

# Studi Genetik Transformasi pada Dua Genotipe Ubi Kayu Indonesia

E. Sudarmonowati, Y. Andayani, dan Inez H.S.-Loedin

*Puslitbang Bioteknologi-LIPI, Cibinong*

## ABSTRAK

Tunas pucuk ubi kayu genotipe Sarewen asal Irian Jaya dan varietas unggul Adira II hasil proliferasi *in vitro* pada media MS yang mengandung 0,5 mg/l BAP, 0,05 mg/l NAA dan 2% sukrosa diintroduksi dengan plasmid pAHC dan pPC. Plasmid pAHC mengandung gen penanda B-glucuronidase (*GUS*) dan gen bar di bawah kontrol promoter ubiquitin dari jagung, sedangkan plasmid pPC selain juga mengandung gen *GUS* dan gen bar juga mengandung gen penyeleksi ketahanan terhadap higromisin di bawah kontrol promoter CaMV35S. Introduksi gen dilakukan dengan metode penembakan menggunakan penembak *biolistic* dengan tekanan gas helium sebesar 2.500 kpa. Selain jenis plasmid, komposisi larutan asai gen *GUS* dan periode asai setelah penembakan juga dicoba untuk memperoleh hasil yang terbaik. Hasil asai gen *GUS* menunjukkan bahwa rata-rata tertinggi titik biru (29) per tunas pucuk diperoleh dengan cara menembak tunas pucuk Adira II dengan plasmid pAHC dan *GUS* asai dilakukan satu hari setelah penembakan menggunakan prosedur dan modifikasi larutan asai yang digunakan untuk *Acacia mangium*.

**Kata kunci:** ubi kayu, penembak *biolistic*, introduksi gen, plasmid, promoter.

## ABSTRACT

Cassava shoot tips of genotypes of Sarewen collected from Irian Jaya and an improved variety Adira II taken from shoot proliferated *in vitro* on MS medium containing 0.5 mg/l BAP, 0.05 mg/l NAA and 2% sucrose were introduced with either pAHC or pPC plasmid. The pAHC plasmid containing-glucuronidase (*GUS*) marker gene and bar gene under the control of an ubiquitin promoter from maize, while the pPC also contains the same genes in addition to hygromycin resistance as a selectable marker gene under the control of a CaMV35S promoter. Biolistic gun bombardment was performed at 2,500 kpa of helium pressure. In order to obtain good results, beside the types of plasmid, the composition of *GUS* assay solution and the period of histochemical assay after bombardment were studied. The result of *GUS* assay indicated that the highest average of blue spots (29) per shoot tip was obtained from shoot tips of Adira II bombarded with pAHC plasmid, assayed one day after bombardment using the procedure and composition of *GUS* assay adopted from that for *Acacia mangium* with slight modification.

**Key words:** cassava, marker gene, biolistic gun, plasmid, promoter

## PENDAHULUAN

Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz) yang merupakan tanaman umbi semusim banyak ditanam di daerah tropis sebagai sumber pangan terpenting ketiga setelah padi dan jagung. Kelebihan ubi kayu dibanding tanaman pangan lain adalah kemampuannya untuk tumbuh di lahan marginal yang banyak mendominasi di beberapa daerah di Indonesia dan di negara-negara tropis lain seperti Afrika bagian timur dan selatan, Brazil bagian utara, pantai utara Colombia dan Venezuela, Muang-thai bagian utara, dan India bagian selatan. Oleh karena itu, perbaikan produksi baik kuantitatif maupun kualitas diperlukan untuk terjaminnya ketersediaan pangan dan peningkatan gizi. Perbaikan genetik untuk peningkatan produksi misalnya dengan mengendalikan faktor yang berpengaruh terhadap laju fotosintesis, ketahanan terhadap stres lingkungan seperti kekeringan dan ketahanan terhadap hama/penyakit. Sedangkan pemuliaan ubi kayu untuk meningkatkan kandungan asam amino yang secara alami sangat sedikit terkandung di umbinya kemungkinan dapat digunakan metode yang pernah dicoba pada tanaman lain. Perbaikan genetik pati ubi kayu juga sudah dirintis dengan cara melakukan kloning dan karakterisasi gen-gen yang mengatur biosintesis pati (Salehuzzaman *et al.*, 1993) dan studi protein dan enzim yang berhubungan dengan pembentukan umbi (Carvalho *et al.*, 1993). Namun demikian, gen-gen yang telah dikarakterisasi dan diisolasi tersebut tidak akan berperan bila tidak diintroduksi dan berfungsi dengan baik pada tanaman yang akan diperbaiki mutu genetiknya. Dewasa ini telah dikembangkan teknik transfer gen untuk memperpendek waktu dan mengatasi beberapa kendala bila pemuliaan dilakukan secara konvensional. Walaupun demikian teknik transformasi genetik ini masih tetap harus terkait dengan prinsip-prinsip metode konvensional seperti untuk pengujian di lapang, uji keturunan, dan kestabilan genetik.

Pada tanaman ubi kayu telah dicoba beberapa metode transfer gen baik melalui *Agrobacterium tumefaciens* (Fauquet *et al.*, 1993; Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 1993; Raemakers *et al.*, 1993) maupun dengan penembakan menggunakan penembak *biolistic*, namun demikian genotipe yang telah dicoba adalah asal Amerika Latin (umumnya dari Colombia) dan Afrika (umumnya dari Nigeria). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil transformasi genetik pada beberapa jenis tanaman sangat dipengaruhi oleh genotipe, oleh karena itu genotipe ubi kayu Indonesia perlu dicoba untuk memperbaiki mutu genetik tanaman ubi kayu dari Indonesia. Selain itu gen-gen yang disisipkan umumnya gen penanda *GUS* dan gen penyeleksi seperti NPTII atau bar pada genotipe dari Colombia, dengan demikian masih perlu dicoba gen penyeleksi lain seperti ketahanan terhadap higromisin dan juga perlu dicoba plasmid lain dengan promoter berbeda untuk lebih meningkatkan efisiensi transformasi genetik pada ubi kayu.

Tujuan penelitian adalah untuk mengembangkan teknik transformasi genetik menggunakan penembak *biolistic* pada genotipe ubi kayu Indonesia untuk perbaikan mutu genetik.

## **BAHAN DAN METODE**

### **Sumber Bahan Tanaman**

Stek genotipe Sarewen asal Irian diperoleh dari Kabupaten Cendrawasih, Irian Jaya atas budi baik Dr. Fred Rumawas, Institut Pertanian Bogor, sedangkan stek ubi kayu Adira II diperoleh dari Puslitbang Tanaman Pangan, Bogor. Stek-stek tersebut ditanam di rumah kaca Puslitbang Bioteknologi-LIPI di Cibinong untuk memperbanyak secara *in vitro*. Tunas pucuk maupun tunas samping yang telah tumbuh dari stek-stek genotipe tersebut diambil untuk dibiakkan pada media Murashige dan Skoog (1962).

### **Sterilisasi Media, Bahan Tanaman, dan Metode Kultur**

Media standar yang digunakan adalah Murashige dan Skoog (MS) yang mengandung 2% sukrosa dan 0,6% agar Oxoid Technical No.6. Setelah pH media mencapai pH 5,7 dengan cara menambahkan 1 M NaOH atau 1 M HCl, maka media disterilisasi dalam otoklaf dengan tekanan 120 bar selama 20 menit. Pemberian antibiotik dilakukan dengan cara meneteskan pada media yang hangat sambil dikocok-kocok.

Tunas pucuk atau tunas samping direndam dalam 30% Difolatan selama 10 menit sebelum disterilisasi dengan larutan 0,03% HgCl<sub>2</sub> selama 10 menit. Setelah dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali, tunas-tunas tersebut diletakkan pada kertas saring steril untuk menghilangkan kelebihan air lalu dibiakkan pada media MS tanpa hormon yang mengandung sukrosa 2% dan 0,1% streptomisin. Proliferasi tunas untuk penelitian transformasi genetik dilakukan dengan cara memisahkan tunas-tunas baru yang tumbuh dan dibiakkan pada media MS yang mengandung 0,5 mg/l BAP dan 0,05 mg/l NAA. Tunas-tunas tersebut dipelihara dalam ruang kultur pada suhu 25°C dan foto periode 16 jam.

### **Plasmid**

Plasmid yang dicoba adalah pAHC dan pPC yang keduanya mengandung gen penanda *GUS* dan gen bar tetapi promoternya berbeda. Plasmid pAHC di bawah kontrol promoter ubiquitin dari jagung sedangkan plasmid pPC juga mengandung gen penyeleksi ketahanan terhadap higromisin dan dibawah kontrol promoter Cauliflower Mosaic Virus (CaMV35S). Plasmid pPC diperoleh dari Dr. P. Christou of John Innes Institute, U.K. dan plasmid pAHC diperoleh dari Prof. P. H. Quail of University of California, Berkeley, USA.

### **Persiapan Partikel Penembakan**

Prosedur yang dilakukan adalah pelapisan DNA dengan partikel emas untuk tanaman padi (Christou, komunikasi pribadi). Partikel emas sebanyak 10 mg dan DNA sebanyak 10 µg dicampur dalam tabung Eppendorf berisi 50 µg bufer yang

mengandung 150 mM NaCl dan 10 mM Tris pH 8,0. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 0,1 M spermidine dan setelah dicampur ditambahkan 25% Polyethylene glycol (PEG, BM=1300-1600). Presipitasi dilakukan dengan menambahkan 2,5 M CaCl<sub>2</sub> lalu didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Setelah disentrifugasi (12.000 rpm), pelet yang diperoleh dilarutkan dalam 100% etanol lalu disonikasi.

### **Metode Penembakan**

Tunas pucuk yang telah dibiakkan pada media MS yang mengandung 0,5 mg/l BAP dan 0,05 mg/l NAA selama 25 hari sebanyak 10 tunas diletakkan di atas kertas saring steril dalam cawan petri diameter 6 cm. Masing-masing kelompok ditembak dua kali dengan tekanan gas helium sebesar 2.500 kpa. Penembak *biolistic* yang digunakan adalah yang dibuat oleh CSIRO, Australia.

### **Asai Histokimia Gen *GUS***

Setelah satu atau 70 hari penembakan, dilakukan asai gen *GUS* secara histokimia. Dua macam komposisi larutan *GUS* dicoba untuk membandingkan pengaruhnya terhadap pendeteksian ekspresi gen *GUS*. Komposisi larutan *GUS* A adalah larutan yang biasa digunakan untuk mendeteksi gen *GUS* secara histokimia pada padi (Rueb dan Hensgens, 1989), sedangkan komposisi larutan *GUS* B adalah modifikasi metode untuk mendeteksi ekspresi gen *GUS* pada tanaman kehutanan seperti *Acacia mangium* (Sudarmonowati, 1996) dan *Paraserianthes falcataria* (Sudarmonowati dan Bachtiar, 1996).

Komposisi larutan *GUS* A adalah 100 mM bufer fosfat pH 7,7 yang mengandung 5 mM potasium ferrosianida, 5 mM potasium ferrisianida, 0,3% X-Gluc, 0,5% Triton X-100 dan 0,1% chlorampenicol. Komposisi larutan *GUS* B adalah 50 mM bufer fosfat pH 7,0 yang mengandung 0,5 mM potasium ferrosianida, 0,5 mM potasium ferrisianida, 0,6% X-Gluc, 0,5% Triton X-100 dan 1,0 mM EDTA pH 8,0.

Tunas-tunas pucuk direndam dalam larutan bufer *GUS* lalu diinkubasi selama 24 jam pada inkubator bersuhu 38°C. Setelah larutan bufer dibuang, diberi 70% etanol lalu diganti dengan 90% etanol dan diinkubasi selama lebih dari 24 jam. Observasi dilakukan menggunakan mikroskop stereo (Olympus, Japan) yang dihubungkan dengan kamera.

### **Seleksi Tunas Transgenik**

Sepuluh hari setelah penembakan, tunas pucuk yang diintroduksi dengan plasmid pPC dibiakkan pada media MS yang mengandung 100 mg/l higromisin, sedangkan tunas pucuk yang diintroduksi dengan plasmid pAHC dibiakkan pada media yang mengandung 5 mg/l bialaphos. Konsentrasi yang dipilih tersebut berdasarkan penelitian pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui konsentrasi yang mematikan

bagi tunas pucuk kontrol kedua genotipe ubi kayu yang dicoba dengan cara membiakkan tunas-tunas pucuk yang tidak ditembak pada media yang mengandung 0, 50 dan 100 mg/l higromisin atau pada media yang mengandung 0; 1,0; 2,5; dan 5,0 mg/l bialaphos.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Dibanding genotipe Sarewen, varietas unggul Adira II lebih responsif karena persentase tunas yang memiliki titik biru dan rata-rata jumlah titik biru per tunas yang menandakan adanya aktivitas gen *GUS* lebih banyak (Tabel 1). Namun demikian, terdapat persamaan pada kedua genotipe tersebut, yaitu persentase eksplan yang memiliki titik biru lebih banyak bila diintroduksi dengan plasmid pAHC (Gambar 1).

Adanya perbedaan pengaruh plasmid yang diintroduksi kemungkinan disebabkan oleh perbedaan promoter, dengan demikian promoter ubiquitin dari jagung pada plasmid pAHC lebih baik dibanding promoter CaMV35S pada plasmid pPC untuk dua genotipe ubi kayu Indonesia yang dicoba. Pengaruh perbedaan promoter sudah dibuktikan pada beberapa jenis tanaman tetapi hasilnya sangat bervariasi tergantung jenis tanamannya atau bahkan genotipenya. Pada tanaman kehutanan seperti *A. mangium* (Sudarmonowati, 1996) dan *Picea mariana* (Duchesne dan Charest, 1991), promoter CaMV35S berfungsi lebih baik dibanding promoter lain yang dicoba. Sedangkan pada tanaman ubi kayu asal Amerika Latin, promoter 35S sama baiknya dengan promoter ubiquitin (Franche *et al.*, 1991).

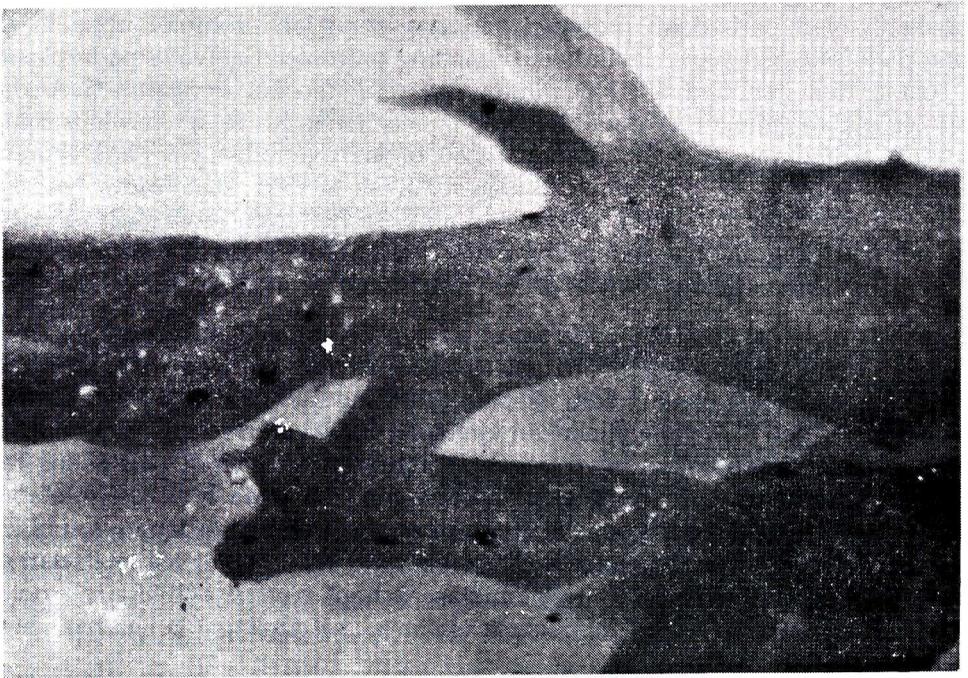
Analisis ekspresi gen *GUS* pada satu hari dan 70 hari setelah penembakan menunjukkan bahwa ekspresi gen *GUS* baik pada genotipe Sarewen maupun Adira II sudah dapat dideteksi bahkan satu eksplan ada yang mempunyai 60 titik biru, dan bahwa transfer gen *GUS* yang dilakukan tergolong stabil karena tunas yang dianalisis setelah 70 hari penembakan tetap berwarna biru dengan daerah biru paling tebal umumnya pada tangkai daun. Deteksi ekspresi gen *GUS* pada satu hari setelah penembakan berdasarkan hasil penelitian Sarria *et al.*, (1993) pada tanaman ubi kayu asal Amerika Latin yaitu ekspresi gen *GUS* lebih rendah bila dideteksi lebih dari satu hari setelah penembakan. Namun demikian, Schopke *et al.*, (1995) mendeteksi ekspresi gen *GUS* pada kalus embriogenik ubi kayu asal Afrika pada tiga hari setelah penembakan.

Jumlah penembakan pada penelitian adalah dua kali karena pada beberapa jenis tanaman termasuk satu kultivar ubi kayu dari Afrika (Schopke *et al.*, 1995) menunjukkan bahwa penembakan dua kali memberikan hasil yang lebih baik.

**Tabel 1.** Pengaruh genotipe, jenis plasmid, dan komposisi larutan bufer *GUS* terhadap efisiensi transformasi ubi kayu.

Genotipe	Plasmid	Bufer <i>GUS</i> larutan A		Bufer <i>GUS</i> larutan B	
		% eksplan bertitik biru	rata-rata jumlah titik biru per eksplan	% eksplan bertitik biru	rata-rata jumlah titik biru per eksplan
Sarewen	pAHC	100	8,3	*	*
	pPC	25	0,3	*	*
Adira II	pAHC	0	0	100	29
	pPC	0	0	66,7	8,0

Keterangan : \* tidak dicoba



**Gambar 1.** Ekspresi gen *GUS* pada tunas pucuk Adira II yang diintroduksi dengan plasmid pAHC.

Hasil menunjukkan bahwa komposisi larutan *GUS* untuk mendeteksi ekspresi gen *GUS* secara histokimia berpengaruh terhadap pendeteksian titik-titik biru pada tunas pucuk ubi kayu varietas Adira II. Perbedaan pengaruh kemungkinan disebabkan perbedaan kandungan klorofil atau ketebalan dinding sel setiap jenis tanaman.

Pada jenis-jenis tanaman tertentu kandungan klorofilnya sangat tinggi sehingga sulit dihilangkan dan dinding selnya sulit dilunakkan sehingga membutuhkan konsentrasi larutan *GUS* lebih pekat atau inkubasi pada larutan *GUS* lebih lama.

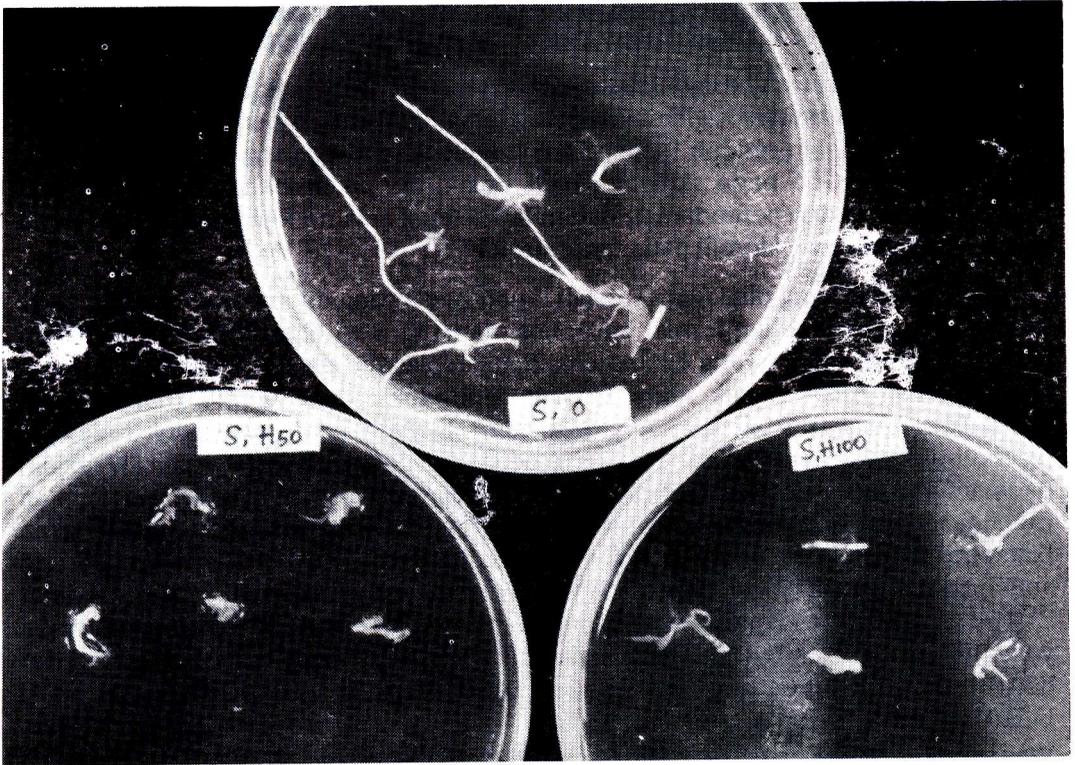
Untuk memperoleh hasil deteksi aktivitas gen *GUS* yang baik pada varietas Adira II, diperlukan konsentrasi X-gluc lebih pekat tetapi konsentrasi potasium ferrosianida dan ferrisianida lebih rendah (sepersepuluh kali) dibanding yang dibutuhkan untuk mendeteksi gen *GUS* pada skutelum padi. Selain itu, penambahan EDTA mungkin berperan penting dan perendaman dalam 90% etanol selama lebih dari 24 jam perlu untuk menghilangkan klorofil pada tunas ubi kayu.

Pengamatan yang dilakukan setelah 7 hari tunas yang ditembak dibiakkan pada media yang mengandung 5 mg/l bialaphos atau 100 mg/l higromisin menunjukkan bahwa umumnya tunas yang diintroduksi dengan plasmid pAHC maupun pPC masih hidup kecuali tunas pucuk Adira II yang diintroduksi dengan pPC (hanya 80%). Sedangkan tunas pucuk Sarewen dan Adira II yang tidak diintroduksi dengan plasmid-plasmid tersebut (kontrol) yang bertahan hidup hanya 60% bila dibiakkan pada media yang mengandung 100 mg/l higromisin (Tabel 2). Pengamatan menunjukkan bahwa higromisin lebih cepat memberikan pengaruh dibandingkan bialaphos hingga konsentrasi tertinggi yang dicoba (5 mg/l) karena pada umur 7 hari sudah terlihat pengaruhnya dan lebih nyata lagi pengaruhnya setelah 14 hari (Gambar 2). Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa setelah 14 hari dibiakkan pada media yang mengandung 5 mg/l bialaphos, tunas pucuk yang bertahan hidup masih berkisar 60-80%. Dengan demikian masih diperlukan uji ketahanan pada konsentrasi bialaphos lebih tinggi walaupun pada padi konsentrasi 2,5 mg/l sudah mematikan. Pengamatan masih terus dilanjutkan hingga 14 hari atau lebih untuk memperoleh pengaruh yang lebih nyata.

**Tabel 2.** Seleksi tunas transgenik pada media yang mengandung 100 mg/l higromisin atau 5 mg/l bialaphos.

Genotipe	Plasmid	Media	% tunas yang hidup*
Sarewen	-	O	100
		B	100
		H	60
	pAHC pPC	O	100
		O	100
		B	100
Adira II	-	H	100
		O	100
		B	100
	pAHC pPC	H	60
		O	100
		O	100
	pAHC pPC	B	100
		H	80

Keterangan: \*observasi dilakukan pada umur 7 hari di media yang mengandung bialaphos (B) atau higromisin (H).



**Gambar 2.** Seleksi ketahanan tunas pucuk genotipe Sarewen pada media yang mengandung higromisin pada berbagai konsentrasi (atas tengah: 0 mg/l, kiri bawah: 50 mg/l, kanan bawah: 100 mg/l).

## KESIMPULAN

Efisiensi transformasi genetik dengan teknik penembakan *biolistic* pada ubi kayu Indonesia dipengaruhi oleh genotipe, jenis plasmid/promoter dan prosedur deteksi ekspresi gen *GUS*.

Hasil penelitian yang diperoleh, walaupun masih memerlukan optimasi dan perolehan data lebih lanjut, memberikan peluang untuk memperbaiki mutu genotipe ubi kayu Indonesia secara genetik. Penelitian masih perlu dilanjutkan untuk meningkatkan efisiensi seperti menggunakan genotipe lain atau bahan tanaman lain yaitu embriogenik kalus atau embrio somatik apabila kedua jenis bahan tanaman tersebut sudah diperoleh atau mencoba tekanan helium berbeda.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdri. S. Hutajulu, W. Rahayu dan A. Sri Rahayu atas bantuannya dalam pelapisan DNA dengan partikel emas.

## DAFTAR PUSTAKA

- Carvalho, L.J.C.B., J.C.M. Cascardo, M.A. Ferreira, and M.E. Loureiro. 1993.** Studies on proteins and enzymes related to tuberization and starch biosynthesis in cassava roots. Proceedings First International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia, 25-28 August, 1992.
- Chavarriaga-Aguirre, P., C. Schopke, A. Sangare, C. Fauquet, and R.N. Beachy. 1993.** Transformation of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) embryogenic tissues using *Agrobacterium tumefaciens*. Proceedings First International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia, 25-28 August, 1992.
- Duchesne, C. and J. Charest. 1991.** Transient expression of the B-glucuronidase gene in embryogenic callus of *Picea mariana* following microprojection. Plant Cell Reports 10: 191-194.
- Fauquet, C., C. Schopke, P. Chavarriaga, A. Sangare, R.N. Beachy. 1993.** Genetic engineering technologies to control viruses and their application to cassava viruses. Proceedings First International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia 25-28 August, 1992.
- Franche, C., D. Bogusz, C. Schopke, C. Fauquet, and R.N. Beachy. 1991.** Transient gene expression in cassava using high velocity microprojectiles. Plant Molecular Biology: Gerlach, W.L. ed.) Use of Plant Virus Satellite RNA Sequences to Control Gene Expression. Viral Genes and Plant Pathogenesis, Kentucky. USA.
- Raemakers, C.J.J.M., E. Jacobsen, and R.G.F. Visser. 1993.** Cyclic somatic embryogenesis and plant transformation in cassava. Proceedings First International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network. Cartagena, Colombia, 25-28 August, 1992.
- Rueb, S. and L.A.M. Hensgens. 1989.** Improved histochemical staining for B-D-glucuronidase activity in monocotyledonous plants. Rice Genet. Newsl. 6: 168-169.
- Salehuzzaman, S., T. Bleker, E. Jacobsen, R.G.F. Visser. 1993.** Cloning and characterization of starch biosynthetic genes of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). Proceedings First International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network. Cartagena, Colombia, 25-28 August, 1992.

- Sarria, R.A., A. Gomez, M.L. Catano, P.V. Herrera, A. Calderon, J.E. Mayer, and W.M. Roca. 1993.** Towards the development of *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment-mediated cassava transformation. Proceedings First International Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network. Cartagena, Colombia, 25-28 August, 1992.
- Schopke, C., N. Taylor, R. Carcamo, G.G. Henshaw, R.N. Beachy, and C. Fauquet. 1995.** Transformation of cassava embryoids by microbombardment of embryogenic suspensions. Proceedings of Second Scientific Meeting Cassava Biotechnology Network, Bogor, Indonesia, 22-26 August, 1994.
- Sudarmonowati, E. 1996.** Particle-gun DNA delivery in *Acacia mangium*: Factors affecting transformation efficiency. 1996. Proceedings International Seminar on Tropical Plantation Establishment: Improving Productivity Through Genetic Practices, Yogyakarta, 19-21 December, 1996.
- Sudarmonowati, E. and A.S. Bachtiar. 1996.** *Agrobacterium*-mediated transformation in *Paraserianthes falcataria*: effect of strains and culture procedure. *Annales Bogorienses* 3(3): 69-76.