

INTRODUKSI GEN *Sitrat Sintase* KE DALAM RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii* MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens*

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

^{*)} Mahasiswa Program Studi Bioteknologi SPs IPB

Kampus IPB Darmaga, Bogor

^{**)} Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, IPB, dan Departemen Biologi,
FMIPA IPB

Kampus IPB Darmaga, Bogor

E-mail: *Ututsuharsono2002@yahoo.com*

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

(Naskah diterima: 12 Juli 2013; Disetujui publikasi: 29 Juli 2013)

ABSTRAK

Kappaphycus alvarezii merupakan salah satu rumput laut merah yang bernilai ekonomis penting. *Ice-ice* merupakan penyakit yang paling umum menyerang rumput laut dan menyebabkan menurunnya produksi rumput laut. Penyakit ini disebabkan oleh perubahan salinitas, suhu dan pencemaran logam berat. Asam sitrat digunakan sebagai pengkelat logam berat. Introduksi gen *sitrat sintase* ke dalam genom tanaman diketahui dapat mengurangi cekaman oksidatif. Penelitian ini bertujuan untuk mengintroduksi gen *sitrat sintase* ke dalam genom *K. alvarezii* menggunakan perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Berdasarkan eksplan yang tahan pada media seleksi higromisin, efisiensi transformasi pada *K. alvarezii* sebesar 7,5 %. Efisiensi regenerasi tunas transgenik putatif sebesar 100%, efisiensi tunas non transgenik sebesar 100%. Analisis molekular menggunakan teknik PCR, satu dari lima *K. alvarezii* transgenik putatif mengandung transgen *PaCS* dibawah kendali promoter 35S CaMV.

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

ABSTRACT: *Introduction of citrate syntase gene to Kappaphycus alvarezii using Agrobacterium tumefaciens. By: Ristanti Frinra Daud, Utut Widyastuti, Suharsono, Emma Suryati, and Andi Parenrengi*

Kappaphycus alvarezii is one of the seaweed species that has high economical value. *Ice-ice* is an important disease which can decrease the production of this seaweed. This disease can be caused by changes in salinity, ocean temperature, and heavy metals contamination. Citric acid has been used as chelating agent. Introduction of citrate synthase gene into plant had been reported to reduce oxidative stress. This research aimed to introduce citrate syntase gene into genome of *K. alvarezii* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Based on hygromycin resistant explant on hygromycin selection medium, the transformation efficiency in *K. alvarezii* was 7.5 %. The efficiency of shoot putative transgenic was 100%, the

efficiency of shoot non transgenic was 100%. Molecular analysis by PCR showed that one of five putative K. alvarezii transgenic was confirmed transgenic containing PaCs transgene under the control of 35S promoter.

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

PENDAHULUAN

Kappaphycus alvarezii (Doty) merupakan salah satu rumput laut merah yang bernilai ekonomis penting yang dinding selnya mengandung polisakarida tinggi, dan menjadi sumber penting karagenan di dunia (Bixler, 1996). Indonesia merupakan salah satu produsen rumput laut dengan rata-rata volume produksi 2.143.126 ton/tahun sejak tahun 2005 hingga 2010. Kebutuhan rumput laut dunia terus meningkat sekitar 27,63%, namun dalam menghadapi pangsa pasar tersebut Indonesia belum mampu memanfaatkannya secara optimal (FAO, 2010).

Menurunnya kualitas rumput laut salah satunya disebabkan oleh penyakit *ice-ice*. Penyakit tersebut kemungkinan besar lebih banyak disebabkan oleh cekaman lingkungan daripada serangan patogen. Hal ini didukung dengan ditemukan fakta bahwa *ice-ice* lebih menonjol pada lingkungan yang kualitas airnya rendah, pergantian air sedikit, salinitas rendah dan perubahan suhu air serta kandungan logam berat yang tinggi di perairan (Mtolera *et al.*, 1995). Logam berat yang banyak ditemukan di perairan adalah Pb, Mn, Cu, Cd dan Al (Jickells, 1955; De Baar & La roche, 2003).

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 memicu gangguan penyerapan hara dan air sehingga menyebabkan defisiensi unsur hara. Cekaman logam berat berupa timbal (Pb) dan tembaga (Cu) pada *Halophila ovalis* menyebabkan aktivitas metabolisme terhambat sehingga berdampak pada ukuran daun mengecil (Ambo-Rappe *et al.*, 2011). Oleh karena itu, perlu dilakukan suatu upaya untuk meningkatkan ketahanan rumput laut terhadap cekaman logam berat yang salah satunya adalah dengan meningkatkan produksi asam sitrat rumput laut

K. alvarezii. Sitrat diketahui sebagai asam organik yang paling kuat dalam mengikat logam berat seperti aluminium. Asam sitrat dihasilkan dari siklus Krebs atau siklus asam sitrat. 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 1287 pb dan menyandikan 428 asam amino telah berhasil diisolasi dan diintroduksi ke dalam tanaman *Nicotiana tabacum* dan *Jatropha curcas* melalui perantaraan *Agrobacterium tumefaciens*. Hasil uji tantang tembakau transgenik dengan cekaman Al menunjukkan bahwa tanaman transgenik yang mengandung gen PaCs lebih toleran dibandingkan dengan tanaman nontransgenik (Tistama, 2012).

Untuk 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 genetik. 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 & Mulyaningrum (2009).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan dari bulan September 2011 hingga Maret 2013, di Laboratorium Biotechnology Research Indonesia-

Netherland (BIORIN) Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB), Institut Pertanian Bogor.

Rumput laut merah jenis *K. alvarezii* yang digunakan sebagai tanaman yang akan diintroduksi dan diperoleh dari Laboratorium Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP) Maros. 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 diperoleh dari Laboratorium Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP), Maros-Sulawesi Selatan digunakan sebagai eksplan. Thalus yang sehat dari penyakit dan bersih dari lumut dipotong sepanjang 5 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 1 menit, kemudian disterilisasi menggunakan campuran antibiotik (penisilin, kanamisin, streptomisin, ripamfisin masing masing dengan konsentrasi 0,05%) untuk menghilangkan mikroba permukaan. Untuk inisiasi dan penyesuaian pada kondisi laboratorium, thalus yang telah dipotong dikultur pada air laut steril yang diperkaya dengan *provasoly enrichment seawater* (PES) (116,88 g NaCl; 650 NaNO₃ 1 M; 3,2 µL Na glycerophospat 0,5 M; 76 µL FeCl₃. 6H₂O 0,01 M; 780 µL Na₂ EDTA 2H₂O 0,01 M; 66 µL Buffer Tris 0,01 M; 7,2 mL H₃BO₃; 14 µL C₂SO₄ 0,005 M; 60 µL ZnSO₄ 7H₂O 0,005 M; 8 µL thia-

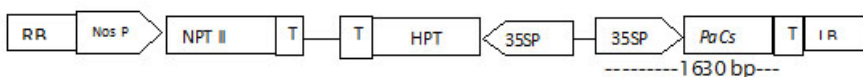
min 1 mg/mL; 0,8 µL biotin 1 mg/mL; 0,16 µL B12 10 mg/mL; 1 L aqudest steril) dengan foto periode 12 jam.

Kultur *A. tumefaciens*

A. tumefaciens yang membawa gen *PaCs* dikultur dalam 3 mL media LB (20% *Bacto tryptone*, 10% *Bacto yeast*, 20% NaCl) yang mengandung antibiotik 50 µg/mL streptomycin, 50 µg/mL kanamycin, 50 µg/mL higromisin dan diinkubasi dengan pengocok (*shaker*) dengan kecepatan 250 rpm, suhu 28°C selama 48 jam di ruang gelap. Setelah 48 jam biakan di subkultur lagi di dalam 20 mL LB selama 16 jam dengan kondisi yang sama. Selanjutnya kultur *A. tumefaciens* dimasukkan ke dalam tabung masing-masing 1,5 mL disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm (*Jouan centrifuge BR 4i*) selama 5 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; 0,05 g/100 mL glukosa) hingga nilai *optical density* (OD₆₀₀) 0,5.

Transformasi genetik *Kappaphycus 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*) selama 3-5 hari. Transformasi dimulai dengan mencuci potongan thalus menggunakan air laut steril 30 ppt, kemudian dikeringkan pada tisu steril. Thalus yang telah dicuci, kemudian diinokulasi 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; 0,05 g/100 mL glukosa) selama 15 menit. Thalus selanjutnya dikeringkan, pada tisu steril dan dipindahkan dalam media ko-kultivasi padat (25 ppt air laut; 0,3% *gelrite*;



Gambar 1. Konstruksi gen *PaCs* di dalam vektor ekspresi pMSH (Tistama, 2012)
 Figure 1. Construction of *PaCS* gene in pMSH expressing vector (Tistama, 2012)

100 µM asetosiringon; 0,05 g/100 mL glukosa) dan diinkubasi dalam ruangan gelap selama 2-3 hari. Selanjutnya thalus direndam di dalam air laut steril yang mengandung 200 mg/L cefotaxime selama 10 menit. Setelah itu thalus dibersihkan dan ditanam dalam media *recovery* (30 ppt air laut steril; 20 mL/L PES; 0,4% *bacto agar*). Setelah 1-2 minggu, thalus dipindahkan ke media seleksi padat (air laut steril 30 ppt; PES 20 mL/L; bacto agar 0,5%; higromisin 10 mg/L). Setelah itu thalus tersebut kemudian di biakkan di media PES cair tanpa antibiotik (20 mL/L PES; 30 ppt air laut steril) diruang kultur jaringan hingga beregenerasi membentuk tunas.

Analisis integrasi gen *PaCs* di dalam *K. alvarezii*

Analisis integrasi gen *PaCs* di dalam genom *K. alvarezii* transgenik dilakukan dengan PCR. DNA genom diisolasi yang menggunakan teknik isolasi Joubert & Fleurence (2005). 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 2 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

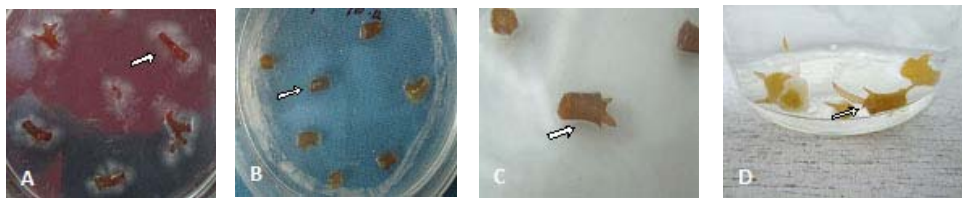
air kemudian divisualisasi dengan UV transiluminator.

HASIL DAN BAHASAN

Transformasi genetik *Kappaphycus alvarezii* dengan gen *Sitrat sintase*

Introduksi gen *PaCs* ke dalam genom *K. alvarezii* dilakukan melalui perantara *A. tumefaciens*. Transformasi menggunakan *A. tumefaciens* memiliki beberapa kelebihan yaitu di antaranya mudah dilakukan (Hiei & Komari, 2008). Kualitas eksplan yang digunakan dalam transformasi merupakan salah satu faktor yang menentukan keberhasilan transformasi. Eksplan yang digunakan pada penelitian ini adalah potongan thalus yang berwarna coklat tua dan tidak ada bagian eksplan yang mengalami perubahan warna setelah di tumbuhkan di media adaptasi. Thalus yang mengalami perubahan warna menjadi hijau tidak dapat digunakan dalam proses transformasi karena thalus tersebut tidak mampu beradaptasi dengan baik dan rentan terhadap kematian. Menurut Hiei & Komari (2008), eksplan yang mendukung kesuksesan transformasi adalah eksplan yang segar dan sehat.

Transformasi dilakukan berdasarkan kemampuan *A. tumefaciens* mentransfer T-DNA kedalam kromosom tanaman. Transformasi genetik menggunakan *A. tumefaciens* telah dilakukan pada *marine* makroalga yaitu *Porphyra yezoensis* (Cheney *et al.*, 2011). Pada penelitian ini kokultivasi dilakukan dengan perendaman thalus pada suspensi *A.*



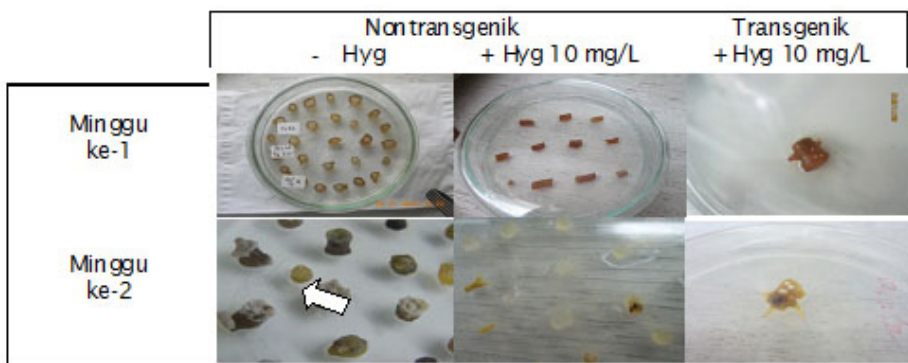
Gambar 2. Perkembangan transformasi rumput laut *K. alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* pada A= media kokultivasi padat; B= media *recovery*; C= media seleksi mengandung higromisin 10 mg/L; D= media aklimatisasi (PES cair) tanpa higromisin

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); D= acclimatization medium (liquid PES) without hygromycin

tumefaciens yang mengandung senyawa asetosiringon 100 μ M selama 10–15 menit yang selanjutnya dikeringkan kemudian ditanam pada media kokultivasi padat yang juga telah mengandung senyawa asetosiringon 100 μ M selama 2-3 hari pada ruang gelap dengan suhu 25°C (Gambar 2). Setelah dibiakkan di media kokultivasi, bakteri yang masih menempel pada thalus dibersihkan dengan perendaman di media yang mengandung cefotaxim. Cefotaxim ini berfungsi untuk membunuh *A. tumefaciens* tetapi tidak untuk rumput laut. Untuk melakukan regenerasi, thalus dipindahkan ke media *recovery* (Gambar 2). Konsentrasi cefotaxime yang digunakan pada penelitian ini lebih rendah daripada penggunaan konsentrasi cefotaxime pada penelitian tanaman tingkat tinggi. Konsentrasi cefotaxime yang efektif digunakan dalam mengurangi jumlah bakteri pada tanaman tingkat tinggi berkisar 250-1 500 μ g/mL (Da silva & Fukai, 2001). Pada konsentrasi yang tinggi, cefotaxime dapat merusak jaringan tanaman. Hasil penelitian Okkels & Paderson (1988) menunjukkan bahwa cefotaxim dalam konsentrasi yang tinggi dapat bersifat *phyto-toxic* pada perkembangan tanaman Bit. Pada dosis tertentu penggunaan cefotaxime pada proses transformasi tidak menghambat regenerasi tanaman (Koronfel, 1998).

Thalus yang mampu bertahan hidup pada media seleksi higromisin disebut thalus

transgenik putatif. Pada penelitian ini, dari 200 eksplan yang diinokulasi dengan *A. tumefaciens* terdapat 15 thalus yang tahan terhadap higromisin sehingga efisiensi transformasi rumput laut berkisar 7,5% (Tabel 1). Efisiensi transformasi ini lebih rendah jika dibandingkan dengan hasil penelitian Handayani (2013) yang memperoleh persentase transformasi pada *K. alvarezii* sebesar 23,56%. Rendahnya persentase transformasi kemungkinan disebabkan oleh perbedaan genotipe *K. alvarezii* yang digunakan. Efisiensi regenerasi thalus transgenik putatif pada penelitian ini sebesar 100% dari jumlah eksplan yang resisten di media higromisin, sedangkan efisiensi regenerasi thalus non transgen sebesar 100% di media non selektif yang tidak mengandung higromisin (Tabel 1). Efisiensi regenerasi pada penelitian ini lebih besar jika dibandingkan dengan efisiensi regenerasi pada hasil penelitian Handayani (2013) sebesar 11,32%. Hal ini kemungkinan disebabkan penggunaan konsentrasi higromisin yang berbeda pada media seleksi dimana pada penelitian ini hanya menggunakan higromisin dengan konsentrasi 10 mg/L sedangkan pada penelitian Handayani (2013) menggunakan konsentrasi higromisin 20 mg/L. Waktu yang diperlukan yang digunakan untuk regenerasi pada thalus transgenik lebih lama dibandingkan dengan thalus non transgenik. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor seperti



Gambar 3. Perkembangan eksplan nontransforman dan putatif transforman di media higromisin 10 mg/L (+Hyg) dan tanpa hygromisin (-Hyg)

Figure 3. Development of non-transformant explants and putative transformant explants on selection medium containing 10 mg/L hygromycin (+ Hyg) and without hygromycin (-Hyg)

perlakuan infeksi *A. tumefaciens* dan pengaruh antibiotik higromisin. Dari 15 thalus transgenik putatif yang telah menghasilkan tunas, 3 thalus diambil secara acak untuk di analisis lebih lanjut. Jumlah tunas yang berhasil membawa gen *PaCs* yaitu 1 tunas dari 1 eksplan yang beregenerasi (Tabel 1). Perkembangan eksplan pada media selektif dapat dilihat pada Gambar 3.

Pertumbuhan thalus rumput laut *K. alvarezii* pada media PES non selektif yang tidak mengandung higromisin memperlihatkan pertumbuhan kristal filamen disekitar thalus (2 minggu), sedangkan thalus non transgenik yang ditanam pada media selektif menunjukkan hampir keseluruhan thalus mengalami kematian. thalus hasil transformasi yang ditanam pada media selektif menunjukkan pertumbuhan dimana tunas tumbuh semakin panjang (Gambar 3). Sensitivitas sel tanaman terhadap agen seleksi bergantung pada genotip, tipe eksplan, dan kondisi kultur jaringan (Koronfel, 1998).

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

Dari 3 thalus yang menghasilkan tunas transgenik putatif, diambil 5 tunas untuk diisolasi DNA nya. Hasil isolasi DNA genom dari kelima tunas *K. alvarezii* transgenik putatif

menunjukkan bahwa DNA tersebut memiliki kualitas yang baik (Gambar 4a). DNA genom dari salah satu tunas transgenik putatif selanjutnya digunakan untuk analisis integrasi gen *PaCs* pada *K. alvarezii*.

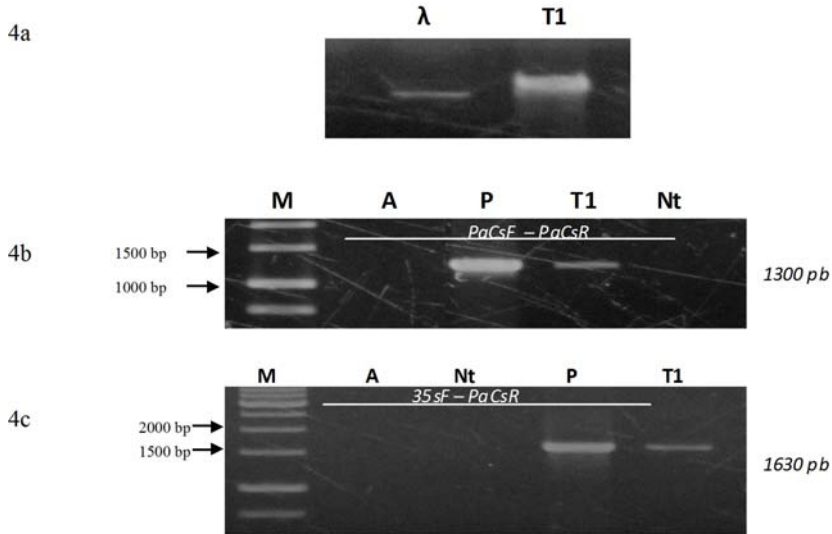
Analisis integrasi gen *PaCs* di dalam rumput laut menggunakan teknik PCR dengan primer gen F *PaCs* dan R *PaCs* menghasilkan pita berukuran 1300 pb, sedangkan pada *K. alvarezii* non transgenik tidak menghasilkan pita tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa primer tersebut dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan transgen *PaCs* di *K. alvarezii* transgenik (Gambar 4b). Hasil ini juga menunjukkan bahwa rumput laut *K. alvarezii* mempunyai urutan nukleotida yang berbeda dengan gen *PaCs* dari *Pseudomona aeruginosa*. PCR dengan kombinasi primer 35sF dan R *PaCs* menghasilkan pita berukuran 1630 pb pada *K. alvarezii* tetapi tidak menghasilkan amplicon pada *K. alvarezii* non transgenik (Gambar 4c). Hasil analisis ini menunjukkan bahwa gen *PaCs* pada *K. alvarezii* transgenik putatif dibawah kendali promotor 35S CaMV. Jadi, satu tunas *K. alvarezii* transgenik yang diambil secara acak dari 5 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).

Tabel 1. Efisiensi transformasi dan regenerasi rumput laut *Kappaphycus alvarezii* mengandung gen *Citrate syntase*

Table 1. The efficiency of transformation and regeneration of *Kappaphycus alvarezii* containing *Citrate syntase* gene

Perlakuan* <i>Treatment</i>	Jumlah eksplan awal	Jumlah eksplan tahan higromisin	Persentase transformasi	Jumlah eksplan		Efisiensi Regenerasi
				Regenerasi	+ PCR	
Diinokulasi	200	15	7,5 % ^{a)}	15	1/1 ^{***}	100% ^{b)}
Tidak diinokulasi	50	0	0	0	0	0
Tidak diinokulasi	50	-	-	50 ^{**}	-	100 % ^{d)}

- a) Jumlah eksplan tahan higromisin/jumlah eksplan x 100%
- b) Jumlah eksplan yang bertunas/jumlah eksplan tahan higromisin x 100%
- c) Jumlah eksplan yang bertunas/jumlah eksplan awal yang ditanam pada media tanpa higromisin x 100%
- *) Dengan *A. tumefaciens*
- **) Di media yang tidak mengandung higromisin
- ***)Jumlah tunas dari 1 eksplan yang + PCR



Gambar 4. Hasil elektroforesis DNA genom rumput laut *Kapapphycus alvarezii* (4a). Analisis integrasi gen *PaCs* di dalam thalus *Kapapphycus alvarezii* yang ditransformasi dengan *Agrobacterium tumefaciens* menggunakan PCR. 4b= menggunakan kombinasi Primer F *PaCs* dan R *PaCs*, 4c= 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 4. Electrophoresis of DNA genome *Kapapphycus alvarezii* (4a). Citrate syntase (*PaCs*) gene detection in *Agrobacterium tumefaciens* transformed thalli *Kapapphycus alvarezii* by PCR method. PCR product using F *PaCs* and R *PaCs* primers (4b); using F 35s dan R *PaCs* primers (4c). M: 1 kb DNA marker; A: negative control (water); P: positive control (plasmid pMSH1-*PaCs*); T1: putative transgenic; Nt: non-transgenic

KESIMPULAN

Gen *PaCs* telah berhasil diintroduksi dan terintegrasi di dalam genom rumput laut *K. alvarezii* dibawah kendali promoter 35S CaMV.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada penelitian kerjasama antara Balai Penelitian dan Pengembangan Kelautan dan Perikanan (BalitbangKP) Maros dengan Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Institut Pertanian Bogor (PPSHB_IPB) yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR ACUAN

- Ambo-Rappe, R., Lajus, D.L., & Schreider, M.J. Heavy metal impact on growth and leaf asymmetry of seagrass, *Halophila ovalis*. *J. Environ Chem Ecotoxicol*, 3(6): 149-159.
- Buch, A.D., Archana, G., & Naresh Kumar, G. 2008. Metabolic channeling of glucose towards gluconate in phosphate-solubilizing *Pseudomonas aeruginosa* p4 under phosphorous deficiency. *Res Microb.*, 159: 635-642.
- Bixler, H.J. 1996. Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia*, 326/327: 35-57.

- Cheng, R., Ruijuan, M.A., Ke Li, Hui, R., Xiangzhi, L., Zhaokai, W., Shanjun, Y., & Yong, M. 2011. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Micres.*, 25421: 1-8.
- Cheney, D., Metz, B., & Stiller, J. 2001. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in the macroscopic marine red alga *Porphyra yezoensis*. *J. Phycol.*, 37: 11-13.
- 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(l): 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.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. 2010. FAOSTAT database. [online]. <http://faostat.fao.org>.
- 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.
- 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., Faukami, K., Adachi, M., & Nhisijima, T. 1997. Direct enumeration of total bacteria from macroalgae by epifluorescence microscopy applied to the flashy red alga *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.
- 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.
- Taiz, L. & Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3th 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* (Soliriciae, 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.