

Tersedia online di: <http://ejournal-balitbang.kkp.go.id/index.php/jra>

REGENERASI DAN PERBANYAKAN RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii* HASIL TRANSFORMASI GEN SUPEROKSIDA DISMUTASE (*MaSOD*)

Emma Suryati[#], Hidayah Triana^{*)}, Utut Widyastuti^{***}, dan Andi Tenriulo^{†)}

^{†)} Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau

^{*)} Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Muslim Indonesia

^{***} Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi dan Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Transformasi gen *superoxide dismutase* (*MaSOD*) pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* telah dilakukan secara *in vitro*. Transformasi gen *MaSOD* ke dalam genom rumput laut diharapkan dapat mengurangi cekaman oksidatif terutama yang disebabkan oleh perubahan suhu, salinitas, dan cemaran logam di perairan. Penelitian ini bertujuan untuk regenerasi rumput laut hasil introduksi gen *MaSOD* dan non-transgenik pada labu kultur. Regenerasi dan perbanyakan rumput laut hasil transformasi gen *MaSOD* dilakukan di laboratorium pada labu kultur yang diletakkan dalam "culture chamber" yang dilengkapi dengan aerasi menggunakan media kultur yang diperkaya dengan pupuk PES, Grund, Conwy, dan SSW sebagai kontrol, salinitas 20, 25, 30, 35, dan 40 g/L, pH 4, 5, 6, 7, dan 8. Intensitas cahaya antara 500-2.000 lux dengan fotoperiode terang dan gelap 8:16; 12:12; dan 16:8. Untuk merangsang pertumbuhan eksplan dilakukan pemeliharaan dengan penambahan hormon tumbuh IAA dan BAP dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1. Penelitian dilakukan secara bertahap. Evaluasi transgenik dilakukan menggunakan teknik PCR. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa sintasan yang paling tinggi diperoleh menggunakan media PES (94%), salinitas 30 g/L (90%), pH 7 (96%), intensitas cahaya pada 1.500 lux (80%), fotoperiode 12:12 (84%), komposisi ZPT dengan campuran IAA dan BAP dengan perbandingan 2:1. Hasil analisis PCR memperlihatkan *K. alvarezii* transgenik putatif mengandung transgen *MaSOD* sebanyak 78% dari hasil transformasi.

KATA KUNCI: regenerasi; *Kappaphycus alvarezii*; gen *MaSOD*; cekaman lingkungan

ABSTRACT: *Regeneration and multiplication of seaweed Kappaphycus alvarezii transformed Superoxide dismutase (MaSOD) gene. By: Emma Suryati, Hidayah Triana, Utut Widyastuti, and Andi Tenriulo*

Superoxide dismutase transformation (MaSOD) gene of seaweed Kappaphycus alvarezii mediated by Agrobacterium tumefaciens has been successfully done in vitro. MaSOD genes introduced into the seaweed genome is expected to reduce oxidative stress caused by environmental conditions such as changes in temperature, salinity and metal contamination of the water. This study aimed to regenerate both the MaSOD transformed seaweed and non-transgenic in a culture flask. Regeneration and multiplication of those seaweed were conducted in a laboratory flask cultures placed in a "culture chamber" which was aerated and enriched with fertilizers PES, Grund, Conwy, and SSW as a control, salinity 20, 25, 30, 35, and 40 g/L, pH: 4, 5, 6, 7, and 8. the light intensity between 500-2000 lux, with light and dark photoperiod 8:16; 12:12; and 16:8. To stimulate the growth of explants the addition of growth hormone IAA and BAP with ratios of 1:1, 1:2 and 2:1 were performed. This study was a multiple-step of process, by which transgenic explants was identified by PCR method. The results showed that the highest survival rate was obtained using media PES (94%), salinity 30 g / L (90%), pH= 7 (96%), the intensity of light at 1500 lux (80%), photoperiod= 12: 12 (84%), and ratio of IAA and BAP 2: 1. The results of PCR analysis showed the putative K. alvarezii transgenic MaSOD was 78% of explants.

KEYWORDS: regeneration; *Kappaphycus alvarezii*; *MaSOD* genes; environmental stress

Korespondensi: Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau. Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan, Indonesia. Tel. + (0411) 371544
E-mail: emmasuryati@yahoo.com

PENDAHULUAN

Rumput laut *K. alvarezii* merupakan salah satu komoditas unggulan penghasil karaginan yang banyak dimanfaatkan dalam industri kertas, tekstil, fotografi, pasta, dan pengalengan ikan. Budidaya *K. alvarezii* mampu menjadi kunci pemberdayaan masyarakat pesisir, peningkatan usaha budidaya di tingkat petani memacu peningkatan sediaan benih unggul baik kualitas maupun kuantitasnya. Selain itu, permintaan pasar dunia masih sangat tinggi (Collen, 1995; FAO, 2010).

Kendala yang sering dihadapi pembudidaya dalam rangka peningkatan produksi adalah terbatasnya ketersediaan bibit yang berkualitas tinggi, lemahnya ketahanan terhadap penyakit *ice-ice*, serta kurangnya ketahanan terhadap cekaman lingkungan biotik maupun abiotik yang sering terjangkit pada lahan budidaya. Ketersediaan bibit yang berkualitas baik sangat dipengaruhi oleh musim, salinitas, suhu, intensitas cahaya, serta kondisi lingkungan perairan yang digunakan untuk membudidayakan rumput laut (Yulianto & Mira, 2009; Mamboya, 2007).

Dalam rangka meningkatkan dan mempertahankan produksi rumput laut nasional perlu dilakukan upaya-upaya untuk mengatasi permasalahan pada budidaya, antara lain menurunnya mutu genetik rumput laut yang disebabkan adanya serangan penyakit, serta perubahan mutu lingkungan yang ekstrem (Largo *et al.*, 1997; Vairappan, 2006). Upaya yang dilakukan antara lain melalui pola tanam, teknik budidaya, dan penyediaan bibit yang baik antara lain kultur jaringan, serta pendekatan teknologi biomolekuler yaitu rekayasa genetik melalui transformasi gen potensial yang dapat meningkatkan ketahanan, serta memperbaiki gen dari rumput laut (Cheney *et al.*, 2000). Beberapa peneliti telah menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai perantara transformasi, seperti yang dilakukan oleh Cheng *et al.* (2011).

Perbaikan mutu genetik pada rumput laut telah dirintis sejak tahun 2010 melalui kerja sama penelitian antara Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP), Maros dengan Pusat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor (PAU-IPB). Informasi yang diperoleh antara lain lain introduksi gen GFP di bawah regulasi promoter sehingga menghasilkan transgenik rumput laut sampai tahap filamen (Rajamuddin *et al.*, 2014), kloning gen penyandi karaginan, merakit vektor ekspresi, serta introduksi gen karaginan rumput laut *K. alvarezii* (Rajamuddin *et al.*, 2016), serta transformasi gen lain untuk meningkatkan ketahanan terhadap cekaman lingkungan antara lain gen *PaCS* (Daud *et al.*, 2013;

Suryati *et al.*, 2014), gen lisozim (Handayani *et al.*, 2014), gen methalothionin type-II (*Mamt2*) (Fajriah *et al.*, 2015; Suryati *et al.*, 2015).

Transformasi gen superoksida dismutase (*MaSOD*) pada rumput laut *K. alvarezii* telah berhasil dilakukan melalui mediasi menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*, serta dapat terintegrasi pada plantlet dan anakan rumput laut *K. alvarezii* (Triana *et al.*, 2016). Namun regenerasi rumput laut hasil transformasi ini belum berhasil tumbuh dengan baik di laboratorium, maupun aklimatisasi pada labu kultur dan bak resirkulasi.

Kematian eksplan hasil transformasi gen sering terjadi pada pada tahap aklimatisasi pada labu kultur maupun pada bak resirkulasi. Beberapa parameter yang berpengaruh terhadap sintasan rumput laut antara lain salinitas, pH, penetrasi cahaya, rasio gelap terang, pupuk, serta kombinasi zat pemacu tumbuh (ZPT) yang diperlukan dalam pertumbuhan rumput laut (Suryati *et al.*, 2015). Penelitian ini bertujuan untuk melakukan regenerasi rumput laut hasil transformasi gen *MaSOD* pada rumput laut *K. alvarezii* dan rumput laut non-transgenik pada media kultur yang diperkaya dengan pupuk dan komposisi ZPT yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Transformasi dan Kokultivasi

Rumput laut yang digunakan untuk transformasi gen *MaSOD* merupakan rumput laut hasil seleksi yang diperoleh dari Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan. Riset dilakukan di Laboratorium Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau, Maros.

Transformasi gen *MaSOD* pada rumput laut *K. alvarezii* dilakukan mengikuti metode Cheney (2000). Metode transformasi dilakukan dengan mediasi *Agrobacterium* LB 4404 yang membawa vektor ekspresi pGWB5 (Hannum, 2012). Tahapan transformasi adalah: penginfeksian, ko-kultivasi, dan *recovery*. Transformasi menggunakan eksplan *K. alvarezii* 0,5 cm; dilukai menggunakan jarum steril, kemudian direndam dalam media infeksi yang berisi *A. tumefaciens* LB-4404 dan 100 μ M asetosiringon selama 30 menit dengan penggoyangan. Eksplan dikeringkan dengan tisu steril dan dipindahkan ke media ko-kultivasi (media PES dan 100 μ M asetosiringon) selama tiga hari di ruang gelap. Eksplan hasil ko-kultivasi dicuci dengan cefotaxim 200 mg/L, dibilas dengan air laut steril sebanyak tiga kali. Eksplan dikeringkan di atas tisu steril, kemudian dipindahkan ke media *recovery* (PES tanpa asetosiringon) selama tujuh hari, kemudian dikultur pada media seleksi yang terdiri atas air laut steril dengan PES dan hygromycin

10 mg/L selama 14 hari. Setelah seleksi, eksplan dipindahkan ke media pemulihan selama 14 hari (Triana *et al.*, 2016).

Regenerasi dan Perbanyak Rumpul Laut Hasil Transgenik

Eksplan hasil transformasi gen *MaSOD* dan eksplan tanpa transformasi non-transgenik (kontrol) ditumbuhkan pada media PES hingga menjadi tanaman muda (planlet) mengacu pada metode Sulistiani *et al.* (2012); Reddy *et al.* (2003); dan Wu *et al.* (2006). Eksplan dikultur pada dua tahapan regenerasi (keduanya dilakukan secara aseptik dan *in vitro*), yaitu: 1) kultur cair pada botol kultur volume 200 mL yang diletakkan pada *shaker* goyang selama pemeliharaan, menggunakan media kultur PES. Setiap botol diisi 20 eksplan, selama pemeliharaan dilakukan pergantian media setiap satu minggu. Kemudian dilanjutkan dengan aklimatisasi pada botol kultur dengan volume satu liter yang diletakkan pada 'culture chamber' dan diberi aerasi dengan jumlah eksplan masing-masing 100 eksplan/botol. Selanjutnya aklimatisasi dilakukan pada bak resirkulasi dengan volume 50 L yang dilengkapi dengan aerasi jumlah plantet hingga 300 eksplan pada setiap bak.

Dalam rangka optimasi media pemeliharaan dilakukan melalui seleksi pupuk antara lain pupuk PES, Grund, Conwy, dan SSW sebagai kontrol, dengan salinitas 20, 25, 30, 35, dan 40 g/L. Selanjutnya kisaran pH yang digunakan yaitu 4, 5, 6, 7, dan 8. Intensitas cahaya berkisar antara 500-2.000 lux dengan *photoperiod* terang dan gelap 8:16; 12:12; dan 16:8. Untuk merangsang pertumbuhan eksplan dilakukan pemeliharaan dengan penambahan hormon tumbuh IAA dan BAP dengan beberapa perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1. Penelitian dilakukan menggunakan rancangan acak dengan lima ulangan untuk ke-6 parameter yang secara bertahap untuk mengurangi bias pada pengamatan masing-masing parameter. Pengamatan dilakukan selama delapan minggu dengan interval satu minggu meliputi sintasan dan laju pertumbuhan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan software statistik versi 3.0 pada $P=0,05$.

Identifikasi Eksplan Transgenik

Sebanyak 0,1 g tunas putatif yang tumbuh setelah pemeliharaan pada bak resirkulasi, diisolasi DNA menggunakan metode Wattier *et al.* (2000). DNA hasil isolasi selanjutnya dianalisis PCR dengan menggunakan primer *MmSOD-F1* (5'-ATG GTGAAGGCTGTGGTTGT-3') dan *MmSOD-R2* (5'-CATCTCCAACGGTGACATTG-3') (Hannum, 2012). Campuran reaksi yang digunakan adalah 100 ng DNA genom; 0,5 μ L masing-masing primer *Forward* dan *reverse* (10 pmol/ μ L); 2 μ L 1x bufer

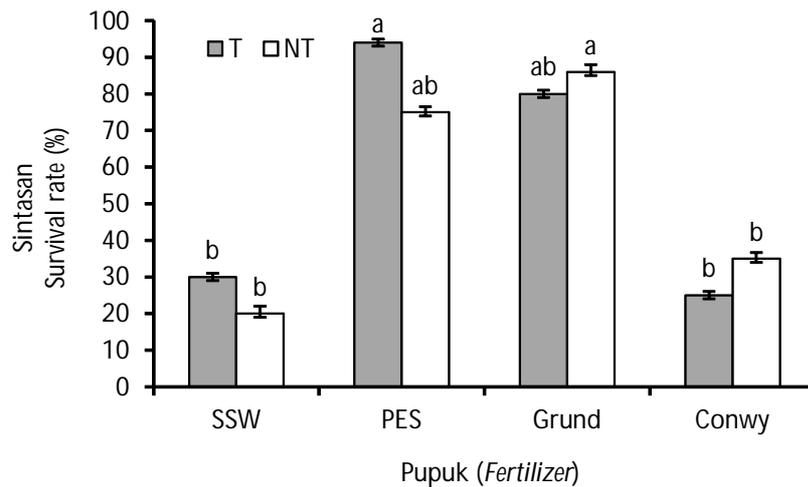
PCR; 2 μ L dNTPmix; 0,2 μ L *Tag* Polymerase dan ditambah dengan ddH₂O hingga volume total reaksi menjadi 20 μ L. Analisis dilakukan dengan kondisi PCR: pra PCR 95°C, lima menit; denaturasi 94°C, 30 detik; penempelan primer 60°C, 30 detik; pemanjangan 72°C, 30 detik; dan reaksi dilakukan sebanyak 30 siklus; dan diakhiri dengan pasca PCR 20°C selama 10 menit. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan 1% gel agarosa pada 100 volt selama 28 menit. Gel divisualisasi di atas UV transluminator setelah diwarnai dengan gel red.

HASIL DAN BAHASAN

Regenerasi rumput laut *K. alvarezii* hasil transformasi gen *MaSOD* dan rumput laut non-transgenik pada media kultur air laut steril, dan air laut steril yang diperkaya dengan pupuk *provasoli enrich seawater* (PES), Grund dan Conwy memperlihatkan sintasan berbeda (Gambar 1).

Pada rumput laut *K. alvarezii* hasil transformasi gen *MaSOD* memperlihatkan sintasan paling tinggi (94%), yaitu pada media yang diperkaya dengan pupuk PES, namun tidak berbeda nyata dengan media yang diperkaya dengan pupuk Grund (80%), berbeda nyata dengan SSW (30%), dan media yang diperkaya dengan Conwy (25%) ($P<0,05$). Pada rumput laut *K. alvarezii* non-transgenik sintasan yang paling tinggi pada media yang diperkaya dengan pupuk Grund (86%) namun tidak berbeda dengan media yang diperkaya dengan pupuk PES (75%), berbeda nyata dengan SSW (20%) dan pupuk Conwy (35%) (Gambar 1). Dari hasil yang diperoleh memperlihatkan adanya perbedaan kebutuhan nutrisi dari eksplan rumput laut *K. alvarezii* hasil transformasi gen *MaSOD* dan rumput laut non-transgenik, pada transformasi sebelumnya antara lain pada transformasi gen *MaMt*, dan *lisozim* sintasan yang paling optimal dan cenderung lebih baik pada media PES (Suryati *et al.*, 2014). Hal ini kemungkinan terjadi karena adanya proses adaptasi selama di laboratorium menggunakan media PES selama proses transformasi gen pada rumput laut *K. alvarezii* mulai pada tahap mediasi hingga pada proses *recovery* sehingga eksplan teradaptasi pada kondisi yang sama. Selain itu, juga disebabkan dari kebutuhan nutrisi pada rumput laut dapat dipenuhi oleh nutrisi yang berada pada media yang diperkaya dengan PES dan Grund, karena eksplan yang digunakan memang diadaptasi pada media dengan pupuk yang sama sehingga dapat tumbuh dengan baik.

Salinitas merupakan faktor pembatas pada sintasan rumput laut pada umumnya, khususnya pada eksplan rumput laut hasil transformasi. Toleransi kemampuan hidup rumput laut *K. alvarezii* berkisar pada salinitas 20-40 g/L, namun sintasan eksplan transgenik yang tertinggi diperoleh pada salinitas 30 g/L, berbeda nyata



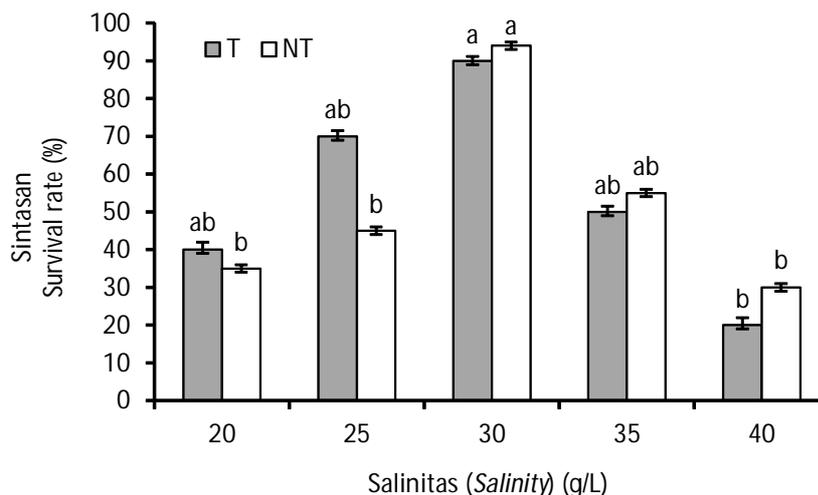
Gambar 1. Sintasan eksplan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* yang diintroduksi dengan gen *MaSOD* (T), dan *K. alvarezii* non-transgenik (NT) pada media yang diperkaya dengan pupuk berbeda (Keterangan: SSW (*steril sea water*); PES (*provasoli enrich seawater*); Grund, dan Conwy)

Figure 1. Survival rate of seaweed *K. alvarezii* explant introduced with *MaSOD* gene and non-transgenic seaweed complemented with various fertilizers (note: T= Transgenic; NT= non-transgenic) (Note: SSW (*steril sea water*), PES (*provasoli enrich seawater*); Grund, and Conwy)

dengan salinitas 20 dan 40 g/L, namun tidak berbeda nyata dengan 25 dan 35 g/L, sedangkan pada eksplan non-transgenik tertinggi pada 30 g/L tidak berbeda dengan 35 g/L, berbeda dengan 20, 25, dan 40 g/L (Gambar 2).

Hal ini sangat erat dengan fisiologi penyerapan dan sirkulasi nutrisi pada rumput laut sehingga pada

salinitas yang lebih rendah maupun tinggi akan mengakibatkan kematian pada rumput laut. Penyakit *ice-ice* sering kali terjadi karena adanya perubahan salinitas yang drastis biasanya pada musim pancaroba atau peralihan musim penghujan ke musim kering atau sebaliknya, di samping pengaruh dari kondisi lingkungan baik fisika, kimia, maupun secara biologi.



Gambar 2. Sintasan eksplan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* yang diintroduksi gen *MaSOD* dan rumput laut non-transgenik yang dipelihara pada salinitas yang berbeda (Keterangan: T= transgenik; NT= non-transgenik)

Figure 2. Survival rate of seaweed *Kappaphycus alvarezii* explant introduced with *MaSOD* gene and non-transgenic seaweed cultivated in various salinity conditions (Note: T= transgenic; NT= non-transgenic)

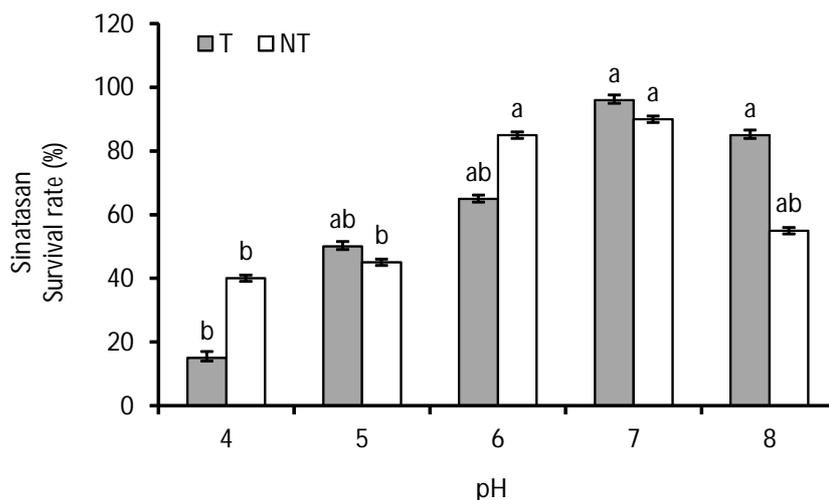
Pada salinitas 30 g/L memperlihatkan sintasan paling tinggi baik pada rumput laut transgenik maupun non-transgenik, hal ini berhubungan dengan proses kesetimbangan senyawa kimia di dalam air laut, yang erat hubungannya dengan sistem osmosa dan penyerapan nutrisi tersebut melalui dinding sel rumput laut (Romimohtarto & Juwana, 2002).

pH pada media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan pada pemeliharaan rumput laut *K. alvarezii* baik di laboratorium maupun di lapangan, karena penyerapan nutrisi dari media tergantung dari derajat keasaman dari lingkungan yang ada dan akan terjadi keseimbangan dalam penyerapan. Hasil pengamatan pH pada media pemeliharaan *K. alvarezii* di laboratorium diperlihatkan pada Gambar 3.

Pada rumput laut *K. alvarezii* yang hidup di laut kisaran pH yang dapat diterima bisa mencapai pH: 9, namun pada pemeliharaan rumput laut hasil transformasi gen *MaSOD* dan non-transgenik di laboratorium memperlihatkan respons yang agak berbeda, memperlihatkan sintasan yang paling tinggi pada pH dengan kisaran 6-8 (Gambar 3). Pada rumput laut transgenik sintasan yang paling tinggi pada pH 6 (96%) dan 8 (85%) tidak berbeda dengan pH 5 (50%) dan 6 (65%), tapi berbeda nyata dengan pH 4 (15%). Sedangkan pada rumput laut non-transgenik sintasan paling tinggi pada pH 6-7 (85%-90%) namun tidak berbeda dengan pH 8 (55%). Perbedaan ini kemungkinan karena adanya proses adaptasi pada kondisi media kultur selama pemeliharaan di laboratorium, serta kondisi rumput laut setelah

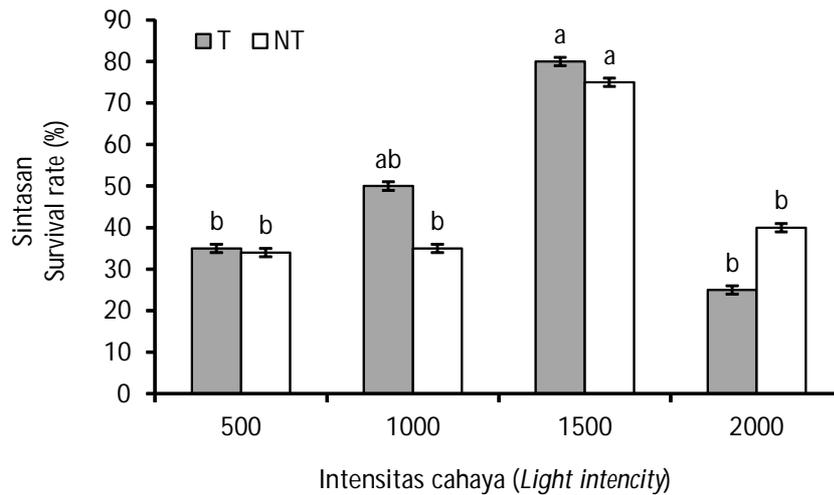
transformasi gen *MaSOD* yang menyebabkan lebih toleran terhadap perubahan pH pada media. Hal ini berbeda dengan pH optimum pada rumput laut hasil transformasi gen karaginan yang menunjukkan pH optimum pada pH= 6 dengan sintasan mencapai 85% (Suryati *et al.*, 2015).

Intensitas cahaya diperlukan untuk fotosintesa pada tumbuhan termasuk pada rumput laut *K. alvarezii*. Pada rumput laut hasil transformasi gen *MaSOD* kondisi sintasan yang paling tinggi pada 1.500 lux (80%) tidak berbeda nyata dengan 1.000 lux (50%), tapi berbeda nyata dengan 500 lux (35%) dan 2.000 lux (25%). Demikian juga pada rumput laut non-transgenik memperlihatkan sintasan paling tinggi pada intensitas 1.500 lux (76%), namun berbeda nyata dengan intensitas 500 lux, 1.000 lux, dan 2.000 lux (Gambar 4). Terlihat pada rumput laut transgenik *MaSOD*, memperlihatkan pertumbuhan bibit yang cukup bagus dibandingkan dengan rumput non-transgenik kisaran intensitas cahaya pada rumput laut transgenik lebih luas dibandingkan dengan rumput laut non-transgenik. Sehingga rumput laut hasil transformasi gen *MaSOD* masih mampu bertahan hidup pada kisaran intensitas tersebut, sedangkan pada rumput laut non-transgenik lebih mudah terjadi kematian pada eksplan. Sangat berbeda dengan kondisi budidaya di laut penetrasi cahaya bisa mencapai 3.000 lux namun peningkatan suhu di laut kemungkinan lebih konstan, serta ada penetrasi dari lingkungan sekitar sehingga rumput laut yang dibudidayakan masih dapat bertahan hidup pada kondisi seperti itu.



Gambar 3. Sintasan eksplan rumput laut *K. alvarezii* yang diintroduksi dengan gen *MaSOD* dan rumput laut non-transgenik yang dipelihara pada media kultur dengan pH yang berbeda (Keterangan: T= transgenik; NT= non-transgenik)

Figure 3. Survival rate of seaweed *K. alvarezii* explant introduced with *MaSOD* gene and non-transgenic seaweed cultivated in various pH conditions (Note: T= transgenic; NT= non-transgenic)

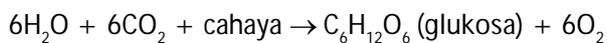


Gambar 4. Sintasan eksplan rumput laut *K. alvarezii* yang diintroduksi dengan gen *MaSOD* dan rumput laut non-transgenik yang dipelihara dengan penetrasi cahaya yang berbeda (Keterangan: T = transgenik; NT = non-transgenik)

Figure 4. Survival rate of seaweed *K. alvarezii* explant introduced with *MaSOD* gene and non-transgenic seaweed cultivated with various light intensity conditions (Note: T = transgenic; NT = non-transgenic)

Penetrasi cahaya pada budidaya rumput laut *K. alvarezii* di laboratorium sangat diperlukan dalam rangka membantu proses fotosintesis pada rumput laut yang dipelihara. Proses fotosintesis pada terdapat pada tumbuhan hijau termasuk rumput laut bersifat autotrof yakni bisa menyusun makanannya sendiri. Melalui *thalus* rumput laut menyerap molekul karbon dioksida juga air dalam rangka menghasilkan gula dan juga oksigen. Kedua senyawa tersebut kemudian akan digunakan sebagai penyokong pertumbuhannya (Romimohtarto & Juwana, 2002).

Adapun persamaan reaksi yang terjadi dalam proses fotosintesis adalah sebagai berikut:

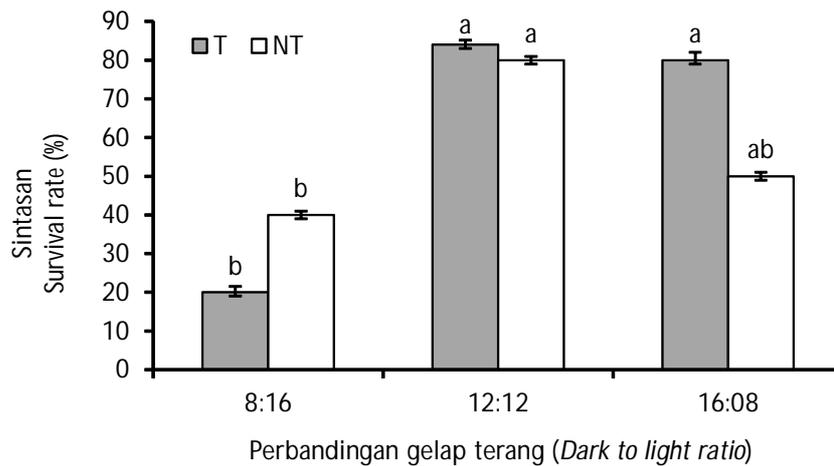


Tumbuhan yang melakukan proses fotosintesis memerlukan bantuan cahaya matahari. Mereka mampu menyerap cahaya tersebut sebab mereka memiliki zat hijau daun atau klorofil. Cahaya matahari selanjutnya akan melewati lapisan epidermis yang tanpa warna kemudian melaju menuju mesofil. Proses fotosintesis ini terdiri atas dua rangkaian reaksi yakni reaksi terang dan juga reaksi gelap. Dinamakan reaksi terang sebab prosesnya membutuhkan cahaya. Dalam proses fotosintesis, reaksi terang merupakan proses yang pada akhirnya menghasilkan ATP juga NADPH₂. Dalam reaksi ini diperlukan molekul air. Fotosintesis dimulai pada saat cahaya mulai mengionisasi molekul klorofil dan kemudian terjadi pelepasan elektron. Pada

tumbuhan sendiri, reaksi biokimia ini akan terjadi siklus calvin di mana karbondioksida akan diikat dengan tujuan membentuk ribose dan lebih lanjut akan menjadi glukosa. Reaksi ini tidak bergantung pada ada atau tidaknya cahaya matahari. Proses fotosintesis pada rumput laut dapat berlangsung dengan laju maksimal jika unsur-unsur pendukungnya terpenuhi yakni antara lain: cahaya, konsentrasi karbondioksida, suhu, kadar air (Romimohtarto *et al.*, 2002).

Proses fotosintesis pada rumput laut, selain tergantung pada intensitas cahaya juga tergantung pada lamanya pemaparan, serta rasio terang dan gelap cahaya yang digunakan. Sintasan eksplan rumput laut hasil transformasi gen *MaSOD* yang paling tinggi pada rasio terang gelap L:D= 12:12 (84%) sama dengan dengan perlakuan L:D= 16:8 (80%), berbeda dengan perlakuan L:D= 8:12 (20%), demikian juga pada rumput laut non-transgenik sintasan paling tinggi pada perlakuan L:D= 12:12 (80%), namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan L:D= 16:8 (50%), dan berbeda nyata dengan perlakuan L:D= 8:16 (40%) (Gambar 5).

Dalam proses fotosintesis, reaksi terang merupakan proses yang pada akhirnya menghasilkan ATP juga NADPH₂. Dalam reaksi ini diperlukan molekul air. Proses reaksi terang dimulai dengan menangkap foton yang dilakukan oleh pigmen klorofil yang berperan sebagai antena. Pada *thalus* rumput laut, cahaya akan diserap melalui molekul klorofil dan kemudian dikumpulkan pada pusat-pusat reaksi.



Gambar 5. Sintasan eksplan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* yang diintroduksi dengan gen *MaSOD* dan rumput laut non-transgenik dengan perbandingan terang dan gelap yang berbeda (Keterangan: T = transgenik; NT = non-transgenik)

Figure 5. Survival rate of seaweed *Kappaphycus alvarezii* explant introduced with *MaSOD* gene and non-transgenic seaweed with various dark to light ratios (Note: T = transgenic; NT = non-transgenic)

Fotosintesis dimulai pada saat cahaya mulai mengionisasi molekul klorofil dan kemudian terjadi pelepasan elektron. Sementara itu, apa yang dimaksud dengan reaksi gelap adalah proses di mana ATP dan juga NADPH yang dihasilkan dalam proses sebelumnya kemudian menghasilkan sejumlah proses atau reaksi biokimia. Reaksi biokimia ini merupakan siklus calvin di mana karbon dioksida akan diikat dengan tujuan membentuk ribose dan lebih lanjut akan menjadi glukosa, namun reaksi ini tidak bergantung pada cahaya matahari (Romimohtarto *et al.*, 2002). Pada rumput laut hasil transformasi gen *MaSOD* sintasannya lebih baik pada rasio 16:8, dibandingkan pada rasio 8:16 hal ini erat hubungannya dengan proses transfer elektron pada protosintesis, di mana pada gen *MaSOD* memiliki ko-enzim yang mampu melakukan transfer elektron lebih baik dibandingkan dengan rumput laut non-transgenik.

Pengaruh ZPT pada pemeliharaan rumput laut *K. alvarezii* diintroduksi dengan gen *MaSOD* yang di laboratorium memberikan respons yang positif terhadap pertumbuhan dan sintasan eksplan ZPT yang digunakan antara lain dari golongan auxin dan sitokinin yaitu IAA dan BAP yang di campur dalam beberapa perbandingan yaitu kombinasi IAA dan BAP dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1 (Gambar 6).

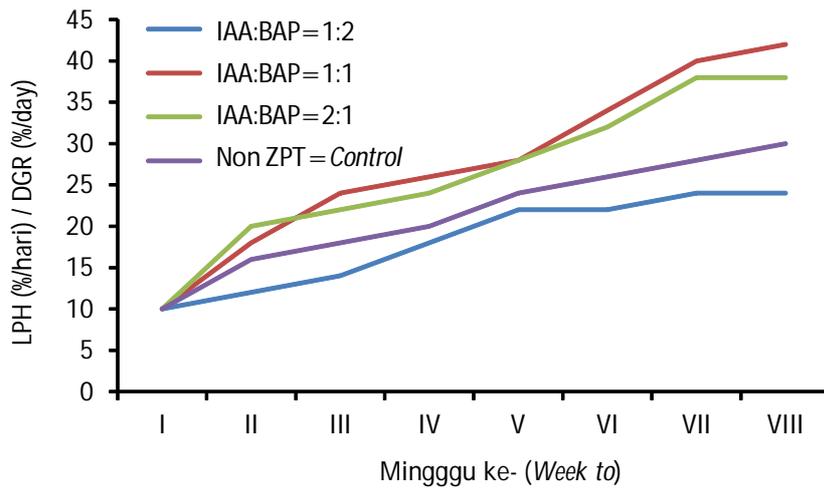
Untuk memacu pertumbuhan tunas pada kultur jaringan rumput laut *K. alvarezii* dilakukan pada media PES yang diperkaya dengan penambahan ZPT antara

lain dari golongan auksin dan sitokinin yaitu kombinasi IAA dengan BAP dapat meningkatkan kemampuan untuk bertumbuh dan beregenerasi (Suryati & Mulyaningrum, 2009). Hasil analisis memperlihatkan sintasan rumput laut *K. alvarezii* yang diintroduksi gen *MaSOD* yang paling baik yaitu pada media PES yang diperkaya dengan IAA dan BAP dengan perbandingan 1:1, berbeda nyata dengan kontrol, namun tidak berbeda dengan perbandingan 1:1, dan 2:1, demikian juga kontrol tidak berbeda nyata dengan perbandingan 1:2 dan 2:1 (Gambar 6). Hal ini berbeda dengan perbanyakannya rumput laut hasil transformasi gen karaginan yang optimal pertumbuhannya dengan penambahan ZPT dengan campuran IAA dan BAP dengan perbandingan 2:1 (Suryati *et al.*, 2015).

Pada aklimatisasi rumput laut *K. alvarezii* yang diintroduksi dengan gen *MaSOD* dilakukan pada labu kultur yang diletakkan pada kultur *chamber*, kemudian dilanjutkan pada bak sirkulasi yang dilengkapi dengan aerasi untuk memacu penyerapan nutrisi, serta pertumbuhan anakan rumput laut.

Identifikasi Eksplan Transgenik *MaSOD*

Hasil analisis PCR untuk konfirmasi rumput laut transgenik disajikan pada Gambar 8. PCR menggunakan primer *MmSOD-F1* dan *MmSOD-R2* memperlihatkan adanya pita pada 456 pb pada sampel P, merupakan sampel positif yang diisolasi dari plasmid, kemudian dari sampel 1, 2, 3, dan 4 merupakan



Gambar 6. Laju Pertumbuhan harian (LPH) eksplan rumput laut *K. alvarezii* hasil transformasi gen *MaSOD* pada media yang diperkaya ZPT dengan kombinasi IAA dan BAP yang berbeda, serta kontrol= tanpa penambahan ZPT.

Figure 6. Daily growth rate of seaweed *K. alvarezii* explant transformation with *MaSOD* gene in enriched media with combination of IAA and BAP are different ratio and not PGR as control



Gambar 7. Aklimatisasi anakan rumput laut *K. alvarezii* yang diintroduksi dengan gen *MaSOD* dan rumput laut non-transgenik pada bak resirkulasi yang dilengkapi dengan aerasi

Figure 7. Acclimatization of seaweed *K. alvarezii* introduced with *MaSOD* gene and non-transgenic seaweed in recirculation basin complemented with aeration

sampel rumput laut transgenik yang membawa gen *MaSOD* sebanyak 78% dari hasil transformasi. Hal ini juga dilakukan pada analisis PCR yang dilakukan oleh Triana *et al.* (2016) memperlihatkan adanya pita pada 456 bp pada sampel rumput laut transgenik yang membawa gen *MaSOD*.

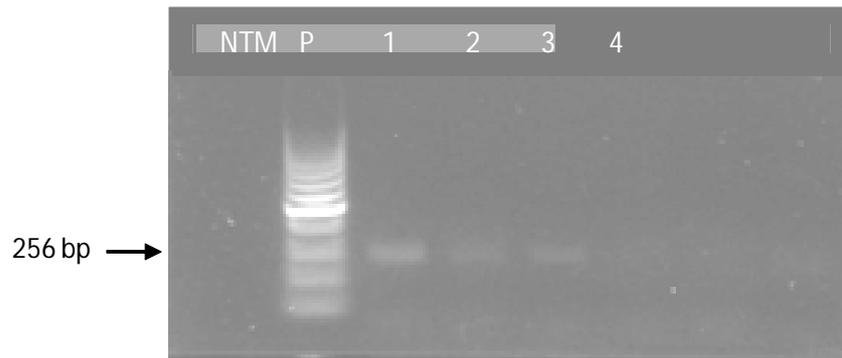
KESIMPULAN

Pada regenerasi rumput laut transgenik *MaSOD*, memperlihatkan media kultur yang paling baik adalah menggunakan media PES dengan salinitas 30 g/L, pH = 7, penetrasi cahaya 1.500 lux, rasio gelap terang = 12:12, dan komposisi ZPT adalah campuran IAA dan

BAP dengan perbandingan 1:1. Hasil analisis PCR memperlihatkan *K. alvarezii* transgenik putatif mengandung transgen *MaSOD* sebanyak 78% dari hasil transformasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh APBN dari DIPA Loka Penelitian dan Pengembangan Budidaya Rumput Laut (LPPBRL) Gorontalo, Tahun Anggaran 2015. Ucapan terima kasih disampaikan kepada kepala LPPBRL, serta peneliti BPPBAP Maros yang telah membantu kelancaran pelaksanaan penelitian ini.



Gambar 8. Hasil elektroforesis produk PCR dengan DNA genom dari rumput laut *K. alvarezii* hasil transformasi dengan gen *MaSOD* dan non-transforman. PCR dilakukan dengan primer *MmSODF-MmSODR2*, NT= non-transgenik, M= marker 1 kb DNA; P adalah kontrol positif (plasmid pGWB5-*MmCU/Zn-SOD*); 1-4= rumput laut transgenik

Figure 8. Electrophoresis result of PCR product with DNA genome from seaweed *K. alvarezii* transformed with *MaSOD* gene and non-transformant. PCR was conducted with primary *MmSODF-MmSODR2*, NT= non-transgenic, M= marker 1 kb DNA; P is positive control (plasmid pGWB5-*MmCU/Zn-SOD*); 1-4= transgenic seaweed

DAFTAR ACUAN

- Cheney, D.P. (2000). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of multicellular marine algae, resultant strains and their products. international classes. Northeastern University (Huntington Avenue Boston) US. <http://ip.com/patfam/en/22440221>. [tanggal akses 20 September 2012].
- 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.*, 25421, 1-8.
- Collen, J.U. (1995). Farming and physiology of the red alga *Eucheuma growii* 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 *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Ris. Akuakultur*, 8(2), 201-208.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2010). The State of world fisheries and aquaculture. sales and marketing group office of knowledge exchange. Research and Extension Food and Agriculture Organization of the United Nations Viale delle Terme di Caracalla 00153, Rome. Italy, 218 pp.
- Fajriah, U., Suryati, E., Parenrengi, A., Suharsono, & Widyastuti, U. (2015). Introduksi gen metallothionein tipe II ke dalam rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Ris. Akuakultur*, 9(3), 377-385.
- Handayani, T., Alimuddin, Widyastuti, U., Suryati, E., & Parenrengi A. (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, 106 hlm.
- Largo, D.B., Faukami, K., Adachi, M., & Nhisijima, 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.
- 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. ISBN 91-7155-374-6. <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:197112/FULLTEXT01.pdf>.
- Rajamuddin, M.A.L., Alimuddin, Widyastuti, U., & Faizal, I. (2014). Evaluation of different promoters driving the GFP reporter gene in seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Indonesian J. Biotechnology*, 19(2), 129-135.
- Rajamuddin, M.A.L., Alimuddin, Widyastuti, U., & Harris, E. (2016). Transformation of kappa (κ)-carrageenase gene from *Pseudoalteromonas* in seaweed *Kappaphycus alvarezii* [Doty]. *Pak. J. Biotechnol.*, 13(3), 157-163.

- Reddy, C.R.K., Kumar, G.R.K., Siddhanta, A.K., Tewari, A., & Eswaran, K. (2003). In Vitro somatic embryogenesis and regeneration of somatic embryos from pigmented callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). *J. Phycol.*, 39, 610–616.
- Romimohtarto, K., & Juwana, S. (2002). Biologi laut: ilmu pengetahuan tentang biologi laut. Penerbit Djambatan. Jakarta, 540 hlm.
- Sulistiani, E., Soelistyowati, D., Alimuddin, & Yani, S.A. (2012). Introduction and filaments regeneration from callus of cottonii seaweed (*Kappaphycus alvarezii* (Doty) collection from Natuna Island, Riau Islands Province. *Biotropia*, 19(2), 103-114.
- 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.
- Suryati, E., Daud, R.F., Widyastuti, U., Tenriulo, A., & Parenrengi, A. (2014). Regenerasi rumput laut *Kappaphycus alvarezii* hasil transformasi *gen sitrat sintase* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* secara *in Vitro*. *J. Ris. Akuakultur*, 9(2), 169-178.
- Suryati, E., Tenriulo, A., Rajamuddin, M.A.L., & Widyastuti, U. (2015). Regenerasi rumput laut hasil introduksi gen karaginan pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan media kultur yang berbeda dengan kondisi optimal. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*, hlm. 1-7.
- Triana, S.H., Alimuddin, Widyastuti, U., Suharsono, Suryati, E., & Parenrengi, A. (2016). The method of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated *MmCu/Zn-SOD* gene transformation in the red seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Pakistan J. Biotechnology* (in press).
- Vairappan, C.S. (2006). Seasonal occurances of epiphytic algae on the commercially cultivated red algae *Kappaphycus alvarezii* (Solieriales, Gigartinales, Rhodophyta). *J. Applied Phycol.*, 18, 611-617.
- Wattier, R.A., Prodöhl, P.A., & Maggs, C.A. (2000). DNA Isolation protocol for red seaweed (Rhodophyta). *Journal Plant Biology Moleculer*, 18(3), 275-281.
- Wu, Y.F., Chen, Y., Liang, X.M., & Wang, X.Z. (2006). An experimental assessment of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation in tomato. *Russian J. Plant Physiology*, 53(2), 252-256.
- 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. Oseanologi dan Limnologi di Indonesia Edisi 35(3)*. Jakarta [ID]. Pusat Penelitian Oceanografi dan Penelitian Limnologi LIPI. hlm. 325-334. ISSN 0125-9830. http://www.limnologi.lipi.go.id/limnologi/doc/public/3._Naskah_Kresno__Mira.pdf.