

# Uji Sensitivitas Kalus dan Tunas Tebu (*Saccharum officinarum* L.) pada Kondisi Tercekam Hygromisin

Giry Marhento<sup>1</sup>, Fitri Damayanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pendidikan Biologi FTMIPA, Universitas Indraprasta PGRI, Jl. Nangka 58 Jagakarsa-Jakarta Selatan  
E-mail: giry-marhento@gmail.com

<sup>2</sup> Pendidikan Biologi FTMIPA, Universitas Indraprasta PGRI, Jl. Nangka 58 Jagakarsa-Jakarta Selatan  
E-mail: fitridamayantineng@gmail.com

## ABSTRAK

Lahan marginal di Indonesia umumnya terdiri dari lahan masam dengan tingkat kemasaman yang tinggi (pH rendah) dan konsentrasi aluminium (Al) yang mencapai tingkat toksisitas. Kendala yang dihadapi adalah tidak adanya kultivar (genotipe) tebu yang adaptif pada lahan masam. Pendekatan yang paling efektif untuk merakit kultivar tebu toleran lahan masam adalah dengan menerapkan teknologi DNA rekombinan. Gen yang diintroduksi ke dalam plasmid selain mengandung gen untuk ketahanan terhadap Al juga mengandung gen penanda seleksi terhadap antibiotik salah satunya adalah *hygromycin phosphotransferase*. Uji sensitivitas kalus dan tunas transforman tebu pada kondisi tercekam hygromisin penting dilakukan untuk menghasilkan nilai efisiensi transformasi yang tinggi. Penentuan konsentrasi antibiotik ini dilakukan untuk menghindari terjadinya *escape* resisten terhadap hygromisin. Tujuan kegiatan ini adalah mendapatkan konsentrasi optimum antibiotik hygromisin pada eksplan kalus dan tunas tebu. Bahan tanaman yang digunakan adalah tebu kultivar PS864 dan BL. Konsentrasi hygromisin yang diuji adalah 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 mg/l yang diuji pada eksplan kalus dan tunas tebu. Hasil uji efektivitas antibiotik hygromisin pada kalus terlihat bahwa tebu kultivar BL lebih sensitif dari pada varietas PS 864 yakni pada penambahan 30 mg/l. Konsentrasi 30 mg/l digunakan sebagai konsentrasi minimal yang dapat menghambat pertumbuhan dan merupakan konsentrasi lethal pada tanaman tebu.

## Kata Kunci

Aluminium, Hygromisin, Kalus, Tebu, Tunas.

## 1. PENDAHULUAN

Salah satu komoditas perkebunan penting dan sudah lama dibudidayakan di Indonesia adalah tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.). Tebu merupakan salah satu tanaman utama penghasil gula. Selain untuk produksi gula, tebu juga dimanfaatkan sebagai bahan baku untuk berbagai macam industri, seperti: farmasi, pengolahan kertas, sumber bahan bakar terbarukan, dan pakan ternak. Oleh karena itu kebutuhan tebu secara nasional terus meningkat. Namun Di Indonesia, peningkatan kebutuhan akan produksi tebu belum diimbangi dengan produksi tebu nasional. Hal ini terjadi karena terbatasnya areal pertanaman tebu atau terjadi alih fungsi lahan. Berdasarkan<sup>[1]</sup> maka perluasan tanaman tebu diarahkan ke lahan-lahan marginal. Di dunia dari total 100% lahan yang dapat ditanami untuk produksi tanaman, sekitar 30-40% merupakan lahan masam ber-pH di bawah lima koma lima<sup>[2], [3]</sup>. Indonesia memiliki lahan marginal yang cukup luas di luar pulau Jawa dimana umumnya terdiri dari lahan masam. Kendala utama yang dihadapi dalam pengembangan tanaman tebu di lahan masam adalah aluminium (Al) yang mencapai tingkat toksisitas. Sel yang tercekam Al dapat memicu produksi Reaktif Oxygen Species (ROS), menghambat respirasi, menguras ATP, dan akhirnya dapat mengakibatkan kematian tanaman<sup>[4]</sup>.

Strategi yang dapat dilakukan untuk mengatasi permasalahan lahan masam adalah penggunaan varietas yang toleran. Keberhasilan perakitan varietas tebu toleran

terhadap cekaman Al sangat ditentukan oleh ketersediaan sumber gen yang mengendalikan toleransi tersebut. Gen-gen yang mengendalikan dan meregulasi toleransi cekaman Al tidak tersedia pada genom tebu<sup>[5]</sup>, sehingga upaya pemuliaan tanaman untuk meningkatkan toleransi cekaman Al menggunakan pendekatan konvensional tidak dapat dilakukan. Rekayasa genetik merupakan teknik yang saat ini sudah banyak digunakan dalam pemuliaan tanaman yang ditujukan untuk mengintegrasikan gen-gen ke dalam genom tanaman target tanpa adanya batasan hubungan spesies. Oleh karena itu pendekatan teknologi DNA rekombinan untuk merakit tanaman transgenik melalui teknik transformasi gen merupakan salah satu pendekatan lain yang dapat dilakukan<sup>[6], [7], [8], [9], [10], [11]</sup>.

Gen yang akan diintroduksi ke dalam plasmid selain mengandung gen untuk ketahanan terhadap Al juga mengandung gen penanda seleksi terhadap antibiotik seperti neomycin phosphotransferase II (NPT II) atau hygromisin phosphotransferase (HPT). Oleh karena itu langkah awal untuk keberhasilan teknik transformasi adalah prosedur kegiatan optimasi media seleksi yaitu penentuan konsentrasi antibiotik yang tepat dalam menyeleksi tanaman tebu transgenik dilakukan uji efektivitas konsentrasi antibiotik hygromisin pada kalus dan tunas pada media MS sehingga diperoleh nilai efisiensi transformasi yang tinggi. Penentuan uji efektivitas

antibiotik ini penting dilakukan agar tidak ada kalus atau tunas yang mati karena dosis antibiotik yang terlalu tinggi. Langkah ini juga penting dilakukan agar kalus dan tunas yang lolos seleksi atau bertahan hidup karena konsentrasi antibiotik yang rendah untuk menghindari terjadinya *escape* resisten terhadap hygromisin. Tujuan dari kegiatan ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi yang optimum dalam uji efektivitas antibiotik hygromisin pada eksplan kalus dan tunas dari beberapa varietas tebu sehingga diperoleh nilai efisiensi transformasi yang tinggi.

## 2. METODE

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah kalus embriogenik dan tunas dari tanaman tebu cv PS 864 dan BL. Konsentrasi hygromisin yang diuji adalah 0, 10, 20, 30, 40, dan 50 mg/l. Perlakuan disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dimana masing-masing perlakuan terdiri dari 25 kalus atau tunas. Hygromisin ditambahkan pada media dasar Murashige and Skoog<sup>[12]</sup> setelah itu di masukkan ke autoklaf dan dibiarkan dingin sampai suhu sekitar 50°C. Pada perlakuan kalus media MS diperkaya dengan dua koma empat strip D 3 mg/l yang diperkaya dengan Casein Hidrolisat pada taraf 500 mg/l dan PVP 100 mg/l serta penambahan asam amino gysin dan atau glutamine. Media untuk seleksi tunas adalah media dasar MS yang diperkaya dengan BAP nol koma tiga mg/l dengan penambahan IBA nol koma lima mg/l dan PVP 100 mg/l<sup>[13]</sup>. Kalus dan tunas diinkubasikan dalam ruang kultur bersuhu 25±2°C. Peubah yang diamati adalah lama kalus atau tunas bertahan hidup dalam media seleksi hygromisin, struktur serta warna kalus dan tunas yang dihasilkan.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil kegiatan optimasi media seleksi antibiotik pada eksplan kalus terlihat bahwa tebu varietas BL lebih sensitif terhadap hygromisin dari pada varietas PS 864 walaupun jumlah tunas yang dihasilkan varietas BL lebih banyak. Minggu pertama dan kedua semua kalus mampu bertahan hidup pada semua konsentrasi hygromisin, sensitifitas mulai terjadi pada minggu ke-3 dimana pada varietas BL mencapai hampir 50% pada konsentrasi 50 mg/l dan mencapai 100% pada minggu ke-4. Dari hasil optimasi media seleksi ini hygromisin pada konsentrasi 30 mg/l digunakan sebagai konsentrasi minimal yang dapat menghambat pertumbuhan dan merupakan konsentrasi lethal pada tanaman tebu (dilihat dari varietas PS 864), sehingga konsentrasi ini digunakan untuk menyeleksi kalus transforman yang resisten terhadap hygromisin. Konsentrasi hygromisin 30 mg/l juga dilakukan untuk menyeleksi *Trichoderma harzianum*<sup>[14]</sup>.

Tabel 1. Hasil uji sensitivitas eksplan kalus tebu PS 864 dan BL terhadap antibiotik hygromisin (n=25)

Konsentrasi hygromisin (mg/l)	Varietas Tebu	Persentase (%) eksplan mati pada minggu ke-				Persentase (%) kalus membentuk tunas	Jumlah tunas
		1	2	3	4		
0	PS 868	0	0	0	0	100	60
	BL	0	0	0	0	100	27.4
10	PS 864	0	0	12	36	28	8
	BL	0	0	28	36	48	4.4
20	PS 864	0	0	20	48	12	5.2
	BL	0	0	40	68	24	2
30	PS 864	0	0	28	52	4	1.6
	BL	0	0	48	84	12	1.6
40	PS 864	0	0	36	64	0	0
	BL	0	0	40	88	18	1.2
50	PS 864	0	0	48	76	0	0
	BL	0	0	48	92	0	0

Varietas tebu PS 864 memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi dibandingkan varietas BL. Hal ini terlihat dari perlakuan konsentrasi 10 mg/l pada minggu ke-2 tunas mati mencapai 90% sedangkan pada varietas BL hanya 40%. Dari hasil kegiatan ini maka konsentrasi hygromisin yang digunakan untuk menyeleksi tunas transforman adalah 10 mg/l pada tahap awal. Pada tunas yang resisten, maka konsentrasi tersebut akan ditingkatkan menjadi 30 mg/l. Konsentrasi 10 mg/l juga dilakukan pada tanaman sorgum<sup>[15]</sup>. Sedangkan pada tanaman tebu varietas HSF-240 konsentrasi hygromisin 50 mg/l digunakan untuk menyeleksi tunas tebu. Pemilihan konsentrasi ini dilakukan untuk menghindari terjadinya *escape* resisten terhadap hygromisin.

Tabel 2. Hasil uji sensitivitas tunas tebu PS 864 dan BL terhadap antibiotik hygromisin (n=25)

Konsentrasi hygromisin (mg/l)	Varietas Tebu	Persentase (%) eksplan mati pada minggu ke-				Persentase (%) tunas bermultiplikasi	Jumlah tunas
		1	2	3	4		
0	PS 868	0	0	0	0	100	225
	BL	0	0	0	0	100	312
10	PS 864	4	92	100	100	20	12
	BL	0	40	72	80	20	26
20	PS 864	8	96	100	100	0	0
	BL	12	100	100	100	0	0
30	PS 864	32	100	100	100	0	0
	BL	28	100	100	100	0	0
40	PS 864	48	100	100	100	0	0
	BL	40	100	100	100	0	0
50	PS 864	100	100	100	100	0	0
	BL	52	100	100	100	0	0

## 4. KESIMPULAN

Uji sensitifitas media seleksi antibiotik hygromisin pada eksplan kalus varietas BL lebih sensitif terhadap hygromisin. Optimasi media seleksi hygromisin pada konsentrasi 30 mg/l digunakan sebagai konsentrasi minimal yang dapat menghambat pertumbuhan dan merupakan konsentrasi lethal pada tanaman tebu.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapkan terima kasih penulis sampaikan Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) Ditjen Penguatan Riset dan Pengembangan DIKTI yang telah mendanai penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Permentan. 2007. *Peraturan Menteri Pertanian No 26/Permentan/OT.140/2/2007 tentang Pedoman Perizinan Usaha Perkebunan*.
- [2] L. V. Kochian, M. A. Pineros, and O. A. Hoekenga. 2005. *The physiology, genetics and molecular biology of plant aluminum resistance and toxicity*. Plant and Soil., vol. 274, pp. 175–195.
- [3] Z. N. Chen, X. Q. Zhao, and R. F. Shen. 2010. *The alleviating effect of ammonium on aluminum toxicity in Lespedeza bicolor results in decreased aluminum-induced malate secretion from roots compared with nitrate*. Plant Soil., vol. 337, pp. 389–398.
- [4] V. A. Vitorello, F. R. Cavaldi, and V. A. Stefanuto. 2005. *Recent advances in aluminum toxicity and resistance and higher plants*. Braz J Plant Physiol. vol. 17, pp. 129–143.
- [5] A. Gianotto, H. M. C. de Abreu, P. Arruda, J. C. Bespalhok, W. L. Burnquis, S. Creste, L. de Ciero, J. A. Ferro, A. V. de Oliveira, T. de Sousa, M. F. Grossi-de-Sá, E. C. Guzza, H. P. Hoffmann, M. G. de Andrade, N. Macedo, S. Matsuoka, F. E. de Castro, W. J. da Silva, M. de Castro, and C. E. Ulian. 2011. *Sugarcane (Saccharum X officinarum): A reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil*. Tropical Plant Biology., vol. 4, no. 1, pp. 62–89.
- [6] N. Fitranty, F. Nurilmala, dan D. Santoso 2003. *Efektivitas Agrobacterium mentransfer gen P5CS ke dalam kalus tebu klon PS 851*. Menara Perkebunan. vo. 71, pp. 16-27.
- [7] D. A. Santosa, R. Hendroko, A. Farouk, and R. Greiner. 2005. *A Rapid and Highly Efficient Method for transformation of Sugarcane Callus*. Molecular Biotechnology, vol. 28, pp. 113-120.
- [8] Gao, Z. Jayaraj, J. Muthukrishnan, S. Clafin, and G. H. Liang. 2005. *Efficient genetic transformation of Sorghum using a visual screening marker*. Genome. vol. 48, pp. 321-333.
- [9] Susiyanti, G. A. Wattimena, M. Surahman, A. Purwito, dan D. A. Santoso. 2007. *Transformasi tanaman tebu (cv. PSJT 94-41) dengan gen fitase menggunakan Agrobacterium tumefaciens GV 2260 (pBinPI-IIEC)*. Bul Agron, vol. 35, pp. 205-211.
- [10] S. Gurel, E. Gurel, R. Kaur, J. Wong, L. Meng, and H. Q. Tan. 2009. *Efficient, reproducible Agrobacterium-mediated transformation of sorghum using heat treatment of immature embryos*. Plant Cell Rep. Vol. 28, pp. 429–444. DOI 10.1007/s00299-008-0655-1.
- [11] W. Shiromani, V. Basnayake, R. Moyle, R. G. Birch. 2011. *Embryogenic callus proliferation and regeneration conditions for genetic transformation of diverse sugarcane cultivars*. Plant Cell Rep, vol. 30, pp. 439–448.
- [12] T. Murashige, and F. Skoog. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture*. Physiol Plant. vol. 15, pp. 473–497.
- [13] F. Damayanti, I. Mariska, Suharsono, U. Widyastuti. 2015. *Pendewasaan kalus embriogenik somatik tanaman tebu (saccharum officinarum l.) dengan kombinasi BAP dan kinetin*. Prosiding Semirata 2015 bidang MIPA BKS-PTN Barat. Universitas Tanjungpura Pontianak, Pp. 29 – 35.
- [14] L. Yang, Q. Yang, K. Sun, Y. Tian, H. and Li. 2010. *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of SOD gene to Trichoderma harzianum*. World J Microbiol Biotechnol, vol. 26, pp. 353–358.
- [15] J. Li, L. Wang, Q. Zhan, F. Fan, T. Zhao, and H. Wan. 2016. *Development of a simple and efficient method for Agrobacterium-mediated transformation in sorghum*. Int. J. Agric. Biol. vol. 18, pp. 134–138.
- [16] S. A. Khan, Z. Hanif, U. Irshad, R. Ahmad, M. Yasin, M. F. Chaudhary, A. Afroz, M. T. Javed, U. Rashid, and H. Rashid. 2013. *Genetic transformation of sugarcane variety HSF-240 with marker gene GUS*. Int. J. Agric. Biol. vol. 15, pp. 1258–1264.