



Multiplikasi, Induksi Planlet dan Seleksi Tembakau Hasil Transformasi Gen *Coat Protein* SMV Secara Kultur in Vitro

In-vitro multiplication, planlets induction, and selection of tobacco transformed with the SMV coat protein gene

AGUNG-ASTUTI, E. HANDAYANI[♥], I.A. RINEKSANE, N.A. FITRIYAH

Program Studi Budidaya Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta 55256

Diterima: 15 Maret 2004. Disetujui: 17 Mei 2004.

ABSTRACT

A study has been conducted to screen and multiply calluses and buds of tobacco transformed with the *Soybean Mosaic Virus* (SMV) coat protein gene and to induce them to plantlet formation by using MS medium with phytohormon treatments. The multiplication of calluses and buds was carried out by sub-culturing on MS medium using 0.3 mg/L NAA+1 mg/L BAP, followed by induction of plantlet formation on MS medium supplemented with NAA and BAP at varied concentration. The results showed that tobacco calluses transformed with SMV coat protein gene was multipliable on MS medium supplemented with NAA at a concentration of 0.3 mg/mL and BAP at 1 mg/L concentration. In this experiment kanamycin was used at a concentration of 100 µg/mL which resulted in the viability level of 84%. On MS medium supplemented with 0.3 mg/L NAA, 0.1 mg/L BAP, and 100 µg/mL kanamycin, induction of calluses to plantlet formation reached 20% level.

Keywords: multiplication, induction, selection, tobacco, SMV coat protein gene.

♥ Alamat korespondensi:

Jl. HOS Cokroaminoto 17,
Yogyakarta 55256.
Tel/Fax: +62-274-618044.
e-mail: ettym@umy.ac.id,
ettym@eudoramail.com

PENDAHULUAN

Banyak penyakit tanaman yang sesungguhnya disebabkan infeksi virus namun disebarkan melalui vektor serangga inang. Mosaik daun merupakan penyakit virus penting pada tanaman yang hingga kini belum ditemukan metode pengendalian yang memadai. Virus tersebut dapat bertahan hidup bertahun-tahun dalam sisa tanaman yang mudah terinfeksi atau di dalam tanah, mudah menular, dan sulit dikendalikan (Agrios, 1988; Prescott *et al.*, 1999).

Soybean Mosaic Virus (SMV) merupakan virus yang menyerang kedelai, penyebab penyakit mosaik (*crinkle*). Bibit memperlihatkan gejala tumbuh tinggi dan kurus. Daun nekrotik,

keriput, dan melengkung ke bawah, tulang daun menguning dan cepat rontok, tanaman menjadi kerdil dan akhirnya mati. Virus merupakan agen infeksi dengan satuan terkecil virion yang terdiri dari bahan genetik DNA atau RNA dan protein selubung *coat protein* (*cp*). Pada saat menginfeksi sel, virus akan memasukkan bahan genetiknya dan bereplikasi dengan cepat dan setelah *coat protein* (*cp*) menyelubungi bahan genetik maka terjadi lisis sel (Prescott *et al.*, 1999). Penyakit mosaik kedelai dapat mempengaruhi pertumbuhan dan hasil panen 60-90%, bahkan mengakibatkan kegagalan panen (Somaatmadja, 1988; Semangun, 1991). *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) merupakan virus yang menyerang tanaman tembakau, dapat menghambat

pertumbuhan tanaman. Daun belang dengan warna hijau muda sampai kuning, luas daun tidak merata, daun menjadi kering dan keriput, sehingga menurunkan mutu daun dan nilai jualnya menjadi rendah. Mosaik tembakau dapat menurunkan produksi hingga 60% (Semangun, 1991).

Berbagai cara pengendalian penyakit akibat virus telah dilakukan, namun hasilnya kurang memuaskan. Pada saat ini banyak peneliti menggunakan teknik rekayasa genetik untuk mengembangkan tanaman transgenik yang tahan terhadap virus yang disebut sebagai *CP-Mediated Resistance* (CP-MR), yaitu: ketahanan tanaman yang disebabkan oleh ekspresi gen *coat protein* (Beachy, 1998). Dilaporkan oleh Power-Abel *et al.*, (1986) tembakau transgenik *cp*-TMV yang resisten terhadap TMV ternyata tidak menunjukkan adanya gejala penyakit, meskipun diinokulasi dengan *Tomato Mosaic Virus* (ToVM) maupun SMV. Demikian juga tomat yang diinfeksi gen *cp*-TMV ternyata tahan terhadap ToVM (Nelson, 1988).

Untuk mendapatkan tanaman kedelai yang tahan terhadap penyakit Mosaik, perlu dikembangkan tanaman transgenik dengan penyisipan gen *cp*-SMV. Isolasi virus SMV isolat lokal dari Yogyakarta dan amplifikasi gen *coat protein* SMV telah dilakukan dan berhasil diklon pada plasmid pCP 19-1, kemudian dipindah ke vektor pRT 101 dan pCV002, lalu ditransformasi ke bakteri *Agrobacterium* (Sismindari dan Sujadi, 1996). Selanjutnya *Agrobacterium* yang mengandung *cp*-gen tersebut telah berhasil ditransformasikan ke daun tembakau dengan metode *leaf disc transformation* dan membentuk kalus tunas pada medium MS yang ditambah NAA kadar 0,3 mg/L dan BAP kadar 1 mg/L dengan penanda kanamisin untuk seleksi (Agung-Astuti *et al.*, 2002).

Tujuan jangka panjang penelitian ini adalah untuk mendapatkan tanaman kedelai yang tahan terhadap infeksi virus SMV dengan mekanisme CP-MR. Untuk mengetahui bekerjanya sistem ekspresi gen *cp*-SMV isolat lokal, maka perlu ditransformasi ke tembakau sebagai tanaman model, karena tembakau sudah biasa digunakan dalam penelitian transformasi, sehingga relatif mudah diperoleh transformasi genetik dan regenerasi tanaman transgeniknya dalam kultur in vitro.

Untuk mengembangkan tembakau transgenik yang tahan virus, maka harus dilakukan multiplikasi kalus dan induksi planlet, sebelum aklimatisasi serta serangkaian pengujian baik

secara in vitro pada aras molekular maupun pengujian dilapangan berupa ketahanan terhadap virus. Faktor yang mempengaruhi keberhasilan kultur in vitro antara lain: keadaan aseptis, lingkungan fisik seperti cahaya dan temperatur, sumber eksplan, komposisi media dan ZPT (zat pengatur tumbuh) (Pierik, 1987). Kultur in vitro tembakau transgenik *cp*-SMV pada medium MS yang ditambah NAA kadar 0,3 mg/L dan BAP kadar 1 mg/L dapat menghasilkan kalus dan tunas (Agung-Astuti *et al.*, 2002). Selanjutnya hasil penelitian Estuningsih (1999) menunjukkan bahwa kultur in vitro tembakau akan menghasilkan planlet pada medium MS yang ditambah dengan NAA 3 mg/L dan BAP 1 mg/L.

Tujuan penelitian ini adalah (i) memperbanyak kalus dan tunas tembakau hasil transformasi gen *cp*-SMV; (ii) menginduksi menjadi planlet pada medium MS dengan perlakuan ZPT; dan (iii) menyeleksi transforman terhadap ketahanan kanamisin. Dari hasil penelitian ini diharapkan diperoleh kalus, tunas dan planlet tembakau hasil transformasi yang selanjutnya dapat dikembangkan dengan serangkaian penelitian dan pengujian. Apabila telah dihasilkan tanaman tembakau atau kedelai transgenik tahan virus maka pada akhirnya dapat dikembangkan bibit tahan virus secara massal melalui kultur in vitro untuk memenuhi kebutuhan petani, sehingga penurunan produksi akibat serangan virus dapat dikendalikan.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan pada penelitian terdiri dari: bakteri *Agrobacterium* yang mengandung plasmid rekombinan *cp*-SMV isolat lokal dari Dr. Sismindari, Apt. Kalus tembakau transgenik *cp*-SMV koleksi Ir. Agung-Astuti, M.Si. Medium MS dengan NAA dan BAP untuk multiplikasi dan induksi kultur in vitro. Alat-alat yang digunakan terdiri dari: alat gelas untuk kultur in vitro, *dissetting set*, *laminar air flow*, autoklaf, timbangan analitik, dan mistar.

Cara kerja

Multiplikasi kalus

Kalus tembakau hasil transformasi dimultiplikasi pada medium MS sesuai prosedur Goerge dan Sherington yang ditambah NAA kadar 0,3

mg/L dan BAP kadar 1 mg/L+kanamisin 100 ug/mL sebagai marker seleksi. Diamati persentase hidup eksplan, tinggi eksplan (mm), dan jumlah daun yang ditampilkan dalam bentuk histogram untuk menunjukkan tingkat multiplikasi eksplan.

Kalus dan daun tembakau hasil transformasi yang diperoleh selanjutnya diinduksi menjadi planlet pada medium MS perlakuan ZPT yang dirancang dengan CRD faktor tunggal 15 perlakuan, yaitu: kombinasi NAA (0,1; 0,3; 1; 2; 3) mg/L dan BAP (0,1; 0,3; 1) mg/L, masing-masing diulang 5 kali. Diamati berat segar (g) dan persentase planlet (%). Data dianalisis dengan uji F pada taraf beda nyata 5%.

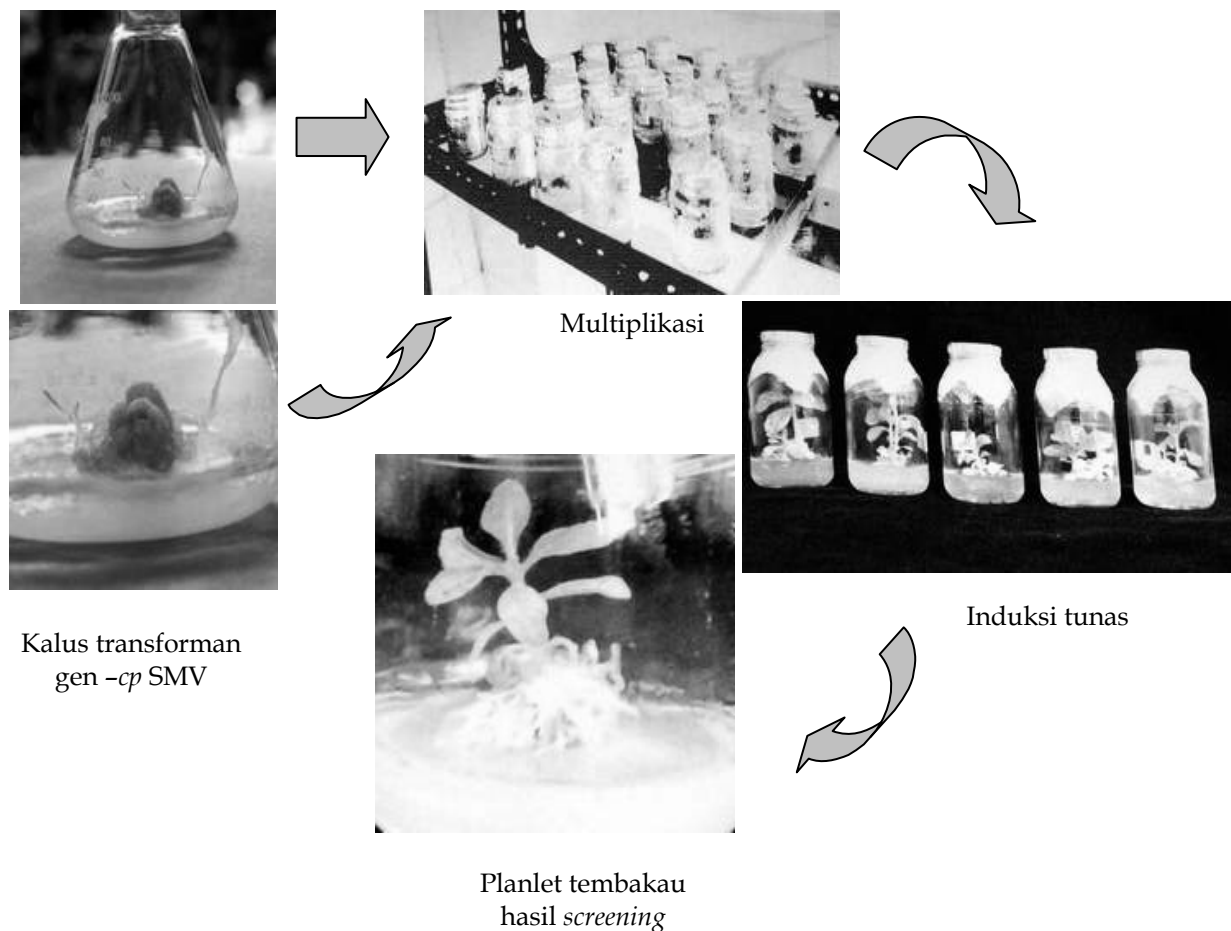
Seluruh tahapan multiplikasi dan induksi dilakukan dalam kondisi aseptis dan diinkubasi pada pencahayaan sekitar 1000 lux (dengan *transmission light*) fase gelap 8 jam dan fase terang 16 jam serta suhu 25-28°C selama 8 minggu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

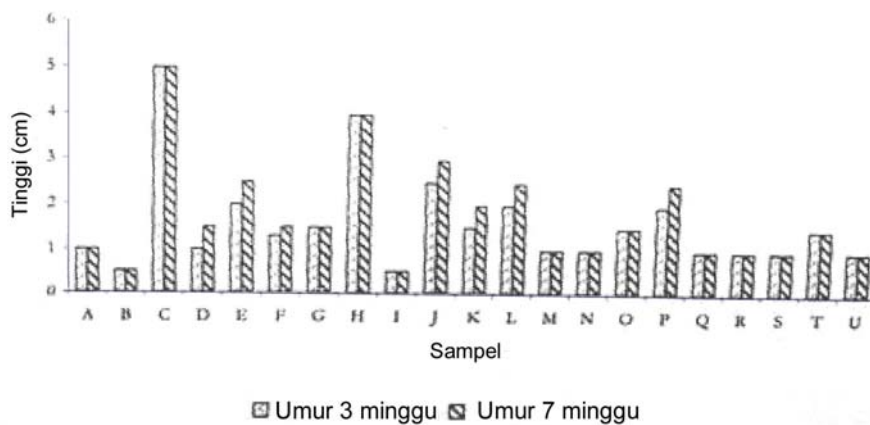
Multiplikasi kalus dan seleksi tembakau hasil transformasi gen cp-SMV

Kalus tembakau hasil transformasi gen *cp-SMV* hasil penelitian terdahulu dimultiplikasi pada medium MS yang ditambah NAA kadar 0,3 mg/L dan BAP kadar 1 mg/L+kanamisin 100 ug/mL sebagai penanda seleksi, hasilnya tersaji pada Gambar 1.

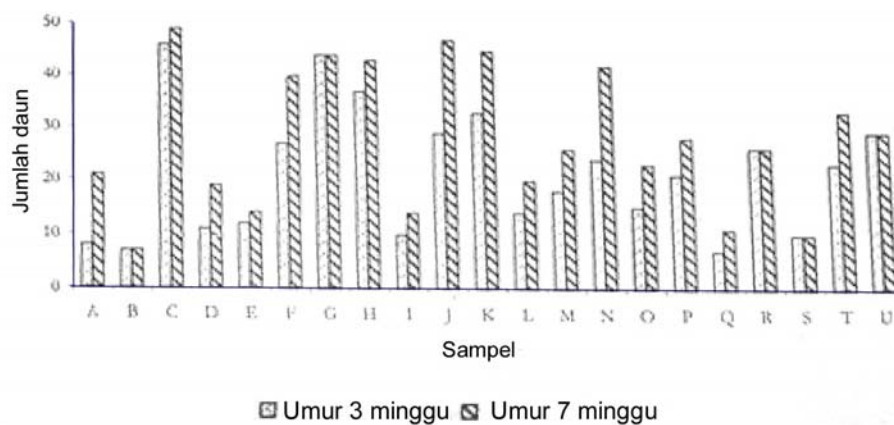
Selama multiplikasi 8 minggu tampak peningkatan biomassa kalus tembakau hasil transformasi gen *cp-SMV* secara eksponensial. Hal ini menunjukkan bahwa sel dapat tumbuh sendiri, meskipun telah dipisah dari tanaman induknya karena memiliki potensi genetik yang mampu memperbanyak diri dengan jalan regenerasi, sesuai teori totipotensi sel (Pierik, 1987).



Gambar 1. Kalus tembakau hasil transformasi gen *cp-SMV*.



Gambar 2. Pertambahan tinggi tanaman tembakau eksplan selama multiplikasi.



Gambar 3. Jumlah daun tanaman eksplan tembakau selama multiplikasi.

Hasil multiplikasi menunjukkan bahwa 84% eksplan mampu hidup pada medium MS ditambah NAA kadar 0,3 mg/L dan BAP kadar 1 mg/L dengan kanamisin 100 µg/mL sebagai marker seleksi. Hal ini disebabkan gen *cp*-SMV telah dikonstruksi pada plasmid pCV002 yang mempunyai resistensi terhadap kanamisin, dan pada saat transformasi terjadi integrasi ke sel tembakau melalui T-DNA bakteri *Agrobacterium*, sehingga kalus tembakau yang mengandung gen *cp*-SMV mampu hidup pada medium MS yang ditambah kanamisin (Sheng dan Citovsky, 1996; Sismindari dan Sudjadi, 1996).

Pertambahan tinggi eksplan dan jumlah daun selama multiplikasi pada medium MS dengan NAA kadar 0,3 mg/L dan BAP kadar 1 mg/L

dan seleksi kanamisin 100 µg/mL diamati, hasilnya disajikan pada Gambar 2 dan Gambar 3.

Dari Gambar 2 dan 3 diketahui bahwa beberapa eksplan tanaman tembakau mengalami pertambahan tinggi dan jumlah daun yang sangat nyata. Hal ini menunjukkan adanya perkembangan kalus tembakau hasil transformasi gen *cp*-SMV secara *in vitro* melalui organogenesis, yaitu: terbentuk kalus yang baru dan tunas atau daun. Eksplan yang dikulturkan mengalami morfogenesis organ adventif secara tidak langsung. Eksplan membentuk kalus terlebih dahulu, kemudian dirangsang pada medium baru, selanjutnya sel kalus akan berdiferensiasi dan bermorfogenesis membentuk tunas dan daun (Mantell *et al.*, 1985).

Induksi planlet dan seleksi tembakau hasil transformasi gen cp-SMV

Kalus dan daun tembakau hasil transformasi yang diperoleh dari multiplikasi kalus pada medium MS diinduksi dengan variasi berbagai kadar NAA dan BAP. Rerata berat segar eksplan dan persentase planlet tersaji pada Tabel 1. Dari tabel tersebut tampak bahwa medium MS yang diinduksi dengan variasi berbagai kadar NAA dan BAP menunjukkan tidak adanya pengaruh secara nyata terhadap berat segar eksplan. Namun kadar NAA 0,3 mg/L dan BAP 0,1 mg/L mampu menginduksi planlet tertinggi, 80%. Auksin merupakan ZPT yang secara *in vitro* berperan dalam pembentukan akar. NAA 0,3 mg/L dapat memacu pembentukan akar, selanjutnya ditambah dengan BAP 0,1 mg/L mampu mengimbangi adanya sitokinin endogen dalam eksplan sehingga merangsang pembentukan tunas dan planlet. Kadar auksin dan sitokinin yang tinggi menyebabkan terbentuknya kalus.

Tabel 1. Rerata berat segar eksplan dan persentase planlet tembakau hasil transformasi gen cp-SMV umur 8 minggu.

Medium MS dengan perlakuan kadar NAA+BAP (mg/L)	Rerata berat segar (g)	Persentase planlet (%)
0,1+0,1	1,75 a	40
0,1+0,5	1,72 a	0
0,1+1,0	1,58 a	40
0,3+0,1	2,81 a	80
0,3+0,5	1,85 a	20
0,3+1,0	1,67 a	0
1,0+0,1	1,66 a	20
1,0+0,5	1,71 a	0
1,0+1,0	1,72 a	20
2,0+0,1	1,48 a	0
2,0+0,5	1,49 a	0
2,0+1,0	1,98 a	0
3,0+0,1	1,81 a	0
3,0+0,5	1,85 a	0
3,0+1,0	1,80 a	0

Keterangan: angka yang diikuti dengan huruf sama menunjukkan tidak ada beda nyata menurut uji F jenjang 5%.

Selanjutnya planlet diseleksi menggunakan medium MS ditambah NAA kadar 0,3 mg/L dan BAP kadar 0,1 mg/L dengan kanamisin 100 µg/ml. Hasil seleksi transforman terhadap ketahanan kanamisin menunjukkan bahwa planlet yang terinduksi sebanyak 20%, pembentukan kalus dan tunas sebesar 64%;

sedang 12% mengalami pencoklatan (*browning*) atau pemucatan (*filtrifikasi*) dan 4% mengalami kontaminasi oleh bakteri. Penurunan persentase induksi planlet disebabkan adanya resistensi terhadap kanamisin. Sel yang tidak mengandung gen cp-SMV dengan penanda kanamisin akan mengalami pencoklatan, pemucatan atau kematian, sebab kanamisin akan mengubah konformasi ribosom, sehingga ikatan aminoasil tRNA pada mRNA tidak mantap dan transfer asam amino menjadi tidak sempurna akibatnya metabolisme terganggu dan terjadi kematian (Prescot *et al.*, 1999).

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: (i) kalus tembakau hasil transformasi gen cp-SMV dapat dimultiplikasi pada medium MS+NAA 0,3 mg/L+BAP 1 mg/L+kanamisin 100 µg/mL dengan persentase hidup sebesar 84%; (ii) eksplan mengalami morfogenesis organ adventif secara tidak langsung dengan membentuk kalus yang akan berdiferensiasi dan bermorfogenesis membentuk tunas dan daun; (iii) kalus tembakau hasil transformasi gen cp-SMV yang dapat diinduksi menjadi planlet sebesar 20% pada medium MS ditambah NAA kadar 0,3 mg/L dan BAP kadar 0,1 mg/L+kanamisin 100 µg/ml.

Penelitian selanjutnya disarankan untuk memfokus pada: (i) deteksi gen cp-SMV pada kalus dan tunas tembakau hasil transformasi; (ii) penelitian *in vitro* untuk mempersiapkan planlet agar dapat diaklimatisasi; (iii) pengujian ketahanan bibit tembakau transgenik cp-SMV terhadap penyakit TMV; dan (iv) penelitian kultur *in vitro* kedelai untuk selanjutnya ditransformasi dengan gen cp-SMV.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G.N. 1988. *Plant Pathology*. 3th ed. New York: Academic Press.
- Agung-Astuti, D. Sunarwati, dan Sismindari. 2002. Transformasi Gen Coat Protein SMV ke Daun Tembakau melalui *Agrobacterium*. *Prosiding Seminar Nasional Inovasi Teknologi Dalam Mendukung Pengembangan Agribisnis*. 2002
- Beachy, R.N. 1998. Virus-resistant Transgenic Plants. In: *Biotechnology in Plant Disease Control*. New York: Wiley-Liss.
- Estuningsih, S.P. 1999. *Budidaya Tembakau Temanggung yang Berciri Srintil Secara In Vitro*. [Tesis S-2]. Yogyakarta: Program Pasca Sarjana UGM.
- Mantell, S.H., J.A. Matthews, and R.A. McKee. 1985. *Principle of Plant Biotechnology An Introduction To Genetic*

- Engineering in Plants*. London: Blackwell Scientific Publications.
- Nelson, R.S. 1988. Virus tolerance, plant growth and field performance of transgenic tomato plant expressing coat protein from TMV. *Bio/Technology* 6: 403-409.
- Pierik, R.L., 1987. *In Vitro Culture of Higher Plant*. Netherlands: Martinus Nijhoff Pub.
- Power-Abel, P., R.S. Nelson, B.D.N. Hoffmann, F. Roger, and R.N. Beachy. 1996. Delay of disease development in transgenic plant that express the TMV coat protein gene. *Science* 232: 738-743
- Prescot, L.M., J.P. Harley, and D.A. Klein. 1999. *Microbiology*. New York: McGraw-Hill Book Co.
- Semangun, H., 1991. *Penyakit-penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Sheng, J. and V. Citovsky. 1996. Agrobacterium-Plant Cell DNA Transport: Have Virulence Protein, Will Travel. *The Plant Cell* 8: 1699-1710.
- Sisindari dan Sujadi. 1996. Kloning Gen Coat Protein SMV dengan pendekatan PCR. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 2: 36-39
- Somaatmadja, S. 1988. *Kedelai*. Bogor: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian P3TP.