

Efektivitas *Agrobacterium* mentransfer gen *P5CS* ke dalam kalus tebu klon PS 851

*Effectivity of Agrobacterium to transfer P5CS gene into sugarcane
callus PS 851 clone*

Niyah FITRANTY¹⁾, F. NURILMALA²⁾, Djoko SANTOSO¹⁾
& Hayati MINARSIH¹⁾

¹⁾Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

²⁾Universitas Nusa Bangsa, Bogor

Summary

Transformation of a P5CS gene construct into plant cells coupled with regeneration for transgenic plantlets should develop sugarcane tolerant to drought stress. The purpose of the research is to increase the efectivity and efficiency of Agrobacterium to transfer into sugarcane callus. Gene transfer into the plant cells was performed biologically using Agrobacterium. In this method, recombinant plasmid of pBI-P5CS could be well conjugated into host cells of Agrobacterium LBA4404 through triparental mating with pRK2013 helper. The parameters were tested to increase the efectivity and efficiency of Agrobacterium to transfer into sugarcane callus is the addition of antioxidant and 1.0% glucose, callus age (2, 3, and 4 weeks), medium pH (4.5; 5.0; and 5.6), treated with air dry for 30 minutes, wetting agent of silwet with and without short vacuum treatment, and acetosyringone concentration (100, 500, and 1000 mg/L). Identification of the gene in sugarcane conducted by PCR using spesific primers, and the expression were tested by measurement of proline content. The result showed that by addition of acetosyringone 100 ppm or more, P5CS transfer into the sugarcane explants by Agrobacterium is effective. The genetic transformation could be optimized by selecting proper age of calli, which was four weeks after sub-culture. The effectiveness could

be maintained and slight improved by inoculation at pH 4.5, addition 1.0% glucose, wetting agent of silwet with short vacuum treatment, or treated with air dry for 30 minutes. In vitro cultures for transgenic regeneration required addition of antioxidant to prevent browning in the culture media. The amplified DNA fragment demonstrated that the gene was transferred into sugarcane plantlets, and P5CS gene expression showed the increasing of proline content in transgenic sugarcane plantlets.

[Key words : Piroline-5 - carboxylate- synthetase, *Saccharum officinarum*, triparental mating, PCR]

Ringkasan

Transformasi transgen *P5CS* yang diikuti dengan regenerasi tanaman transgeniknya diperkirakan mampu menghasilkan tanaman tebu transgenik yang toleran terhadap cekaman kekeringan. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan efektivitas dan efisiensi *Agrobacterium* mentransfer gen *P5CS* ke dalam kalus tebu. Metode transfer gen ke dalam sel tanaman tebu telah dilakukan secara biologis menggunakan *Agrobacterium*. Dalam metode ini, plasmid rekombinan pBI-*P5CS* berhasil dengan baik ditransformasikan ke dalam sel.

Agrobacterium LBA4404 dengan pendekatan *triparental mating* menggunakan *helper* pRK2013. Parameter yang diuji untuk meningkatkan kondisi efektif dan efisien dalam transfer gen *P5CS* ke dalam kalus tebu adalah penambahan antioksidan dan glukosa 1,0%, umur kalus (2, 3, dan 4 minggu), pH medium (4,5; 5,0; dan 5,6), pengeringan kalus 30 menit, bahan pembasah silwet tanpa dan dengan pemakuman, dan konsentrasi asetosiringon (100, 500, dan 1000 mg/L). Pengujian keberadaan transgen *P5CS* dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik, sedangkan ekspresinya diuji dengan mengukur kandungan prolin dari tanaman tebu. Hasil percobaan menunjukkan bahwa Dengan penambahan asetosiringon 100 ppm atau lebih, penggunaan *Agrobacterium* terbukti efektif dan efisien dalam transfer konstruk transgen *P5CS* ke dalam eksplan kalus tebu. Transformasi dapat dioptimalkan dengan memilih eksplan kalus tebu yang baik, yaitu yang umur subkulturnya 4 minggu. Efektivitasnya juga dapat dijaga atau sedikit ditingkatkan dengan inokulasi pH 4,5, penambahan glukosa 1,0%, bahan pembasah silwet dengan pemakuman, ataupun pemberian perlakuan pengeringan udara selama 30 menit. Kultur kalus transgenik memerlukan penambahan antioksidan untuk mencegah terjadinya pencokelatan. Adanya fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer spesifik *P5CS* menunjukkan pada tanaman tebu telah terdapat gen *P5CS*. Demikian pula dengan ekspresi gen *P5CS*, menunjukkan adanya peningkatan kandungan prolin pada tanaman tebu transgenik

Pendahuluan

Salah satu program pemuliaan tebu adalah mendapatkan tanaman tebu toleran kekeringan. Varietas tebu tahan kekeringan yang ada saat ini bukan merupakan varietas tebu dengan produksi tinggi. Rekayasa genetik tebu untuk sifat tahan terhadap cekaman kekeringan dapat dilakukan dengan

mentransfer gen *P5CS* (Δ^1 -pirolin-5-karboksilat sintetase) melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Kishor *et al.*, 1995 melaporkan bahwa gen yang diperoleh dari tanaman *Vigna aconitifolia*, terbukti dapat meningkatkan ekspresi ketahanan terhadap kekeringan dan salinitas tinggi pada tanaman tembakau.

Proses transfer gen *P5CS* dilakukan melalui *Agrobacterium* galur LBA4404 pBI-*P5CS*. Sedangkan gen itu sendiri terdapat dalam plasmid rekombinan pBI-*P5CS*. Plasmid pBI-*P5CS* membawa gen-gen asing yang dapat diekspresikan pada tanaman, yaitu gen *NPTII* (*neomycin phosphotransferase*) yang menyandi pembentukan enzim *neomycin phosphotransferase*, enzim yang dapat merusak antibiotik kanamisin, dan gen *P5CS* (Δ^1 -pirolin-5-karboksilat sintetase). Gen *P5CS* adalah gen yang menyandi enzim Δ^1 -pirolin-5-karboksilat sintetase. Enzim ini mengkatalisis konversi glutamat menjadi Δ^1 -pirolin-5-karboksilat yang kemudian direduksi menjadi prolin. Prolin dianggap sebagai senyawa yang menyebabkan tanaman tahan terhadap cekaman kekeringan.

Transformasi melalui *Agrobacterium* telah berhasil dilakukan pada tanaman padi (Slamet-Loedin *et al.*, 1997), kelapa sawit (Chaidamsari *et al.*, 1998), dan tebu (Minarsih *et al.*, 1999). Namun demikian, pada tanaman kelapa sawit dan tebu, untuk toleransi kekeringan menggunakan gen *P5CS* regenerasi planlet yang terbukti transgenik masih belum berhasil dengan baik. Salah satu aspek yang diduga belum berhasilnya regenerasi planlet tebu transgenik adalah kurang efektifnya proses transfer gen *P5CS* ke dalam kalus tebu.

Penelitian ini bertujuan untuk

meningkatkan efektivitas dan efisiensi *Agrobacterium* mentransfer gen *P5CS* ke dalam kalus tebu dengan berbagai variasi kondisi transformasi sehingga dapat diekspresikan dan regenerasi kalus tebu transgenik menjadi planlet dapat berhasil dengan baik.

Bahan dan Metode

Triparental mating

Secara bertahap proses *mating* dilakukan dengan menggoreskan atau mengaduk bersama satu lup koloni bakteri *E. coli* kemudian *helper* dan *Agrobacterium* secara bergantian pada medium LB padat tanpa antibiotik (Minarsih, 2003). Selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu 28°C selama 8-18 jam. Seleksi dilakukan dengan cara menumbuhkan kembali koloni bakteri tersebut pada medium seleksi yaitu LB padat yang mengandung antibiotik rifampisin 50 mg/L, kanamisin 100 mg/L dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 18 jam. Pada medium seleksi ini diharapkan tumbuh bakteri *Agrobacterium* LBA4404 yang membawa plasmid rekombinan pBI-*P5CS*. Pengujian adanya plasmid rekombinan pBI-*P5CS* pada *Agrobacterium* LBA4404 pBI-*P5CS* dilakukan melalui PCR koloni menggunakan primer spesifik *P5CS*.

Plasmid rekombinan pBI-P5CS

Pengujian adanya plasmid rekombinan pBI-*P5CS* pada *Agrobacterium* LBA4404 pBI-*P5CS* dilakukan melalui PCR koloni menggunakan primer spesifik *P5CS* (Minarsih, 2003) (*forward*: 5'CGGGGG TTCATGAAGGACG 3' dan *reverse*:

5'GAATCGTTAAACATTGTGGACC 3'). Dengan menggunakan tusuk gigi steril, setiap koloni yang tumbuh pada media seleksi dilarutkan dalam 10 µL ddH₂O lalu dicampur dengan 15 µL pereaksi PCR yang terdiri dari 2,5 µL bufer, 0,5 µL dNTPs, 1 µL primer 1, 1 µL primer 2, 0,2 µL enzim *Taq polymerase*, dan 9,8 µL H₂O. Program termalnya untuk setiap reaksi PCR diatur sebagai berikut: denaturasi pada 94°C selama 1 menit, *annealing* pada 55°C selama 1 menit, dan ekstensi pada 72°C selama 3 menit. Reaksi dijalankan pada mesin PCR sebanyak 35 siklus.

Hasil PCR ini dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa 0,8% yang mengandung etidium bromida. Elektroforesis dilakukan selama sekitar 1 jam dengan arus 50 V dalam larutan bufer 0,5x TBE. Hasil elektroforesis diamati dan difoto dengan menggunakan sinar UV. Ukuran fragmen DNA yang dihasilkan dari setiap koloni diharapkan sesuai dengan kontrol positif *E. Coli* JM109 pBI-*P5CS*.

Transformasi Agrobacterium LBA4404 pBI-P5CS

Agrobacterium LBA4404 pBI-*P5CS* yang telah dikulturkan selama 16 jam pada suhu 28°C diencerkan dengan penambahan medium LB (1:10) dan dikulturkan kembali selama 3 jam (Chaidamsari *et al.*, 1998). Sejumlah kalus tebu dari klon PS 851 dicacah dan diinokulasikan ke dalam kultur *Agrobacterium* LBA4404 pBI-*P5CS* yang telah diencerkan kembali dengan medium MS cair (1:10) yang mengandung asetosiringon selama 15 menit. Setelah inokulasi, kalus tebu diangkat dan ditiriskan di atas tisu steril di dalam cawan Petri, lalu

ditanam di medium kokultivasi yang mengandung asetosiringon selama dua hari di ruang gelap. Setelah kokultivasi, kalus dipindahkan ke medium adaptasi yang mengandung antibiotik sefotaksim 500 mg/L selama 5 hari, selanjutnya ditransfer ke medium seleksi yang mengandung antibiotik kanamisin 100 mg/L. Pada medium ini terjadi seleksi antara kalus transforman dan kalus non-transforman. Kalus transforman mampu tumbuh pada medium seleksi sedangkan kalus non-transforman akan mati. Setelah satu bulan di medium seleksi, kalus transforman yang tumbuh dipindahkan ke medium regenerasi MS-T padat untuk pertumbuhan tunas tebu transgenik dengan seleksi antibiotik kanamisin 75 mg/L sampai menjadi planlet. Setelah tiga minggu dan planlet mampu tumbuh pada medium seleksi, planlet dipindah ke medium regenerasi tanpa antibiotik sampai tinggi planlet cukup dan dipindah ke medium MS-R cair untuk pertumbuhan akar. Planlet tebu transgenik ini sudah siap untuk diisolasi DNA dan diuji keberadaan gen *P5CS* dengan PCR.

Pada tahap transformasi ini dilakukan berbagai variasi kondisi transformasi untuk mendapatkan prosedur yang efektif dalam proses transfer gen dari *Agrobacterium* ke dalam sel tanaman tebu. Variasi tersebut adalah (1) penambahan antioksidan asam askorbat dan asam sitrat masing-masing 2,5 mg/L ke dalam medium. (2) kalus sebagai bahan transformasi digunakan dalam berbagai umur, yaitu 2, 3, dan 4 minggu. (3) keasaman lingkungan sel atau media inokulasi dengan menggunakan pH 4,5; 5,0; dan 5,6. (4) penambahan ekstra glukosa sebanyak 1%. (5) perlakuan pengeringan kalus 30 menit sebelum inokulasi. (6) perlakuan vakum dengan menambahkan

silwet pada saat inokulasi, dan (7) variasi kadar asetosiringon 500 dan 1000 mg/L.

Isolasi DNA genomik tebu transgenik

DNA genomik tebu transforman diisolasi dengan metode *CTAB Extraction* dengan skala mini (Minarsih, 2003). Contoh daun seberat 200 mg dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* dan digerus dengan nitrogen cair hingga halus. Ke dalam tabung ditambahkan 750 μ L bufer ekstraksi CTAB. Campuran tersebut dikocok dengan vorteks, lalu diinkubasi dalam pemanas air selama 60 menit pada suhu 65°C. Setelah dibiarkan dingin hingga suhu kamar, kemudian campuran ditambah 750 μ L kloroform-isoamil alkohol (24:1), lalu dicampur secara perlahan dengan cara membalikkan tabung sebanyak 40 kali. Campuran tersebut disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm suhu 4°C. Lapisan atas sebanyak 500 μ L dipipet ke dalam tabung lain yang mengandung isopropanol dan dicampur dengan cara membalik-balikkan. Setelah sentrifugasi 10 menit 11.000 rpm, endapan DNA dicuci dengan menambahkan 76% etanol dan dikeringkan. Endapan DNA yang sudah kering dilarutkan dalam 25 μ L bufer TE. DNA ini dapat digunakan untuk analisis PCR lebih lanjut

Uji keberadaan gen P5CS dan NPTII

Pengujian keberadaan gen *P5CS* pada tanaman tebu transgenik dilakukan menggunakan PCR dengan primer spesifik *P5CS* (*forward*: 5' CATGGAGAGCGCGGTG-GATC 3', *reverse*: 5'CTTCACAGTCT CAGTAAGCTGC 3'). Gen *NPTII*, yang merupakan gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin juga diuji menggunakan primer *NPTII* (*forward*:

Efektivitas *Agrobacterium* mentransfer gen P5CS....

5'GAGGCTATTCGGCTAT GACT 3',
reverse: 5' ATCGGCAGCGGCGATAACC
GT 3'). DNA genomik tebu yang diisolasi
dengan metode *CTAB Extraction* digunakan
sebagai template pada reaksi PCR. Program
termal untuk setiap reaksi PCR diatur
sebagai berikut: denaturasi pada 94°C
selama satu menit, *annealing* pada 58°C
selama satu menit, dan ekstensi pada 72°C
selama tiga menit. Setiap campuran reaksi
total volume sebesar 25 µL dan mengandung
keempat dNTP masing-masing 5 mM, 50 ng
primer 1, 50 ng primer 2, 1 unit *DNA Taq*
polymerase, 100 ng template. Reaksi di-
jalankan pada mesin PCR *Gene-Amp*
sebanyak 35 siklus. Beberapa kontrol
diikutsertakan untuk mengkonfirmasi hasil-
nya. Ukuran fragmen DNA yang dihasilkan
diharapkan sesuai dengan kontrol positif
pBI-P5CS.

Analisis prolin

Pengukuran kandungan asam amino
prolin dilakukan dengan metode Bates *et al.*,
(1973). Sebanyak 0,5g sampel daun tanaman
transgenik digerus dan diekstrak dengan
asam sulfosalisilat 3%. Untuk pewarnaan
ditambahkan larutan ninhidrin serta asam
asetat glasial dan kemudian dipanaskan
100°C selama satu jam. Penambahan toluen
dilakukan setelah itu dan kromofor diukur
dengan spektrofotometer pada panjang
gelombang 520 nm.

Hasil dan Pembahasan

Triparental mating

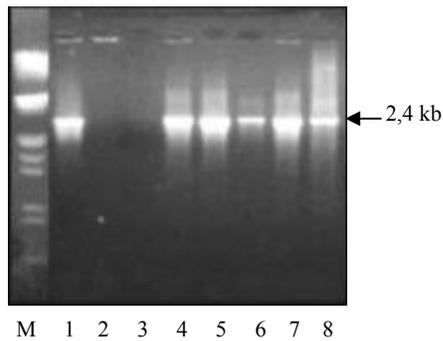
Proses pemindahan plasmid pBI-P5CS
dari *E. coli* ke dalam *Agrobacterium* yang
dilakukan melalui *Triparental mating*

menghasilkan koloni-koloni yang tumbuh
baik pada media seleksi yang mengandung
antibiotik rifampisin dan kanamisin. Anti-
biotik rifampisin dapat menyeleksi
pertumbuhan *Agrobacterium* dari *E. coli*,
sehingga hanya *Agrobacterium* saja yang
mampu tumbuh pada media tersebut.
Sedangkan antibiotik kanamisin adalah
sebagai penyeleksi adanya plasmid pBI-
P5CS pada *Agrobacterium*. Sehingga koloni
yang tumbuh pada media seleksi tersebut
adalah *Agrobacterium* LBA4404 pBI-P5CS.
Konfirmasi adanya plasmid pBI-P5CS yang
dilakukan dengan PCR menunjukkan bahwa
pita fragmen DNA yang dihasilkan
berukuran sama dengan kontrol positif yaitu
2,4kb (Gambar 1).

Transformasi tebu

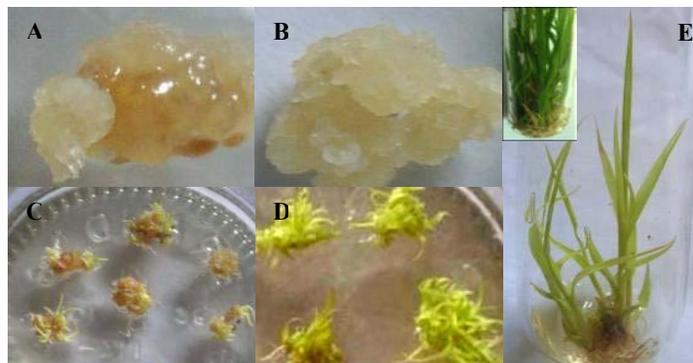
Setelah inokulasi sel kalus dengan
Agrobacterium dan dikulturkan pada
medium seleksi yang mengandung kana-
misin 100 mg/L, terjadi inisiasi kalus baru
dan terus berkembang sampai berumur
empat minggu (Gambar 2). Kalus yang
terseleksi ini kemudian dipindahkan ke
medium regenerasi padat MS-T yang
mengandung antibiotik kanamisin 75 mg/L.
Setelah dua minggu terjadi inisiasi tunas.
Sampai tinggi planlet lebih kurang 5 cm,
planlet dipindahkan ke medium regenerasi
cair MS-R tanpa antibiotik untuk
pertumbuhan akar. Kalus maupun tunas
yang mampu tumbuh di medium seleksi
kanamisin tersebut dapat dipastikan telah
memiliki gen ketahanan terhadap kanamisin
(*NPTII*). Sehingga bisa dipastikan bahwa
proses transformasi *Agrobacterium* yang
membawa plasmid pBI-P5CS telah berhasil.

Variasi kondisi transformasi yang
dilakukan menghasilkan persentase per-



Gambar 1. Hasil PCR koloni *Agrobacterium* yang tumbuh pada medium seleksi. Dari kiri ke kanan: (M) marka λ *EcoRI-HindIII*, (1) plasmid pBI-P5CS, (2) *Agrobacterium* kontrol, (3) H₂O, (4 s.d. 8) koloni transforman.

Figure 1. Coloni PCR result of *Agrobacterium* on selection media. From left to right: (M) λ *EcoRI-HindIII* marker, (1) plasmid pBI-P5CS, (2) control *Agrobacterium*, (3) H₂O, (4 s.d. 8) transformed colonies.



Gambar 2. Perkembangan kalus tebu transgenik. (A) inisiasi kalus di medium seleksi berumur 2 minggu, (B) kalus berumur 4 minggu, (C) inisiasi tunas di medium seleksi berumur 1 minggu, (D) planlet berumur 4 minggu, dan (E) planlet berumur 2 bulan di media tanpa kanamisin, (insert) tebu kontrol.

Figure 2. Development of calli from the transformed-leaf explant. (A) initiation of calli on selection media 2 weeks, (B) 4 weeks, (C) initiation of bud after 1 week on selection media, (D) plantlet after 4 weeks, (E) plantlet after 2 months on media without kanamycin, (insert) control of sugarcane.

Efektivitas Agrobacterium mentransfer gen P5CS....

tumbuhan kalus yang berbeda-beda (Tabel 1). Penggunaan kalus tebu berumur 4 minggu memberikan persentase tertinggi yaitu, 27,12%. Kemungkinan hal ini dipengaruhi oleh tingkat kestabilan kalus. Menurut Sugiyono (1993), masa transisi sel somatik menjadi sel embriogenik telah terlewati pada tahap ini sehingga fragmen DNA dapat diterima dengan baik. Hal ini menyebabkan sel mampu tumbuh pada medium seleksi dan dapat beregenerasi dengan baik.

Proses pengeringan dan vakum memberikan sedikit peningkatan persentase tumbuh kalus. Arencibia *et al.* (1998) melaporkan bahwa pengeringan kalus selama 30 menit sebelum inokulasi dapat mengefektifkan proses transformasi, karena pada keadaan sel kering pelekatan *Agrobacterium* dengan sel akan lebih baik. Perlakuan vakum dapat mengoptimalkan pelekatan *Agrobacterium* dengan sel agar lebih baik dan lama. Pada kondisi vakum, udara yang berada pada rongga sel ditarik

Tabel 1. Pengaruh variasi kondisi transformasi pada pertumbuhan kalus tebu.

Table 1. The effect of transformation condition variation on the development of sugarcane calli.

Peubah <i>Parameter</i>	Entri <i>Entry</i>	Kalus tumbuh <i>Growth of callus</i> (%)
Kontrol ¹⁾ (<i>Control</i>)	2-4 minggu (<i>weeks</i>)	> 80
Umur kalus (<i>Age of callus</i>)	2 minggu (<i>weeks</i>)	8,23
	3 minggu (<i>weeks</i>)	9,26
	4 minggu (<i>weeks</i>)	27,12
Pengeringan (<i>Draination</i>)	tanpa pengeringan (<i>without draination</i>)	12,45
	30 menit (<i>minutes</i>)	19,12
Vakum + silwet (<i>Vacuum + silwet</i>)	tanpa vakum +silwet (<i>without vacuum+ silwet</i>)	7,90 (kan 200)
	3 menit (<i>minutes</i>)	13,80 (kan 200)
pH	4,5	25
	5,0	8,23
	5,6	10,58
Glukosa (<i>Glucose</i>)	tanpa glukosa (<i>without glucose</i>)	15,13
	1%	27,70
Asetosiringon (<i>Acetosyringone</i>)	100 mg/L	10,53
	500 mg/L	10,70
	1000 mg/L	30,00

Keterangan : ¹⁾ Pertumbuhan dan regenerasi tebu non-transgenik.

Explanation : ¹⁾ Growth and regeneration of non-transgenic sugarcane.

sehingga pada saat pelepasan vakum secara perlahan, suspensi *Agrobacterium* dapat dengan cepat memasuki rongga tersebut dan dapat dipastikan *Agrobacterium* masuk ke dalam sel. Selain itu penambahan silwet dapat meningkatkan kontak ini melalui penurunan tegangan permukaan dari suspensi *Agrobacterium* sehingga sel tanaman lebih mudah dibasahi oleh suspensi tersebut.

Kondisi asam pada saat inokulasi sel tebu dengan *Agrobacterium* juga mempengaruhi keefektifan transformasi. Tingkat keasaman yang umumnya digunakan dalam teknik *in vitro* ini adalah pH 5,6 – 5,8. Menurut De la Riva *et al.* (1998), ekspresi gen virulensi yang berperan dalam transfer bagian T-DNA dari *Agrobacterium* ke dalam sel tanaman, lebih baik pada tingkat keasaman yang sedikit lebih rendah. Oleh karena itu dalam penelitian ini, selain pH 5,6 juga digunakan pH 4,5 dan 5,0. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pH 4,5 memberikan persentase kalus tumbuh yang lebih tinggi (25%) dibandingkan dengan pH lainnya yaitu 8,23 dan 10,58% (Tabel 1). Pada pH 4,5 kemungkinan transfer T-DNA ke dalam kalus tebu lebih optimal, sehingga persentase kalus yang tumbuh pada medium seleksi lebih besar. Tetapi dalam perkembangan kalusnya, pH 5,6 memberikan hasil planlet yang lebih baik dari pada perkembangan kalus pada pH 4,5. Menurut Dodds & Robert (1995) pada pH 5,6 proses penyerapan nutrisi oleh sel tanaman lebih optimal.

Penambahan glukosa sebanyak 1% juga berpengaruh terhadap pertumbuhan kalus transforman yaitu sebesar 27,70%. Baron & Zambryski (1995) melaporkan bahwa pada *Agrobacterium*, glukosa berfungsi sebagai *inducer* untuk mengekspresikan gen

virulensi dalam mengenali senyawa fenolik yang dikeluarkan oleh bagian tanaman yang luka, sehingga intensitas masuknya *Agrobacterium* ke dalam sel kalus bisa berlangsung dengan baik. Menurut Gunawan (1988) pada tanaman, glukosa berperan sebagai sumber energi yang siap pakai sehingga ketika tanaman mengalami cekaman setelah inokulasi dapat dengan cepat menstabilkan kondisi tanaman yang tercekam dan hal ini dapat membuat regenerasi kalus tebu menjadi lebih baik.

Pemakaian asetosiringon dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari metode standar (100 mg/L) memberikan hasil yang cukup signifikan. Baron & Zambryski (1995) melaporkan bahwa asetosiringon adalah senyawa fenolik yang ditambahkan pada saat inokulasi yang berfungsi merangsang ekspresi gen *VIR* pada *Agrobacterium* dalam mentransfer T-DNA. Tebu adalah tumbuhan monokotil yang secara alami tidak mengeluarkan senyawa asetosiringon pada saat pelukaan sehingga perlu ditambahkan dari luar. Menurut Chaidamsari *et al.* (1998) konsentrasi yang biasa digunakan pada metode standar adalah 100 mg/L. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa konsentrasi asetosiringon 1000 mg/L menghasilkan persentase kalus yang cukup tinggi yaitu 30,0% (Tabel 1). Asetosiringon dengan konsentrasi tinggi membuat *Agrobacterium* lebih tertarik untuk berintegrasi dengan sel tanaman.

Gen P5CS dan NPTII pada planlet tebu

Hasil PCR menunjukkan adanya pita pada ukuran 400 pb baik pada lajur plasmid pBI-P5CS (n) dan tembakau transgenik (o) maupun pada lajur tebu transgenik (a – m) (Gambar 3). Tampak bahwa gen P5CS

Efektivitas Agrobacterium mentransfer gen P5CS...

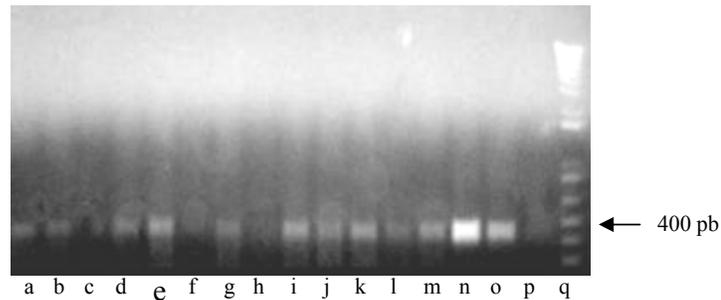
telah positif berada di dalam genom tanaman tebu. Gen *NPTII* yang merupakan gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin diamplifikasi menggunakan primer spesifik *NPTII* juga menunjukkan hasil yang positif (Gambar 4). Pita berukuran 500 pb ini adalah ukuran sekuen *NPTII* yang dihasilkan baik oleh plasmid pBI-*P5CS* (o) maupun DNA tebu transgenik (a – n).

Eksresi gen P5CS pada planlet tebu

Eksresi gen *P5CS* pada tanaman tebu transgenik diketahui berdasarkan kandungan prolannya. Prolin akan terakumulasi di dalam jaringan tanaman apabila tanaman tersebut mengalami cekaman kekeringan atau pada keadaan cekaman salinitas tinggi. Menurut Widyasari & Sugiyarta (1997) dalam keadaan normal, prolin yang dihasilkan bersifat umpan balik dan karena kehadiran air, prolin akan dioksidasi kembali menjadi

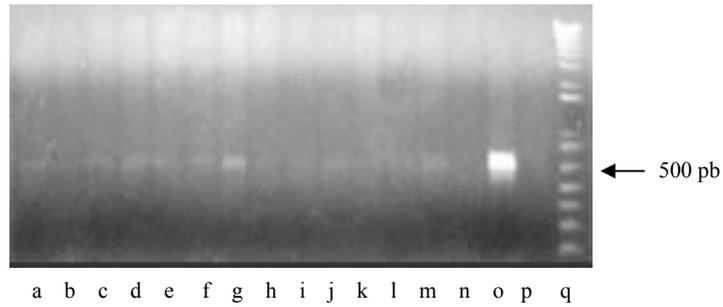
asam glutamat (Gambar 5). Oleh karena itu dalam kondisi normal konsentrasi prolin akan selalu rendah. Pada kondisi kekeringan oksidasi prolin akan dihambat sehingga produksi prolin akan bertambah dan dengan adanya gen *P5CS* produksi prolin semakin meningkat karena enzim *P5CS* memicu katalisis glutamat menjadi prolin. Oleh sebab itu adanya akumulasi prolin dapat menjadi indikator tanaman yang toleran terhadap kekeringan dan salinitas tinggi.

Hasil analisis kandungan prolin pada tebu transgenik dan non transgenik menunjukkan adanya variasi yang cukup tinggi dibandingkan dengan tanaman tebu kontrol non transgenik (Gambar 6). Kadar prolin bervariasi kemungkinan disebabkan masuknya transgen *P5CS* ke dalam kromosom tanaman terjadi pada intensitas dan posisi yang berbeda. Hal ini menyebabkan ekspresi transgen *P5CS* dari masing-masing planlet tebu transgenik



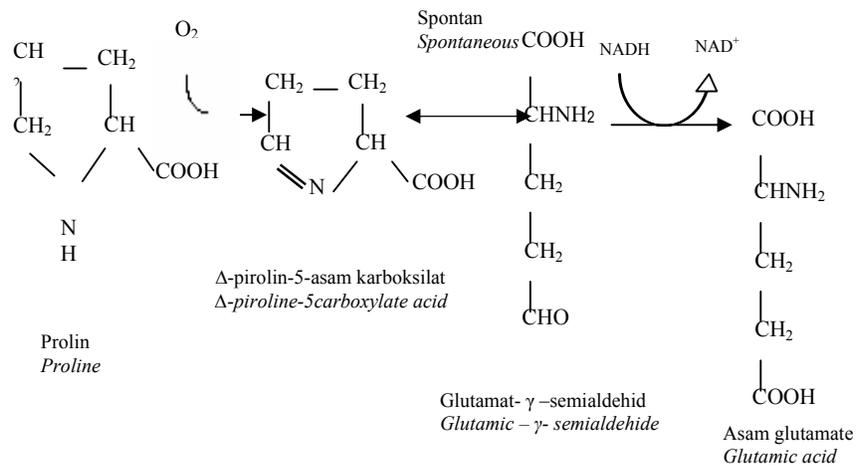
Gambar 3. Profil gel agarosa dari produk PCR DNA genomik tebu transgenik menggunakan primer spesifik *P5CS*. (a) s.d. (m) tebu transgenik, (n) pBI-*P5CS*, (o) tembakau transgenik, (p) tebu non transgenik dan (q) marka 1 kb ladder plus.

Figure 3. Agarose gel profile of the PCR product of transgenic sugarcane genomic DNA using the *P5CS* Specific primer. (a) to (m) transgenic sugarcane plantlets, (n) plasmid pBI-*P5CS*, (o) transgenic tobacco plantlets, (p) sugarcane non-transformed, and (q) 1 kb ladder plus marker.



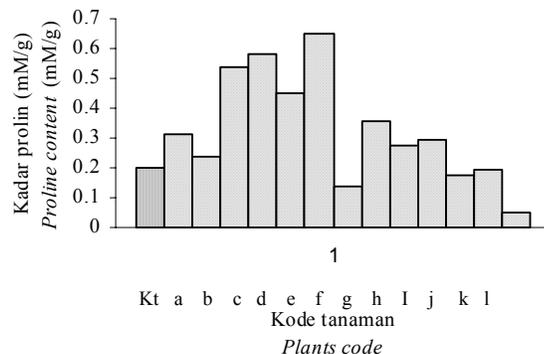
Gambar 4. Profil gel agarosa dari produk PCR DNA genomik tebu transgenik menggunakan primer NPTII. (a) s.d. (n) tebu transgenik, (o) pBI-P5CS, (p) tebu non transgenik, dan (q) marka 1 kb ladder plus.

Figure 4. Agarose gel profile of the PCR product of sugarcane genomic DNA using the NPTII primer. (a) to (n) transgenic sugarcane plantlets, (o) plasmid pBI-P5CS, (p) sugarcane non-transformed, and (q) 1 kb ladder plus marker.



Gambar 5. Rangkaian reaksi oksidasi prolin.

Figure 5. The pathway of proline oxidation.



berbeda pula. Penyebab lainnya adalah keadaan vigor dari tebu transgenik itu sendiri yang lemah. Oleh karena itu akumulasi prolin tidak bisa berlangsung dengan semestinya.

Kesimpulan

Efektivitas *Agrobacterium* dalam mentransfer gen *P5CS* ke dalam kalus tebu klon PS 851, dapat ditingkatkan dengan penginduksi asetosiringon 1000 mg/L, pH media 4,5 dengan penambahan glukosa 1%. Kalus yang digunakan berumur 4 minggu yang didahului dengan pengeringan 30 menit lalu divakum dengan penambahan bahan pembasah silwet.

Daftar Pustaka

Arencibia, A. D., E. R. Carmonia, P. Tellez M. Chan, S. Yu, L. E. Trujillo & P. Oramas (1998). An efficient protocol

for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res.*, **7**, 213-222.

Bates, L. S., R. P. Waldren & I. D. Tiare (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, **39**, 205-207.

Baron, C. & P. C. Zambryski (1995). Notes from the underground: highlights from plant-microbe interactions. *Tibtech.*, September, **13**, 356-361.

Chaidamsari, T., D. Santoso & J. S. Tahardi (1998). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of oil palm cells. *In Proc. Inter. Oil Palm Conf.* Bali, September 23-25, 1998 p. 602-605.

De la Riva, G.A., J.G. Cabrera, R. Vasquez-Padron & C. Ayra-Pedro (1998). *Agrobacterium*: a natural tool for plant transformation. *Electronic of Biotech.*, **1**(30), 1-19.

Efektivitas Agrobacterium mentransfer gen P5CS....

- Dodds, J. H. & L. W. Roberts (1995). *Experiments in plant tissue culture*. 3rd ed. New York, Cambridge University Press.
- Gunawan, L. W. (1988). *Teknik kultur jaringan tumbuhan*. Bogor, Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB.
- Kishor, P. B. K., Z. Hong, G. H. Miao, C. A. A. Hu & D. P. S. Verma (1995). Overexpression of Δ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plant. *Plant Physiol.*, 108, 1387-1394.
- Minarsih, H., D. Santoso & E. Sugiyarta (1999). Perakitan tanaman tebu tahan kekeringan melalui pendekatan rekayasa genetika. *Dalam Prosiding Pertemuan Teknis Bioteknologi Perkebunan untuk Praktek*. Bogor, 5-6, Mei 1999. p. 59-69.
- Minarsih, H. (2003). *Rekayasa genetik tebu (Saccharum officinarum L.) untuk toleransi kekeringan*. Laporan Penelitian. Riset Unggulan Terpadu VIII. Bogor, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.*, 15, 473-496.
- Sugiyono (1993). *Pengaruh hormon 2,4 D dan BAP terhadap multiplikasi kalus purwoceng*. Purwokerto, Universitas Jenderal Soedirman. Skripsi
- Widyasari, W. B. & E. Sugiyarta. (1997). Akumulasi prolin dalam jaringan daun tebu sebagai indikator sifat varietas tebu tahan kering. *Majalah Penelitian Gula*, XXXIII (1), 1-10.