

INTRODUKSI GEN METALLOTHIONEIN TIPE II KE DALAM RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii* MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens*

Ulia Fajriah¹⁾, Emma Suryati^{2*)}, Andi Parenrengi^{3**)}, Suharsono^{3***)}, dan Utut Widyastuti^{3***)}

¹⁾ Mahasiswa Bioteknologi Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor
Jl. Raya Darmaga, Gedung Andi Hakim Nasoetion Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
E-mail: uliafajriah@gmail.com

^{2*)} Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau
Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan

^{3**)} Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi dan
Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor
Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 2 April 2014; Revisi final: 30 Oktober 2014;
Disetujui publikasi: 10 November 2014)

ABSTRAK

Kappaphycus alvarezii adalah jenis alga merah yang memproduksi kappa karagenan yang sangat penting untuk industri makanan, farmasi, dan kosmetik. Untuk meningkatkan produksi, diperlukan ketersediaan bahan baku yang baik. Salah satu yang memengaruhi ketersediaan bahan baku adalah kondisi lingkungan perairan untuk budidaya. Metallothionein (MT) adalah protein yang memiliki kemampuan untuk mengikat ion logam seperti Cd, Zn, dan Cu. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengintroduksi gen Metallothionein Tipe II (MaMt2) ke dalam genom *K. alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Talus rumput laut diinokulasi dengan *A. tumefaciens* mengandung plasmid pIG6-SMt2 yang membawa gen MaMt2, selanjutnya dilakukan seleksi bertingkat menggunakan higromisin 10 mg/L dan 20 mg/L. Hasil efisiensi transformasi yang diperoleh adalah 27,4%, efisiensi regenerasi tunas transgenik adalah 27,6%. Analisis molekuler dengan PCR menunjukkan bahwa 13 tunas transgenik mengandung gen MaMt2. Tunas transgenik putatif ditumbuhkan hingga menjadi talus baru dan dapat dilakukan uji tantang pada penelitian selanjutnya.

KATA KUNCI: *Kappaphycus alvarezii*, MaMt2, transformasi genetik, alga merah

ABSTRACT: *Introduction of Metallothionein Type II gene to Kappaphycus alvarezii using Agrobacterium tumefaciens. By: Ulia Fajriah, Emma Suryati, Andi Parenrengi, Suharsono, and Utut Widyastuti*

Kappaphycus alvarezii is a type of red algae producing kappa carrageenan that very important for food industry, pharmaceuticals, and cosmetics. To increase the production of raw materials, we need availability of good raw materials. One that affects the availability of raw materials is water environment conditions for cultivation. Metallothionein (MT) is a protein that has the ability to bind metal ions such as Cd, Zn, and Cu. The aims of this study was to introduce Metallothionein Type II genes (MaMt2) into the genome *K. alvarezii* using *Agrobacterium tumefaciens*. Thallus

seaweed inoculated with *A. tumefaciens* containing plasmid pIG6-SMt2 carrying MaMt2 gene, then performed multilevel selection using hygromycin of 10 mg/L and 20 mg/L. The transformation efficiency in *K. alvarezii* was 27.4%, the efficiency regeneration of transgenic shoots was 27.6%. Molecular analysis by PCR showed that 13 putative transgenic shoots was contained MaMt2 gene. Putative transgenic shoots were grown up to be a clump of new thallus and challenge test can be done in the future studies.

KEYWORDS: *Kappaphycus alvarezii*, **MaMt2**, genetic transformation, red algae

PENDAHULUAN

Kappaphycus alvarezii (DOTY) atau *Eucheuma cottonii* merupakan spesies alga merah (Rhodophyta, Gigartinales, Areschougiales) yang mengandung karagenan jenis kappa, jenis fikokoloid yang sangat penting bagi industri makanan, farmasi, dan kosmetik (Bindu & Levine, 2011; Hayashi *et al.*, 2011). Berdasarkan data yang dirilis oleh Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP) produksi rumput laut tahun 2012 meningkat menjadi 6,2 juta ton dibandingkan dengan produksi tahun 2011 yang mencapai 5,1 juta ton. KKP juga menargetkan bahwa pada tahun 2014 produksi rumput laut bisa mencapai 10 juta ton (Kembaren, 2013). Peningkatan produksi tersebut harus diimbangi dengan ketersediaan bahan baku yang memiliki kualitas tinggi. Ketersediaan bahan baku dipengaruhi oleh musim, salinitas, suhu, intensitas cahaya, dan kondisi lingkungan perairan yang digunakan untuk membudidayakan rumput laut (Yulianto & Mira, 2009; Mamboya, 2007).

Polusi menjadi masalah yang serius pada lingkungan perairan pantai yang berakibat langsung terhadap pertumbuhan dan sintasan organisme pantai khususnya pada makroalga (Mamboya, 2007). Efek toksisitas logam berat seperti Cu pada alga sama dengan tanaman tingkat tinggi, menyebabkan fotoinhibitor pada fotosistem II yang berakibat pada *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan disfungsi kloroplas (Owen *et al.*, 2012).

Metallothionein (MT) merupakan protein dengan berat molekul rendah (4-8 kDa), kaya akan sistein dengan kemampuan mengikat atom logam (Moilanen *et al.*, 1999; Mir *et al.*, 2004). Sintesis metallothionein tidak hanya diinduksi oleh beberapa logam berat seperti Cd, Zn, dan Cu, tetapi juga menjadi mediator pada stres fisiologis, termasuk hormon dan ROS (Shestivska *et al.*, 2011). Anggraito *et al.* (2012) telah berhasil melakukan transformasi genetik

pada tanaman *Nicotiana benthamiana* dengan menggunakan gen *MaMt2* yang berasal dari *Melastoma affine* (Suharsono *et al.*, 2009), sehingga diperoleh tanaman *N. benthamiana* transgenik.

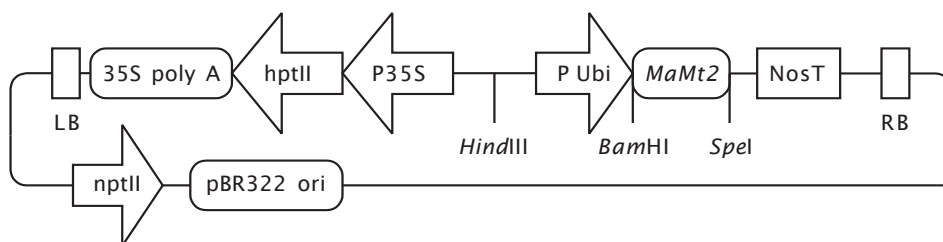
Teknologi rekayasa genetika pada rumput laut penting untuk peningkatan mutu genetik rumput laut. Peningkatan mutu genetik dapat dilakukan dengan kultur jaringan, fusi protoplas, dan transformasi genetik pada rumput laut *Porphyra yezoensis* (Cheney, 2000). Metode transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* umum digunakan pada tanaman tingkat tinggi, fungi, khamir, dan sel manusia (Vieira & Camilo, 2011).

Untuk meningkatkan toleransi rumput laut *K. alvarezii* terhadap kondisi lingkungan perairan yang tercemar logam berat, maka dapat dilakukan perbaikan genetik dengan mentransfer gen *MaMt2* pada *K. alvarezii* menggunakan perantara *A. tumefaciens*. Dengan meningkatkan ekspresi gen *MaMt2*, diharapkan akan meningkatkan pertahanan rumput laut terhadap kondisi lingkungan yang ekstrim. Penelitian ini bertujuan untuk mengintroduksi gen *MaMt2* ke dalam genom rumput laut *K. alvarezii* melalui perantara *A. tumefaciens*.

BAHAN DAN METODE

Bahan Penelitian

Bahan percobaan yang digunakan meliputi talus rumput laut *K. alvarezii* yang diperoleh dari Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP) Maros, larutan media pertumbuhan rumput laut *Provasoli Enrichment Seawater* (PES), kultur *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 mengandung plasmid pIG6-SMt2 yang membawa gen *MaMt2* (Suharsono *et al.*, 2009) dengan promotor ubiquitin (Anggraito, 2012). Peta plasmid pIG6-SMt2 yang membawa gen *MaMt2* disajikan pada Gambar 1. Pasangan primer UbiQF (5'-



Gambar 1. Peta fisik plasmid pIG6-SMt2 (Anggraito, 2012)

Figure 1. Physical map of the plasmid pIG6-SMt2 (Anggraito, 2012)

TGATGGCCCTGCCTTCATACG-3') dan NosTR2 (5'-TGCCGGTCTTGGGATGATTA-3'), SMt2UF (5'-TCATGGATCCATGTCTTGGCTGTGGAGG-3') dan NosTR1 (5'-CTCATAAATAACGTCATGCATTACA-3') yang didesain oleh Anggraito (2012) digunakan untuk mendeteksi keberadaan gen *MaMt2* di dalam genom rumput laut transgenik.

Metode Penelitian

Persiapan rumput laut

Metode persiapan hingga pemeliharaan bibit rumput laut menggunakan metode yang dilakukan oleh Suryati *et al.* (2011) yang telah dimodifikasi. Talus rumput laut yang digunakan sebagai eksplan diperoleh dari BPPBAP, Maros. Talus yang sehat dipotong sepanjang 5 cm dan dibersihkan dari kotoran yang menempel. Sterilisasi dilakukan menggunakan 1% larutan iodine dan 0,05% larutan antibiotik. Eksplan yang telah steril ditumbuhkan pada media PES cair, menggunakan *shaker* kecepatan 100 rpm dengan suhu 23°C selama satu minggu. Eksplan yang bertahan hidup selanjutnya dipotong sepanjang 2 cm dan dikultur selama satu bulan dengan subkultur dilakukan setiap dua minggu sekali. Eksplan siap diinokulasi dengan *A. tumefaciens*.

Kokultivasi

Metode transformasi genetik pada rumput laut *K. alvarezii* menggunakan metode Cheney (2000) dan Anggraito (2012) yang telah dimodifikasi. Bakteri *A. tumefaciens* strain LBA 4404 yang mengandung plasmid pIG6-SMt2 ditumbuhkan pada 5 mL media LB yang mengandung antibiotik (100 mg/L streptomisin, 50 mg/L kanamisin, 50 mg/L higromisin) pada suhu ruangan, digoyang dengan kecepatan 220 rpm selama dua hari. Suspensi bakteri yang tumbuh selanjutnya disubkultur pada media yang sama selama 18 jam. Bakteri yang

tumbuh selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama lima menit. Pelet bakteri yang diperoleh disuspensi dengan media PES cair dan penambahan 100 µM *acetosyringone* hingga mencapai $OD_{600} = 0,5-1$.

Eksplan yang siap ditransformasi sebelumnya dilukai dengan menggunakan jarum steril pada permukaan, selanjutnya eksplan dimasukkan ke dalam media infeksi selama 15-60 menit menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Eksplan yang telah diinfeksi dipindahkan pada media kokultivasi berupa media PES cair yang diberi 100 µM *acetosyringone* selama tiga hari pada kondisi gelap.

Seleksi transforman dan identifikasi rumput laut transgenik

Eksplan yang telah dikokultivasi selanjutnya dibilas dengan air laut steril dan dipindahkan pada media pemulihan (media PES cair dengan penambahan ZPT 0,1 NAA: 0,5 BAP) selama dua minggu. Eksplan yang tumbuh pada media pemulihan dipindahkan pada media seleksi, yaitu media PES cair yang mengandung higromisin 10 mg/L (seleksi I) dan diinkubasi selama tujuh hari. Eksplan yang hidup pada media seleksi I dipindahkan pada media seleksi II (higromisin 20 mg/L) dan diinkubasi selama 14 hari. Eksplan yang tumbuh pada media seleksi selanjutnya dipindahkan pada media regenerasi yang sama dengan media pemulihan hingga tumbuh tunas.

Sebanyak 0,1 g tunas yang tumbuh pada media regenerasi diisolasi menggunakan metode CTAB oleh Doyle & Doyle (1990) dengan modifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah penggantian suhu inkubasi 65°C dengan suhu 37°C selama satu jam. DNA hasil isolasi selanjutnya dianalisis PCR dengan menggunakan pasangan primer UbiQF dan NosTR2, dan pasangan primer Smt2UF dan NosTR1. Campuran reaksi yang digunakan adalah 100 ng DNA

genom; 0,5 μ M masing-masing primer *Foward* dan *Reverse* (10 pmol/ μ L); 1x *buffer* PCR; 0,2 mM dNTPmix; 1.25 U *Tag* DNA *Polymerase* dan ditambah dengan ddH₂O hingga volume total reaksi menjadi 20 μ L. Analisis dilakukan dengan kondisi PCR: praPCR 95°C, lima menit; denaturasi 94°C, 30 detik; penempelan primer 60°C, 30 detik; pemanjangan 72°C, 30 detik dan reaksi dilakukan sebanyak 30 siklus; dan diakhiri dengan pascaPCR 20°C, sepuluh menit. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan 1% gel agarosa pada 100 volt selama 28 menit. Gel divisualisasi di atas UV transluminator setelah diwarnai dengan 0,5 mg/L larutan etidium bromida.

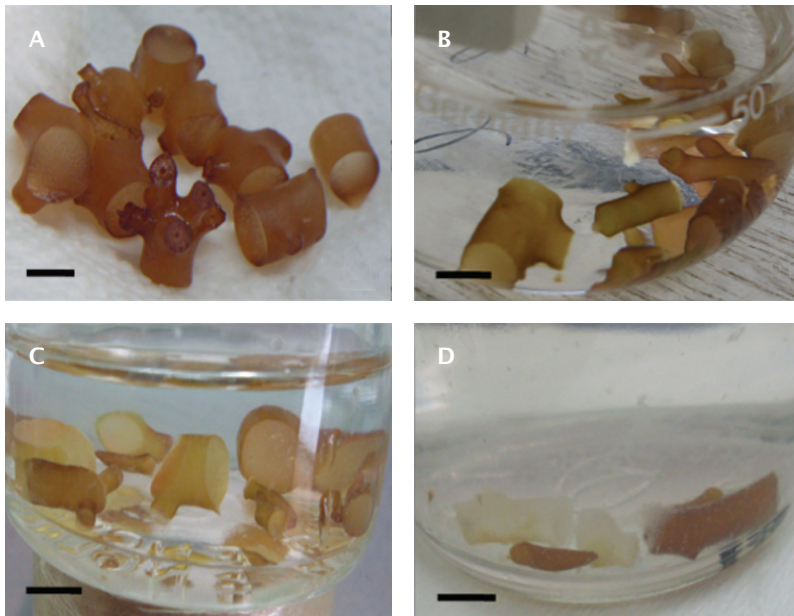
HASIL DAN BAHASAN

Transformasi *K. alvarezii* dengan Gen *MaMt2*

Talus yang telah disterilisasi dipotong dengan ukuran 2 cm (Gambar 2A) dan ditumbuhkan pada media PES cair. Jika pada luka

bekas potongan mulai tertutup atau tumbuh bakal tunas baru (Gambar 2B), maka eksplan siap untuk diinokulasi dengan *A. tumefaciens*. Talus yang telah ditumbuhkan pada media kokultivasi (Gambar 2C) terdapat dua jenis, yaitu: 1) Talus yang tidak mengalami perubahan bentuk dan warna, berwarna coklat tua; 2) Talus yang mengalami perubahan warna menjadi coklat muda dan pada bagian ujung terdapat warna kemerahan dan terdapat kerutan pada dinding talus. Eksplan yang mengalami perubahan warna umumnya tidak bertahan lama pada media pemulihan, hal ini ditandai dengan perubahan talus menjadi berwarna putih transparan dan akhirnya mati (Gambar 2D).

Untuk mengetahui eksplan yang terintegrasi dengan gen *MaMt2*, maka dilakukan seleksi menggunakan agen seleksi yang terdapat pada peta plasmid pIG6-SMt2 yaitu higromisin. Higromisin dan kanamisin adalah agen seleksi yang umum digunakan untuk menentukan keberhasilan dari transformasi



Gambar 2. Tahap inokulasi talus *K. alvarezii*; eksplan yang telah dipotong dan siap diadaptasikan pada media PES cair (A); eksplan yang siap ditransformasi (B); eksplan pada media kokultivasi (C); eksplan pada media pemulihan (D). Bar = 1 cm

Figure 2. Inoculation stage of *K. alvarezii* thallus; explants were cut and ready to be adapted to PES liquid medium (A); explants were ready to be transformed (B); explants on cocultivation medium (C); explants on recovery medium (D). Bar = 1 cm

(Torregrosa *et al.*, 2000). Seleksi higromisin pada penelitian ini dilakukan secara bertingkat, seleksi I dengan konsentrasi higromisin 10 mg/L selama tujuh hari, dan seleksi II dengan konsentrasi higromisin 20 mg/L selama 14 hari. Pada penelitian transformasi *K. alvarezii*, Daud (2013) melakukan seleksi menggunakan higromisin dengan konsentrasi 10 mg/L, dan Handayani (2012) menggunakan higromisin dengan konsentrasi 20 mg/L. Menurut Anggraito (2012), seleksi bertingkat dimaksudkan untuk mendapatkan tanaman transgenik dengan persentase yang lebih tinggi dan mengurangi adanya tanaman transgenik palsu. Tanaman transgenik palsu menurut Torregrosa *et al.* (2000), adalah tanaman yang mampu bertahan hidup pada media seleksi, tetapi tidak membawa gen ketahanan terhadap agen seleksi tersebut.

Eksplan yang hidup dari media pemulihan ditumbuhkan pada media seleksi I dengan konsentrasi higromisin 10 mg/L selama tujuh hari. Pada media seleksi I ini hanya 146 eksplan yang bertahan hidup dengan persentase regenerasi sebesar 34,5% (Tabel 1). Selanjutnya eksplan tersebut ditumbuhkan pada media seleksi II dengan konsentrasi higromisin yang ditingkatkan menjadi 20 mg/L. Pada media seleksi II hanya 116 eksplan yang dapat bertahan hidup dengan persentase regenerasi sebesar 27,4% (Tabel 1). Persentase eksplan yang hidup pada media seleksi higromisin ini lebih tinggi dibandingkan dengan persentase hasil seleksi higromisin pada penelitian transformasi *K. alvarezii* yang dilakukan oleh Handayani (2012) sebesar 23,56% dan penelitian yang dilakukan oleh Daud (2013) sebesar 7,5%. Faktor yang mempengaruhi keberhasilan tersebut adalah eksplan yang digunakan untuk kokultivasi sudah beradaptasi dengan baik dengan media pertumbuhannya, ditandai dengan bekas luka potongan yang mulai menutup bahkan ada eksplan yang mulai tumbuh bakal tunas. Selain itu, pada penelitian ini menggunakan seleksi bertahap mulai dari dosis higromisin terendah 10 mg/L kemudian ditingkatkan menjadi 20 mg/L pada media pertumbuhannya PES cair.

Eksplan yang diperoleh dari hasil seleksi higromisin selanjutnya ditumbuhkan pada media pemulihan. Suryati & Mulyaningrum (2009) menyatakan bahwa kombinasi ZPT dari golongan auksin dan sitokinin pada media pertumbuhan akan menghasilkan kristal filamen dan embrio rumput laut. Pada penelitian

ini diperoleh tunas-tunas baru yang tumbuh pada eksplan yang ditransformasi (Gambar 3C). Tunas-tunas baru yang tumbuh selanjutnya disebut sebagai tunas transgenik putatif.

Tiga puluh dua eksplan yang tumbuh pada media regenerasi menghasilkan 135 tunas baru (27,6%) dan rata-rata pertumbuhan tunas per eksplan sebesar 4,2. Nilai ini lebih rendah dibandingkan dengan persentase tunas dari eksplan yang tidak diinokulasi dengan *Agrobacterium* yaitu sebesar 70,8% dengan rata-rata pertumbuhan tunas per eksplan sebesar 5,5. Persentase tunas transgenik putatif ini lebih tinggi dibandingkan dengan persentase tunas transgenik putatif dari Handayani (2012) yaitu sebesar 11,32% (kemungkinan dikarenakan penelitian yang dilakukan oleh Handayani memberikan perlakuan antibiotik pada eksplan terlalu lama sehingga banyak menghambat terbentuknya tunas pada eksplan); dan lebih rendah dibandingkan dengan tunas transgenik putatif dari Daud (2013) yaitu sebesar 100%. Torregrosa *et al.* (2000) menyatakan bahwa perlakuan antibiotik khususnya higromisin akan menghambat pertumbuhan dan perkembangan tunas pada eksplan. Perkembangan eksplan pada media seleksi disajikan pada Gambar 3.

Analisis Integrasi Gen *Mamt2* pada *K. alvarezii*

Tunas baru yang tumbuh pada eksplan di media regenerasi selanjutnya diisolasi DNA dan dianalisis PCR. Sebanyak 135 tunas baru yang tumbuh pada eksplan, dianalisis menggunakan pasangan primer dari promotor-terminator dan gen-terminator. Hasil analisis PCR dapat dilihat pada Gambar 4.

Analisis PCR pada tunas transgenik putatif pada kolom 1-4 menggunakan primer Ubi QF-NosTR2, menghasilkan pita berukuran 431 pb. Hasil ini sesuai dengan kontrol positif dari plasmid pIG6-SMt2. Hasil PCR tersebut dikonfirmasi ulang menggunakan primer Smt2F-NosTR1 dengan pita berukuran 450 pb. Pita yang dihasilkan sesuai dengan kontrol positif yang menggunakan DNA dari plasmid pIG6-SMt2. Pita yang dihasilkan menunjukkan bahwa tunas rumput laut yang dianalisis adalah tanaman transgenik yang mengandung gen *MaMt2*.

Konfirmasi menggunakan primer yang sama juga dilakukan pada DNA rumput laut non-transgenik (Gambar 4 kolom 2 dan 9). Hasil

Tabel 1. Perkembangan eksplan selama transformasi dan seleksi
 Table 1. Development of explants during transformation and selection

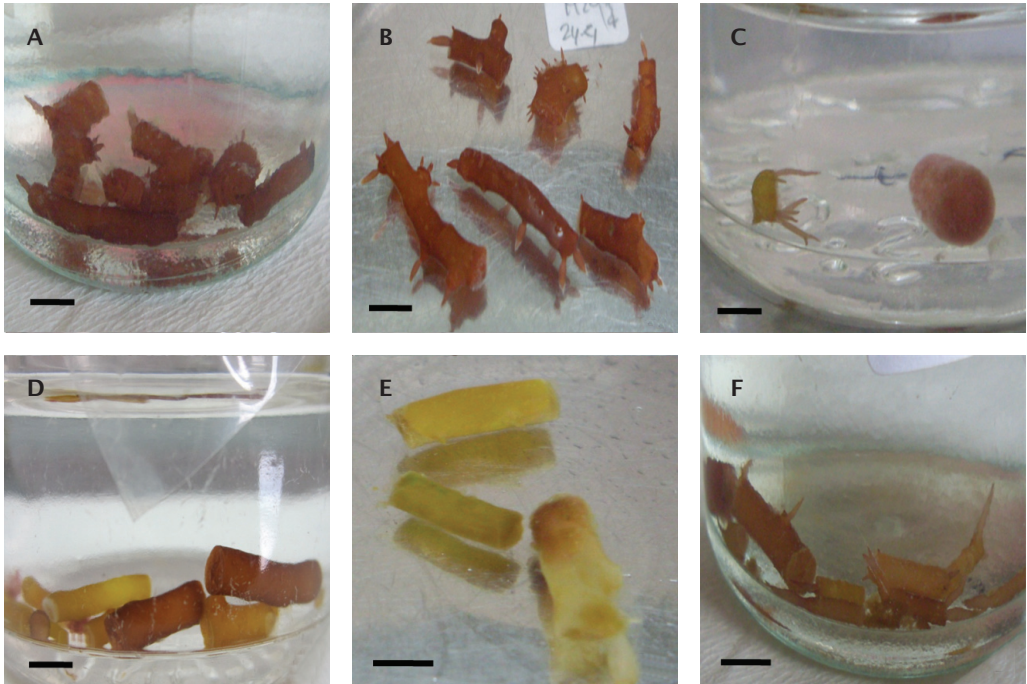
Perlakuan Treatments	Jumlah eksplan Number of explants	Seleksi (Selection)				Jumlah eksplan bertunas Number of explants sprouted	Jumlah tunas Number of sprouts	Persentase eksplan bertunas Percentage of explants sprouted
		I		II				
		Hidup Life	Mati Dead	Hidup Life	Mati Dead			
Inokulasi* Inoculation*	423	146 (34.5%)	277	116 (27.4%)	30	32	135	27.6%
Tidak Diinokulasi** Not inoculated**	46	-	-	0	46	-	-	-
Tidak Diinokulasi*** Not inoculated***	48	-	-	-	-	34	186	70.8%

Keterangan (Note):

* Diinokulasi dengan *A. tumefaciens* (Inoculated with *A. tumefaciens*)

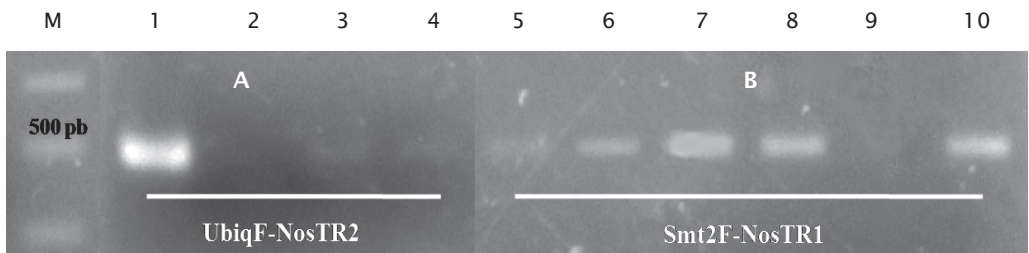
** Ditumbuhkan pada media hiromisin 20 mg/L (Grown in hygromycin medium at 20 mg/L)

*** Ditumbuhkan pada media yang tidak mengandung higromisin (Grown in no hygromycin medium)



Gambar 3. Perkembangan eksplan pada media seleksi; eksplan transforman di media seleksi I (higromisin 10 mg/L) (A); eksplan transforman di media seleksi II (higromisin 20 mg/L) (B); eksplan transforman di media regenerasi (C); eksplan non-transforman di media seleksi I (higromisin 10 mg/L) (D); eksplan non-transforman di media seleksi II (higromisin 20 mg/L) (E); eksplan non-transforman di media regenerasi (F) (Bar = 1 cm)

Figure 3. The development of explants on selection medium; explants in first selection medium (hygromycin 10 mg/L) (A); explants in second selection medium (hygromycin 20 mg/L) (B); explants in regeneration medium (C); explants non-transformants in first selection medium (hygromycin 10 mg/L) (D); explants non-transformants in second selection medium (hygromycin 20 mg/L) (E); explant non-transformants in regeneration medium (F) (Bar = 1 cm)



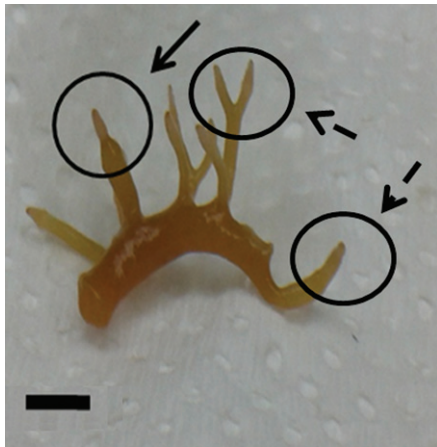
Gambar 4. Hasil analisis PCR; primer UbiqF-NosTR2 (1-4) (A) dan primer Smt2F-NosTR1 (5-10) (B); Kolom 1 & 10 = produk PCR dengan cetakan berupa plasmid pIG6-SMt2 sebagai kontrol positif; 2 & 9 = rumput laut non-transforman (NT); 3-8 = rumput laut transforman; M = marker 1 Kb

Figure 4. PCR analysis result; UbiqF-NosTR2 primers (1-4) (A) and Smt2F-NosTR1 primers (5-10) (B); column 1 & 10 = PCR product with template plasmid pIG6-SMt2 as a positive control; 2 & 9 = non-transformants seaweed (NT); 3-8 = transformants seaweed; M = marker 1 Kb

analisis PCR pada sampel rumput laut non-transgenik tidak menghasilkan pita DNA. Dengan demikian dapat dipastikan bahwa primer yang digunakan spesifik terhadap promotor dan terminator yang terdapat pada plasmid pIG6-SMt2. Dari 135 tunas transgenik putatif yang tumbuh, jumlah tunas yang positif PCR adalah 13 sampel tunas dengan persentase sebesar 9,63%.

Morfologi Rumput Laut Transgenik Putatif

Eksplan yang mengandung tunas transgenik putatif selanjutnya ditumbuhkan pada media pertumbuhannya (media PES dengan penambahan ZPT 0,5 BAP: 0,1 NAA), namun tunas tersebut mengalami pertumbuhan yang lebih lambat jika dibandingkan dengan tunas non-transgenik pada eksplan yang sama. Tunas transgenik putatif yang berumur tiga bulan memiliki panjang tunas kurang dari 1 mm, sedangkan tunas non-transgenik dengan umur yang sama memiliki panjang tunas 5 mm (Gambar 5). Pengukuran panjang tunas dilakukan setelah pemotongan ujung tunas untuk isolasi DNA. Perbandingan pertumbuhan tunas rumput laut transgenik putatif dengan tunas non-transgenik dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Pertumbuhan tunas transgenik putatif (tanda panah) dan non-transgenik putatif (tanda panah putus-putus) pada eksplan yang sama (Bar = 1 mm)

Figure 5. Growth of transgenic putative shoots (arrow) and non-transgenic putative (dashed arrows) at the same explants (Bar = 1 mm)

Tunas transgenik putatif yang diperoleh belum dapat dilakukan uji tantang dengan media yang mengandung logam berat, karena jumlah sampel tunas yang terlalu sedikit. Untuk itu, tunas transgenik putatif selanjutnya ditumbuhkan di dalam tabung erlenmeyer hingga tunas tumbuh menjadi talus baru yang nantinya dapat dipindahkan ke dalam akuarium dan dilakukan pengujian dengan menggunakan air laut yang diberi penambahan logam dengan konsentrasi tertentu.

KESIMPULAN

Gen *MaMt2* pada plasmid pIG6-SMt2 telah berhasil diintroduksi ke dalam rumput laut *K. alvarezii* melalui perantara *A. tumefaciens*. Transformasi genetik diperoleh 13 tunas transgenik putatif dengan dengan persentase pertumbuhan tunas sebesar 27,6%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih diberikan atas riset kerja sama Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP), Maros dengan PPSHB-IPB atas nama Dr. Utut Widyastuti yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Anggraito, Y.U. (2012). *Transformasi genetik Nicotiana benthamiana L. dan kedelai dengan gen MaMt2 penyandi metallothionein tipe II dari Melastoma malabathricum L.* Disertasi. Bogor [ID]: Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Anggraito, Y.U., Suharsono, Pandal, S.J., & Sopandie, D. (2012). Konstruksi vektor ekspresi gen *MaMt2* penyandi metallothionein tipe II dan introduksinya ke dalam *Nicotiana benthamiana*. *Forum pascasarjana*, 35(3), 179-188.
- Bindu, M.S. & Levine, I.A. (2011). The commercial red seaweed *Kappaphycus alvarezii* an overview on farming and environment. *Journal of applied phycology*, 23, 789-796.
- Cheney, D.P. (2000). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of multicellular marine algae, resultant strains and their products. Northeastern University (Huntington Avenue Boston) U.S., 18 pp.
- Daud, R.F. (2013). *Introduksi gen sitrat sintase ke dalam rumput laut Kappaphycus alvarezii menggunakan Agrobacterium tumefaciens.* Tesis. Bogor [ID]: Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Handayani, T. (2012). *Konstruksi vektor biner dan transformasi gen lisozim pada rumput laut Kappaphycus alvarezii menggunakan Agrobacterium tumefaciens*. Tesis. Bogor [ID]: Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor,
- Hayashi, L., Faria, G.S.M., Nunes, B.G., Zitta, C.S., Scariot, L.A., Rover, T., Felix, M.R.L., & Bouzon, Z.L. (2011). Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield, and cellular structure of *Kappaphycus alvarezii* (rhodophyta, gigartinales) cultured in vitro. *Journal of applied phycology*, 23, 439-447.
- Kembaren, L. (2013). Ekspor rumput 2013, US\$230 Juta. *Jurnal Nasional*, 10. Retrived from jurnal nasional website: <http://www.jurnas.com/halaman/10/2013-01-17/232069>
- Mamboya, F.A. (2007). *Heavy metal contamination and toxicity: Studies of macroalgae from the tanzania coast*. Stockholm University Library. Stockholm. U.S., p. 1-48.
- Mir, G., Dome'nech, J., Hugueta, G., Guo, W.J., Goldsbrough, P., Atrian, S., & Molinas, M. (2004). A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 55(408), 2,483-2,493.
- Moilanen, Lori, H., Fukushige, T., & Freedman, J.H. (1999). Identification of upstream regulatory elements and transcription factors responsible for cell-specific expression of the metallothionein genes from *Caenorhabditis elegans*. *Journal of biological chemistry*, 274(42), 29,655-29,665.
- Owen, J.R., Morris, C.A., Nicolaus, B., Harwood, J.L., & Kille, P. (2012). Induction of expression of a 14-3-3 gene in response to copper exposure in the marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Ecotoxicology*, 21, 124-138.
- Shestivska, S., Adam, V., Prasek, J., Macek, T., Mackova, M., Havel, L., Diopan, V., Zehnalek, J., Hubalek, J., & Kizek, R. (2011). Investigation of the antioxidant properties of metallothionein in transgenic tobacco plants using voltammetry at a carbon paste electrode. *International Journal of electrochemical science*, 6, 2,869-2,883.
- Suharsono, Trisnaningrum, N., Sulistyaningsih, L.D., & Widyastuti, U. (2009). Isolation and cloning of cDNA of gene encoding for metallothionein type 2 from *Melastoma affine*. *Biotropia*, 16(1), 28-37.
- Suryati, E. & Mulyaningrum, 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.
- Suryati, E., Fadilah, S., & Tenriulo, A. (2011). Perkembangan kristal filamen serta pembentukan mikropropagula rumput laut *Kappaphycus alvarezii* melalui induksi kalus pada media PES 1/20.
- Torregrosa, L., Lopez, G., & Bouquet, A. (2000). Antibiotic sensitivity of grapevine: a comparison between the effect of hygromycin and kanamycin on shoot development of transgenic 110 richter rootstock (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*). *South african journal of enology and viticulture*, 21(1), 32-39.
- Vieira, A.L.G. & Camilo, C.M. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 806-811.
- Yulianto, K. & Mira, S. (2009). Budidaya makro alga *Kappaphycus alvarezii* (Doty) secara vertikal dan gejala penyakit "ice-ice" di perairan Pulau Pari. *Dalam* Juwana, S. & Riyatno (Eds.), *Oseanologi dan limnologi di Indonesia*. Pusat Penelitian Oceanografi dan Penelitian Limnologi. LIPI. Jakarta, 35(3), 325-334.