

(Lowe *et al.*, 1997). Selain sebagai bahan pangan, ubi jalar dimanfaatkan sebagai bahan baku industri, misalnya untuk pembuatan tepung, gula cair, makanan ternak, dan alko-hol (Hall dan Phatak, 1990). Kendala utama dalam peningkatan produksi ubi jalar adalah serangan hama boleng (*Cylas formicarius* F.) dan penyakit virus belang (*Sweet Potato Feathery Mottle Virus*, SPFMV). Serangan hama boleng dapat mengakibatkan kehilangan hasil 60-100% (Chalfont *et al.*, 1990). Serangan SPFMV dapat menurunkan hasil sampai 30% (Nakano, 1994), bahkan kadang-kadang tidak berproduksi sama sekali (Machmud *et al.*, 1998).

Program pemuliaan tanaman ubi jalar sudah banyak dilakukan baik untuk perbaikan mutu, peningkatan hasil maupun untuk memperoleh ketahanan terhadap hama atau penyakit. Namun demikian, sampai saat ini belum ditemukan varietas tahan untuk pengendalian hama boleng atau penyakit boleng, karena tidak adanya sumber gen ketahanan ubi jalar terhadap hama atau penyakit tersebut. Pemuliaan konvensional juga sulit dilakukan, karena proses seleksi memerlukan waktu lama, jumlah aksesori yang banyak, masalah inkompatibilitas, sterilitas, viabilitas biji yang rendah, dan hama bersifat heksaploid (Carelli *et al.*, 1992; Prakash dan Varadarajan, 1992). Teknik bioteknologi melalui rekayasa genetika merupakan pilihan yang dapat ditempuh untuk mendukung dan melengkapi program pemuliaan.

Rekayasa genetik diharapkan dapat memberikan perbaikan karakteristik penting pada tanaman. Sifat ketahanan terhadap beberapa cekaman biotik seperti gulma, serangga, dan patogen telah dapat diperbaiki dengan pendekatan ini. Perbaikan ketahanan tanaman terhadap cekaman abiotik dan modifikasi kualitas dan kuantitas produk tanaman juga dapat diperbaiki (Bennet, 1993). Suatu gen yang terdapat pada suatu spesies tanaman tertentu dapat diperoleh dari organisme lain seperti bakteri, virus, binatang, dan tanaman (Herman, 1996). Penelitian transformasi untuk memasukkan gen ketahanan terhadap hama boleng atau virus SPFMV merupakan wahana baru untuk merakit tanaman transgenik ubi jalar tahan hama boleng atau penyakit virus.

Penelitian transformasi untuk merakit tanaman ubi jalar tahan hama boleng dapat dilakukan dengan menggunakan sumber gen yang berasal dari tanaman kentang, yaitu gen *proteinase inhibitor* (*pinII*). Ketahanan terhadap penyakit virus dapat diperoleh dengan mengintroduksi gen coat protein (*CP-SPFMV*) yang berasal dari virus tersebut. Transformasi atau pemindahan gen asing fungsional untuk memperoleh tanaman ubi jalar transgenik dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode, seperti dengan vektor bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (Newell *et al.*, 1995; Otani *et al.*, 1998) atau dengan penembakan partikel (Prakash dan Varadarajan, 1992).

Keberhasilan transformasi ditandai dengan keberhasilan menyisipkan rangkaian gen yang diintroduksi ke dalam genom tanaman, dapat diekspresikan, dan tetap terpelihara dalam seluruh proses pembelahan sel berikutnya. Usaha untuk mengkonfirmasi integritas gen yang diintroduksi

dan menentukan jumlah kopinya di dalam genom tanaman, serta menentukan gen tersebut dapat berfungsi dengan benar atau tidak. Identifikasi dari jaringan tanaman yang tertransformasi dapat dilakukan dengan sejumlah teknik yang telah ada, di antaranya adalah menggunakan teknik PCR.

Pada tahun 2002 telah dilakukan transformasi gen *pinII* dan gen *CP-SPFMV* melalui teknik *A. tumefaciens* dan telah diperoleh beberapa transforman yang lolos dari media seleksi dan berhasil diaklimatisasi. Selanjutnya telah dilakukan identifikasi terjadinya integrasi gen *pinII* atau *CP-SPFMV* tersebut ke dalam tanaman ubi jalar putatif transgenik menggunakan teknik PCR. Dengan teknik ini, sekuen DNA dari gen *pinII* atau *CP-SPFMV* dapat diamplifikasi menggunakan primer spesifik yang mengapit gen tersebut, sehingga dapat dideteksi keberadaan gen sasaran dalam genom tanaman ubi jalar.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Kelompok Peneliti Biologi Molekuler dan Rekayasa Genetik, Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Bahan yang digunakan adalah tanaman ubi jalar putatif transgenik yang diduga mengandung gen *pinII* atau *CP-SPFMV*, sedangkan primer pelacak yang digunakan adalah primer spesifik untuk gen *pinII* atau *CP-SPFMV*.

Ekstraksi DNA Ubi Jalar

Ekstraksi DNA ubi jalar dilakukan menggunakan modifikasi metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani (2001). Sebelum ekstraksi, daun tanaman ubi jalar muda diinkubasi selama satu malam pada suhu 50°C dan digerus menggunakan *pestle* menjadi tepung. Hasil gerusan ditimbang sebanyak 25 mg dan dimasukkan ke dalam eppendorf. Setelah itu, ditambah 600 µl bufer ekstraksi CTAB dan dicampur dengan baik kemudian diinkubasi pada 65°C selama 30-60 menit, kemudian ditambahkan 1 volume chloroform/isoamilalkohol (24 : 1) dan dicampur perlahan-lahan selama 5 menit. Campuran disentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit. Fase akuosa dipindahkan ke eppendorf baru dan ditambah 1/10 volume larutan CTAB 10% dan dicampur dengan baik. Setelah itu, ditambah 1 volume chisam dan dicampur kemudian disentrifuse pada 12.000 rpm selama 5 menit dan fase akuosa dipindahkan ke eppendorf yang baru, kemudian ditambahkan 1-1,5 volume larutan CTAB 1% dan dicampur perlahan-lahan. Campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam dan disentrifus pada 8000 rpm selama 10 menit dan dibuang supernatannya. Pelet yang terbentuk dilarutkan dengan 400 µl larutan NaCl-TE 1M, kemudian ditambah 4 µl RNase A (1 mg/ml) dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit. Campuran ditambah dengan 800 µl ethanol 100% dingin, dicampur perlahan-lahan dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan pelet dicuci dengan 400 µl

ethanol 70%. Pelet kemudian dikeringkan dan di-larutkan kembali dengan 100 µl TE (pH 8,0). DNA yang diperoleh siap digunakan untuk analisis PCR.

Kemurnian dan kuantitas DNA yang diperoleh dihitung dengan menggunakan spektrofotometer. Kemurnian DNA dihitung dengan rumus = $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$,

sedangkan konsentrasi DNA dihitung dengan rumus $OD_{260} \times 50 \times$ faktor pengenceran.

Uji PCR dan Analisis Hasil PCR

DNA tanaman ubi jalar hasil transformasi dengan gen *pinII* atau *CP-SPFMV* melalui vektor *A. tumefaciens* yang telah diekstrak digunakan untuk analisis PCR. Reaksi PCR dilakukan dalam total bufer PCR yang terdiri atas 100 ng DNA dari tanaman putatif transgenik dan tanaman kontrol; 100 nM masing-masing primer; 200 mM dNTP, dan 1,5 unit enzim *Taq DNA polymerase* (Promega, Madison, Wisconsin, USA), menggunakan mesin PCR Programable Thermal Controller (MJ Research Inc., Massachusetts, USA). Program PCR terdiri dari denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari tahap de-naturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer pada 55°C selama 2 menit dan pemanjangan DNA pada 72°C selama 1 menit dan siklus diakhiri dengan pemanjangan akhir pada 72°C selama 5 menit. Primer untuk gen *pinII* adalah primer 1 dengan sekuen basan 5'-GGAAGTTAATTTTC GTTGCTTACC-3' dan primer 2 dengan sekuen basanya 5'-GCCTTGGGCTCA TCACTCTCTCTCCTTCAC-3'. Primer untuk gen *CP-SPFMV* adalah primer 1 dengan sekuen basanya 5'-CCTCAGTTATTGTGGGTGGTGGAG-3' dan primer 2 dengan sekuen basa 5'GGTGATGAGCAAGTGTGACATATCCA-3'. Hasil amplifikasi PCR dipisahkan dengan elektroforesis menggunakan 0,9% (w/v) agarose gel dan pewarnaan dengan ethidium bromida (Gama *et al.*, 1996).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan transformasi ditandai dengan keberhasilan menyisipkan rangkaian gen yang diintroduksi ke dalam genom tanaman, dapat diekspresikan dan tetap terpelihara pada generasi berikutnya. Tanaman putatif transgenik yang telah dihasilkan melalui seleksi pada media dengan antibiotik kanamisin belum diketahui mengandung gen *pinII* atau *CP-SPFMV*. Konfirmasi awal pada tanaman putatif transgenik akan sangat berguna, karena tanaman yang tidak mengandung gen yang diintroduksi dapat langsung diketahui, sehingga hanya tanaman yang mempunyai gen yang diinginkan yang digunakan untuk penelitian selanjutnya. Pada kegiatan transformasi ubi jalar tahun 2002 telah dihasilkan 26 tanaman putatif trans-

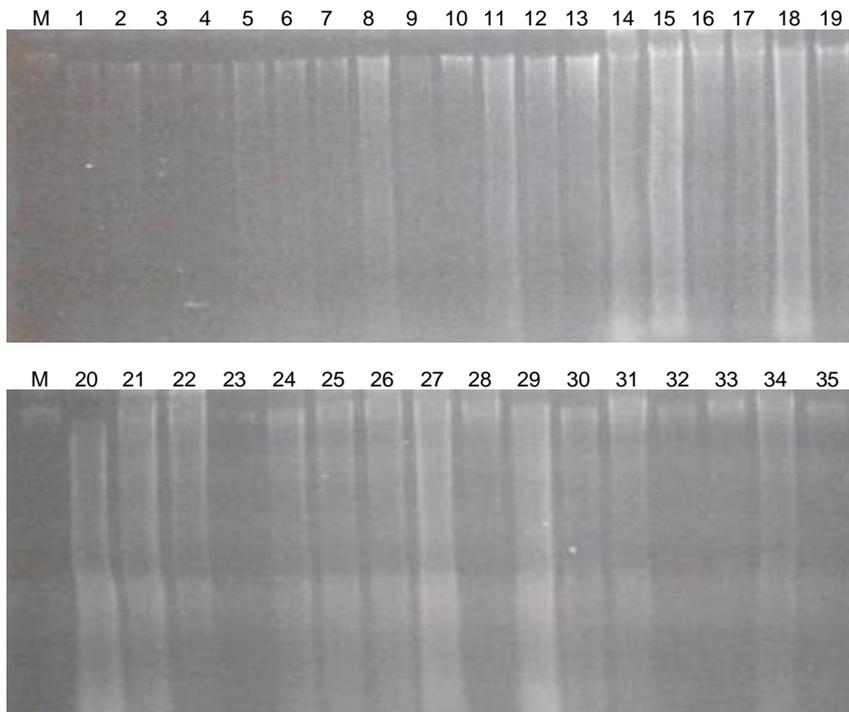
genik yang telah lolos seleksi dan diduga mengandung gen *pinII* dan 9 tanaman dengan gen *CP-SPFMV*.

Ekstraksi DNA Ubi jalar Hasil Transformasi

Pengujian integrasi gen *pinII* dengan teknik PCR sebaiknya menggunakan DNA yang murni untuk menjamin keakuratan pengujian. Ini dikarenakan tanaman ubi jalar memiliki kandungan polisakarida dan polifenol yang tinggi sehingga apabila tidak menggunakan DNA dengan kondisi yang murni maka dikhawatirkan akan mengganggu di dalam pengujian terutama dapat menghambat kerja dari enzim *Taq polymerase*. Apabila ini terjadi maka hasil yang optimal dari pengujian PCR mungkin tidak akan diperoleh. Pada kegiatan ekstraksi DNA ubi jalar ini, digunakan metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani (2001), yang merupakan metode ekstraksi DNA ubi jalar terbaik hasil optimasi tahun 2001. Pada metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani, sebelum diekstraksi, daun ubi jalar dikeringkan dalam oven 50°C selama semalam. Perlakuan tersebut dimaksudkan untuk mengurangi kadar getah (polifenol) di dalam jaringan daun ubi jalar, di samping itu, dimaksudkan untuk membuat jaringan ubi jalar menjadi kering sehingga memudahkan ketika dilakukan penggerusan untuk memperoleh hasil gerusan yang lembut. Metode ini, menggunakan penambahan dua kali larutan CTAB dengan konsentrasi yang berbeda. Penambahan CTAB konsentrasi tinggi (CTAB 10%) dimaksudkan untuk melarutkan atau mengeluarkan DNA dari inti sel, sedangkan penambahan CTAB konsentrasi rendah (CTAB 1%) dimaksudkan untuk presipitasi DNA secara selektif. Hasil ekstraksi DNA ubi jalar hasil transformasi dengan gen *pinII* dan gen *CP-SPFMV* dapat dilihat pada Gambar 1.

Secara umum, kualitas DNA yang dihasilkan masih kurang baik, terlihat adanya *smear* DNA dari sebagian sampel-sampel DNA yang diekstraksi. Hal ini berarti bahwa sebagian DNA yang diperoleh sudah terdenaturasi tidak utuh lagi pada saat proses ekstraksi berlangsung. Hasil uji kuantitas menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh mempunyai konsentrasi lebih dari 100 ng/μl. Hal ini dikonfirmasi dengan membandingkan ketebalan DNA sampel dengan DNA standar, yaitu λ DNA. Hasil lengkap pengukuran kualitas (kemurnian) dan kuantitas (konsentrasi) DNA ubi jalar putatif transgenik yang telah disajikan pada (Tabel 1).

Dari hasil spektrofotometer tersebut telah diperoleh DNA dengan kemurnian 1,4-2,26, sedangkan konsentrasi DNA bervariasi antara 0,009-2,5 μg/μl. Untuk keperluan analisis PCR, maka DNA sampel yang telah diperoleh tersebut disamakan konsentrasinya menjadi 100 μg/μl. Hal ini dimaksudkan untuk menjamin keakuratan hasil analisis PCR. Dengan demikian maka DNA yang diperoleh tersebut siap digunakan untuk analisis PCR, yaitu untuk



M = marker λ DNA, dan 1-35 = contoh DNA dari tanaman ubi jalar putatif transgenik

Gambar 1. Hasil ekstraksi DNA ubi jalar menggunakan metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani (2001)

mengetahui keberadaan gen *pinII* atau *CP-SPFMV* pada genom tanaman ubi jalar.

Identifikasi Gen *pinII* dengan Teknik PCR

PCR adalah prosedur yang sangat efektif untuk menggandakan atau memperbanyak urutan basa DNA spesifik secara *in vitro*. Dalam sistem transformasi teknik ini dapat digunakan untuk mengamplifikasi gen yang telah diintroduksi untuk mengetahui keberadaannya di dalam jaringan tanaman putatif transgenik. Pada analisis ini digunakan dua primer nukleotida spesifik untuk mengamplifikasi daerah spesifik dari gen *pinII*. Fragmen DNA (gen *pinII*) yang dihasilkan dari amplifikasi PCR tersebut mempunyai ukuran 600 bp. Pada pengujian PCR ini telah di-amplifikasi sebanyak 26 DNA sampel tanaman ubi jalar putatif transgenik. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa tidak ada DNA sampel tanaman ubi jalar putatif transgenik yang mempunyai pita DNA hasil amplifikasi gen *pinII*. Hal ini dikonfirmasi dengan DNA kontrol positif (gen *pinII*) yang mempunyai produk amplifikasi sebesar 600 bp (Gambar 2).

Identifikasi Gen *CP-SPFMV* dengan Teknik PCR

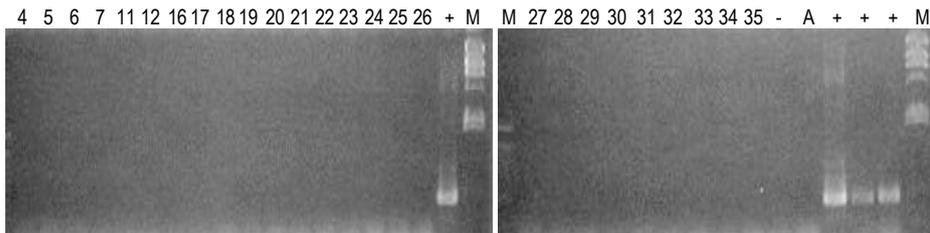
Identifikasi keberadaan gen *CP-SPFMV* pada tanaman ubi jalar putatif trans-genik yang telah lolos seleksi dan diduga mengandung gen *CP-SPFMV* telah dilakukan dengan analisis PCR. Hasil optimasi kondisi PCR untuk identifikasi gen tersebut menunjukkan kondisi optimum sebagai berikut: denaturasi awal 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari tahap denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan primer pada 56°C selama 1 menit dan pemanjangan DNA pada 72°C selama 5 menit.

Pada pengujian ini telah diamplifikasi 9 sampel DNA ubi jalar putatif trans-genik. Sampel DNA yang positif mengandung gen *CP-SPFMV* mempunyai produk amplifikasi sebesar 500 bp. Hasil PCR tidak menunjukkan adanya pita DNA yang terimplikasi, kecuali pada kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada tanaman ubi jalar putatif transgenik yang mengandung gen *CP-SPFMV* (Gambar 3).

Tabel 1. Hasil isolasi serta uji kualitas dan kuantitas DNA ubi jalar putatif transgenik dengan spektrofotometer

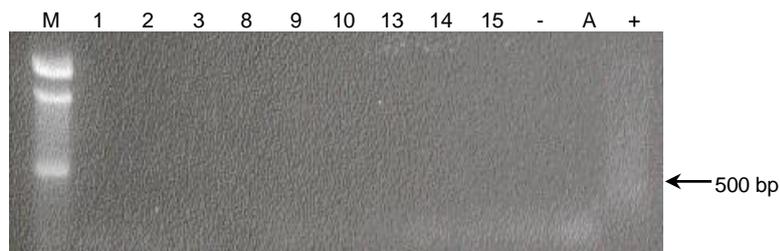
No. tanaman	Gen yang diintroduksi	Kemurnian DNA	$\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$	Konsentrasi DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
1	<i>CP-SPFMV</i>	1,80		0,45
2	<i>CP-SPFMV</i>	2,05		0,54
3	<i>CP-SPFMV</i>	2,13		0,15
4	<i>pinII</i>	2,00		0,15
5	<i>pinII</i>	1,80		0,34
6	<i>pinII</i>	1,82		0,39
7	<i>pinII</i>	1,40		0,31
8	<i>CP-SPFMV</i>	2,02		1,31
9	<i>CP-SPFMV</i>	2,26		0,65
10	<i>CP-SPFMV</i>	2,17		0,14
11	<i>pinII</i>	2,00		2,50
12	<i>pinII</i>	1,85		0,45
13	<i>CP-SPFMV</i>	2,02		2,38
14	<i>CP-SPFMV</i>	1,97		1,03
15	<i>CP-SPFMV</i>	1,76		0,95
16	<i>pinII</i>	1,80		0,70
17	<i>pinII</i>	1,72		0,38
18	<i>pinII</i>	1,82		0,87
19	<i>pinII</i>	1,80		0,72
20	<i>pinII</i>	2,06		1,08
21	<i>pinII</i>	1,75		0,64
22	<i>pinII</i>	1,54		1,22
23	<i>pinII</i>	2,00		0,06
24	<i>pinII</i>	2,50		0,31
25	<i>pinII</i>	2,40		0,34
26	<i>pinII</i>	1,95		0,51
27	<i>pinII</i>	1,96		0,64
28	<i>pinII</i>	2,10		0,49
29	<i>pinII</i>	2,00		1,05
30	<i>pinII</i>	1,56		0,20
31	<i>pinII</i>	1,80		0,37

32	<i>pinII</i>	2,00	0,09
33	<i>pinII</i>	1,77	0,29
34	<i>pinII</i>	1,76	0,41
35	<i>pinII</i>	2,25	0,09



M = DNA λ *HindIII*, 4-35 = tanaman ubi jalar putatif transgenik; - = ubi jalar nontransforman; A = ddH₂O, dan + = kontrol positif (600 bp)

Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik gen *pinII*



M = DNA λ *HindIII*, 1-15 = tanaman ubi jalar putatif transgenik; - = ubi jalar nontransforman; A = ddH₂O, dan + = kontrol positif

Gambar 3. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik gen *CP-SPFMV*

KESIMPULAN

1. DNA ubi jalar telah diperoleh menggunakan metode CTAB dengan kemurnian antara 1,4-2,26 dan konsentrasi antara 0,009-2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
2. Analisis PCR dari 35 tanaman ubi jalar putatif transgenik menunjukkan bahwa tidak ada tanaman yang positif mengandung gen *pinII* atau *CP-SPFMV*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bennet, J. 1993.** Genes for crops improvement. *Genetic Engineering* 16:93-116.
- Carelli, M.L.D., R.M. Skirvin, and D.E. Harry. 1992.** Transformation and regeneration studies of Jewel sweet potato. *In* W.A. Hill, C.K. Bonsi, and P.A. Loretan (Eds.). *Sweet Potato Technology for 21st Century*. Tuskegee Univ., USA. p. 52-60.
- Chalfontt, R.B., R.K. Janson, D.R. Seal, and J.M. Schalk. 1990.** Ecology and management of sweet potato insect. *Annu. Rev. Entomol* 35:157-180.
- Gama, M.I.C.S., R.P. Leite Jr, A.R. Cordeiro, and D.J. Cantliffe. 1996.** Transgenic sweet potato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 46:237-244.
- Hall, M.R. and S.C. Phatak. 1990.** Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). *Genetic Improvement of Vegetable Crops*. Publ. p. 693-706.
- Herman, M. 1996.** Rekayasa genetika untuk perbaikan tanaman. *Buletin Agrobio* 1(1):24-34
- Lowe, J.M., M. Herman, D. Maingi, J.H. Dodds, and M.A.W. Hinshee. 1997.** The development of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] embryogenic cultures from a wide range of African and American genotypes, and the use of *Agrobacterium tumefaciens* in the production of transgenic plants. 13 p. (unpublished).
- Machmud, M., Rusmadi, dan A. Yaku. 1998.** Deteksi virus dan fitoplasma serta pengendalian penyakit dalam kaitannya dengan pengetahuan petani setempat. *Risalah Lokakarya di Univ. Cendrawasih, Manokwari*, 13-17 April 1998. hlm. 29-37.
- Nakano, N., S. Fuentes, and L.F. Salazar. 1994.** Spot virus diseases detected in the tropics of South and Central America and South East Asia. *JIRCAS Paper* 1:58-65.
- Newell, C.A., J.M. Lowe, A. Merryweather, L.M. Rooke, and W.D.O. Hamilton. 1995.** Transformation of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. *Plant Science* 107:215-227.
- Otani, M., T. Shimada, T. Kimura, and A. Saito. 1998.** Transgenic plant production from embryogenic callus of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology* 15 (1):11-16.
- Prakash, C.S. and U. Varadarajan. 1992.** Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 11:53-57.

Tanaka, M. and M. Nakatani. 2001. Protocol for RAPD analysis of sweet potato. Apresiasi Introduksi Analisa DNA Ubi Jalar. Bogor, 6-7 Agustus 2001.