**REGENERASI RUMPUT LAUT *Kappaphycus alvarezii* HASIL TRANSFORMASI GEN SUPEROKSIDA DISMUTASE (*MmSOD)* UNTUK MENINGKATKAN KETAHANAN TERHADAP CEKAMAN LINGKUNGAN PADA KONDISI YANG OPTIMAL**

**Oleh:**

Emma Suryati 1), Nurhidayah2), Utut Widyastuti2)  , dan Andi Tenriulo1)

1)Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau, Maros, Sulawesi Selatan, 2)Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, IBP, dan Departemen Biologi, FMIPA IPB

**ABSTRAK:**

Transformasi gen superoxide dismutase (*MmSOD)* pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefacient* telah berhasil dilakukan secara invitro. Transformasi gen *MmSOD*  ke dalam genom rumput laut dapat mengurangi cekaman oksidatif terutama perubahan yang disebabkan oleh perubahan suhu, salinitas dan cemaran logam di perairan. Penellitian ini bertujuan untuk mendapatkan media dan kondisi yang optimal untuk regenerasi eksplan transgenik yang dihasilkan. Penelitian dilakukan secara bertahap menggunakan labu kultur dengan volume 1L dengan kepadatan eksplan 100 eksplan/botol, ditempatkan pada “Chamber Culture”, dengan media kultur yang diperkaya dengan pupuk, salinitas, pH, penetrasi cahaya, ratio gelap terang serta komposisi ZPT yang berbeda. Parameter yang diukur adalah kelangsungan hidup dari eksplan yang dipelihara serta integrasi gen *MmSOD* pada tunas putatif yang dianalisa menggunakan PCR dengan primer *MmSOD-F1* dan *MmSOD-R2*. Hasil penelitian memperlihatkan kelangsungan hidup yang paling tinggi pada media PES, pada salinitas 30 ppt, pH = 7, penetrasi cahaya 1500 lux, ratio gelap terang =12:12, komposisi ZPT dengan campuran IAA dan BAP dengan perbandingan 2:1.. Hasil analisis PCR memperlihatkan *K. alvarezii* transgenik putatif mengandung transgen *MmSOD* dibawah kendali promoter 35S CaMV.

**Kata Kunci : regenerasi, *Kappaphycus alvarezii,* gen *MmSOD*, cekaman lingkungan**

***ABSTRACT****:* ***Regeneration of seaweed Kappaphycus alvarezii transformed Superoxide dismutase gene (MmSOD) for enhanced resistance to environmental stress in Optimum Condition****. By : Emma Suryati 1), Nurhidayah2), Utut Widyastuti2)  , dan Andi Tenriulo1*)

*Gene superoxide dismutase (MmSOD) transformation in seaweed Kappaphycus alvarezii using Agrobacterium tumefacient has been conducted invitro. MmSOD transformation into seaweed genome is capable to reduce oxidative stress especially caused by temperature raise, salinity and metal pollution in the water. This research is objected to obtain the media formulation and optimum condiion for the transgenic explant to regenerate. This research was conducted in sequence of 1 L culture flask at first, with population of 100 explant/flask and placed in “Chamber Culture”, and also in variation of culture medium enriched with fertilizer, salinity, pH, light penetration, dark to light ratio, and growth stimulating substances different compositions. Parameters measured are viability of the explants, and also gene MmSOD integration in putative seed which is analyzed using PCR with primary MmSOD-F1 and MmSOD-R2. The results show that the highest viability was obtained using PES medium, in salinity of 30 ppt, pH = 7, light penetration 1500 lux, dark to light ratio of 12:12, and with ZPT composition of 2:1 with mixture of IAA and BAP. PCR analysis shows that putative transgenic of K. alvarezii has been integrated wih transgene MmSOD under the control of 35S CaMV promotor.*

***Key Word:regeneration, Kappaphycus alvarezii,, MmSOD genes, environmental stress***

**PENDAHULUAN**

Rumput laut *K. alvarezii* merupakan salah satu komoditas unggulan penghasil karaginan yang banyak dimanfaatkan dalam industri kertas, tekstil, fotografi, pasta, dan pengalengan ikan. Pada aspek budidaya ia mampu menjadi kunci pemberdayaan masyara kat pesisir, peningkatan usaha budidaya ditingkat petani memacu peningkatan sediaan benih unggulan baik kualitas maupun kuantitasnya. Selain itu permintaan pasar dunia masih sangat tinggi (Collen *et al* 1995, dan FAO, 2010).

Kendala yang sering dihadapi petani dalam rangka peningkatan produksi adalah terbatasnya ketersediaan bibit yang berkualitas tinggi, lemahnya ketahanan terhadap penyakit ice-ice, serta kurangnya ketahanan terhadap cekaman lingkungan biotik maupun abiotik yang sering terjangkit pada lahan budidaya. Ketersediaan bibit yang berkualitas sangat dipengaruhi oleh musim, salinitas, suhu, intensitas cahaya serta kondisi lingkungan perairan yang digunakan untuk membudidayakan rumput laut (Yulianto & Mira, 2009; Mamboya, 2007).

Limbah industri, minyak bumi dan limbah rumah tangga merupakan sumber polusi dan pencemaran pada lingkungan, hal ini menjadi masalah yang serius serta dapat berakibat langsung terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup organisme pantai khususnya pada makroalgae (Mamboya, 2007). Tiram *Crassostrea corteziensis*, alga hijau *Ulva compressa*)dan alga coklat *Laminaria digitata* dan *Sargassum sp.*sering digunakan sebagi bioindikator logam berat secara alami (Contreras-Porcia *et al.*, 2011; Bernal-Herna´ndez *etal*., 2010 dan Davis *et al*., 2003). Efek toksisitas logam berat seperti Cu pada alga dapat menyebabkan fotoinhibitor pada photosystem II yang berakibat pada *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan disfungsi kloroplas (Owen *et al.*, 2012).

Untuk meningkatkan dan mempertahankan produksi rumput laut nasional perlu dilakukan upaya-upaya dalam mengatasi permasalahan dalam budidaya, seperti menurunnya mutu genetik rumput laut akibat permasalahan penyakit dan lingkungan (Largo *et al.* 1997; Vairappan 2006) melalui beberapa pendekatan teknologi, antara lain rekayasa genetik melalui transformasi gen potensial yang dapat meningkatkan ketahanan serta memperbaiki gen dari rumput laut (Cheney *et al* 2000).

Transformasi gen Melastoma Superoksida Dismutase (*MmSOD)* pada rumput laut *K.alvarezii* telah berhasil dilakukan melalui mediasi bakteri *Agrobacterium tumefaciens* serta dapat terintegrasi dengan genom plantet dan anakan rumput laut (Hannum. 2012 dan Triana *et al* 2015). Demikian juga gen-gen yang lain seperti gen *PaCS* (Daud *et al.,* 2013), gen lisozim (Handayani *et al.,* 2014), dan gen *Mamt2* sebagai model (Fajriah *et al.,* 2015). Kedua peneliti yang pertama menggunakan media *Prevasoli’s enriched seawater* (PES) padat, sedangkan Fajriah *et al.* (2015) menggunakan PES cair. Beberapa peneliti telah menggunakan *A. tumeficiencens* sebagai perantara transformasi, seperti yang dilakukan oleh Cheng *et al*. (2011) pada mikroalaga *Schizochytrium.* Pengembangan teknologi kultur jaringan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* telah dikembangkan oleh Suryati & Mulyaningum (2009)

Kematian eksplan hasil transformasi gen pada saat regenerasi dan perbanyakan talus sering terjadi pada tahap aklimatisasi pada labu kultur maupun pada bak resirkulasi yang dilengkapi dengan sistem aerasi. Beberapa parameter yang berpengaruh terhadap kelangsungan hidup rumput laut antara lain salinitas, pH, penetrasi cahaya, ratio gelap terang, pupuk serta kombinasi ZPT yang diperlukan dalam pertumbuhan rumput laut.

Untuk mendapatkan anakan rumput laut transgenik hasil transformasi gen *MmSOD*, diperlukan kondisi lingkungan yang optimal untuk kelangsungan hidupnya. Sehingga dalam penelitian ini dilakukan pemeliharaan eksplan rumput laut transgenik hasil transformasi gen *MmSOD* dan rumput laut non transgenik pada media kultur yang diperkaya dengan pupuk dan komposis ZPT yang berbeda serta kondisi lingkungan yang berbeda

**BAHAN DAN METODE**

**Regenerasi dan Perbanyakan Rumput laut Hasil Transgenik.**

Eksplan hasil transformasi gen *MmSOD* dan eksplan tanpa transformasi (kontrol), selanjutnya ditumbuhkan pada media PES hingga menjadi tanaman muda (planlet), mengacu pada metode (Sulistiani *et al*. 2012, Reddy *et al*. 2003 dan Wu *et.al* 2006. Eksplan dikultur pada dua tahapan regenerasi (keduanya dilakukan secara aseptik dan *in vitro*), yaitu: 1). Kultur cair pada botol kultur volume 200 mLyang diletakkan pada shaker goyang selama pemeliharaan, menggunakan media kultur PES. Setiap botol diisi 10-50 eksplan, dan selama pemeliharaan dilakukan pergantian media setiap 1 minggu. Kemudian dilanjutkan dengan aklimatisasi pada botol kultur dengan volume 1 liter yang diletakkan pada ‘*culture chamber’* dan diberi aerasi dengan jumlah eksplan berkisar 50-100 eksplan. Seiring berkembangnya eksplan menjadi rumput laut muda, selanjutnya dipindahkan ke tempat kultur dengan volume yang lebih besar, dengan sistem pergerakan air media yang lebih kuat untuk merangsang pertumbuhan thalus yang lebih cepat. Setiap botol diisi 50-100 planlet, dengan masa pemeliharaan sampai terbentuk tunas dan cabang,media kultur dan pergantian media yang sama pada kultur sebelumnya. Selanjutnya aklimatisasi dilakukan pada bak resirkulasi yang dilengkapi dengan aerasi dengan jumlah plantet hingga 300 eksplan pada setiap bak resirkulasi (Gambar 1)



B

A

Gambar 1. Aklimatisasi anakan rumput laut *K.alvarezii* yang diintroduksi dengan gen *MmSOD* dan rumput laut non transgenik pada bak resirkulasi yang dilengkapi dengan aerasi (A) dan (B) eksplan dalam wadah yang diletakkan dalam bak resirkulasi

Figure 1. Acclimatization of seaweed *K. alvarezii*saplings introduced with gene*MmSOD* and non transgenic seaweed in recirculation basin complemented with aeration (A) and and (B) explants in a container that is placed in a recirculation bath

Aklimatisasi rumput laut transgenik dan non transgenik dilakukan dalam labu kultur dengan volume 1L yang ditempatkan pada *‘Chamber culture’* yang dilengkapi dengan aerasi. optimasi media pemeliharaan rumput laut transgenik dilakukan secara bertahap secara bertahap antara lain: seleksi pupuk antara lain pupuk PES (Uchida *et al* 1991) dengan formula: Tris Base, NaNO3, sodium glyserposfat, Trace metal, larutan besi-EDTA, thiaminn , biotin, dan cyanocobalamin (Vit B12), sedangkan pupuk Grund terdiri atas Sodium–EDTA, FeSO4, NaHPO4, MnCl dan NaNO3, dan pupuk Conwy mengandung : FeCL3.6H2O, MnCl2.4H2O, H3BO3, Titriplek III, NaHPO4.2H2O, NaNO3, Trace Metal dan Vitamin Mix (Liao *et al* 1983) dan SSW sebagai kontrol, dengan salinitas 20, 25, 30, 35, dan 40 ppt. Selanjutnya kisaran pH yang digunakan yaitu 4, 5, 6, 7, dan 8. Intensitas cahaya berkisar antara 500-2000 lux dengan photopheriod terang dan gelap 8:16; 12:12; dan 16:8..Untuk merangsang pertumbuhan eksplan dilakukan pemeliharaan dengan penambahan hormon tumbuh IAA dan BAP dengan beberapa perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1. Rancangan penelitian yang digunakan adalah RAL dengan 5 kali ulangan untuk ke 5 parameter yang dilakukan secara tunggal untuk mengurangi bias pada pengamatan masing-masing parameter. Pengamatan dilakukan selama 8 minggu dengan interval 1 minggu meliputi sintasan serta laju pertumbuhan.Data kelangsungan hidup rumput laut transgenik dan non transgenik yang dianalisis ragam menggunakan software statistik Versi 3.0.

**Analisis Integrasi gen *MmSOD* pada Tanaman Transgenik**

Sebanyak 0,1 g tunas yang tumbuh pada media recovery II yang terdiri atas media PES yang diperkaya dengan ZPT campuran IAA dan BAP dengan perbandingan 0,1:0,5. DNA diisolasi menggunakan metode (Wattier *et al* 2000). DNA yang diperoleh dianalisis PCR menggunakan primer *MmSOD*-F1 (5'-ATG GTGAAGGCTGTGGTTGT-3 ') dan *MmSOD*-R2 (5'-CATCTCCAACGGTGACATTG-3'). Campuran reaksi yang digunakan adalah 100 ng DNA genom ;0,5 µLmasing-masing primer *Forward* dan *Reverse* (10 pmol/µl); 2 µL 1x buffer PCR; 2 µL dNTPmix; 0,2 µL Tag Polymerase dan ditambah dengan ddH2O hingga volume total reaksi 20 µL. Analisis dilakukan dengan kondisi PCR: pra PCR 950C, 5 menit; denaturasi 940C, 30 detik; penempelan primer 600C, 30 detik; pemanjangan 720C, 30 detik dan reaksi dilakukan sebanyak 30 siklus; dan diakhiri dengan pasca PCR 200C, 10 menit. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan 1% gel agarosa pada 100 volt selama 28 menit. Gel divisualisasi di atas UV transluminator setelah diwarnai dengan gel red.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Pada regenerasi rumput laut hasil introduksi gen *MmSOD* pada rumput laut memperlihatkan optimasi media pemeliharaan antara lain pupuk yang paling optimal untuk pemeliharaan yaitu menggunakan pupuk PES (Gambar 2)

Gambar 2. Kelangsungan hidup eksplan rumput laut *K.alvarezii* yangdiintroduksi dengan gen *MmSOD* dan non transgenik rumput laut *Kappaphycus alvarezii* yang dipelihara pada pupuk yang berbeda (Ket: T=Transgenik; NT= non transgenik)

Figure 2. Survival rate of seaweed *K.alvarezii* explant introduced with gene *MmSOD* and non transgenic seaweed complemented with various fertilizers (Note: T=Transgenic; NT= non transgenic)

Pengaruh pemberian pupuk yang berbeda terhadap kelangsunga hidup rumput laut *K.alvarezii* transgenik hasil transformasi gen *MmSOD* dan rumput laut non transgenik

Kelangsungan hidup eksplan rumput laut *K. alvarezii* yang diintroduksi dengan gen *MmSOD* memperlihatkan kelangsungan hidup yang paling baik pada media yang di perkaya dengan pupuk PES walaupun tidak berbeda nyata dengan media yang diperkaya dengan pupuk Grund (P>0,05). Sedangkan *K. alvarezii* non transgenik memperlihatkan kelangsungan hidup yang paling baik pada media yang dipeliharan pada media kultur yang diperkaya dengan pupuk Grund walaupun tidak berbeda nyata dengan media yang diperkaya dengan pupuk PES (Gambar 2.). Dari hasil yang diperoleh memperlihatkan adanya perbedaan kebutuhan nutrien dari eksplan rumput laut *K.alvarezii* hasil transformasi gen *MmSOD* dan rumput laut non transgenik, pada transformasi sebelumnya antara lain pada transformasi gen *MaMt*, dan *lisozym* kelangsungan hidup yang paling optimal dan cenderung lebih baik pada media PES (Suryati *et al* 2014) . Hal ini kemungkinan terjadi karena adanya proses adaptasi selama di laboratorium menggunakan media PES selama proses transformasi gen pada rumput laut *K.alvarezii* mulai pada tahap mediasi hingga pada proses pemulihan sehingga eksplan teradaptasi pada kondisi yang sama, selain itu juga disebabkan dari kebutuhan nutrien pada rumput laut dapat dipenuhi oleh nutrien yang berada pada media yang diperkaya dengan PES dan Grund, selain itu eksplan yang digunakan memang diadaptasi pada media dengan pupuk yang sama sehingga dapat tumbuh dengan baik. Komposisi media pada pupuk PES memperlihatkan formula yang komplit baik mikro maupun makro nutiennya serta vitaminnya. sehingga pada rumput laut transgenik lebih baik dibandingkan dengan non transgenik, hal ini disebabkan karena penyerapan nutrien pada rumput laut transgenik lebih baik dibandingkan dengan non transgenik karena penyerapannya kurang sempurnapada talus rumput laut hal ini disebabkan adanya proses adaptasi pada eksplan rumput laut transgenik.

Pengaruh salinitas terhadap kelangsungan hidup eksplan rumput laut transgenik gen *MmSOD* dan laut rumput non transgenik

Salinitas merupakan faktor pembatas pada kelangsungan hidup rumput laut pada umumnya, khususnya pada eksplan rumput laut hasil transformasi.Toleransi kemampuan hidup rumput laut *K.alvarezii* berkisar pada salinitas 20-40 ppt, namun kelangsungan hidup eksplan yang tertinggi yaitu pada salinitas 30 ppt, berbeda nyata dengan salinitas 20 dan 40 ppt, namun tidak berbeda nyata dengan 25 dan 35 ppt. (Gambar 3).

Gambar 3.Kelangsungan hidup eksplan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* yang diintroduksi gen*MmSOD* dan rumput laut non transgenik yang dipelihara pada salinitas yang berbeda (Ket: T=Transgenik; NT=non transgenik)

Figure 3. Survival rate of seaweed *Kappaphycus alvarezii* explant introduced with gene *MmSOD* and non transgenic seaweed cultivated in various salinity conditions (Note: T=Transgenic; NT=non transgenic)

Hal ini sangat erat dengan fisiologi peneyerapan dan sirkulasi nutrien pada rumput laut sehingga pada salinitas yang lebih rendah maupun tinggi akan mengakibatkan kematian pada rumput laut. Penyakit ice-ice sering kali terjadi karena adanya perubahan salinitas yang drastis biasanya pada musim pancaroba atau peralihan musim penghujan ke musim kering atau sebaliknya disamping pengaruh dari lingkungan dan kualitas perairan baik fiskia, kimia maupun secara biologi. Berdasarkan pengamatan yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti memperlihatkan pertumbuhan eksplan rumput laut *K.alvarezii* di laboratorium secara in vitro yang paling baik yaitu pada salinitas 35 ppt walaupun tidak berbeda dengan salinitas 25 dan 45 ppt, tapi berbeda nyata dengan salinitas 55 ppt. (Hayashi *et al* 2010), dalam hal ini kisaran salinitas untuk pertumbuhan masih ada pada kisaran yang layak. Pada salinitas yang tinggi diatas 45 ppt dapat mempengaruhi sel hingga terjadi plasmolisis serta memberikan effek kumulatif pada enzym dan menghambat pembelahan sel pada rumput laut (Lobban and Horrison 1994). Sedangkan pada salinitas yang lebih rendah dari 15 ppt, pada umumnya tumbuhan akan menjadi pucat dan berwarna putih yang disebabkan karena terjadi pigmentasi dan kekakuan pada thalus sehingga terjadi kematian setelah tiga hari, hal ini sangat erat kaitannya dengan terjadinya penurunan level kandungan klorophyl dan phycobiliproten pada sel rumput laut (Yokoya and Olivera 1992, Kumar *et al* 2010). Selain berpengaruh terhadap sel, salinitas juga sangat berpengaruh terhadap pembentukan karaginan pada rumput laut K.alvarezii . pada salinitas 25 ppt memperlihatkan pembentukan karaginan yang paling tinggi dan berbeda dengan salinitas 35, 45, dan 55 ppt. (Hayashi *et al* 2010).

pH pada media kultur merupakan salah satu faktor penentu keberhasilan pada pemeliharaan rumput laut *K.alvarezii* baik di laboratorium maupun di lapangan, karena penyerapan nutrien dari media tergantung dari derajat keasaman dari lingkungan yang ada dan akan terjadi keseimbangan dalam penyerapan. Hasil pengamatan pH pada media pemeliharaan *K.alvarezii* di laboratorium diperlihatkan pada Gambar 4

Gambar 4.Kelangsungan hidup eksplan rumput laut *K.alvarezii* yang dintroduksi dengan gen *MmSOD* dan rumput laut non transgenik yang dipelihara pada media kultur dengan pH yang berbeda (Ket: T=Transgenik; NT=non transgenik)

Figure 4. Survival rate of seaweed *K.alvarezii*explant introduced with gene *MmSOD* and non transgenic seaweed cultivated in various pH conditions. (Note: T=Transgenic; NT=non transgenic)

Pada rumput laut *K.alvarezii* yang hidup di laut kisaran pH yang dapat diterima bisa mencapai pH 9, namun pada kondisi pemeliharaan rumput laut hasil transformasi gen *MmSOD* di laboratorium memperlihatkan pH yang lebih tinggi yaitu berkisar 7-8 (Gambar 4). Hal ini kemungkinan disebabkan karena proses adaptasi pada kondisi media kultur selama pemelihraan di laboratorium. Hal ini berbeda dengan pH optimum pada rumput laut hasil transformasi gen karaginan yang menunjukkan pH optimum pada pH =6 dengan kelangsungan hidup mencapai 85% (Suryati *et al* 2015).

Penetrasi cahaya pada kondisi di laboratorium memperlihatkan kelangsungan hidup yang paling baik yaitu pada 1500 lux berbeda nyata dengan 2000 lux, namun tidak berbeda nyata dengan 500 dan 1000 lux (Gambar 5) pada 2000 lux seringkali terjadi kematian yang disebabkan karena peningkatan temperatur terutama pada chamber pemeliharaan. Sangat berbeda dengan kondisi budidaya di laut penetrasi cahaya bisa mencapai 3000 lux namun peningkatan suhu di laut kemungkinan lebih konstan serta ada penetrasi dari lingkungan sekitar sehingga masih dapat bertahan hidup.

Gambar 5 .Kelangsungan hidup eksplan rumput laut *K.alvarezii* yang dintroduksi dengangen *MmSOD* dan rumput laut non transgenik yang dipelihara dengan penetrasi cahaya yang berbeda (Ket: T=Transgenik; NT=non transgenik)

Figure 5. Survival rate of seaweed *K.alvarezii*explant introduced with gene *MmSOD* and non transgenic seaweed cultivated with various light penetration conditions (Note: T=Transgenic; NT=non transgenic)

Penetrasi cahaya pada budidaya rumput laut *K.alvarezii* di laboratorium sangat diperlukan dalam rangka membantu proses fotosintesa pada rumput laut yang dipelihara. Proses fotosintesis pada terdapat pada tumbuhan hijau termasuk rumput laut bersifat autotrof yakni bisa menyusun makanannya sendiri. Melalui daun, tumbuhan menyerap molekul karbondioksida juga air dalam rangka menghasilkan gula dan juga oksigen. Kedua senyawa tersebut kemudian akan digunakan sebagai penyokong pertumbuhannnya (Romimohtarto dan Juwana 2002).

Tumbuhan yang melakukan proses fotosintesis memerlukan bantuan cahaya matahari. Mereka mampu menyerap cahaya tersebut sebab mereka memiliki zaht hijau daun atau klorofil.. Cahaya matahari selanjutnya akan melewati lapisan epidermis yang tanpa warna kemudian melaju menuju mesofil.. Proses fotosintesis ini terdiri atas dua rangkaian reaksi yakni reaksi terang dan juga reaksi gelap. Dinamakan rekasi terang sebab prosesnya membutuhkan cahaya. Dalam *proses fosintesis,* reaksi terang merupakan proses yang pada akhirnya menghasilkan ATP juga NADPH2. Dalam rekasi ini diperlukan molekul air. Fotosintesis dimulai pada saat cahaya mulai mengionisasi molekul klorofil dan kemudian terjadi pelepasan electron.  
Pada tumbuhan sendiri, reaksi biokimia ini akan terjadi siklus calvin dimana karbondioksida akan diikat dengan tujuan membentuk ribose dan lebih lanjut akan menjadi glukosa. Reaksi ini tidak bergantung pada ada atau tidaknya cahaya matahari. proses fotosintesis pada rumput laut dapat berlangsung dengan laju maksimal jika unsur-unsur pendukungnya terpenuhi yakni antara lain: cahaya, konsentrasi karbondioksida, suhu, dan air (Romimohtarto danJuwana2002). Pada kondisi dilapangan penetrasi cahaya pada budidaya rumput laut bervariasi berkisar antara 500 hingga 2000 lux dan sangat erat hubungannya dengan suhu dan musim terutama kaitannya dengan musim tanam (Lideman *et al* 2011).

Proses fotosintesa pada rumput laut, selain tergantung pada intensitas cahaya juga tergantung pada lamanya pemaparan serta ratio terang dan gelap cahaya yang digunakan. Kelangsungan hidup eksplan rumput laut hasil transformasi gen *MmSOD* yang paling tinggi pada ratio terang gelap 16 : 8, disini terlihat kebutuhan cahaya untuk mempertahankan kelangsungan hidup lebih banyak walaupun tidak berbeda nyata dengan perbandingan 12:12 (Gambar 6)

Gambar 6. Kelangsungan hidup eksplan rumput laut *Kappaphycus alvarezii* yang diintroduksi dengan gen *MmSOD* dan rumput laut non transgenik dengan perbandingan terang dan gelap yang berbeda (Ket: T=Transgenik; NT=non transgenik)

Figure 6. survival rate of seaweed *Kappaphycus alvarezii*explant introduced with gene *MmSOD* and non transgenic seaweed with various dark to light ratios (Note: T=Transgenic; NT=non transgenic)

Dalam *proses fosintesis,* reaksi terang merupakan proses yang pada akhirnya menghasilkan ATP juga NADPH2. Dalam rekasi ini diperlukan molekul air. Proses reaksi terang dimulai dengan menangkap foton yang dilakukan oleh pigmen klorofil yang berperan sebagai antenna. Pada thalus rumput laut , cahaya akan diserap melalui molekul klorofil dan kemudian dikumpulkan pada pusat-pusat reaksi. Fotosintesis dimulai pada saat cahaya mulai mengionisasi molekul klorofil dan kemudian terjadi pelepasan electron.Sementara itu, apa yang dimaksud dengan reaksi gelap adalah proses dimana ATP dan juga NADPH yang dihasilkan dalam proses sebelumnya kemudian menghasilkan sejumlah proses atau reaksi biokimia. Reaksi biokimia ini merupakan siklus calvin dimana karbondioksida akan diikat denga tujuan membentuk ribose dan lebih lanjut akan menjadi glukosa, namun reaksi ini tidak bergantung pada cahaya matahari (Romimohtarto *dan* Juwana 2002). Pada isolasi dan pemeliharaan protoplas rumput laut *K.alvarezii* perbandingan cahaya gelap dan terang berpengaruh terhadap pembelahan sel protoplas dan proses germinasi hal ini juga berkaitan dengan proses fotosintesa pada sel rumput laut dan yang paling optimal pada perbandingan 12:12 (Salvador and Serrano 2005)

Pengaruh ZPT pada pemeliharaan rumput laut *K.alvarezii* iintroduksi dengan gen *MmSOD* yang di laboratorium memberikan respon yang positif terhadap pertumbuhan dan kelangsungan hidup eksplan ZPT yang digunakan antara lain dari golongan auxin dan sitokinin yaitu IAA dan BAP yang di campur dalam beberapa perbandingan yaitu kombinasi IAA dan BAP dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1. (Gambar 6)

Gambar 7. Laju pertumbuhan harian (LPH) eksplan rumput laut *K.alvarezii* yang diintroduksi dengan gen *MmSOD* dengan penambahan ZPT dengan komposisi yang berbeda

Figure 7. Daily growth rate of seaweed *K.alvarezii* explant introduced with gene *MmSOD* complemented with various compositions of ZPT

Untuk memacu pertumbuhan tunas pada kultur jaringan rumput laut *K.alvarezii* dilakukan pada media PES yang diperkaya dengan penambahan ZPT antara lain dari golongan auksin dan sitokinin yaitu kombinasi IAA dengan BAP dapat meningkatkan kemampuan untuk bertumbuh dan beregenerasi (Suryati *et al* 2009). Hasil analisis memperlihatkan kelangsungan hidup rumput laut *K. alvarezii* yang diintroduksi gen *MmSOD* yang paling baik yaitu pada media PES yang diperkaya dengan IAA dan BAP dengan perbandingan 1:1, berbeda nyata dengan kontrol, dan namun tidak berbeda dengan perbandingan 2:1, demikian juga kontrol tidak berbeda nyata dengan perbandingan 1:2 dan 2:1.(Gambar 6). Hal ini berbeda dengan perbanyakan rumput laut hasil transformasi gen karaginan yang optimal pertumbuhannya dengan penambahan ZPT dengan campuran IAA dan BAP dengan perbandingan 2:1 (Suryati *et al* 2015). Sedangkan pada regenerasi embriogenesis memperlihatkan kombinasi zat pengatur tumbuh golongan auksin dan sitokinin dapat membantu proses regenerasi kalus rumput laut *K. alvarezii.* Kombinasi IAA : zeatin memiliki efek lebih baik dibandingkan IAA : kinetin. Kombinasi auksin dan zeatin memiliki efek regenerasi yang lebih tinggi dibandingkan kombinasi auksin dan kinetin (Mulyaningrum *et al* 2013). Perbedaan ini sangat dipengaruhi karakter dari zat pengatur tumbuh, di mana zeatin diketahui memiliki aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan kinetin (Bradley & Cheney, 1990; Sakakibara, 2006)

Pada aklimatisasi rumput laut *K.alvarezii* yang diintroduksi dengan gen MmSOD dilakukan pada labu kultur yang diletakkan pada kultur chamber, kemudian dilanjutkan pada bak resirkulasi yang dilengkapi dengan aerasi untuk memacu penyerapan nutrien, serta pertumbuhan anakan rumput laut.

**Analisis Integrasi gen *MmSOD* pada Tanaman Transgenik**

Gen yang  diintroduksikan   adalah   gen*MmCuZnSOD*   yang   diisolasi   dari*M.* *malabathricum*,  diklon ke dalam plasmid pGWB5 dan sudah disisipkan ke dalam  *A.  tumefaciens* LBA4404  (Hannum  2009).

Gambar 8. Plasmid biner pGWB5 yang membawa gen Mn Cu / Zn-SOD (pGWB-SOD) (Hannum 2012

Hasil analisis PCR untuk konfirmasi rumput laut transgenik disajikan pada Gambar 8. PCR menggunakan primer *MmSOD-F1* dan *MmSOD-R2* memperlihatkan adanya pita pada 456 pb pada sampel P, merupakan sampel positif yang diioslasi dari plasmid, kemudian dari sampel 1,2,3, dan 4 merupakan sampel rumput laut transgenik yang membawa gen *MmSOD.* Hal ini juga dilakukan pada analisis PCR yang dilakukan oleh Triana *et al* (2015) memperlihatkan adanya pita pada 456 bp pada sampel rumput laut transgenik yang membawa gen *MmSOD*.

NT M P 1 2 3 4



456 bp

Gambar 8. Hasil elektroforesis produk PCR dengan DNA genom dari rumput laut *K. alvarezii* hasil transformasi dengan gen *MmSOD* dan non transforman. PCR dilakukan dengan primer *MmSODF-MmSODR2*, NT=non transgenik, M = marker 1 kb DNA; P adalah kontrol positif (plasmid pGWB5-*MmCU/Zn-SOD*);1-4 = rumput laut transgenik.

Figure 8. Electrophoresis result of PCR product with DNA genome from seaweed *K. alvarezii* transformed with gene *MmSOD* and non-transformant. PCR was conducted with primary *MmSODF-MmSODR2*, NT=non transgenic, M = marker 1 kb DNA; Pis positive control (plasmid pGWB5-*MmCU/Zn-SOD*);1-4 = transgenic seaweed.

**KESIMPULAN**

## Pada regenerasi rumput laut transgenik *MmSOD*, memperlihatkan media kultur yang paling baik yaitu media PES dengan salinitas 30 ppt, pH = 7, penetrasi cahaya 1500 lux, ratio gelap terang =12:12, dan komposisi ZPT adalah campuran IAA dan BAP dengan perbandingan 1:1. Hasil analisis integrasi gen *MmSOD* menggununakan PCR dengan primer *MmSOD-F-MmSOD-R2* menunjukkan adanya fragmen pada posisi 465 bp

**DAFTAR PUSTAKA**

Bernal-Hernandes Y.Y. Medina-Diaz I.M, Robledo-Morenco M.L, Vela’zques-Fernandes J.B, Giro’n-Perez M.I, Ortega –Cervantes L, Maldonado-Va’zques W.A, Rojas-Garci’a A.E. 2010. Acetylcholinesterase and metallothionein in oysters (*Crassostreacorteziensis*) from a subtropical Mexican Pacific estuary. *Ecotoxicol* 19:819–825. doi:10.1007/s10646-009-0459-2.

Cheney DP. 2000. Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Multicellular Marine Algae, Resultant Strains And Their Products. International classes.Northeastern University (Huntington Avenue Boston) US.<http://ip.com/patfam/en/22440221>. [tanggal akses 20 september 2012].

Cheng R, Ruijuan MA, Ke Li , Hui R, Xiangzhi L, Zhaokai W, Shanjun Y, Yong M. 2011. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of marine microalgae *Schizochytrium*. *Micres.* 25421:1-8

Collen.J. U. 1995. Farming and Physiology of the Red Alage Eucheuma Gowing Commercial Importance in East Africa.Ambio. Vol 24. p 7-8

Contreras-Porcia L, Dennett G, González A, Vergara E, Medina C, Correa JA, Moenne A. 2011.Identification of Copper-Induced Genes in the Marine Alga *Ulvacompressa* (Chlorophyta).*Mar Biotechnol* 13:544–556. doi:10.1007/s10126-010-9325-8.

Daud, R.F., U. Widyastuti, Suharsono, E. Suryati, dan A. Parenrengi. 2013. Introduksi gen Sitrat Sintase ke dalam rumput laut *Kappaphyus alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens. J. Riset Akuakultur,* 8(2):201-208.

Davis TA, Volesky B, Mucci A. 2003.A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae.*Water Res* 37: 4311–4330. doi:10.1016/S0043-1354(03)00293-8.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome, 2010.THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE**.**SALES AND MARKETING GROUP Ofﬁce of Knowledge Exchange, Research and Extension Food and Agriculture Organization of the United Nations Viale delle Terme di Caracalla 00153 Rome, Italy p 218

Fajriah, U., E. Suryati, A. Parenrengi, Suharsono, dan U. Widyastuti. 2015. Introduksi gen Metallothionein tipe II ke dalam rumput laut *Kappaphyus alvarezii* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens.* *J. Riset Akuakultur,* 9 (3):377-385.

Hayashi. L, Gabriel S. M. Faria , Beatriz G. Nunes, Carmen S. Zitta, Lidiane A. Scariot , Ticiane Rover, Marthiellen R. L. Felix , Zenilda L. Bouzon. 2011. Effects of salinity on the growth rate, carrageenan yield, and cellular structure of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) cultured in vitro. J Appl Phycol (2011) 23:439–447. DOI 10.1007/s10811-010-9595-6

Handayani T. 2013. Konstruksi vektor biner dan transformasi gen lisozim pada rumput laut *Kappaphycus alvarezii* menggunakan perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Seminar hasil sekolah pasca sarjana. Bogor(ID). Institut Pertanian Bogor

Hannum, S. 2012. Isolasi, pengklonan, dan analisis ekspresi gen penyandi *Copper/Zinc Superoxide Dismutase* (*CuZn-SOD*) dari *Melastoma malabathricum* L. Disertasi. Sekolah Pascasarjana.Institut Pertanian Bogor. 106 hlm.

Yokoya NS, and Oliveira EC .1992 .Effects of salinity on the growth rate, morphology and water content of some Brazilian red algae of economic importance. Cienc Mar 18:49–64

Yulianto K dan Mira S. 2009. Budidaya Makro Alga *Kappaphycus alvarezii* (Doty) secara vertikal dan gejala penyakit “ice-ice” di perairan Pulau Pari. Di dalam: Juwana S dan Riyatno. *Oseanologi dan Limnologi di IndonesiaEdisi* 35(3). Jakarta [ID]: Pusat Penelitian Oceanografi dan Penelitian Limnologi LIPI. hlm 325 – 334. ISSN 0125 – 9830.<http://www.limnologi.lipi.go.id/limnologi/doc/public/3._Naskah_Kresno__Mira.pdf>

Kumar M, Kumari P, Gupta V, Reddy CRK, Jha B . 2010. Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta) to salinity induced oxidative stress. J Exp Mar Biol Ecol. doi:10.1016/j.jembe.2010.06.00

Largo *et al.* 1997; Largo DB, Faukami K, Adachi M, Nhisijima T. 1997. Direct enumeration of total bacteria from macroalgae by epifluoresecence microscopy asapllied to the flashy red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Glacilaria Spp* (Rhodophyta).*J Phycol.*33:554-557

Liao, I.C, H.M. Su, and J.H. Lin. 1983. Larval foods for penaeid prawns. p.43-69. In Mc Vey, J.P. and J.R. Moore (Eds.). CRC Handbook of Mariculture, Crustacean Aquaculture volume I, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.

Lideman, Gregory N. Nishihara, Tadahide Noro, Ryuta Terada. 2012 . Effect of temperature and light on the photosynthesis as measured by chlorophyll fluorescence of cultured Eucheuma denticulatum and Kappaphycus sp. (Sumba strain)from Indonesia J Appl Phycol DOI 10.1007/s10811-012-9874-5

Lobban C and , Harrison PJ . 1994. Seaweed ecology and physiology. in Palmaria Cambridge University Press, Cambridge, p 366

Mamboya, FA. 2007. Heavy Metal Contamination and Toxicity: Studies of Macroalgae from the Tanzania Coast. Stockholm [US]: Stockholm University library. pp. 1–48. ISBN 91-7155-374-6.<http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:197112/FULLTEXT01.pdf>

Owen JR, Morris CA, Nicolaus B, Harwood JL, Kille P. 2012. Induction of expression of a 14-3-3 gene in response to copper exposure in the marine alga, *Fucusvesiculosus*.*Ecotoxicol* 21:124–138.doi:10.1007/s10646-011-0772-4

Reddy, C. R. K, G. Raja Krishna Kumar, A. K. Siddhanta, and A. Tewari, 2003. In Vitro Somatic Embriogenesis and Regeneration of Somatic Embryos from Pigmented Callus of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty (Rhodophyta, Gigartinales). *J. Phycol.* **39,** 610–616

Romimohtarto, K dan S. Juwana 2002. Biologi laut Ilmu Pengetahuan tentang Biologi Laut . Penerbit Djambatan. 540 hal

Salvador. R.C and Serrano. A.E. 2005. Isolation of protoplasts from tissue fragments of Philippine cultivarsof *Kappaphycus alvarezii (*Solieriaceae, Rhodophyta) ournal of Applied Phycology (2005) 17: 15–22. DOI: 10.1007/s10811-005-5516-5

Sulistiani. E, D.Soelistyowati, Alimuddin , and Samsul Ahmad Yani. 2012. Introduction and Filaments Regeneration from Callus of Cottonii Seaweed (*Kappaphycus alvarezii* (Doty)tCollection from Natuna Island, Riau. Islands Province. Biotropia Vol 19. No 2. 103-114

Suryati E, Mulyaningum S.R.H. 2009. Regenerasi rumput laut *Kappaphycus alvarezii* (Doty) melalui induksi kalus dan embrio dengan penambahan hormon perangsang tumbuh secara *In vitro. J Ris Akuakultur.*4(1): 39-45

Suryati , E, R.F. Daud, U.Widyastuti, A. Tenriulo, dan A. Parenrengi 2014. Regenerasi Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* Hasil Transformasi *Gen Sitrat sintase* Menggunakan *Agrobacterium tumefacien* Secara in Vitro. *. J Ris Akuakultur.*9(2): 169-178.

Suryati, E , A. Tenriulo, A. Rajamuddin, dan U.Widyastuti. 2015. Regenerasi Rumput Laut hasil Introdulsi Gen Karaginan pada Rumput laut *Kappaphycus alvarezii*  menggunakan media kultur yang Berbeda dengan kondisi optimal. Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur p 1-7

Triana, S.H., Alimuddin, U. Widyastuti, Suharsono, E. Suryati dan A. Parenrengi. 2016. The method of *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated *MmCu/Zn-SOD* Gene Transformation in the Red Seaweed *Kappaphycus alvarezii. Pakistan J. Biotechnology, in press.*

Uchida. T, K.Yoshikawa, A. Aray, and S. Aray. 1991. Life cycle and its control of *Sargassum muticum* (Phaeoohyta) in bath culture. Bulletin of the Japaness Society of Scientific Fisheries.57(12) 2249-2255

Vairappan C.S. 2006. Seasonal Occurancences of epiphytic algae on the comercially cultivated red algae Kappaphycus alvarezii (Soliriciae , Gigartinales, Rhodophyta). *J.Applied Phycol.* 18:611-617

Wattier *et al* 2000. DNA Isolation Protocol for Red Seaweed (Rodophyta).Journal Plan Biology moleculer. V 18 No 3 pp 275-281

Wu, Y.F., Y. Chen, X.M. Liang, X.Z. Wang. 2006. An experimental assessment of the factors influencing *Agrobacterium-*mediated transformation in tomato. *Russian J. Plant Physiology,* 53 (2), 252-256.