

## Evaluasi varietas, sumber eksplan dan strain *Agrobacterium* terhadap keberhasilan transformasi tebu dengan gen *P5CS*

Evaluation of varieties, explant sources, and *Agrobacterium* strains for successful sugarcane transformation using *P5CS* gene

Hayati MINARSIH<sup>1\*)</sup>, Dwi SUBIYARTI<sup>2)</sup>, Imron RIYADI<sup>1)</sup>,  
Soekarno Mismana PUTRA<sup>1)</sup> & Laksmi AMBARSARI<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16128 Indonesia

<sup>2)</sup> Sekolah Pascasarjana, Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Jln. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Indonesia

Diterima tanggal 2 Maret 2015/disetujui tanggal 4 Mei 2015

### Abstract

*Genetic transformation can be used as an alternative to develop sugarcane (Saccharum officinarum L.) tolerant to drought stress. P5CS gene has a role in biosynthesis of proline, an amino acid that accumulated under drought stress conditions. Transfer of a P5CS gene construct into plant cells in conjunction with regeneration of transgenic plantlets may develop sugarcane tolerant to drought stress. The aim of this research was to obtain an optimal transformation method which includes a suitable strain of Agrobacterium tumefaciens, and the best sugarcane explant and variety. The results showed that transfer of P5CS gene has been successfully carried out on sugarcane explants from solid media-derived calli, embryogenic calli and somatic embryos derived from temporary immersion system (TIS) culture. Whilst Agrobacterium strain LBA4404 was indicated as the most effective transformation vector. The regeneration of Kidang Kencana variety transformants from calli and somatic embryos was better than those of PS 881 and PS 891. The best performance of transformants based on the source of explants obtained from somatic embryos from TIS culture. Moreover, a successful Agrobacterium mediated transformation on sugarcane was indicated by transient expression of Gus gene and the ability of the transformants grew in a selection medium containing 50 ppm of kanamycin.*

[Keywords: Drought stress, embryogenic calli, somatic embryos, proline]

### Abstrak

Transformasi genetik dapat digunakan sebagai upaya untuk merakit tebu (*Saccharum officinarum* L.) toleran terhadap cekaman kekeringan. Gen *P5CS* diketahui berperan dalam biosintesis prolin, yaitu

asam amino yang umumnya terakumulasi ketika tanaman mengalami cekaman kekeringan. Transformasi gen *P5CS* dan regenerasi transgeniknya mungkin dapat menghasilkan tanaman tebu transgenik yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode transformasi yang optimum yang mencakup strain *Agrobacterium tumefaciens* yang sesuai, sumber eksplan dan varietas tebu terbaik sebagai target transformasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa transformasi gen *P5CS* telah berhasil dilakukan ke eksplan tebu baik yang berupa kalus asal media padat maupun kalus embriogenik dan embrio somatik asal kultur sistem perendaman sesaat (SPS). Sementara itu strain *A. tumefaciens* LBA4404 menunjukkan hasil yang paling efektif sebagai vektor transformasi. Pertumbuhan transforman baik pada kalus maupun embrio somatik pada varietas Kidang Kencana terlihat paling baik dibandingkan dengan varietas PS 881 dan PS 891. Sumber eksplan yang paling efektif adalah embrio somatik yang diperoleh dari kultur SPS. Keberhasilan transformasi tebu melalui *Agrobacterium* ditunjukkan oleh ekspresi transien dari gen GUS dan kemampuan dari transforman untuk tumbuh di media yang mengandung 50 ppm kanamisin.

[Kata kunci: Cekaman kekeringan, embrio somatik, kalus embriogenik, prolin]

### Pendahuluan

Kebutuhan bibit tebu semakin meningkat seiring meningkatnya produksi gula menuju swasembada gula di Indonesia. Jutaan bibit tebu per tahun diperlukan, sebagai contoh pada tahun 2011 sekitar 11 juta bibit tebu disediakan oleh Kementerian Pertanian dan jumlah ini terus meningkat dari tahun ke tahun (Mulyono, 2011). Sementara itu lahan perkebunan tebu semakin menurun dan bergeser ke lahan-lahan marginal. Pemanfaatan lahan marginal

\*) Penulis korespondensi: hmiskan@yahoo.com

menuntut tanaman tebu yang memiliki produktivitas tinggi, toleran terhadap cekaman biotik dan abiotik, khususnya toleran kekeringan.

Rekayasa genetik merupakan salah satu upaya yang ditempuh guna merakit tebu yang toleran kekeringan. Prinsip rekayasa genetik sama dengan pemuliaan tanaman konvensional, yaitu memperbaiki sifat-sifat tanaman dengan menambahkan sifat-sifat ketahanan terhadap organisme pengganggu tanaman (OPT) maupun toleransi terhadap cekaman lingkungan. Namun pemindahan gen dari satu organisme ke organisme lainnya pada pemuliaan melalui rekayasa genetika terjadi dengan lebih terarah dan spesifik. Keberhasilan perakitan tanaman transgenik unggul dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain (1) adanya sistem transformasi dan regenerasi yang mapan, (2) tersedianya konstruksi gen pembawa sifat unggul yang berfungsi dan sesuai, serta (3) tersedianya klon-klon tanaman anjuran baik atas dasar karakter agronomis maupun kemudahan teknis (Berringer, 2000).

Perakitan tebu toleran kekeringan dapat diupayakan dengan mentransfer gen *P5CS* yang menyandi enzim  $\Delta 1$ -Pyrroline-5-carboxylate synthetase (*P5CS*) pada tebu. Gen *P5CS* berperan dalam biosintesis prolin. Prolin merupakan asam amino yang berperan sebagai senyawa osmoprotektan, yaitu senyawa yang terakumulasi saat tanaman mengalami cekaman kekeringan atau cekaman osmotik (Szabados & Savoure, 2009). Transfer gen *P5CS* ke *Arabidopsis thaliana* dan tembakau dilaporkan meningkatkan kandungan prolin dan ketahanan tanaman tersebut terhadap cekaman kekeringan (Kishor *et al.*, 2005; Verbruggen & Hermans, 2008).

Salah satu metode transformasi tanaman yang banyak digunakan adalah dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* yang memiliki kemampuan secara biologis dalam mentransfer bagian DNA tertentu (T-DNA) dari plasmid Ti (*tumor inducing*) ke dalam sel tanaman yang kemudian berintegrasi ke genom tanaman target (Sheludko, 2008). Penggunaan *A. tumefaciens* sebagai vektor untuk melakukan transformasi genetik pada berbagai tanaman dikotil dan monokotil telah terbukti efektif dan mempunyai tingkat keberhasilan dan kestabilan gen yang tinggi, spesifik, mengurangi terbentuknya tanaman kimera dan lebih ekonomis dibandingkan metode transformasi genetik yang lain (Kumar *et al.*, 2014; Mano *et al.*, 2014; Sugiharto & Safitri, 2011).

Selain untuk memperbanyak, kultur jaringan juga dapat digunakan untuk meningkatkan efisiensi transfer gen, seleksi dan regenerasi tanaman transgenik (Shah *et al.*, 2009). Sistem regenerasi tanaman dengan teknik kultur jaringan dapat dilakukan melalui pembentukan organ (*organogenesis*) atau embrio somatik (*somatic embryogenesis*). Metode *embryogenesis somatik* merupakan teknologi yang dapat

memperbanyak tanaman secara seragam dan dalam jumlah yang sangat banyak karena berasal dari satu sel. Transformasi genetik ke sel-sel embrioid atau embrio somatik dianggap sebagai metode terbaik untuk menghindari terjadinya kimera (Deo *et al.*, 2010) dan albino yang dapat disebabkan oleh mutasi pembelahan sel di titik tumbuh eksplan (Susiyanti *et al.*, 2007). Transformasi tanaman tebu telah berhasil dilakukan, tetapi masih banyak kendala yang dihadapi antara lain terhambatnya pertumbuhan tanaman transgenik dan terbentuknya planlet albino (Miswar *et al.*, 2007; Susiyanti *et al.*, 2007). Oleh karena itu, penelitian ini penting untuk dilakukan dalam upaya mendapatkan metode transformasi melalui *A. tumefaciens* yang optimal hingga mendapatkan tebu transgenik yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat *Agrobacterium* yang efektif, sumber eksplan yang sesuai dan varietas tebu yang responsif dalam proses introduksi gen *P5CS* dan regenerasi tanaman transgenik.

## Bahan dan Metode

### Penyiapan eksplan

Pucuk dari varietas PS 881, PS 891 dan Kidang Kencana (KK) ditanam pada media MS padat dan diinkubasi dalam ruang kultur tanpa cahaya selama 4-6 minggu hingga terbentuk kalus. Kalus embriogenik dan embrio somatik varietas PS 881, PS 891 dan KK disiapkan melalui metode *Temporary Immersion System* (TIS) atau Sistem Perendaman Sesaat (SPS) (Mordocco *et al.*, 2009; Minarsih *et al.*, 2013). Kalus yang berasal dari pucuk tebu ketiga varietas tersebut setelah disubkultur sebanyak 2-4 kali kemudian dimasukkan dalam bejana SPS RITA<sup>®</sup> yang dihubungkan dengan pompa dan *automatic timer* (*Autonic*) dengan lama perendaman diatur selama tiga menit dengan frekuensi setiap 24 jam hingga terbentuk kalus embriogenik (enam minggu) dan embrio somatik (delapan minggu).

### Transformasi tebu dengan *pBI-P5CS* melalui *Agrobacterium*

Konstruksi plasmid *pBI* yang telah membawa gen *P5CS Vigna aconitifolia* diperoleh dari Dr. Desh Pal S. Verma, Ohio State University, USA. Transformasi tebu dengan konstruksi tersebut dilakukan menggunakan sel kompeten dari *A. tumefaciens* strain GV3101, LBA4404 dan AGL1. Pembuatan sel kompeten menggunakan metode pembekuan (Wang, 2006). Pengujian keberhasilan transformasi dilihat dari pertumbuhan koloni *A. tumefaciens* di media seleksi mengandung antibiotik kanamisin 50 ppm dan dari analisis menggunakan PCR dengan primer spesifik, dan uji GUS pada kalus transforman.

Gen *P5CS* yang sudah berada di *A. tumefaciens* selanjutnya ditransfer ke dalam eksplan tebu, yaitu pada kalus asal media padat, kalus embriogenik dan embrio somatik asal kultur SPS. Metode transformasi yang digunakan adalah metode Sain *et al.* (1994) yang menggunakan asetosiringon 100 ppm dengan ko-kultivasi dalam kultur gelap selama dua hari. Setelah ko-kultivasi, kalus dipindahkan ke media MS untuk pertumbuhan tunas yang mengandung antibiotik kanamisin. Pertumbuhan kalus di media seleksi diamati di ruang kultur dengan kondisi terang mulai hari ke-1 hingga hari ke-28 yang selanjutnya disubkultur setiap empat minggu hingga terbentuk planlet.

Setelah ko-kultivasi, jika *Agrobacterium* terlihat tumbuh signifikan, maka eksplan kemudian dicuci dengan media MS cair yang mengandung antibiotik cefotaxime untuk menghilangkan sisa-sisa *Agrobacterium* lalu disubkultur di media MS padat dengan penambahan sefotaksim 500 ppm selama tujuh hari di kultur gelap. Jika pertumbuhan *Agrobacterium* tidak terlihat, eksplan dapat langsung dipindahkan ke media seleksi, yaitu MS padat yang mengandung sefotaksim 500 ppm dan kanamisin 50 ppm. Kontrol positif, yaitu kalus, kalus embriogenik dan embrio somatik yang tidak ditransformasi, ditanam di media MS padat sedangkan kontrol negatif, yaitu kalus, kalus embriogenik dan embrio somatik yang tidak ditransformasi, ditanam di media MS padat dengan penambahan sefotaksim 500 ppm dan kanamisin 50 ppm. Pengamatan dilakukan terhadap pertumbuhan kalus transforman, pembentukan tunas dan regenerasinya. Persentase pertumbuhan kalus dihitung berdasarkan jumlah kalus yang tumbuh di media seleksi dibandingkan jumlah kalus yang ditransformasi.

#### Uji GUS

Pengujian GUS dilakukan pada eksplan yang telah ditransformasi berdasarkan metode Jefferson (1987). Larutan X-Gluc (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronic acid*) dipersiapkan dengan cara mencampurkan 1 mM X-Gluc; 0.1 mM  $K_3Fe(CN)_6$ ; 0.1 mM  $K_4Fe(CN)_6$ ; 50 mM fosfat bufer ( $NaH_2PO_4/NaHPO_4$ ) dengan pH 7.0. Tebu transforman diinkubasi selama 24 jam dalam larutan X-Gluc tersebut pada suhu 37°C tanpa cahaya, setelah itu eksplan dicuci dengan metanol, dilanjutkan dengan pengamatan terhadap eksplan yang mengekspresikan gen *gusA* dengan adanya warna biru pada eksplan.

#### Uji keberadaan konstruk P5CS pada tebu hasil transformasi

Pengujian keberadaan gen *P5CS* pada tunas tebu dilakukan menggunakan PCR dengan primer spesifik terhadap daerah terkonservasi dari Open Reading

Frame (ORF) gen *P5CS* dan primer spesifik terhadap gen ketahanan antibiotik kanamisin (*NPTII*). Sampel dari tanaman transgenik di dalam tabung berumur sekitar dua bulan setelah transformasi diisolasi DNA genomiknya dengan metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) skala kecil yang kemudian digunakan sebagai *template* untuk analisis PCR. Beberapa kontrol diikutsertakan untuk mengkonfirmasi hasilnya.

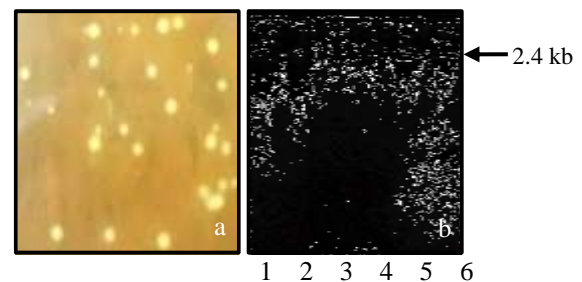
#### Analisis statistik

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan pada semua parameter diuji statistik dengan menggunakan statistika non parametrik. Perbedaan antara nilai rata-rata antar perlakuan ditentukan menurut uji jarak *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf nyata 5%.

### Hasil dan Pembahasan

#### Transfer konstruk gen *P5CS* ke *A. tumefaciens*

Transfer konstruk gen *P5CS* ke dalam *A. tumefaciens* strain GV3101, LBA4404 dan AGL1 telah berhasil dilakukan. Hal ini ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan koloni pada media seleksi dengan penambahan antibiotik kanamisin 50 ppm (Gambar 1a). Hasil elektroforesis dari isolasi plasmid dan PCR menunjukkan ukuran basa yang sama dengan kontrol positif pada 2.4 kb (Gambar 1b). Hal tersebut menunjukkan keberhasilan transformasi ketiga strain *A. Tumefaciens* dengan konstruk gen *P5CS* yang selanjutnya akan ditransfer ke eksplan tebu.



Gambar 1. a. Pertumbuhan koloni hasil transformasi pBI-P5CS ke *A. tumefaciens*. b. Profil elektroforesis hasil transformasi pBI-P5CS ke *A. tumefaciens*. 1= kontrol positif, 2-3= koloni 1 dan 3 strain AGL1; 4-5= koloni 1 dan 2 strain LBA4404 dan 6= koloni 1 strain GV3101

Figure 1. a. Colony growth after transformation of pBI-P5CS to *A. tumefaciens* b. Elektroforesis profile after transformation of pBI-P5CS to *A. tumefaciens* 1= Positive control; 2-3= colony 1 and 3 strain AGL1; 4-5= colony 1 and 2 strain BA4404 and 6= colony 1 strain GV3101.

*Transformasi tebu dengan konstruk gen P5CS dan transient expression dengan uji GUS*

Pertumbuhan eksplan tebu asal kalus dari media padat, kalus embyogenik dan kultur SPS menunjukkan bahwa kalus yang tidak ditransformasi yang ditanam di media MS sebagai kontrol positif terlihat baik, berwarna putih dan sudah mulai muncul tunas pada minggu ke-3. Eksplan yang tidak ditransformasi ditanam di media MS dengan penambahan antibiotik sefotaksim 500 ppm dan kanamisin 50 ppm sebagai kontrol negatif menunjukkan pertumbuhan kalus yang sangat lambat, berwarna kuning dan coklat kehitaman, tidak berkembang dan akhirnya mati. Eksplan yang sudah ditransformasi dapat tumbuh dan berproliferasi walaupun lebih lambat pertumbuhannya dibandingkan dengan kontrol positif. Selanjutnya terlihat eksplan kalus yang berwarna putih mulai membentuk calon tunas kehijauan (Gambar 2).

Pertumbuhan eksplan di media seleksi yang mengandung antibiotik kanamisin mengindikasikan keberhasilan proses transformasi karena pada konstruk plasmid pBI-P5CS terdapat gen *NPTII*, yaitu gen ketahanan terhadap kanamisin (Kishor *et al.* 1995). Kanamisin merupakan antibiotik yang berperan menghambat proses translasi pada bakteri. Oleh karena itu, kanamisin membantu sefotaksim menghambat pertumbuhan *A. tumefaciens* pada jaringan yang telah ditransformasi (Mentewab dan Stewart, 2005).

Pengujian tanaman hasil transformasi dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu skrining untuk ekspresi gen reporter (misalnya gen GUS) dan seleksi tanaman transforman yang tahan terhadap agen penyeleksi (antibiotik) (Jouanin *et al.*, 1993). Ekspresi gen GUS yang mengkode enzim  $\beta$ -glukuronidase (GUS) pada kalus ditandai dengan terbentuknya warna biru (Gambar 3) pada eksplan

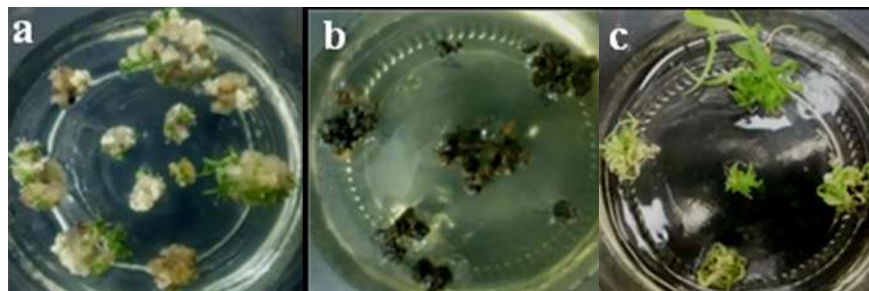
transforman, sehingga mengindikasikan bahwa transformasi konstruk gen P5CS telah berhasil dilakukan ke tebu.

Aktivitas enzim tersebut dapat divisualisasikan dengan kehadiran substrat X-Gluc (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronic acid*) yang diuraikan, sehingga membentuk senyawa antara melalui reaksi dimerisasi oksidatif yang menghasilkan senyawa dikloro-dibromoindigo (ClBr-indigo) yang berwarna biru. Gen GUS hanya akan diekspresikan pada sel tanaman dan tidak pada *Agrobacterium* karena adanya intron pada daerah N-terminal dari sekuens gen *gusA* (Jouanin *et al.*, 1993). Uji GUS merupakan metode yang efektif untuk melihat ekspresi gen GUS pada tanaman transgenik (Hossain *et al.*, 2006; Khamrit *et al.*, 2012).

*1. Pertumbuhan eksplan transforman di media seleksi*

Keberadaan konstruk gen P5CS yang membawa gen reporter NPTII pada eksplan transforman dapat diverifikasi dari pertumbuhan eksplan pada media seleksi MS dengan penambahan antibiotik kanamisin 50 ppm dan sefotaksim 500 ppm. Tabel 1 menunjukkan pertumbuhan dan perkembangan eksplan transforman berumur 16 minggu. Persentase pertumbuhan eksplan transforman yang optimum adalah eksplan yang ditransformasi gen P5CS menggunakan *A. tumefaciens* strain LBA4404 dengan sumber eksplan embrio somatik.

Strain LBA4404 adalah salah satu strain *A. tumefaciens* yang telah banyak digunakan untuk transformasi gen ke tebu seperti yang telah dilakukan Ahmed *et al.* (2007) dan Setyati *et al.* (2007), serta direkomendasikan oleh Eldessoky *et al.* (2011). Selain itu, strain LBA4404 memiliki nilai efisiensi transformasi cukup tinggi yaitu 70% (Tripathi *et al.*, 2005).



Gambar 2. Pertumbuhan eksplan tebu asal kalus setelah transformasi. a. Kontrol positif, b. Kontrol negatif dan c. Tunas tebu transforman.

Figure 2. Growth of sugarcane explants from calli after transformation. a. Positive control, b. Negative control, c. Transformant sugarcane shoots.



Gambar 3. Ekspresi transien gen reporter GUS pada kalus transforman.  
 Figure 3. Transient expression of GUS reporter gene on transformant calli.

Tabel 1. Persentase pertumbuhan eksplan tebu transforman setelah 16 minggu menggunakan tiga strain *A. tumefaciens*.

Table 1. Growth percentages of transformant of sugarcane explants after 16 weeks using three *A. tumefaciens* strains.

Varietas Variety	Sumber eksplan (Explant source)			Rata-rata tumbuh per strain Growth average per strain (%)	Rata-rata tumbuh per varietas Growth average per variety (%)
	Kalus Callus (%)	Kalus embriogenik Embryogenic calli (%)	Embrio somatik Somatic embryo (%)		
Strain GV3101					
KK	94.0	83.9	83.3	80.6 <sup>a</sup>	87.1 <sup>c</sup>
PS 881	88.1	85.7	77.8		83.9 <sup>d</sup>
PS 891	57.1	75.0	80.0		70.7 <sup>e</sup>
Strain LBA4404					
KK	88.0	97.5	80.7	85.3 <sup>a</sup>	88.7 <sup>c</sup>
PS 881	87.6	85.0	82.4		85.0 <sup>d</sup>
PS 891	83.7	72.7	90.0		82.1 <sup>e</sup>
Strain AGL1					
KK	92.9	88.9	81.5	80.8 <sup>a</sup>	87.8 <sup>c</sup>
PS 881	77.8	81.8	76.2		78.6 <sup>d</sup>
PS 891	66.7	70.1	91.7		76.2 <sup>e</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada P=0,05

Note : Means on column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P= 0.05).

Sedangkan sumber eksplan dalam bentuk embrio somatik memiliki persen rata-rata pertumbuhan yang tertinggi, yaitu 82.6%, meskipun secara statistik tidak berbeda nyata dengan eksplan lainnya. Penggunaan embrio somatik sebagai eksplan telah banyak digunakan dalam kultur jaringan tebu (Khan & Khatri, 2006; Ali *et al.*, 2007; Malabadi *et al.*, 2011; Ikram-ul-Haq & Memon, 2012) karena selain pertumbuhannya yang cepat juga memiliki bentuk yang seragam. Selain itu, penggunaan embrio somatik sebagai target transformasi gen menurunkan frekuensi terbentuknya kimera pada regenerasi transgenik (Deo *et al.* 2010).

Pertumbuhan tunas transforman pada media seleksi berumur 32 minggu dapat dilihat pada Tabel

2. Persentase rata-rata pertumbuhan tunas transforman tertinggi diperlihatkan oleh eksplan yang berasal dari kalus embriogenik dengan *A. tumefaciens* strain LBA4404. Akan tetapi hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan jenis eksplan dan strain *Agrobacterium* yang digunakan tidak memberikan hasil yang berbeda nyata. Kalus embriogenik merupakan sumber eksplan yang efektif sebagai target transformasi gen pada tebu seperti yang dilakukan oleh Carmona *et al.* (2005), Susiyanti *et al.* (2007), Gilbert *et al.* (2009) dan Raza *et al.* (2010). Hasil penelitian menunjukkan pula bahwa varietas tebu yang memiliki pertumbuhan eksplan dan tunas tertinggi adalah KK (Tabel 1 dan Tabel 2). Perhitungan persen rata-rata pertumbuhan pada media

Tabel 2. Persentase pertumbuhan tunas transforman (32 minggu).

Table 2. Growth percentages of transformant explants after 32 weeks.

Varietas <i>Variety</i>	Sumber eksplan ( <i>Explant source</i> )			Rata-rata tumbuh per strain <i>Growth average per strain (%)</i>	Rata-rata tumbuh per varietas <i>Growth average per variety (%)</i>
	Kalus <i>Callus (%)</i>	Kalus embriogenik <i>Embryogenic calli (%)</i>	Embrio somatic <i>Somatic embryo (%)</i>		
Strain GV3101					
KK	28.9	5.0	15.7	19.3a	16.5c
PS 881	16.7	23.1	34.0		24.6d
PS 891	22.5	18.9	8.75		16.7e
Strain LBA4404					
KK	26.5	40.0	8.3	22.2a	24.9c
PS 881	33.3	8.3	14.2		18.6d
PS 891	25.9	22.9	20.0		22.9e
Strain AGL1					
KK	7.1	38.0	2.9	12.3a	16.0c
PS 881	11.1	15.4	9.2		11.9d
PS 891	11.1	15.4	0.7		9.1e

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada P=0,05.

Note : Means on column followed by the same letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P= 0.05.

Tabel 3. Tingkat warna kehijauan tunas tebu transforman.

Table 3. Green colour level of transformant of sugercane shoots.

Varietas <i>Variety</i>	Kalus ( <i>Callus</i> )	Kalus embriogenik <i>Embryogenic calli</i>	Embrio somatic <i>Somatic embryo</i>
Strain GV3101			
KK	+	+	+
PS 881	+++	+++	+++
PS 891	+	+	+
Strain LBA440			
KK	+	+	+
PS 881	+	+++	+
PS 891	++	+	++
Strain AGL1			
KK	++	++	+
PS 881	+	+	+
PS 891	+++	+++	++

Keterangan (Note) : +++ = baik (hijau tua seperti kontrol), ++ = cukup (hijau muda), + = kurang (hijau keputih-putihan) ( +++ = Good (dark green similar to control), ++ = moderate (light green), + = poor (white greenish))

seleksi telah diuji secara statistik menggunakan uji beda Duncan/*Duncan Multiple Range Test* dengan selang kepercayaan 5%. Hasil analisis menunjukkan bahwa persentase rata-rata pertumbuhan berdasarkan strain *A. tumefaciens*, sumber eksplan dan varietas tebu yang digunakan tidak berbeda nyata. Sedangkan dalam perkembangannya, yang menunjukkan tingkat

warna hijau tunas yang baik adalah varietas PS 881 (Tabel 3). Perbedaan respons dan efektivitas metode transformasi gen *P5CS* pada ketiga varietas disebabkan karena variasi genotipe tebu yang unik dari masing-masing varietas tebu yang digunakan (Gilbert *et al.*, 2005).



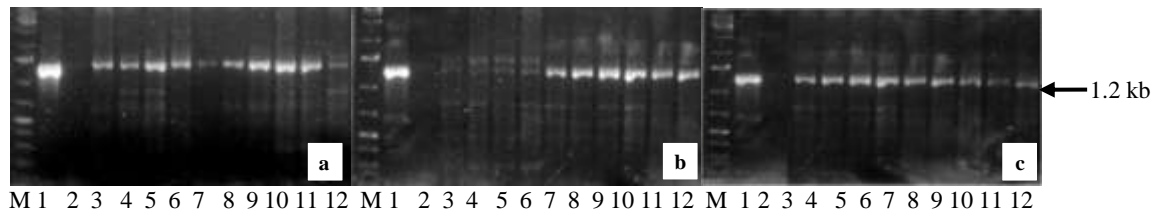
*Pengujian keberadaan konstruk gen P5CS pada transforman dengan metode PCR*

Pengujian keberadaan gen *P5CS* dilakukan dengan analisis PCR dari DNA eksplan transforman. Amplifikasi menggunakan primer spesifik *P5CS CR Forward* dan *P5CS CR Reverse* menghasilkan pita DNA dengan ukuran sekitar 1.2 kb seperti terlihat pada Gambar 5. Primer spesifik ini berasal dari daerah terkonservasi dari sekuen gen *P5CS* tanaman *V. aconitifolia* (Minarsih *et al.*, 2001). Gambar 6 menunjukkan bahwa gen *P5CS* telah tertransformasi ke dalam eksplan dengan adanya pita yang mempunyai ukuran yang sama dengan kontrol positif. Kontrol positif menggunakan DNA plasmid pBI-P5CS, sedangkan kontrol negatif menggunakan air sebagai templat pada proses PCR.

Pengujian menggunakan primer spesifik *NPTII* juga membuktikan kebenaran adanya konstruk gen

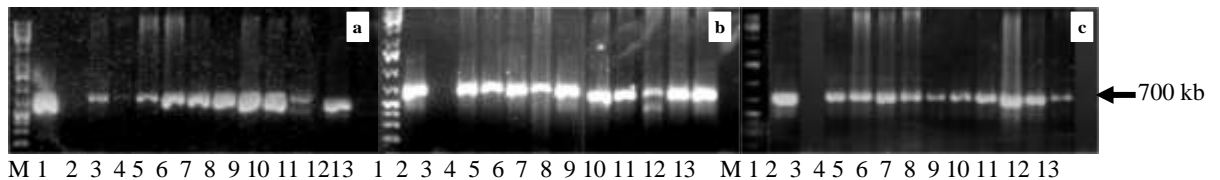
*P5CS* dalam eksplan transforman yang dapat tumbuh dengan baik di media seleksi dengan penambahan kanamisin 50 ppm. Oleh karena itu, eksplan yang tumbuh dan tahan terhadap kanamisin karena telah tertransformasi oleh konstruk gen *P5CS*. Hasil amplifikasi PCR dapat dilihat pada Gambar 6.

Gen *NPTII* (*Neomycin Phosphotransferase II*) telah digunakan secara luas dalam seleksi tanaman transforman. Gen ini membawa sifat resistensi terhadap antibiotik yang berbeda-beda (kanamisin, neomisin, paronomisin dan genetisin) (Jouanin *et al.*, 1993). Analisis PCR menunjukkan adanya pita pada ukuran kurang lebih 700 bp yang mengindikasikan bahwa konstruk gen *P5CS* yang juga membawa gen ketahanan terhadap kanamisin telah tertransformasi dan masuk ke dalam genom tebu. Sedangkan pada kontrol negatif dan eksplan yang tidak ditransformasi tidak terdapat pita karena tidak mengandung konstruk gen *P5CS*.



Gambar 5. Profil elektroforesis amplifikasi eksplan transforman menggunakan primer spesifik *P5CS CR F-R*. A= kalus, B= kalus embriogenik dan C= embrio somatic, M= Marka DNA, 1. Kontrol positif, 2. Kontrol negatif, 3 – 12. Eksplan transforman

Figure 5. Electrophoretic profile of the amplification of transformant explants using specific primer *P5CS CR F-R*. A= callus, B= embryogenic calli, and C= somatic embryo, M= DNA marker. 1= Positive control, 2= Negative control, 3-12= transformant explants.



Gambar 6. Elektroforegram amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik *NPTII* pada eksplan kalus embriogenik. M= Marka DNA, 1= Kontrol positif, 2= Kontrol negatif, 3 – 12= Eksplan transforman dan 13= Eksplan yang tidak ditransformasi.

Figure 6. Electrophoregram of PCR amplification using specific primer *NPTII* on embryogenic calli explants. M= DNA marker, 1= positive control, 2= negative control, 3-12= transformant explants and 13= non-transformant explants.

### Kesimpulan dan Saran

Transformasi gen *P5CS* telah berhasil dilakukan pada tebu menggunakan *A. tumefaciens* strain GV3101, LBA4404 dan AGL1 dengan eksplan kalus dari media padat, embrio somatik dan kalus asal kultur SPS. Pertumbuhan eksplan dan tunas transforman dari eksplan embrio somatik dan kalus embriogenik asal kultur SPS lebih baik dibandingkan eksplan kalus. Sedangkan eksplan transforman yang berasal dari varietas Kidang Kencana menunjukkan pertumbuhan tunas yang paling baik dibandingkan dua varietas lainnya. Hasil uji GUS dan analisis PCR menunjukkan bahwa konstruk gen *P5CS* telah berhasil ditransformasi ke tanaman tebu.

Untuk selanjutnya perlu dilakukan pengamatan pertumbuhan pada regenerasi tanaman transgenik dan analisis ekspresi gen *P5CS* pada eksplan transforman yang diberikan perlakuan cekaman kekeringan.

### Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini merupakan penelitian kontrak kerja sama antara Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI), PT Riset Perkebunan Nasional (RPN) dengan Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan (PUSLITBANGBUN) dengan dana DIPA APBN Tahun 2012. Terima kasih kami ucapkan kepada Tim Peneliti BPBPI dan Dr. Sony Suhandono, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung.

### Daftar Pustaka

- Ahmed MB, MS Akhter, M Hossain, R Islam, TA Choudhury, MM Hannan, MA Razvy & I Ahmad (2007). An efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with an aphidicidal gene, *Pta* (*Pinellia Agglutinin*). *Middle-East J Sci Res* 2 (2), 155-160.
- Ali A, S Naz & J Iqbal (2007). Effect of different explants and media: Compositions for efficient somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Pak J Bot* 39(6), 1961-1977.
- Beringer JE (2000). Releasing genetically modified organism: will any harm out weigh any advantage? *J Appl Ecol* 37, 207-214.
- Carmona ER, AD Arencibia, J Lopez, J Simpsin, D Vargas & F Sala (2005). Analysis of genomic variability in transgenic sugarcane plants produced by *Agrobacterium tumefaciens* infection. *Plant Breed* 124, 33-38.
- Deo PC, AP Tyagi, M Taylor, R Harding & D Becker (2010). Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *SPJNAS* 28, 27-40.
- Eldessoky DS, RM Ismail, AA Abdel-Hadi & N Abdallah (2011). Establishment of regeneration and transformation system of sugarcane cultivar GT54-9 (C9). *GM Crops* 2 (2), 126-134.
- Gilbert RA, M Gallo-Meagher, JC Comstock, JD Miller, M Jain & A Abouzid (2005). Agronomic evaluation of sugarcane lines transformed for resistance to sugarcane mosaic virus strain E. *Crop Sci.* 45, 2060-2067.
- Gilbert RA, NC Glyun, JC Comstock & MJ Davis (2009). Agronomic performance and genetic characterization of sugarcane transformed for resistance to sugarcane yellow leaf virus. *Field Crops Res.* 11, 39-46.
- Hossain MA, MM Shaik, N Islam, HM Faruquee & MAS Miah (2007). Transformation of foreign gene in sugarcane variety Isd 28 using *Agrobacterium*-mediated method. *Bangladesh J Sugarcane* 29, 1-6.
- Ikrum-ul-Haq & S. Memon (2012). Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) cultivar CPF-237. *Afr J Biotechnol* 11(15), 3704-3708.
- Jefferson R (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Reporter* 5, 387-405.
- Jouanin L, ACM Brasileiro, JC Leple, G Pilate & D Cornu (1993). Genetic transformation: a short review of methods and their application, results and perspectives for forest trees. *Ann Forest Sci* 50, 325-336.
- Khamrit R, P Jaisil & S Bunnag (2012). Callus induction, regeneration and transformation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) with chitinase gene using particle bombardment. *African J Biotechnol* 11(24), 6612-6618.
- Khan IA & A Khatri (2006). Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: Histological studies. *Pak J Bot* 38(3), 631-636.
- Kishor PBK, Z Hong, C Miao, C Hu & DPS Verma (1995). Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol* 108, 1387-1394.



- Kavi Kishor PB, S Sangam, RN Amrutha, PS Laxmi, KR Naidu, KRSS Rao, S Rao, KJ Reddy, P Theriappan & N Sreenivasulu (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implication in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci* 88, 424-438.
- Kumar T, MR Khan, SA Jan, N Ahmad, N Ali, MA Zia, S Roomi, A Iqbal & GM Ali (2014). Efficient regeneration and genetic transformation of sugarcane with AVP1 gene. *American-Eurasian J Agric & Environ Sci* 14 (2), 165-171.
- Malabadi RB, GS Mulgund, K Nataraja & SV Kumar (2011). Induction of somatic embryogenesis in different varieties of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *RPB* 1(4), 39-48.
- Mano H, T Fujii, N Sumikawa, Y Hiwatashi & M Hasebe. (2014). Development of an Agrobacterium-mediated stable transformation method for the sensitive plant *Mimosa pudica*. *Plos One* 9(2), 1-11.
- Mentewab A & CN Jr. Stewart (2005). Over-expression of an *Arabidopsis thaliana* ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nat Biotechnol* 23, 1177-1180.
- Minarsih H, D Santoso & N Fitranti (2001). Identification of p5cs gene on sugarcane by PCR using heterologous primer. *Menara Perkebunan*, 69(1), 1-9.
- Minarsih H, I Riyadi, Sumaryono & A Budiani (2013). Perbanyakan massal planlet tebu melalui kultur in vitro menggunakan sistem perendaman sesaat (SPS). *Menara Perkebunan* 81(1), 1-8.
- Miswar, B Sugiharto, J Soedarsono & S Moeljopawiro (2007). Transformasi gen sucrose phosphate synthase (SoSPS1) menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* untuk meningkatkan sintesis sukrosa pada tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.). *Berk Penel Hayati* 12, 137-143.
- Mordocco AM, JA Brumbley & P Lakshmanan (2009). Development of a temporary immersion system (RITA<sup>®</sup>) for mass production of sugarcane (*Saccharum spp.* interspecific hybrids). *In Vitro Cell Dev-P* 45 (4), 450-457.
- Orozco-Castillo, CKJ Chalmers, R Waugh & W Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gen introgression in coffee using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 8, 934-940.
- Raza G, K Ali, Z Mukhtar, S Mansoo, M Arshad & S Asad (2010). The response of sugarcane (*Saccharum officinarum* L) genotypes to callus induction, regeneration and different concentrations of the selective agen (getecitin-418). *J Biotechnol* 9 (51), 8739-8747.
- Sain SL, KK Oduro & DB Furtex (1994). Genetic transformation of cocoa leaf cells using *Agrobacterium tumefaciens*. *PCTOC* 37, 243-251.
- Setyati S, P Oktaviandari, M Hazmi & B Sugiharto (2007). Studi perbandingan metode transformasi DNA menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* pada tanaman tebu (*Sacharum hybrid*). *Berk Penel Hayati* 13, 39-44.
- Shah AH, N Rashid, MS Haider, F Saleem, M Tahir & J Iqbal (2009). An efficient, short and cost-effective regeneration system for transformation studies of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Pak J Bot* 41 (2), 609-614.
- Sheludko YV (2008). *Agrobacterium*-mediated transient Expression as an approach to production of recombinant proteins in plants. *Recent Pat. Biotechnol.* 2, 198-208.
- Sugiharto, B & H Safitri. (2011). A Comparison Study for Agrobacterium-mediated transformation Method in Sugarcane (*Saccharum spp* L.). *J Ilmu Dasar* 12(2), 140 – 147.
- Susiyanti, GA Wattimena, M Surahman, M Purwito & DA Santosa (2007). Transformasi tanaman tebu (cv. PSJT 94-41) dengan gen fitase menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* GV 2260 (pBinPI-IIEC). *Bul Agr* 35 (3), 205-211.
- Szabados L & A Savoure (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15 (2), 1360-1385.
- Tripathi L, JN Tripathi & Jd'A Hughes (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of plantain (*Musa spp.*) cultivar Agbagba. *African J Biotechnol* 4 (12), 1378-1383.
- Verbruggen N & C Hermans (2008). Proline accumulation in plants : A review. *Amino Acids* 35, 753-759.
- Wang K (2006). *Agrobacterium Protocols Second Edition*. Totowa, Humana Press.