

Transformasi Genetik Tanaman Kentang cv. Atlantik Dengan Mengintroduksi Gen Hordothionin untuk Mendapatkan Ketahanan terhadap Penyakit Bakteri

Genetic Transformation of Potato cv. Atlantic by Introducing Hordothionin Gene for Engineering Bacterial Disease Resistance

Nurhasanah¹⁾, G. A. Wattimena¹⁾, Agus Purwito¹⁾,
Ni Made Armini Wiendi¹⁾, Suharsono²⁾

ABSTRACT

*Hordothionins are small anti-bacteria proteins present in barley endosperm. To reveal the potential of this proteins for engineering bacterial disease resistance into potato, a semi-synthetic hordothionin gene construct was introduced in potato cv. Atlantic via *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404, under the control of a cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promotor. The in vitro grown stem (internodus) was used in this research. After 6 weeks in regeneration medium and 2 weeks in rooting medium there were 22 regenerated plants that were screened in kanamycine containing medium. PCR analysis using spesific primer from CaMV 35S promotor showed the presence of amplified T-DNA in 4 transgenic lines from 22 putative transgenic plants were tested. The in vitro toxicity against *Ralstonia solanacearum* tested from transgenic lines showed variation in resistance level. There were only 2 of the transgenic lines were tolerant, while one of them was moderate tolerant even one of them was susceptible.*

Key words : Potato, Hordothionin gene, Disease resistance

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Kentang adalah salah satu tanaman pangan yang paling produktif dan ditanam secara luas di dunia. Kentang memproduksi kalori kurang lebih dua kali lebih banyak dibandingkan padi dan jagung. Kentang juga bergizi tinggi, sebab mengandung konsentrasi vitamin C yang cukup tinggi dan asam amino essensial yang baik untuk nutrisi manusia (Poehlman dan Sleper, 1996).

Kendala utama dalam budidaya tanaman kentang adalah tingginya tingkat serangan hama dan penyakit yang dapat menurunkan produksi tanaman kentang (Mahmud, 1990). Salah satu penyakit yang penting dan banyak menyebabkan kerusakan pada tanaman kentang adalah penyakit-penyakit bakteri.

Penyakit bakteri merupakan penyakit yang secara ekonomi sangat penting untuk daerah tropik, termasuk Indonesia. Hal ini dikarenakan kelembaban dan temperatur yang cukup tinggi, sehingga sangat disukai untuk pertumbuhan bakteri dan kondisi ini merupakan

faktor pembatas untuk budidaya tanaman kentang (Doring *et al.*, 1993; Doring, 1996; Hayward, 1991; Montanelli *et al.*, 1995; Mahmud, 1990).

Menurut Mahmud (1990), secara umum penyakit bakteri lebih sukar dikendalikan dibanding penyakit lain, dan tidak ada bahan kimia yang dapat digunakan untuk mengontrol penyakit-penyakit tersebut. Cara yang dapat diterapkan untuk mengatasi masalah tersebut yaitu dengan penggunaan kultivar yang resisten atau toleran terhadap penyakit tersebut, sertifikasi benih dan rotasi tanaman.

Untuk mendapatkan kultivar baru yang memiliki resistensi tinggi terhadap serangan penyakit dan sesuai untuk kebutuhan konsumen perlu dilakukan program pemuliaan tanaman yang dapat diterapkan melalui persilangan konvensional dan teknik rekayasa genetika tanaman.

Pemuliaan tanaman secara konvensional untuk mendapatkan kultivar kentang yang resisten terhadap bakteri menghadapi berbagai kendala. Kendala itu disebabkan gen resisten terdapat pada spesies kentang yang diploid atau gen-gen anti mikroba yang terdapat pada organisme lain (Rich, 1983; Doring, 1996). Oleh

1) Laboratorium Bioteknologi Jurusan Budidaya Pertanian IPB
Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga. Telp/Fax (0251) 629353

2) Laboratorium Genetika Pusat Penelitian Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.

karena itu penerapan teknik rekayasa genetika dapat digunakan untuk mengatasi permasalahan tersebut. Teknik rekayasa genetika pada tanaman kentang dapat dilakukan dengan berbagai cara antara lain dengan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* (Stiekema, 1988).

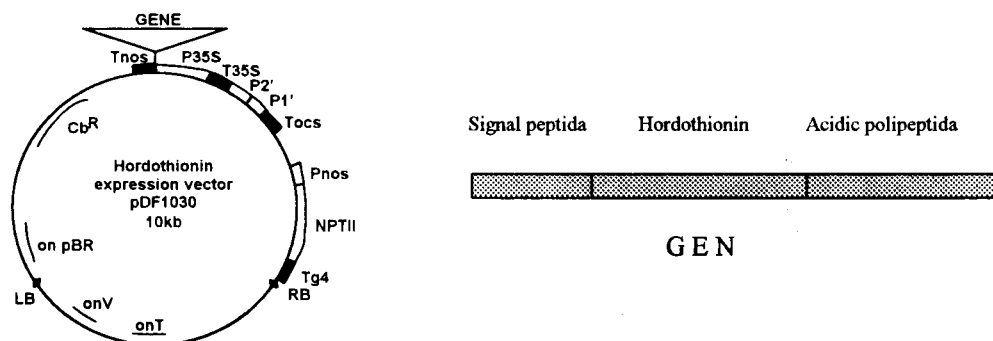
Beberapa gen-gen penyandi peptida anti mikroba yang digunakan dalam rekayasa genetika untuk mendapatkan ketahanan terhadap penyakit bakteri telah diaplikasikan pada tanaman *solanaceae*, khususnya tanaman tembakau yang umumnya dipakai sebagai model dalam sistem transformasi. Beberapa hasil penelitian yang telah dilakukan memberikan hasil yang cukup menjanjikan di masa mendatang untuk mendapatkan tanaman yang mempunyai resistensi terhadap bakteri, seperti cecropin, attacin, tachyplestin I dan thionin.

Hordothionin, yaitu thionin yang terdapat pada endosperma tanaman barley adalah suatu protein anti bakteri yang dapat meningkatkan resistensi tanaman terhadap serangan bakteri berdasarkan penelitian Florack *et al.* (1994), yang menggunakan gen hordothionin yang ditransformasikan pada tanaman tembakau dan menunjukkan adanya toksisitas *in vitro* dari tanaman tembakau terhadap beberapa penyakit akibat serangan bakteri pada tanaman *solanaceae*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman kentang transgenik yang resisten terhadap penyakit bakteri.

BAHAN DAN METODE

Konstruksi Gen Hordothionin dan Penyiapan Bakteri

Gen hordothionin yang terdapat pada plasmid pBINPLUSth (pDF1030) (koleksi Dr. Willem J. Stiekema dari CPRO-DLO Belanda) terdiri dari tiga domain, yaitu, sekuen signal peptida, sekuen hordothionin dan sekuen acidic peptida yang berasal dari pCPO5 (Florack *et al.*, 1994) dan diklonkan pada situs *EcoRI/BamHI* pada pBINPLUS (Gambar 1). Plasmid ini diintroduksi ke dalam *Escherichia coli* DH5 α (koleksi Dr. Suharsono, Lab. Genetika Pusat Penelitian Bioteknologi IPB) sebagai inang untuk memperbanyak dan selanjutnya diintroduksi ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 (koleksi Balai Penelitian Perkebunan Karet Taman Kencana Bogor) dengan metoda konjugasi tiga tetua (*triparental mating*) dengan bantuan bakteri penolong *E. coli* HB101 (pRK 2013) (koleksi Dr. Antonius Suwanto, Lab Mikrobiologi Pusat Penelitian Bioteknologi IPB). Bakteri hasil *triparental mating* ini selanjutnya digunakan untuk mentransformasi tanaman kentang.



Gambar 1. Peta plasmid pBINPLUSth (pDF1030). Gen hordothionin dengan tiga domain yaitu : signal peptida, gen hordothionin dan acidic polypeptida diinsersikan pada plasmid pBINPLUS menghasilkan plasmid pBINPLUSth (pDF1030).

Persiapan Eksplan, Transformasi, Kokultivasi dan Regenerasi

Eksplan ruas batang (*internodus*) dari tanaman kentang *in vitro* kultivar atlantik (koleksi Prof. Dr. G. A. Wattimena, Lab Bioteknologi Tanaman Jurusan Budidaya Pertanian IPB) yang berumur 4 minggu disiapkan dalam cawan petri, dan ditransformasi dengan kultur bakteri LBA 4404 (pDF 1030) selama 15 menit. Selanjutnya eksplan dikokultivasi selama 2 hari dan ditanam dalam media regenerasi dengan

penambahan antibiotika kanamisin 100 mg/l dan cefotaxime 500 mg/l. Subkultur dilakukan dengan pemindahan ke medium yang sama 2 minggu sekali atau sesuai kebutuhan dan eksplan yang bertunas dipindahkan ke medium pengakaran dengan penambahan kanamisin 100 mg/l dan cefotaxime 250 mg/l.

Analisis Tanaman Transgenik

Tanaman yang mampu bertahan tumbuh dalam medium seleksi kanamisin selanjutnya diuji keberadaan

gennya dengan analisa PCR dengan menggunakan primer dari promotor CaMv 35S, yaitu 5'-CTGCATGCTTCACGGTGCAAGC-3 (*forward primer*) dan 3'-CAAGCGAGGAGGTGCGACTTC-5 (*reverse primer*). Kondisi PCR dilakukan pada denaturasi awal 94°C 2 menit, denaturasi 94 °C 1 menit, annealing 56 °C 1 menit, extension 72°C 2 menit (35 siklus).

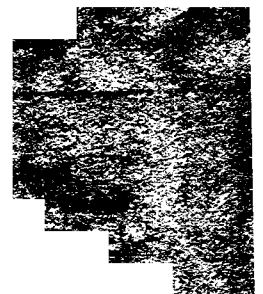
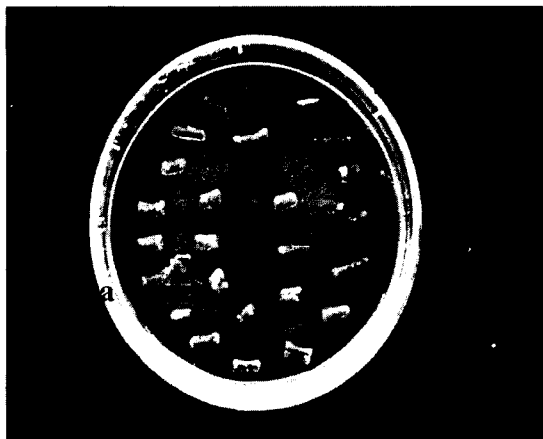
Analisa toksisitas *invitro* pada tanaman transgenik juga dilakukan untuk menguji ketahanannya terhadap *Ralstonia solanacearum*. Tanaman transgenik yang berumur 4 minggu diinokulasi secara *in vitro* dengan inokulum yang berasal dari kentang pada konsentrasi 1.2×10^9 Colony Forming Unit (CFU) per ml bakteri. Inokulasi dilakukan dengan menggantung daun kedua/ketiga dari pucuk dengan menggunakan gunting yang dicelup dengan inokulum bakteri setiap kali infeksi. Tanaman yang telah diinokulasi diinkubasi pada suhu 20-25°C dan dilakukan pengamatan terhadap periode inkubasi dan kejadian penyakit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gen hordothionin dalam plasmid pDF 1030 telah berhasil diintroduksi ke dalam *E. coli* DH5 α yang digunakan sebagai inang untuk memperbanyak plasmid. Metoda triparental mating yang dilakukan juga telah berhasil memindahkan plasmid pDF 1030 ke dalam *Agrobacterium* strain LBA 4404. Koloni LBA 4404 (pDF 1030) ini selanjutnya digunakan untuk mentransformasi tanaman kentang.

Eksplan tanaman kentang kultivar atlantik yang telah ditransformasi dengan LBA 4404 (pDF1030) setelah enam minggu dalam media regenerasi yang mengandung kanamisin, mulai beregenerasi membentuk tunas yang didahului dengan pembentukan kalus pada eksplan (Gambar 2). Tanaman atlantik yang ditransformasi dengan *Agrobacterium* LBA 4404 kosong (tanpa plasmid pDF1030) yang digunakan sebagai kontrol mulai dari minggu pertama setelah dipindahkan ke medium regenerasi mulai menguning dan mati. Hal ini menunjukkan ketidak mampuan tanaman atlantik normal untuk tumbuh di dalam medium yang mengandung kanamisin.

Sebagian besar kultur dari eksplan yang ditransformasi yang tidak mampu membentuk tunas selanjutnya mulai menguning dan mati. Kematian kultur yang ditransformasi ini dapat diakibatkan oleh kegagalan transformasi eksplan sehingga tidak mampu bertahan dalam medium yang mengandung kanamicin. Barret *et al.* (1997), menyatakan bahwa kerugian transformasi genetik tanaman dengan menggunakan *Agrobacterium* dikarenakan banyaknya terjadi kematian kultur yang dapat diakibatkan oleh kontaminasi bakteri *Agrobacterium* yang tidak terbunuh oleh antibiotik cefotaxime karena sulitnya untuk mengeliminasi pertumbuhan *Agrobacterium* sehingga mengganggu pertumbuhan kultur dan mengakibatkan kematian karena tingginya konsentrasi antibiotik pembunuh *Agrobacterium* yang ditambahkan kedalam media regenerasi.



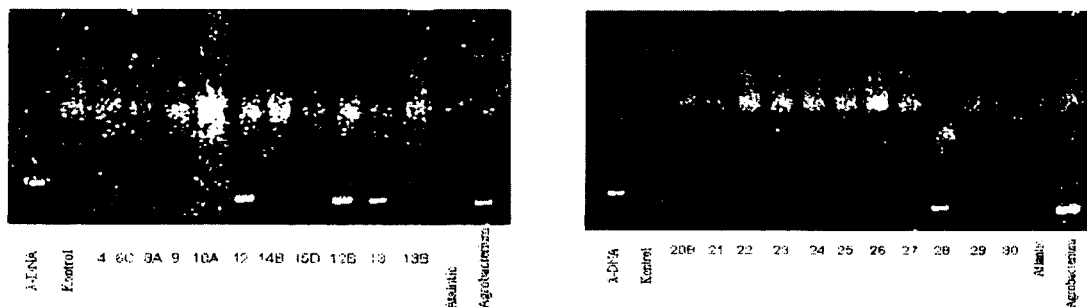
Gambar 2. Perkembangan eksplan pada media regenerasi : a. Eksplan bertunas b. eksplan menguning dan mati

Kultur yang bertunas setelah dipindahkan ke dalam medium pengakaran yang mengandung kanamisin dan cefotaxime mampu membentuk akar setelah 1-2 minggu di dalam medium pengakaran. Dari 500 eksplan yang ditransformasi diperoleh 22 kultur dugaan transgenik

yang mampu tumbuh dengan baik menjadi *plantlet* di dalam medium seleksi kanamisin. Selanjutnya kultur ini diperbanyak dengan stek satu nodus di dalam medium kultur yang ditambah kanamisin untuk dilakukan pengujian lanjutan.

Dari hasil analisis PCR dengan menggunakan primer dari promotor 35S CaMV yang dilakukan pada 22 tanaman dugaan transgenik didapatkan 4 tanaman yang positif dapat teramplifikasi (Gambar 3) yang ditunjukkan dengan munculnya pita pada ukuran ± 400 bp. Hal ini menunjukkan bahwa gen yang diintroduksi berhasil masuk ke dalam genom

tanaman kentang. Sedangkan tanaman-tanaman lainnya yang tahan terhadap media kanamisin (lolos dari media seleksi kanamisin) tetapi tidak memberikan hasil positif dari uji PCR mungkin merupakan tanaman yang tumbuh dari bagian sel eksplan yang tidak bersentuhan dengan medium kanamisin.



Gambar 3. Hasil analisis PCR pada 22 tanaman kandidat transgenik (tahan medium seleksi kanamisin). Terlihat adanya band pada ukuran ± 400 bp. Marker DNA λ 500 bp.

Hasil pengujian toksisitas *in vitro* terhadap *Ralstonia solanacearum* menunjukkan tingkat resistensi yang bervariasi dari kultur transgenik (Tabel 1). Dimana dari keempat kultur transgenik tersebut hanya 2 kultur yang toleran terhadap *Ralstonia solanacearum* sedangkan 1 diantaranya moderat toleran dan 1 lagi

rentan. Tingkat resistensi yang bervariasi ini dipengaruhi oleh ekspresi dari gen hordothionin yang diintroduksi, yaitu oleh jumlah protein hordothionin yang dihasilkan (Florack *et al.*, 1994) tetapi hal ini sulit dibuktikan karena dalam penelitian ini tidak dilakukan isolasi protein hordothionin dari tanaman transgenik.

Tabel 1. Pengujian toksisitas invitro terhadap *Ralstonia solanacearum*

Nomor tanaman transgenik	Periode inkubasi	Kejadian penyakit	Tingkat resistensi
12A (Transgenik +)	15	15	Toleran
12B (Transgenik +)	6	100	Rentan
13A (Transgenik +)	9	35	Moderat toleran
28 (Transgenik +)	14	15	Toleran
Atlantik	7	100	Rentan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Transformasi genetik tanaman kentang dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* yang dilakukan mampu meregenerasikan $\pm 5\%$ dari eksplan menjadi kultur yang dapat tumbuh dalam medium seleksi.
2. Didapatkan 4 kultur transgenik dari hasil introduksi gen hordothionin kedalam genom tanaman kentang berdasarkan hasil analisis PCR.
3. Hasil pengujian toksisitas invitro terhadap *Ralstonia solanacearum*, menghasilkan 2 tanaman transgenik yang toleran, 1 kultur moderat toleran dan 1 kultur rentan terhadap penyakit ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Proyek RUT VIII atas nama Agus Purwito dengan judul "Metoda Transgenik dan Fusi Protoplas untuk Merakit Klon Kentang Tahan Penyakit Busuk Lunak dan Layu Bakteri" yang mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Barret, C., E. Cobb, R. McNicol, G. Lyon. 1997. A risk assessment study of plant genetic transformation using agrobacterium and implications for analysis of transgenic plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 47 : 135-144.

- During, K., M. Fladung, H. Lörz. 1993. Antibacterial resistance of transgenic potato plants producing T4 lysozyme *dalam* Fritig, Bornard dan Michel Legrand. Mechanisms of plant defense responses. Kluwer Academic Publishers. p. 437-440.
- During, K. 1996. Genetic engineering for resistance to bacteria in transgenic plants by introduction of foreign genes. *Molecular Breeding*. 2: 297-305.
- Florack, D. E. A., W. G. Dirkse, B. Visser, F. Heidekamp, W. J. Stiekema. 1994. Expression of biologically active hordothionins in tobacco. Effects of pre- and pro-sequences at the amino and carboxyl termini of the hordothionin precursor on mature protein expression and sorting. *Plant Molecular Biology*. 24: 83-96.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 29: 65-87.
- Mahmud, M. 1990. Penyakit bakteri tanaman pangan dan hortikultura di Indonesia *Dalam* Perlindungan Tanaman (eds). Prawiroesoemardjo, S., D. Sudarmadji, Harsono, I. S. Basuki. PT. Agricon. Hal 233-251.
- Montanelli, C., A. Chiari, T. Chiari, F. Stefanini, G. Nascari. 1995. Evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato under controlled conditions. *Euphytica*. 81: 35-43.
- Poehlman, J. M., D. A. Sleper. 1996. *Breeding Field Crops 4th*. Iowa State University Press. 494 hal.
- Rich, A. E. 1983. *Potato Disease*. Academic Press. 238 hal.
- Stiekema, W. J., F. Heidekamp, J. D. Louwerse, H. A. Verhoeven, P. Djikhuis. 1988. Introducing of foreign genes into potato cultivars Bintje and Desiree using an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Plant Cells Report*. 7: 47-50.