

Analisis Molekuler Gen *CP-PStV* pada Tanaman Kacang Tanah Transgenik

Ifa Manzila, Jumanto, Tri I.R. Utami, Wawan, dan Asoko Wardoyo

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Pengujian analisis molekuler gen *CP-PStV* pada tanaman kacang tanah trans-genik R1 telah selesai dilaksanakan di Laboratorium Virologi dan Biologi Molekuler, Kelti RPI Balitbio Bogor, pada tahun anggaran 2002. Kegiatan di-mulai dengan dua bagian, yaitu (1) isolasi DNA total 17 nomor tanaman dan 1 nomor kontrol (non-transgenik) dari daun tanaman yang berumur 1 minggu dan (2) konfirmasi gen *CP-PStV* dengan teknik PCR. Optimasi PCR dilakukan terhadap 5 nomor yang diperkirakan tahan PStV dari hasil bioasai dan 1 nomor ta-naman kontrol (non transgenik). Keberadaan gen *CP-PStV* dideteksi menggu-nakan sepasang primer spesifik dengan teknik PCR dan gel elektroforesis. Se-bagai pembanding menggunakan DNA tanaman non-transgenik. DNA plasmid yang mengandung *CP-PStV* berukuran ± 300 bp dan DNA plasmid wereng yang berukuran 500 bp. Hasil analisis terhadap foto gel elektroforesis menunjukkan 3 tanaman positif mengandung pita berukuran ± 300 bp, yaitu R2Dd1.4, R2Dd1.2, dan Cp4Dd2.

Kata kunci: Analisis molekuler, gen *CP-PStV*, kacang tanah transgenik R1

ABSTRACT

A research to analyze molecular existances of coat protein gen of PStV (*CP-PStV*) in second generation (R2) of transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plant based on polymerase chain reaction (PCR), was carried out in the screen house and laboratory virology of Agricultural Research and Development Biotechnology and Genetic Resources, Bogor in 2002. Two main step of the research were: 1) Isolation of total DNA of the seventeen genotypes to be analysed and one control (non transgenic) of young one week-old leaves; 2) *CP-PStV* gene confirmation with PCR technique. PCR optimization was carried out against 5 putative plants resistant to PStV which was obtained from bioassay result. Presence of *CP-PStV* gene was detected using pair of spesific primer PST1 and PST2 with PCR and electrophoresis gel. It was used DNA of non transgenic plants, Plasmid DNA containing *CP-PStV* gene of size ± 300 bp, and BPH plasmid DNA size of 500 bp as control. Results of the electrophoregraph analysis revealed presence of three putative transgenic plants positive contained *CP-PStV* gene with band at ± 300 bp. Those genotypes were R2Dd1.4, R2Dd 1.2, and Cp4Dd2.

Key words: Molecular Analysis, *CP-PStV* gene, R2 Transgenic Peanut Plant

PENDAHULUAN

Penyakit kacang tanah yang disebabkan oleh *Peanut Stripe Virus* (PStV) hampir selalu dapat ditemukan pada pertanaman kacang tanah di Indonesia. Hal ini disebabkan adanya vektor yang berperan menyebarkan PStV dari satu tanaman ke tanaman lainnya. Banyaknya tanamaan yang menjadi inang

alternatif dari PStV dan belum ditemukannya varietas kacang tanah yang tahan terhadap PStV menjadi kendala yang perlu diperhatikan (Demski *et al.*, 1984; Natural *et al.*, 1989; Saleh dan Baliadi, 1988; Wongkaew, 1989). Oleh sebab itu, dibuat kacang tanah transgenik yang mengandung gen *CP-PStV*. Untuk membuktikan keberhasilan pengujian terhadap ketahanan suatu tanaman transgenik, perlu diketahui apakah gen yang di-sisipkan pada tanaman target telah terintegrasi dalam kromosom tanaman tersebut (Birch dan Bower, 1994). Teknik molekuler yang biasa digunakan untuk mendeteksi gen asing pada tanaman hasil transformasi genetik adalah dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik ini dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan gen sisipan pada tanaman hasil transformasi.

BAHAN DAN METODE

Pengujian analisis molekuler tanaman kacang tanah transgenik tahan *PStV* meliputi dua tahapan, yaitu (a) isolasi DNA tanaman dan (b) deteksi gen *CP-PStV* dengan PCR.

Isolasi DNA Tanaman

Metode isolasi DNA tanaman transgenik dan non transgenik kacang tanah mengikuti prosedur dari Scott dan Bendich (1988) dan metode Tanaka dan Nakatani (2001) yang dimodifikasi. Urutannya adalah daun diambil dari tanaman transgenik (tanaman uji) dan tanaman non transgenik (kontrol) masing-masing sebanyak 0,025 g. Selanjutnya daun tersebut dimasukkan ke dalam eppendorf 1,5 ml dan ditambahkan dengan nitrogen cair kemudian digerus. Ke dalam eppendorf selanjutnya dimasukkan 600 µl bufer CTAB sambil digoyang selama 5 menit. Eppendorf yang berisi ekstrak daun kemudian diinkubasi pada pemanas air pada suhu 65°C selama 30 menit. Setiap 10 menit eppendorf dibolak balik. Kemudian ke dalam eppendorf ditambahkan larutan kloroform/isoamilalkohol dan dibolak-balik selama 5 menit. Eppendorf disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Larutan bagian atas dipindahkan ke eppendorf yang lain yang baru. Pada eppendorf ditambahkan 60 µl larutan 10% CTAB dan digoyang perlahan. Selanjutnya eppendorf diinkubasi selama 1 jam pada ruangan dengan suhu kamar. Eppendorf disentrifugasi kembali pada kecepatan 8000 rpm selama 10 menit. Larutan bagian atas (supernatan) dibuang. Pelet yang ada pada eppendorf diencerkan dengan 400 µl larutan 1 M NaCl-TE. Kemudian ke dalam eppendorf ditambahkan 4 µl 1mg/ml RNase dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Kemudian ke dalam eppendorf ditambahkan 800 µl larutan ETOH dingin dan dibolak-balik perlahan. Selanjutnya eppendorf disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang dan selanjutnya pelet dicuci dengan 400 µl larutan 70% ETOH. Eppendorf disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang ada di eppendorf dikeringkan untuk selanjutnya diencerkan dengan 100 µl larutan TE (pH 8,0). DNA siap dianalisis. Untuk analisis

kualitas dan kuantitas DNA digunakan 1 µl DNA dengan alat spektrofotometer UV A260 nm dan A280 nm serta teknik elektroforesis dengan gel agarose 0,8%.

Deteksi Gen *CP-PStV* dengan Teknik PCR

Sampel ekstrak DNA hasil isolasi dari tanaman kacang tanah transgenik dan non transgenik masing-masing sebanyak 1,5 µl dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang berisi 25 µl larutan pereaksi PCR. Larutan pereaksi PCR terdiri dari 2,5 µl 10x bufer PCR (Boehringer), 2,5 µl dNTPs, 1 µl primer spesifik, 0,25 µl Taq DNA polymerase, 16,25 µl dd H₂O. selanjutnya larutan ditutup dengan 1 tetes minyak mineral dan diletakkan pada mesin PCR. Reaksi amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan alat *thermal cycle* (mesin PCR) yang diprogram sebagai berikut: siklus PCR yang digunakan adalah pemanasan pada suhu 94°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus pada suhu 94°C (denaturasi) selama 45 detik, kemudian suhu 55°C selama 45 detik (*annealing*/pelekatan), dan 75°C selama 90 detik (tahap pemanjangan DNA). Ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit, dan kemudian pada tahap berikutnya suhu 15°C untuk waktu yang tidak terbatas. Fragmen DNA hasil amplifikasi divisualisasi dengan elektroforesis pada 1% gel agarose dalam bufer TBE (Dietzgen, 1997). Elektroforesis dilakukan dalam kondisi konstan dengan kecepatan 5 volt/1 cm selama 1 jam 20 menit. Gel hasil elektroforesis direndam dalam larutan ethidium bromida (1 µl/ml bufer) selama ±5 menit kemudian divisualisasi dengan UV transiluminator dan dilakukan pemotretan dengan kamera polaroid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian yang diukur pada pengamatan terhadap tanaman uji adalah (a) Kualitas total DNA dari tanaman kacang tanah transgenik dan non transgenik dan (b) Hasil PCR berupa pita DNA yang diperoleh dibandingkan dengan pita DNA dari kontrol positif (plasmid yang membawa gen *CP-PStV*).

Dari 17 nomor sampel yang diuji diperoleh kualitas DNA yang relatif sama baik (Tabel 1 dan Gambar 1). Hasil PCR masih belum optimal masih perlu ditingkatkan optimasinya. Hasil sementara hanya menunjukkan adanya pita DNA pada 3 nomor yang positif mengandung gen *CP-PStV*.

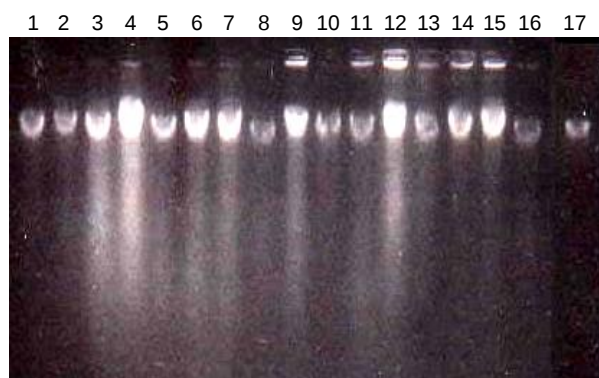
Hasil pengamatan pada Tabel 1 dan Gambar 1 kualitas dan kuantitas DNA hasil ekstraksi dari daun tanaman kacang tanah transgenik menunjukkan kemurnian yang cukup baik berkisar antara 1,471-2,058, konsentrasi DNA yang dihasilkan, yaitu antara 5,56-31,08 µg/µl.

Keberhasilan dalam produksi tanaman transgenik adalah dengan diperolehnya tanaman yang mengekspresikan sifat sesuai dengan gen yang disipkan, dalam hal ini gen *CP-PStV*, sehingga muncul fenotipe baru yang diinginkan (Koziel *et al.*, 1996). Data hasil PCR (Gambar 2) menunjukkan bahwa gen yang diintroduksi menunjukkan hasil yang positif, yaitu pada

R2Dd1.4, R2Dd1.2, dan Cp4Dd2 sebagai konfirmasi, untuk mengetahui bahwa ketiga gen tersebut terekspresi dengan baik, telah dilakukan bioasai. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa 3 nomor tanam-an kacang tanah tersebut, yaitu R2Dd1.4, R2Dd1.2, dan Cp4Dd2 positif mengandung gen *CP-PSV* ± 300 bp. Pada penelitian ini baru 5 nomor yang diuji PCR dari 17 nomor, karena reaksi PCR masih perlu dioptimasi. Setelah optimasi, apabila 5 nomor tersebut menunjukkan hasil yang positif, maka akan dilanjutkan untuk nomor-nomor berikutnya.

Tabel 1. Kualitas total DNA dari tanaman kacang tanah transgenik dan non transgenik

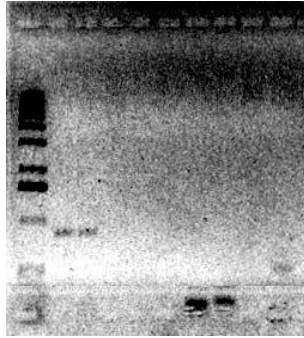
Kode sampel	λ 260	λ 280	p λ 260/280	Konsentrasi DNA $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
R2Dd1.1	1,534	0,785	1,954	30,68
R2Dd1.2	0,466	0,263	1,771	8,92
R2Dd1.(1)	0,516	0,256	2,015	10,32
R2Dd1.(3)	1,154	0,618	1,867	23,08
R2Dd1.(4)	1,154	0,588	1,962	23,08
R2Dd1.2 (1)	0,603	0,296	2,058	12,06
R2Dd1.2 (2)	0,392	0,193	2,031	7,84
R2Dd1.2 (3)	0,817	0,430	1,900	16,34
R2Dd1.2 (4)	0,407	0,203	2,000	8,14
R2Dd1.2 (5)	0,562	0,297	1,892	11,24
Eel 1	0,547	0,270	2,025	10,94
Eel 2	0,694	0,352	1,971	13,88
Eel 3	0,834	0,436	1,912	16,86
Eel 4	1,554	0,056	1,471	31,08
Eel 5	0,435	0,215	2,023	8,70
CP4Dd2 (2)	0,496	0,252	1,968	9,92
CP4Dd2 (3)	0,278	0,139	2,000	5,56
Kontrol	0,776	0,422	1,838	15,52



No 1 = R2Dd1.1, No. 2 = R2Dd1.2, No. 3 = R2Dd1.(1), No. 4 = R2Dd1.(3), No. 5 = R2Dd1.(4), No. 6 = R2Dd1.2 (1), No. 7 = R2Dd1.2 (2), No. 8 = R2Dd1.2 (3), No. 9 R2Dd1.2 (4), No. 10 = R2Dd1.2 (5), No. 11 = Eel 1, No. 12 = Eel 2, No. 13 = Eel 3, No. 14 = Eel 4, No. 15 = Eel 5, No. 16 = CP4Dd2 (2), dan No. 17 = CP4Dd2 (3).

Gambar 1. Pita DNA hasil ekstraksi dari 17 nomor tanaman kacang tanah transgenik

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9



M = marker, 1 = DNA No. 5, 2 = DNA No. 7, 3 = DNA No. 12, 4 = DNA No. 17, 5 = DNA No. 19 (No. 2 PStV sudah di PCR), 6 = DNA No. 20 PCP I, 7 = DNA No. 21 (No. 1 PStV sudah di PCR), 8 = DNA No. 18 kontrol, dan 9 = DNA No. 10 ditambah pUBC wereng.

Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR dari DNA tanaman kacang tanah putatif transgenik (R1) dengan primer spesifik gen *CP-PStV*

KESIMPULAN

Uji molekuler teknik PCR terhadap 17 DNA dari nomor tanaman transgenik sebagai konfirmasi keberadaan gen *CP-PStV* baru dilakukan pada 5 nomor (1 kontrol). Dari 5 nomor yang diuji, 3 nomor positif mengandung pita DNA berukuran ± 300 bp, (R2Dd1.4, R2Dd1.2, dan Cp4Dd2). Hal ini menunjukkan keberadaan gen *CP-PStV* dan hasil bioasainya juga menunjukkan ketahanan ketiga nomor tersebut terhadap PStV.

DAFTAR PUSTAKA

- Birch, R.G. and R. Bower. 1994.** Principles of Gene Transfer Using Particle Bombardment. *In* Particle Bombardment Technology for Gene Transfer. Sun Yang, N. and P. Christou. (Eds.). Oxford University Press. New York. pp. 3-37.
- Demski, J.W., D.R. Reddy, J.R.G. Sowell, and Bays. 1984.** Peanut stripe virus-a new seed born potyvirus from china infecting groundnut (*Arachis hypogaea*). Plant. Dis. 78:708-711.
- Dietzgen, R.G. 1997.** Detection of groundnut viruses by molecular hybridization with non radioactive DNA probe. Queensland Agricultural Biotechnology Centre. Australia. hlm. 1-6.
- Kozziel, M.D., N.B. Carrozi, and N. Dessai. 1996.** Optimizing expression of transgenes with emphasis on post-transcriptional events. Plant Mol. Biol. 32:393-340.

- Natural, M.P., F.L. Mangaban, and L.D. Valencia. 1089.** Groundnut virus research in the Phillipines. Summary Proceeding of the second coordinators meeting on *peanut stripe virus*. ICRISAT, India : 12 hlm.
- Saleh, N. dan Y. Baliadi. 1988.** Penyaringan ketahanan genotip kacang tanah terhadap *peanut stripe virus*. Risalah Hasil Penelitian Tanaman Pangan, tahun 1990. hlm. 115-117.
- Scott, O.R. and A.J. Bendich. 1988.** Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molekuler Biology Manual A6:1-10.
- Tanaka, M. and M. Nakatani. 2001.** Protocol for RAPD analysis of Sweet Potato. Apresiasi Introduksi Analisa DNA Ubijalar. Bogor, 6-7 Agustus 2001.
- Wongkaew, S. 1989.** Groundnut virus reaseach in Thailand. Summary proceeding of the second coordinators meeting on peanut stripe virus. ICRISAT. India. p. 18-19.