

**Optimization of Concentration Kanamycin in the Soybean Explants
(*Glycine max* L. Merr) to Transformation TcPIN Gene^{*)}**

Optimasi Konsentrasi Kanamisin pada Eksplan Kedelai (*Glycine max* L. Merr) Untuk Transformasi gen TcPIN

Mayta Novaliza Isda

Department of Biology, Faculty of Science and Mathematics, Riau University, Indonesia
E-mail : maytaisda@yahoo.com

ABSTRACT

Increase of production soybean plagued by pod borer (*Etiella zinckenella*, Tr.). This pest is one factor that leads to lower soybean production. This pest can cause yield losses of up to 80% of soybean production. Until now there is no way of effective and efficient control of the pest is spreading very fast. One of the genes for traits such as plant resistance to pod borer is Proteinase Inhibitor (*PIN*) which is toxic to predators and pathogens. The *TcPIN* genes derived from cocoa crop This study aims to determine the concentrations of kanamycin prior to transformation *TcPIN* genes in soybean plants. Soybean explants grown in culture media that have been added in various concentrations of kanamycin. The results showed that the optimum concentration obtained kanamycin concentration of 50 ppm (mg / L).

Key words : *TcPIN gene, soybean pod bore , proteinase inhibitor, transformation, kanamycin*

ABSTRAK

Peningkatan produksi tanaman kedelai terkendala dengan adanya hama penggerek polong (*Etiella zinckenella*,Tr.). Serangan hama ini merupakan salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya produksi kedelai. Serangan hama ini dapat menyebabkan kehilangan hasil produksi kedelai hingga 80%. Hingga saat ini belum ada cara pengendalian yang efektif dan efisien terhadap hama yang penyebarannya sangat cepat tersebut. Salah satu gen yang membawa sifat ketahanan tanaman terhadap hama penggerek polong adalah Proteinase Inhibitor (*PIN*) yang bersifat toksik terhadap predator dan patogen. Gen proteinase inhibitor ini (*TcPIN*) telah diisolasi dari kulit buah kakao. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentasi kanamisin sebelum dilakukan transformasi gen *TcPIN* pada tanaman kedelai. Eksplan kedelai ditanam dalam media kultur yang sudah ditambahkan kanamisin dalam berbagai konsentrasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi kanamisin optimum didapatkan konsentrasi 50 ppm (mg/L).

Kata kunci : *Gen TcPIN, hama penggerek polong, ,proteinase inhibitor, transformasi, kanamisin*

^{*)} Makalah ini telah diseminarkan pada SEMIRATA PTN WILAYAH BARAT pada tanggal 11-13 Mei 2012 di Universitas Negeri Medan.

PENDAHULUAN

Usaha peningkatan produksi kedelai di Indonesia terkendala oleh adanya serangan hama penggerek polong. Serangan hama ini merupakan salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya produksi kedelai. Kehilangan produksi dapat mencapai hingga 80%, dan biji kedelai yang terserang mutunya menurun atau bahkan tidak laku dijual. Hingga saat ini belum ada cara pengendalian yang efektif dan efisien terhadap hama yang penyebarannya sangat cepat tersebut.

Salah satu pemecahan yang menjadi pusat perhatian saat ini adalah penyediaan bibit tanaman kedelai yang tahan terhadap hama penggerek polong. Pendekatan pertama telah dilakukan dengan seleksi terhadap varietas yang memiliki daya regenerasi *in vitro* yang cukup baik dan tahan terhadap penggerek polong. Untuk mencari alternative lain dikembangkan tanaman kedelai transgenik yang membawa gen ketahanan terhadap penggerek polong. Agar dapat diterima masyarakat, gen ketahanan diambil dari tanaman, yang dalam penelitian ini menggunakan gen proteinase inhibitor yang diisolasi dari buah kakao (Isda *et al.*, 2008).

Proteinase inhibitor (*Pin*) tanaman diketahui bersifat toksik terhadap predator dan patogen. Jika protein tersebut termakan oleh hama, *pin* akan berinteraksi dengan protease yang terdapat di dalam usus, selanjutnya terikat dan terkunci pada situs aktif (*active site*) protease (Terra *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 1998). Oleh karena asam amino tidak dapat dihasilkan oleh proteasenya, hama menjadi kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhan dan perkembangannya menjadi terhambat. Peluang keberhasilan ekspresi gen *pin* pada beberapa tanaman cukup tinggi. Transformasi dengan gen *pin* telah berhasil dilakukan diantaranya pada tanaman ubi jalar varietas Jewel (Ambarwati *et al.*, 2000). Pada biji kakao telah ditemukan proteinase inhibitor sebagai storage protein (Tai *et al.*, 1991). Santosa (2001) telah melakukan pengembangan prosedur analisis ekspresi gen *pin* pada tingkat DNA dari tanaman kakao UAH. Isda *et al.* (2007), fragmen gen *pin* dari kulit kakao yang berukuran 600 bp telah berhasil diisolasi, dari hasil analisis dengan program BLAST fragmen tersebut mempunyai homologi yang tinggi dengan protein 21 kDa. Selanjutnya Isda *et al.*, (2008) menjelaskan bahwa ekspresi gen *Tcpin* pada kulit buah kakao yang tahan penggerek buah kakao lebih tinggi ekspresi gen *Tcpin* dari klon buah kakao yang tidak tahan penggerek buah kakao.

Peluang keberhasilan ekspresi gen *PIN* pada beberapa tanaman cukup tinggi. Transformasi dengan gen *pin* telah berhasil dilakukan diantaranya pada tanaman ubi jalar varietas Jewel (Ambarwati *et al.*, 2000), ekspresi gen *pin* dari *Arabidopsis* dalam tanaman poplar yang mengekspresikan sifat ketahanan terhadap hama *Chrysomela populi* L. (Delledonne *et al.*, 2001), gen *pin II* dari kentang telah berhasil ditransformasi pada tanaman kedelai dan mengekspresikan sifat ketahanan terhadap hama *Etiella zinckenella* Tr. (Pardal *et al.*, 2004).

Berkembangnya bioteknologi memungkinkan penggunaan sumber gen yang berasal dari organisme lain. Untuk mendapatkan kedelai yang mempunyai ketahanan hama penggerek polong dapat dilakukan dengan menyisipkan gen *TcPIN* (*Theobroma cocoa proteinase inhibitor*) kedalam tanaman kedelai. Penyisipan gen ketahanan ini dapat dilakukan dengan teknik transformasi gen *TcPIN* pada tanaman kedelai melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Untuk mentransformasi *Agrobacterium tumefaciens* Strain *AGL-O* ke media transformasi maka media harus ditambahkan jenis dan konsentrasi antibiotik yang cocok sehingga gen *Tcpin* sebagai gen target dapat tersisip ke tanaman kedelai. Untuk itu tujuan penelitian adalah menentukan konsentrasi optimal kanamisin sebelum dilakukan transformasi gen *TcPIN* pada tanaman kedelai.

METODE PENELITIAN

Sterilisasi Biji Kedelai

Dipilih 100 biji kedelai varietas Anjasmoro yang bagus. Direndam di detergen 3% selama 30 menit, dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Diirendam dalam fungisida 0.2% selama 30 menit., dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Direndam dalam alkohol selama 1 menit, dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Direndam dalam Clorox 10% selama 10, bilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Direndam dalam Clorox 5% selama 20 menit. dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali. Direndam dalam betadine 10*, selama 5 menit. Dibilas dengan akuades steril sebanyak 3 kali dan siap ditanam pada media ½ MS (eksplan tanam 100 biji).

Perkecambahan Biji Kedelai sebagai Bahan Eksplan

Biji kedelai yang telah disterilisasi dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi *tissue* steril dan ditiriskan beberapa saat. Proses penanaman kedelai dilakukan secara aseptik di dalam

laminar air flow cabinet. Penanaman kedelai di masing-masing botol dilakukan rata-rata 7 biji kedelai per botol media. Seluruh botol-botol yang telah berisi kedelai dan telah ditutup dengan aluminium foil diletakkan pada rak kultur di ruang kultur. Suhu ruang kultur berkisar antara 24-25°C, dalam kondisi terang dengan penerangan selama 16 jam /hari. Ruang kultur diusahakan bebas dari bakteri dan jamur sehingga pertumbuhan kedelai tidak terhambat.

Pengaruh Kanamisin Terhadap Eksplan Pada Media Induksi Tunas

Pembuatan media induksi embrio sebanyak 350 mL yang akan dibagi ke dalam 7 labu Erlenmeyer. Pertama dilakukan dengan menimbang sukrosa sebanyak 10.5 g dan *gellan gum* sebanyak 0.1 g untuk masing-masing labu Erlenmeyer. Selanjutnya, larutan MS dipipet dan dimasukkan ke dalam gelas piala 500 mL. Larutan tersebut ditambahkan akuades hingga setengah gelas piala dan diletakkan di atas pengaduk magnetik. Kemudian, sukrosa ditambahkan dan dilakukan pengukuran pH larutan dengan pH meter hingga menunjukkan nilai 5.7-5.8. Apabila nilai pH yang terukur kurang dari 5.7, maka dilakukan penambahan KOH 1N dan apabila lebih dari 5.8 ditambahkan dengan HCl 1N. Jika sudah mencapai nilai pH yang diinginkan, gelas piala diangkat. Selanjutnya, larutan dituang ke dalam gelas ukur dan ditambahkan akuades hingga 350 mL. Kemudian, larutan dituang kedalam Erlenmeyer yang telah ditambahkan *gellan gum*. Larutan diaduk hingga rata lalu mulut Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan dikuatkan dengan karet. Labu Erlenmeyer yang berisi larutan media induksi embrio tersebut disterilisasi. Setelah disterilisasi, media didiamkan beberapa menit sampai hangat kemudian dituang ke dalam cawan petri kecil secara aseptik di dalam laminar. Sebelum dituang ke dalam cawan petri, media ditambahkan antibiotik kanamisin dengan konsentrasi 0, 25, 50, 75, 100, 125, dan 150 ppm menggunakan pipet mikro dan media dikocok hingga rata. Media didiamkan sampai memadat lalu dirapatkan dengan parafilm dan diberi label untuk membedakan tiap konsentrasi.

Kultur Eksplan Kedelai pada Media dengan Penambahan Kanamisin

Setelah Perkecambahan biji kedelai selama 12 sampai 14 hari, daun dan kotiledon yang tumbuh digunakan sebagai bahan eksplan. Daun kedelai secara aseptik dengan bantuan pinset dipindahkan ke dalam cawan petri steril. Daun dipotong menjadi eksplan dengan ukuran 0,5 cm². Selanjutnya, parafilm dibuka kemudian pinggiran dari cawan petri dipanaskan di atas bunsen. Cawan dibuka dan dengan bantuan pinset, lalu eksplan daun dikulturkan pada media induksi tunas yang sudah ditambahkan kanamisin pada konsentrasi

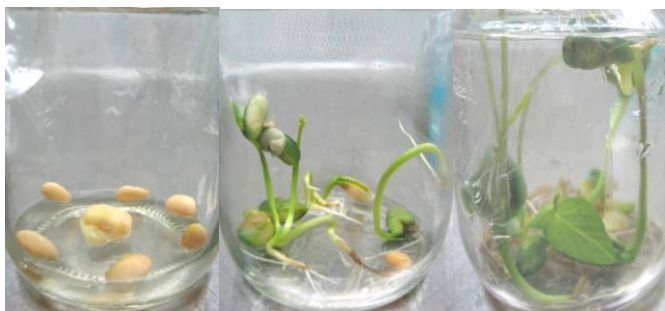
yang berbeda-beda. Cawan lalu dipanaskan dan ditutup dengan *wrap*, kemudian cawan petri diberi label untuk membedakan masing-masing konsentrasi kanamisin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Kultur Kedelai

Media Murashige-Skoog (MS) merupakan media yang digunakan untuk seluruh prosedur kultur jaringan. Menurut Gunawan (1992), media ini mengandung unsur N dalam bentuk NO_3 dan NH_4^+ dengan konsentrasi yang besar dibandingkan media tumbuh lainnya. Unsur N yang terdapat dalam media MS merupakan komponen dari asam amino, amida, nukleotida dan koenzim yang amat diperlukan oleh tanaman (Lehninger, 1995).

Kultur kedelai ditumbuhkan kurang lebih dua minggu dengan diberikan sedikit penyinaran lampu neon setiap harinya (Gambar 1.). Ruang kultur diusahakan bebas dari bakteri dan jamur sehingga pertumbuhan kedelai tidak terhambat. Cahaya penting dalam pengendalian pertumbuhan eksplan karena tanpa cahaya pertumbuhan jadi semakin melambat, berdaun sedikit, kecil dan pucat karena produksi klorofil berkurang. Namun, kedelai tidak dapat mengalami penyinaran lebih dari 16 jam/hari karena berdasarkan Sumarno & Manshuri (2007) kedelai merupakan tanaman hari pendek dan kedelai tidak akan berbunga bila lama penyinaran (panjang hari) melampaui batas kritis tersebut sebab cahaya merupakan faktor lingkungan yang dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman kedelai. Data pertumbuhan kultur kedelai diambil pada minggu kedua tepatnya setelah hari kedua belas.



Gambar 1. Perkecambahan biji kedelai untuk bahan bahan eksplan: 0, 7, dan 12 hari

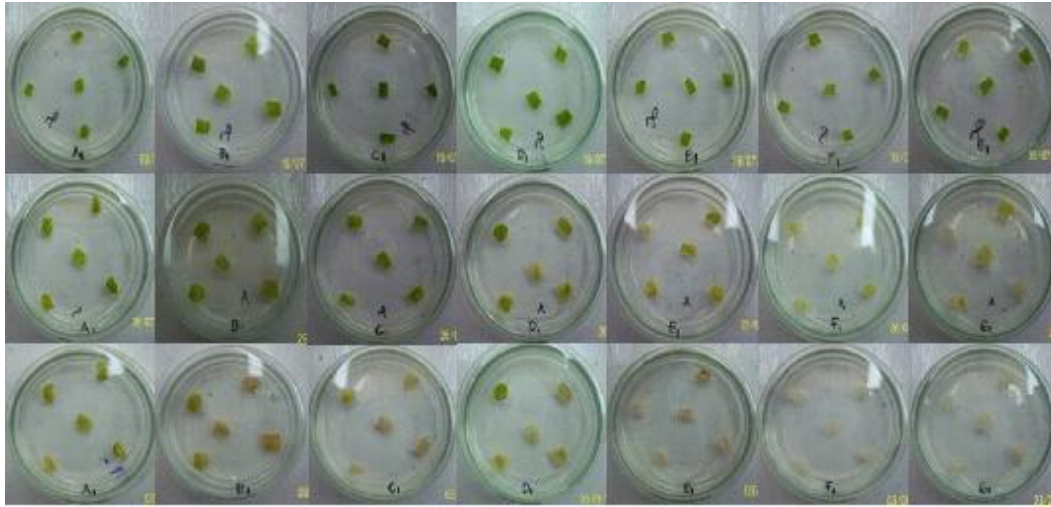
Proses Penentuan Konsentrasi Kanamisin pada Eksplan Kedelai

Penentuan konsentrasi kanamisin dilakukan melalui beberapa tahapan-tahapan diantaranya sterilisasi dan inisiasi kedelai, pertumbuhan kultur kedelai, pengamatan sensitivitas daun kedelai terhadap kanamisin, dan penentuan konsentrasi optimum kanamisin. Tahapan-tahapan tersebut dilakukan dengan beberapa kali ulangan untuk mendapatkan hasil yang akurat. Proses sterilisasi dan inisiasi kedelai dilakukan dengan menggunakan biji kedelai dan mengalami proses sterilisasi sebanyak empat kali ulangan dengan dua kali perlakuan. Proses ini merupakan langkah awal untuk menghasilkan eksplan kedelai, yaitu proses penanaman biji kedelai pada media Murashige-Skoog sehingga terjadi pertumbuhan biji kedelai. Proses pertumbuhan kultur kedelai merupakan tahap lanjutan dari proses sterilisasi dan inisiasi kedelai. Kedelai setelah tumbuh pada media Murashige-Skoog (MS) dan menghasilkan eksplan kedelai berupa daun barulah masuk ke tahap berikutnya yaitu pengamatan sensitivitas eksplan daun kedelai terhadap kanamisin. Pengamatan sensitivitas eksplan daun kedelai terhadap kanamisin merupakan proses pengamatan daun kedelai dikulturkan pada media induksi tunas yang sudah ditambahkan kanamisin pada konsentrasi berbeda-beda. Tujuan perbedaan konsentrasi ini untuk membandingkan pengaruh konsentrasi pada daun kedelai. Daun kedelai digunakan karena lebih mudah tumbuh dan lebih mudah dalam proses pengamatan warna daun. Pengamatan daun kedelai dilakukan selama dua minggu dengan dua kali ulangan untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat dan mendekati hasil yang diharapkan oleh peneliti. Hasil dari pengamatan tersebut yang kemudian digunakan untuk tahapan akhir yaitu penentuan konsentrasi optimum antibiotik kanamisin. Proses penentuan konsentrasi optimum antibiotik kanamisin ini dilakukan dengan melihat pada konsentrasi berapa daun masih terlihat menghijau sebelum konsentrasi pada saat daun memutih seluruhnya. Penentuan konsentrasi optimum antibiotik kanamisin tersebut yang kemudian akan digunakan untuk kegiatan transformasi gen pada tanaman kedelai.

Pengamatan Sensitivitas Daun Kedelai terhadap Kanamisin

Pertumbuhan kultur kedelai selama kurang lebih 12 hari tersebut menunjukkan hasil pertumbuhan eksplan kedelai. Eksplan kedelai tersebut yaitu daun hasil penanaman biji kedelai yang sudah tumbuh pada botol kultur. Daun akan di tanam pada media induksi embrio yang diberikan larutan stok kanamisin 100.000 ppm dengan masing-masing konsentrasi yaitu 0, 25, 50, 75, 100, 125 dan 150 ppm. Daun kedelai yang sudah tumbuh secara aseptik dengan bantuan pinset dipindahkan ke dalam cawan petri steril. Daun dipotong

menjadi eksplan dengan ukuran 0.5 cm² selanjutnya dikulturkan pada media induksi tunas yang sudah ditambahkan kanamisin pada konsentrasi yang berbeda-beda (Gambar 2).



Gambar 2. Pengamatan konsentrasi kanamisin hingga minggu ke-2

Hasil persentase kematian eksplan serta pengamatan sensitivitas konsentrasi kanamisin sejak awal pengkulturan hingga minggu kedua digunakan untuk menentukan pada konsentrasi optimum antibiotik kanamisin pada eksplan kedelai untuk proses transformasi gen pada tanaman kedelai. Transfer gen yang akan dilakukan oleh peneliti membutuhkan penanda (*marker*) pada proses transformasi dan penanda tersebut berupa antibiotik kanamisin. Kanamisin digunakan bertujuan untuk menguji aktifitas dan kebenaran gen yang sedang diteliti dapat ditransformasi ke dalam tanaman kedelai atau tidak. Sehingga untuk mengetahui aktifitas tersebut perlu di tentukan konsentrasi optimum kanamisin untuk proses transformasi. Data yang telah di dapatkan berdasarkan pengamatan sensitivitas eksplan daun kedelai pada kanamisin menunjukkan bahwa konsentrasi optimum kanamisin terjadi pada konsentrasi 50 ppm (mg/L).

SIMPULAN DAN SARAN

SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat diambil kesimpulan yaitu

1. Berdasarkan pengamatan sensitivitas eksplan daun kedelai pada kanamisin menunjukkan bahwa konsentrasi 50 ppm (mg/L) merupakan konsentrasi optimum untuk transformasi gen *TcPIN* pada tanaman kedelai

SARAN

Pada penelitian selanjutnya perlu penyisipan gen TcPIN dan regenerasi kalus yang banyak untuk dilakukan analisis DNA dengan PCR sebagai konfirmasi insersi gen dari hasil transformasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati,A.D., A. Sisharmini, T.J. Santosa, M. Herman & Minantyorini. 2000. Transformasi Ubi Jalar dengan Gen PIN II dan Gen CP-SPFMV. Dalam: *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. pp. 111-117.
- Delledonne, M., G. Allegro, B. Belenghi, A. Balestrazzi, F. Picco, A. Levine, S. Zelasco, P. Calligari & M. Confalonieri. 001. Transformation of white poplar (*Populus alba* L.) with a novel *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. *Molecular Breeding* 7: 35–42
- Isda, M.N., M. Kasim, T. Chaidamsari, dan Mansyurdin. 2007. Kloning dan Karakterisasi Gen Proteinase Inhibitor (PIN) dari Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.). Laporan KKP3T 2007.
- Isda, M.N., M. Kasim, T. Chaidamsari, Mansyurdin dan D. Santoso. 2008. Kloning dan Karakterisasi Gen Penyandi Inhibitor dari Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *J. Menara Perkebun* 76(2):83-92.
- Isda, M.N., M. Kasim, Mansyurdin dan T. Chaidamsari. 2008. Isolasi Gen *Proteinase Inhibitor* dari Tanaman Kakao (*Theobroma cacao*, L.). Seminar Nasional Kakao. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Andalas, Padang pada tanggal 22 Agustus 2008.
- Lehninger AL. 1994. *Dasar-Dasar Biokimia*. Edisi ke-3. Maggy Thenawidjaya, penerjemah Jakarta. Erlangga. Terjemahan dari Basic of Biochemistry.
- Pardal, S.J., G.A. Wattimena, H. Aswidinnoor, M. Herman, E. Listanto & Slamet. 2004. Transfer Gen Proteinase Inhibitor II pada Kedelai melalui Vektor *Agrobacterium tumefaciens* untuk Ketahanan Terhadap Hama Penggerek Polong (*Etiella zinckenella* Tr.). *Jurnal Bioteknologi Pertanian*, Vol. 9. No. 1 : 20-28.
- Sumarno A.G., Manshuri. 2007. Persyaratan tumbuh dan wilayah produksi kedelai di Indonseia, hal 74 – 103. Dalam Sumarno, Suyamto, A. Widjono, Hermanto, H. Kasi (Eds). *Kedelai, Teknik Produksi dan Pengembangan*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor.
- Tai, H., McHenry, L., Fritz, P.J., & D.B. Furtek. (1991). Nucleid acid sequence of a 21 kDa *cocoa* seed protein with homology to the *soybean trypsin inhibitor* (Kumitz) family of *protease inhibitors*. *Plant Mol. Biol.* 16: 913-915.
- Walker, A.J., L. Ford, M.E.N. Majerus, I.E. Geoghegan, A.N.E. Birch, J.A. Gatehouse & A.M.R. Gatehouse. (1998). Characterisation of the midgut digestive proteinase



activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28: 173-180.

