus tidak dapat beradaptasi dengan baik dan mudah terkontaminasi oleh bakteri, sehingga menyebabkan kematian. Transformasi menggunakan *A. tumefaciens* memiliki beberapa kelebihan yaitu diantaranya mudah dilakukan (Hiei & Komari, 2008).

Transformasi dilakukan berdasarkan kemampuan *A. tumefaciens* mentransfer T-DNA ke dalam kromosom tanaman, sebelumnya transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* telah dilakukan pada *marine makroalga* yaitu *Porphyra yezoensis* (Cheney *et al.*, 2011). Penggunaan cefatoxim dimak-



Gambar 2. Perkembangan transformasi rumput laut *K. alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* pada A = media ko-kultivasi padat; B = media *recovery*; C = media seleksi mengandung higromisin 10 mg/L; D = media regenerasi (PES cair) tanpa higromisin

Figure 2. Development of *Agrobacterium tumefaciens* transformed thalli *Kappaphycus alvarezii* on solid co-cultivation medium (A); recovery medium (B); selection medium containing 10 mg/mL hygromycin (C); regeneration medium (liquid PES) without hygromycin (D)

sudkan untuk menghilangkan bakteri *A. tumefaciens* pada rumput laut sehingga diperoleh rumput laut dengan sisipan gen *PaCS* yang dibawa oleh bakteri *A. tumefaciens*.

Konsentrasi cefotaxim yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada (Daud *et al.*, 2013), lebih rendah daripada penggunaan konsentrasi cefotaxim pada penelitian tanaman tingkat tinggi, fungsi dari cefotaxim adalah untuk menghilangkan bakteri *A. tumefaciens* yang membawa gen *PaCs*. Konsentrasi cefotaxim yang efektif digunakan dalam mengurangi jumlah bakteri pada tanaman tingkat tinggi berkisar 250-1500 µg/mL (Da silva & Fukai, 2001). Hasil penelitian Okkels & Paderson (1988) menunjukkan bahwa cefotaxim dalam konsentrasi yang tinggi dapat bersifat *phytotoxic* pada perkembangan tanaman Bit, namun pada dosis tertentu penggunaan cefotaxim pada proses transformasi tidak menghambat regenerasi tanaman (Koronfel, 1998).

Thalus transgenik putatif merupakan thalus yang dapat bertahan pada media seleksi higromisin, konsentrasi higromisin yang digunakan 10 mg/L mengacu pada konsentrasi yang digunakan oleh Daud (2013), persentase efisiensi transformasi yang diperoleh pada kegiatan ini mencapai 30%, lebih besar dari yang diperoleh Daud (2013) dan Handayani (2013) yang memperoleh efisiensi transformasi pada *K. alvarezii* hanya 7,5% dan 23%. Hal ini kemungkinan disebabkan perbedaan kondisi thalus pada saat transformasi serta perbedaan ketahanan rumput laut terhadap antibiotik, sedangkan efisiensi regenerasi thalus putatif yang diperoleh hanya 83% dari jumlah eksplan yang resisten pada media higromisin, sedang-

kan efisiensi regenerasi thalus non transgenik sebesar 95% pada media non selektif yang tidak mengandung higromisin (Tabel 1). Efisiensi regenerasi yang diperoleh lebih rendah dari efisiensi regenerasi yang dihasilkan oleh Daud (2013) sebesar 100%, namun lebih besar bila dibandingkan dengan hasil penelitian Handayani (2013) yang memperoleh efisiensi regenerasi 11,32%. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor antara lain perbedaan kondisi serta ketahanan thalus terhadap infeksi bakteri, kondisi media kultur yang digunakan, serta konsentrasi antibiotik yang digunakan, selain itu sensitivitas sel tanaman terhadap agen seleksi bergantung pada genotip, tipe eksplan dan kondisi kultur jaringan (Koronfel, 1998).

Regenerasi rumput laut hasil transformasi gen *PaCs* dilakukan pada media *recovery* semi solid yang diperkaya dengan pupuk PES, Grund, dan SSW. Hasil penelitian memperlihatkan sintasan yang paling tinggi pada media PES, berbeda nyata dengan SSW, namun tidak berbeda nyata dengan media Grund (Gambar 3). Hal ini disebabkan kebutuhan nutrisi pada rumput laut dapat dipenuhi oleh nutrisi yang berada pada media yang diperkaya dengan PES, selain itu eksplan yang digunakan memang diadaptasi pada media dengan pupuk yang sama sehingga tidak perlu menyesuaikan diri dengan lingkungannya sendiri.

Regenerasi eksplan rumput laut hasil transformasi pada media cair yang diinkubasi di dalam *culture chamber* pada suhu 20°C. memperlihatkan pertumbuhan tunas yang lebih cepat pada media PES, namun pada media yang diperkaya dengan pupuk Grund, se-

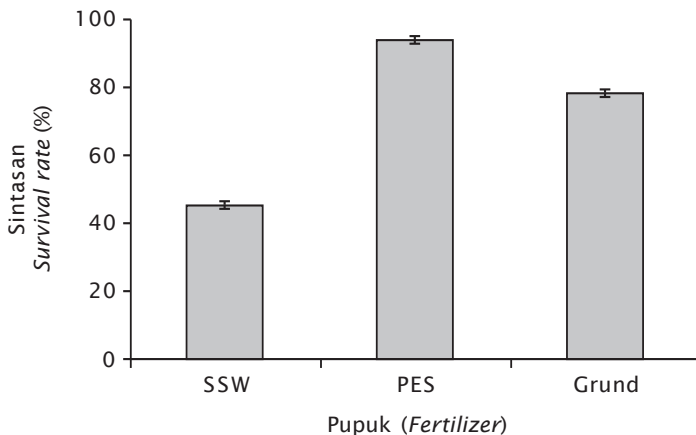
Tabel 1. Efisiensi transformasi dan regenerasi rumput laut *K. alvarezii* mengandung gen *citrate syntase*

Table 1. The efficiency of transformation and regeneration of *K. alvarezii* containing *citrate syntase gene*

Perlakuan Treatments	Jumlah eksplan awal Number of initial explants	Jumlah eksplan tahan higromisin Number of hygromycin resistant explants	Persentase transformasi Percentage of transformation (%)	Jumlah eksplan regenerasi Number of regeneration explant	Efisiensi regenerasi Efficiency of regeneration (%)
Diinokulasi Inoculated	400	120	30 ^{a)}	120	83 ^{b)}
Tidak diinokulasi Not inoculated	400	0	0	380	95 ^{d)}

Keterangan (Note):

- a) Jumlah eksplan tahan higromisin/jumlah eksplan x 100% (*The number of hygromycin resistant explants/number of explants x 100%*)
- b) Jumlah eksplan yang bertunas/jumlah eksplan tahan higromisin x 100% (*The number of sprouted explants/number of hygromycin resistant explants x 100%*)
- c) Jumlah eksplan yang bertunas/jumlah eksplan awal yang ditanam pada media tanpa higromisin x 100% (*The number of sprouted explants/number of initial explants grown on media without hygromycin x 100%*)



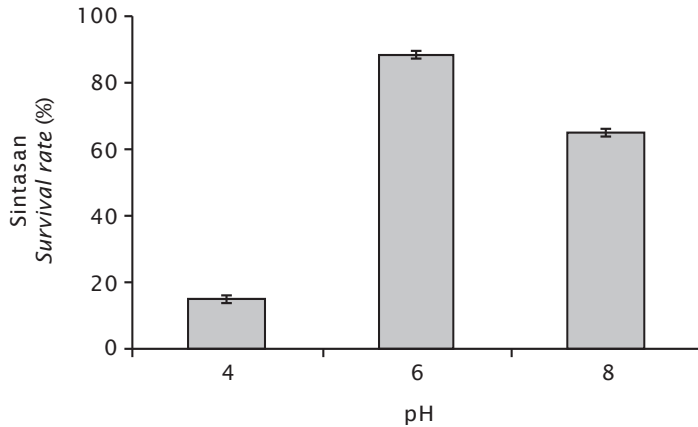
Gambar 3. Sintasan rumput laut hasil transformasi gen *PaCs* pada media kultur dengan pupuk yang berbeda

Figure 3. Survival of seaweed *PaCs* gene transformation in culture media with different fertilizer

cara visual memperlihatkan tampilan warna thalus rumput laut yang lebih cerah dan segar serta warna yang lebih coklat.

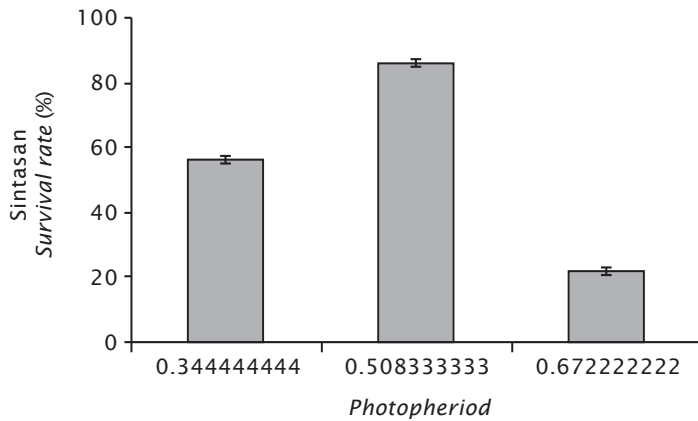
Pengaruh derajat keasaman (pH) pada regenerasi rumput laut hasil transgenik memperlihatkan sintasan yang paling baik yaitu pada pH = 6, walaupun tidak berbeda nyata dengan pH = 8. (Gambar 4).

Ratio gelap terang (*Photoperiod*) pada regenerasi dan pemeliharaan anakan rumput laut hasil transgenik merupakan faktor penunjang pertumbuhan dan sintasan anakan rumput laut tersebut. Hasil pengamatan memperlihatkan sintasan yang paling baik yaitu pada perbandingan gelap dan terang 12:12, dan sintasan yang paling rendah yaitu pada perbandingan 16:8. (Gambar 5).



Gambar 4. Sintasan rumput laut hasil transformasi gen *PaCs* pada media PES dengan pH yang berbeda

Figure 4. Survival of seaweed *PaCs* gene transformation in PES media with different pH



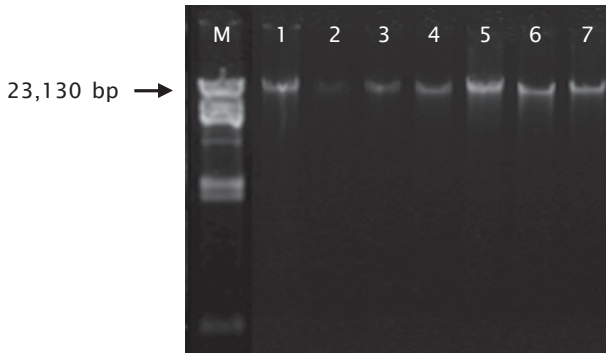
Gambar 5. Sintasan rumput laut hasil transformasi gen *PaCs* pada media PES dengan *photoperiod* yang berbeda

Figure 5. Survival of seaweed *PaCs* gene transformation in PES media with different *photoperiod*

Analisis Integrasi Gen *PaCs* di dalam *K. alvarezii*

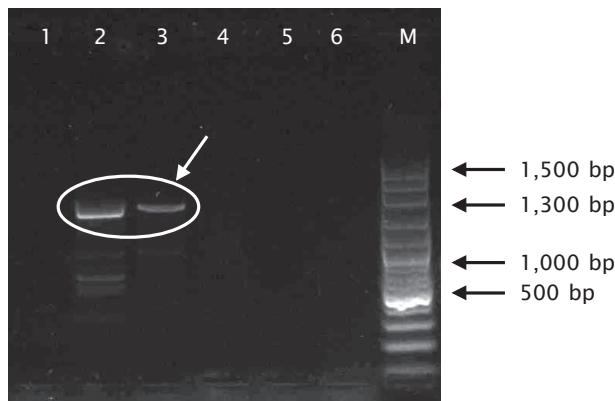
Dari thalus yang menghasilkan tunas transgenik putative pada media regenerasi, diambil beberapa tunas untuk diisolasi DNA-nya. Hasil isolasi DNA genom dari tunas *K. alvarezii* transgenik putatif pada media regenerasi menunjukkan bahwa DNA tersebut memiliki kualitas yang baik (Gambar 6). DNA genom dari salah satu tunas transgenik putatif selanjutnya digunakan untuk analisis integrasi gen *PaCs* pada *K. alvarezii*.

Analisis integrasi gen *PaCs* di dalam rumput laut menggunakan teknik PCR dengan primer gen F *PaCs* dan R *PaCs* menghasilkan pita berukuran 1.300 bp, sedangkan pada *K. alvarezii* non transgenik tidak menghasilkan pita tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa primer tersebut dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan transgen *PaCs* di *K. alvarezii* transgenik (Gambar 7). Hasil ini juga menunjukkan bahwa rumput laut *K. alvarezii* mempunyai urutan nukleotida yang berbeda dengan gen *PaCs* dari *Pseudomonas aeruginosa*. PCR dengan



Gambar 6. Elektroforesis DNA genom rumput laut *K. alvarezii*. M = marker; 1-7 = sampel DNA rumput laut

Figure 6. Electrophoresis of DNA genome *K. alvarezii*. M = Marker DNA; 1-7 = DNA sample



Gambar 7. Analisis integrasi gen *PaCs* di dalam thalus *K. alvarezii* yang ditransformasi dengan *A. tumefaciens* menggunakan PCR. PCR menggunakan kombinasi primer F *PaCs* dan R *PaCs*. Lajur M = Marker 100 bp plus, 1 = non transgenik, 2 = RL transgenik putatif (1), 3 = RL transgenik putatif (2), 4&5 = RL transgenik (pucat), 6 = RL transgenik (mati)

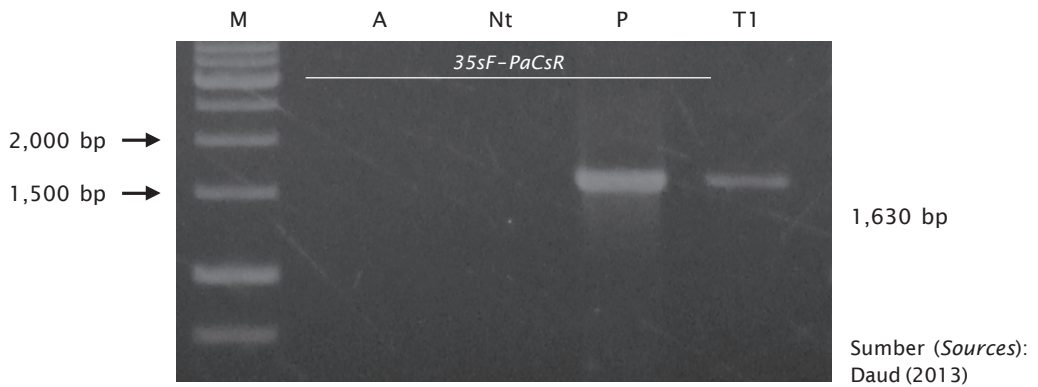
Figure 7. Electrophoresis of DNA genome *K. alvarezii* citrate syntase (*PaCs*) gene detection in *A. tumefaciens* transformed thalli *K. alvarezii* by PCR method. PCR product using F *PaCs* and R *PaCs* primers. M = 100 bp plus DNA marker, 1 = non transgenic, 2 = putatif transgenic (1), 3 = putatif transgenic (2), 4&5 = transgenic explant (pale), 6 = transgenic explant (dead)

kombinasi primer 35sF dan R *PaCs* menghasilkan pita berukuran 1.630 bp pada *K. alvarezii* tetapi tidak menghasilkan amplikon pada *K. alvarezii* non transgenik (Gambar 8) (Daud *et al.*, 2013). Hasil analisis ini menunjukkan bahwa gen *PaCs* pada *K. alvarezii* transgenik putatif di bawah kendali promotor 35S CaMV. Jadi, satu tunas *K. alvarezii* transgenik yang diambil secara acak dari tunas yang telah diisolasi DNA-nya adalah transgenik. Kombinasi primer ini juga digunakan untuk

analisis integrasi gen *PaCs* pada *Nicotiana tabacum* dan *Jatropha curcas* (Tistama, 2012).

KESIMPULAN

Regenerasi rumput laut hasil transformasi gen *PaCs* paling baik dipelihara pada media cair yang diperkaya dengan pupuk PES, dengan derajat keasaman pH = 6; dan *photoperiod* 12:12. Gen *PaCs* telah berhasil diintroduksi dan terintegrasi di dalam genom



Gambar 8. Hasil elektroforesis DNA genom rumput laut *K. alvarezii* menggunakan primer F 35s dan R PaCs. Lajur M = Marker 1 kb, A = kontrol air, P = kontrol + plasmid, T1 = Rumput laut transgenik putatif, Nt = non transgenik

Figure 8. Electrophoresis of DNA genome *K. alvarezii* transformed thalli *K. alvarezii* by PCR method. PCR product using F 35s dan R PaCs primers. M = 1 kb DNA marker, A = negative control (water), P = positive control (plasmid pMSH1-PaCs), T1 = putative transgenic, Nt = non-transgenic

rumpuit laut *K. alvarezii* di bawah kendali promoter 35S CaMV pada 1.300 bp dan 1.630 bp menggunakan primer F 35s dan R PaCs.

DAFTAR ACUAN

- Buch, A.D., Archana, G., & Kumar, N.G. 2008. Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* p4 under phosphorous deficiency. *Res. Microb.*, 159: 635-642.
- Cheney, D., Metz, B., & Stiller, J. 2011. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in the macroscopic marine red algae *Porphyra yezoensis*. *J. Phycol.*, 37: 11-13.
- Cheng, R., Ruijuan, M.A., Ke, L., Hui, R., Xiangzhi, L., Zhaokai, W., Shanjun, Y., & Yong, M. 2011. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Micres.*, 25,421: 1-8.
- Collen, J.U. 1995. Farming and physiology of the red algae *Euclidean* growing commercial importance in East Africa. *Ambio.*, 24: 7-8.
- Daud, R.F., Widyastuti, U., Suharsono, Suryati, E., & Parenrengi, A. 2013. Introduksi gen sitrat sintase ke dalam rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Ris. Akuakultur*, 8(2): 201-208.
- Da Silva, J.A. & Fukasi, S. 2001. The impact of carbenicillin, cefotaxime and vancomycin on chrysanthemum and tobacco morphogenesis and *Agrobacterium* growth. *J. Appl. Hort.*, 3(1): 3-12.
- De Baar, H.J.W. & La Roche, J. 2003. Metals in the oceans; evolution, biology and global change. *Springer Verlag*. Berlin (DE), p. 79-105.
- Diantariani, N.P., Sudiarta, I.W., & Elantiani, N.K. 2008. Proses biosorpsi dan desorpsi ion Cr (IV) pada biosorben rumput laut *Euclidean spinosum*. *Jurnal Kimia*, 2(1): 45-52.
- Handayani, T. 2013. Konstruksi vektor biner dan transformasi gen *lisozim* pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Seminar hasil sekolah pasca sarjana. Bogor (ID). Institut Pertanian Bogor. Bogor, 27 hlm.
- Hiei, Y. & Komari, T. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocol*, 3(5): 824-826.
- Jickells, T. 1995. Atmospheric inputs of metals and nutrients to the oceans: their magnitude and effects. *Marine Chem.*, 48(3-4): 199-214.
- Joubert, Y. & Fleurence, J. 2005. DNA isolation protocol for seaweeds. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 23: 197a-197g.
- Koronfel, M. 1998. Effects of the antibiotics kanamycin, cefotaxime, and carbenicillin on the differentiation of flax hypocotyls. *Arab J. Biotechnol.*, 1(1): 93-98.

- Largo, D.B., Faulkner, K., Adachi, M., & Nishijima, T. 1997. Direct enumeration of total bacteria from macroalgae by epifluorescence microscopy as applied to the flashy red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Glacilaria* spp. (Rhodophyta). *J. Phycol.*, 33: 554-557.
- Mtolera, M.S.P., Collén, J., Pedersen, M., & Semesi, A.K. 1995. Destructive hydrogen peroxide production in *Eucheuma denticulatum* (Rhodophyta) during stress caused by elevated pH, high light intensities and competition with other species. *Eur. J. Phycol.*, 30: 289-297.
- Nagy, N.E., Dalen, L.R., Jones, D.L., Swensen, B., Fossdal, C.G., & Eldhuset, T.D. 2004. Cytological and enzymatic responses to aluminum stress in root tips of Norway spruce seedlings. *New Phytol.*, 163(3): 595-607.
- Okkels, F.T. & Pedersen, M.G. 1988. The toxicity to plant tissue and to *Agrobacterium tumefaciens* of some antibiotics. *Acta Hort.*, 255: 199-207.
- Rochyatun, E. & Rozak, A. 2007. Pemantauan kadar logam berat dalam sedimen di perairan Teluk Jakarta. *Makara, Sains*, 11(1): 28-36.
- Suryati, E. & Mulyaningum, S.R.H. 2009. Regenerasi rumput laut *Kappaphycus alvarezii* (Doty) melalui induksi kalus dan embrio dengan penambahan hormon perangsang tumbuh secara *In vitro*. *J. Ris. Akuakultur*, 4(1): 39-45.
- Taiz, L. & Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd edition. Sinauer Associated Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts, 637 pp.
- Tistama, R. 2012. *Isolasi dan introduksi gen sitrat sintase dari Pseudomonas aeruginosa ke dalam tanaman untuk meningkatkan toleransi terhadap cekaman aluminium*. Disertasi. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Vairappan, C.S. 2006. Seasonal occurrences of epiphytic algae on the commercially cultivated red algae *Kappaphycus alvarezii* (Solieriales, Gigartinales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol.*, 18: 611-617.
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., & Matsumoto, H. 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.*, 125: 199-208.