

OPTIMALISASI SISTEM PERBANYAKAN KACANG TANAH SECARA KULTUR JARINGAN PADA PROSES TRANSFER GEN

(The optimization of *in-vitro* propagation of peanut in gene transfer process)

Aswaldi Anwar*

ABSTRACT

The development of an effective gene transfer system for any crop depends largely on the ability to introduce a desired gene into the plant cells, the subsequent integration of the gene into the plant genome and on availability of tissue culture techniques that permit the growth and development of the explants and the recovery of fertile transgenic plants. Gene transfer system in peanut is also depending on successfully of tissue culture techniques, especially in the source of explants and the polarity of the explants. The sources of explants in this experiment are the primary leaf of germinated embryo and the epicotyls. The treatment are: Primary leaves; horizontally epicotyls; vertically inverted epicotyls; and vertically upright epicotyls. Completely Randomized Design was used as an experimental design with five observations. The disarmed super virulent *Agrobacterium* strain EHA 101 harboring pBI121 IG was used for transformation studies. Result indicated that the source and polarity of the explants were critical as explants vertically inverted during co cultivation improved transformation and shoot regeneration frequency.

PENDAHULUAN

Keberhasilan sistem transfer gen dalam rekayasa genetik tanaman sangat bergantung kepada : kemampuan mengintroduksi gen yang diinginkan ke sel tanaman, integrasi gen tersebut ke genom tanaman dan kemampuan teknik kultur jaringan untuk menumbuhkan tanaman transgenik yang dihasilkan. Semua itu merupakan suatu proses terpadu yang melibatkan: pilihan yang tepat dalam menentukan eksplan, kondisi kultur, sistem vektor, teknik transformasi, lamanya kokultivasi, dan proses seleksi terhadap sel-sel yang mengalami transformasi. Optimalisasi dari masing-masing faktor tersebut meningkatkan keberhasilan dari proses transformasi.

Sistem transfer gen pada tanaman kacang tanah juga membutuhkan tingkat keberhasilan kultur jaringan yang tinggi. Sumber eksplan yang berbeda dengan kondisi kultur yang bervariasi akan menghasilkan berbagai kemungkinan seperti terbentuknya kalus, shootlet, rootlet, atau plantlet (George dan Sherington, 1984, Taji, William, dan Richard, 1992).

Untuk kepentingan transfer gen, setiap tahapnya membutuhkan tipe kultur yang berbeda. Misalnya, untuk regenerasi tanaman transgenik dibutuhkan teknik kultur dengan laju multiplikasi tinggi sehingga didapatkan hasil kloning transgenik dalam jumlah banyak dan seragam dalam waktu relatif singkat.

Oleh karena itu sebelum mengembangkan sistem transfer gen pada kacang tanah terlebih dahulu perlu dipersiapkan protokol yang optimal dalam sistem perbanyakannya secara kultur jaringan. Tulisan ini merupakan hasil penelitian dengan judul "Optimalisasi sistem perbanyak kacang tanah secara kultur jaringan pada proses transfer gen" yang bertujuan untuk mendapatkan sistem perbanyak kacang tanah secara kultur jaringan yang terbaik, yang selanjutnya akan bermanfaat dalam sistem transformasi genetik pada kacang tanah.

BAHAN DAN METODA

Percobaan ini merupakan bahagian dari Proyek Peningkatan Mutu Kacang tanah melalui penerapan Bioteknologi di Center for Plant Biotechnology Research, Tuskegee University, Tuskegee, Alabama, Amerika Serikat. Percobaan dilaksanakan dari bulan Februari sampai dengan April 1997, bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Pusat Penelitian tersebut.

Bahan tanaman yang digunakan adalah benih kacang tanah kultivar Valencia, media dasar Murashige and Skoog (1962) dengan tambahan 30 g/l sukrosa, 100 mg/l myo-inositol, dan 3 g/l phytigel untuk tahap inisiasi, dan ditambah dengan 2.2 mg/l thidiazuron (MS Tdz) pada tahap berikutnya. Untuk keduanya, pH diatur 5.8.

Sistem perbanyak yang diuji adalah sumber dan peletakan eksplan sebagai berikut:

- A. Perbanyak dengan daun primer
- B. Perbanyak dengan epikotil yang ditanam horizontal
- C. Perbanyak dengan epikotil yang ditanam vertikal

* Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang

D. Perbanyakkan dengan epikotil yang ditanam vertikal terbalik

Setiap perlakuan terdiri dari lima ulangan yang setiap ulangan terdiri dari 20 eksplan. Perlakuan ditempatkan secara acak sempurna. Data hasil pengamatan diuji dengan uji F pada taraf nyata 5% dan bila didapatkan pengaruh yang nyata dilanjutkan dengan uji BNJ pada taraf nyata 5%.

Sterilisasi permukaan sumber eksplan dilakukan dengan jalan membakar benih kacang tanah dalam petridish steril yang ditetesi dengan sekitar 0,5 ml alkohol 96%. Embrio kemudian dilepaskan dan dikecambahkan pada media MS dengan tambahan 30 g/l sukrosa, 100 mg/l myo-inositol dan 3 g/l phytigel dan pH diatur 5,8. Semua petri tersebut diinkubasikan pada suhu $26 \pm 2^\circ\text{C}$ dengan 16 jam fotoperiodesitas.

Kecambah yang tumbuh pada tahap inisiasi di atas dijadikan sebagai sumber eksplan bagi perlakuan yaitu dengan memotong daun primer dan epikotil. Batas pemotongan epikotil adalah di atas buku kotiledon dengan panjang 0,5 cm. Bagian bawah dipotong datar, sedangkan bagian atas dipotong meruncing untuk memudahkan/menandai perlakuan C dan D.

Sumber eksplan menurut perlakuan (A,B,C, dan D) sebelum dikokultivasi/ditanam diberi perlakuan dengan *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 101/pB1Hm 1G untuk mempelajari transformasinya. Eksplan yang sudah dipotong direndam dalam media $\frac{1}{2}$ MS selama 15-20 menit dalam cawan-petri steril, setelah itu mediannya dipipet dan dibuang. Lakukan sampai tiga kali untuk masing-masingnya. Ambil biakan bakteri dari masing-masing strain EHA 101 yang sudah dipersiapkan dan tuangkan ke dalam petri, biarkan selama 10 menit. Tempatkan masing-masing eksplan yang telah diinfeksi pada kertas blotting selama lima menit dan segera

dikokultivasi/ditanam pada media MS0 dan diinkubasikan seperti di atas.

Untuk perlakuan A daun primer ditempatkan secara mendatar di atas media. Perlakuan B, potongan epikotil diletakkan mendatar/horizontal di atas media. Perlakuan C, potongan epikotil diletakkan vertikal dengan bagian yang datar terbenam dalam media, sementara perlakuan D bagian yang dipotong meruncing terbenam dalam media. Setelah kokultivasi selama 5-6 hari pindahkan ke media tumbuh MS Tdz yang ditempatkan dalam petridish steril. Jumlah eksplan tiap petridish 20 buah (satu ulangan). Sistem inkubasi sama dengan proses inisiasi di atas.

Pengamatan yang dilakukan meliputi: persentase eksplan membentuk kalus saja, tunas saja, serta kalus dan tunas. Juga diamati penampakan hasil transformasi pada masing-masing perlakuan. Pengamatan hasil transformasi ini dilakukan dengan GUS expression assay (Jefferson, 1987).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan dan morfogenesis eksplan yang ditanam dapat dipengaruhi oleh genotip, umur tanaman, umur jaringan, fase fisiologis, keadaan kesehatan tanaman, ukuran eksplan, metode inokulasi dan pengaruh peletakan eksplan (Pierik, 1987 dan Dixon dan Gonzales, 1994). Hasil pengamatan pada percobaan ini membuktikan pernyataan tersebut. Sumber eksplan dan cara peletakan eksplan ternyata memberikan arah pertumbuhan dan morfogenesis yang berbeda seperti dapat dilihat pada Tabel 1. Hal ini sangat erat kaitannya dengan orientasi pertumbuhan dan perkembangan dari masing-masing sumber eksplan.

Tabel 1. Pertumbuhan dan morfogenesis eksplan kacang tanah dari sumber dan cara peletakan eksplan yang berbeda pada tahap kokultivasi

Sumber dan cara peletakan eksplan	Persentase eksplan yang membentuk kalus	Persentase eksplan yang membentuk tunas	Persentase eksplan yang membentuk kalus dan tunas
Daun Primer	60 a	14 a	10 a
Epikotil Horizontal	34 bc	16 ab	19 a
Epikotil Vertikal	22 c	18 ab	32 b
Epikotil Vertikal terbalik	38 b	24 b	24 ab

Angka-angka dalam kolom yang sama diikuti oleh huruf kecil yang sama berbeda tidak nyata menurut Uji BNJ pada taraf nyata 5%.

Dari Tabel tersebut di atas dapat dilihat bahwa eksplan yang berasal dari daun primer cenderung membentuk kalus lebih banyak dari yang lain, hanya sebahagian kecil yang membentuk tunas. Menurut Gunawan (1987) salah satu faktor yang

menentukan terbentuknya kalus atau tunas adalah zat pengatur tumbuh (hormon eksogen) dan hormon endogen terutama auksin dan sitokinin. Dalam percobaan ini tidak ditambahkan hormon eksogen. Oleh karena itu hormon yang sangat

berpengaruh adalah hormon endogen. Auksin terutama banyak ditemukan pada daun yang muda dibandingkan epikotil. Peranan auksin ini sangat menentukan terhadap terbentuknya kalus.

Hasil percobaan menunjukkan bahwa eksplan daun primer ternyata sebahagian besar membentuk kalus.

Sementara itu tunas lebih banyak terbentuk pada eksplan yang berasal dari epikotil terutama yang diletakan vertikal, baik terbalik atau tidak. Seperti diketahui epikotil merupakan bahagian tanaman yang pada waktu dewasa berkembang menjadi batang tanaman. Apabila bahagian ujungnya dipotong maka dominansi apikal akan berkurang sehingga akibatnya tunas-tunas baru akan segera terbentuk. Fenomena ini juga ditemukan pada percobaan ini. Eksplan epikotil baik yang diletakan vertikal ataupun vertikal terbalik tetap mampu mengeluarkan tunas. Tunas yang terbentuk umumnya adalah tunas adventif dan juga didapatkan tunas yang tumbuh melalui proses embriogenesis langsung. Hal ini ditandai dengan perkembangan awal eksplan tersebut, dimana pada awalnya yang terbentuk adalah kalus. Beberapa hari setelah kalus terbentuk terjadi perubahan warna menjadi hijau yang kemudian tumbuh melalui tahapan pembentukan embrio dan langsung tumbuh membentuk tunas-tunas baru.

Hasil pewarnaan menunjukkan bahwa keberhasilan proses transformasi ditemukan pada eksplan yang berasal dari epikotil yang ditanam secara terbalik, dimana warna biru ditemukan hampir merata pada seluruh bahagian eksplan kecuali ujung bahagian atas. Warna biru ini merupakan ekspresi dari aktifitas GUS-Intron yang menandakan bahwa telah terjadi proses transformasi.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat ditarik dari percobaan ini adalah: sumber dan cara peletakan eksplan berpengaruh terhadap pertumbuhan dan morfogenesis eksplan kacang tanah pada proses transformasinya. Hasil yang terbaik diperoleh dari eksplan epikotil yang diletakan secara vertikal terbalik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Percobaan ini terselenggara berkat bantuan IAEA melalui P3IN Unand dan Batan, dan The Center for Plant Biotechnology Research, Tuskegee University, Alabama, USA. Terima kasih penulis untuk lembaga-lembaga tersebut. Ucapan terima secara khusus disampaikan untuk Prof. Dr.Ir. Nurhajati Hakim, Dr. C. S. Prakash dan Dr. Marceline Egnin.

DAFTAR PUSTAKA

- Dixon, R.A. dan R.A. Gonzales. 1994. *Plant Cell Culture*. Oxford University Press. 230 p.
- George, E.F. dan P.D. Sherington, 1984. *Plant propagation by Tissue Culture*. Exegetics, Ltd. Eversley Basingstoke, Hants. England. 709 p.
- Gunawan, L.W. 1987. Teknik Kultur Jaringan. Lab. Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi IPB Bogor. 252 hal.
- Jefferson, R.A. 1987. *Plant Molecular Biology Rep.* 5: 387-405.
- Pierik, R.L. 1987. *In vitro Culture of Higher Plant*. Martinus Nijhoff Publ. Netherlands. 344 p.
- Taji, M., Acram, Dodd, A. William, dan R. Richard. 1992. *Plant Tissue Culture Practice*. Centre for Biological Population Management Queensland University of Technology, Brisbane.

-----oo0oo-----