

Uji Stabilitas Integrasi Gen *CryIAc* dalam Transforman Jagung R3 dan R4

Toto Hadiarto, Sutrisno, dan Tri J. Santoso

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Tanaman yang sudah ditransformasi dengan teknik *Agrobacterium* maupun penembakan partikel dianalisis dengan cara PCR untuk mengetahui keberadaan gen yang sudah dimasukkan ke dalam tanaman tersebut. Ada 90 sampel tanaman yang diuji dengan teknik ini. Selain mudah, penggunaan teknik PCR ini juga cepat, sehingga bisa menguji jumlah sampel yang banyak. Dua pasang pri-mer digunakan untuk mengamplifikasi bagian dari gen *cry*. Primer *cryIAc* akan menghasilkan fragmen yang besarnya 490 bp sedangkan primer *cryIAb/Ac* akan mengamplifikasi fragmen sebesar 450 bp. Dari hasil uji PCR ini ternyata tidak ada fragmen dari sampel tersebut yang diampifikasi meskipun kondisi PCR sudah optimum. Ini menandakan tidak ada gen *cry* kemungkinan akibat dari ketidakstabilan gen di dalam sel tanaman jagung sehingga sampai saat ini tujuan untuk mendapatkan jagung transgenik tahan hama belum diperoleh.

Kata kunci: *Agrobacterium*, penembakan partikel, PCR

ABSTRACT

The genetically modification of maize to produce the plant resistant to stem borer has been carried out. *Cry* gene whose product has been known to be toxic to stem borer was introduced into the plants using the method of *Agrobacterium* or particle bombardment. To analyze whether or not the plants contain the introduced gene, molecular investigation was performed. 90 samples were examined for the presence of the *cry* gene by means of PCR. The use of PCR technique is to ease and fasten the analysis of large number of samples. Two pairs of specific primers were used to amplify parts of *cry* gene. Primers *cryIAc* will produce 490 bp fragment whereas primers *cryIAb/Ac* will amplify *cry* gene to produce fragment of 450 bp. It is found that none of the fragments have been amplified under the optimum PCR conditions. This indicates the absence of *cry* gene which might be due to its instability in the plant cells. As a result, the objective to produce maize line that is resistant to stem borer has not yet been achieved.

Key words: *Agrobacterium*, particle bombardment, PCR

PENDAHULUAN

Jagung merupakan tanaman penting di Indonesia. Selain berfungsi sebagai makanan pokok untuk sebagian masyarakat, jagung juga digunakan sebagai bahan dasar makanan lainnya. Seiring dengan pertumbuhan populasi yang sangat cepat, kebutuhan jagung juga meningkat, akan tetapi produksi jagung mengalami penurutan. Salah satu penyebab penurunan produksi tanaman pangan adalah kerusakan tanaman yang diakibatkan oleh serangan hama dan penyakit.

Beberapa cara dilakukan untuk meningkatkan produktivitas jagung, termasuk melalui bioteknologi. Salah satu tujuan bioteknologi tanaman adalah untuk memproduksi tanaman yang dimodifikasi secara genetik dengan tujuan mendapatkan tanaman yang lebih tahan terhadap hama dan penyakit (Watson *et al.*, 1992a).

Pada penelitian ini tanaman jagung telah ditransformasi dengan memasukkan gen ketahanan ke dalam sel tanaman, sehingga tanaman hasil rekayasa genetika ini diharapkan bisa tahan terhadap serangan hama dan pada akhirnya akan dapat meningkatkan produktivitas tanaman.

Perakitan jagung transgenik tahan terhadap hama penggerek batang dilakukan dengan memasukkan gen asing *cry* pada tanaman jagung dengan menggunakan teknik transformasi *Agrobacterium*.

Gen *cryIAC* terdapat pada bakteri gram positif *Bacillus thuringiensis*. Gen ini mengekspresikan protein kristal protoksin intraselular dari kelompok δ -endotoksin. Protein racun ini dapat membunuh hama Lepidoptera. Aktivitas dari protein ini dilakukan dengan pembentukan kompleks toksin (racun)-reseptor pada epitel usus bagian tengah dalam serangga yang pada akhirnya akan merusak sel usus serangga tersebut (Sutrisno *et al.*, 2000). Dengan demikian, penyisipan gen *cryIAC* pada kromosom jagung diharapkan dapat menurunkan serangan hama penggerek batang dan meningkatkan produktivitas tanaman.

Setelah proses transformasi dilakukan, tanaman yang sudah disisipi gen *cryIAC* diseleksi dengan menumbuhkan tanaman pada media seleksi. Tanaman yang dianggap sebagai transforman (mengandung gen sisipan) kemudian ditumbuhkan untuk memperoleh tanaman dewasa. Daun dari tanaman dewasa diambil untuk digunakan sebagai sumber DNA yang akan diuji lagi secara molekuler. Proses pengujian ini merupakan salah satu tahap penting dalam perakitan tanaman transgenik. Hal ini dilakukan untuk melihat keberadaan dan stabilitas gen yang telah disisipkan ke dalam kromosom sel tanaman jagung.

Teknik molekuler yang paling cepat dan efisien untuk pengujian gen asing pada tanaman transforman adalah Polymerase Chain Reaction (PCR). PCR digunakan untuk memperbanyak bagian tertentu DNA. Perbanyakkan fragmen DNA dilakukan secara selektif dan spesifik oleh sepasang oligonukleotida yang dikenal sebagai primer. Perbanyakkan juga dilakukan secara eksponensial, sehingga satu gen dapat diperbanyak menjadi 10^6 - 10^7 dalam waktu beberapa jam. Enzim penting yang digunakan dalam proses ini adalah *Taq* polimerase.

PCR diawali dengan pemisahan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Proses ini disebut denaturasi dan dilakukan pada suhu 94 atau 95°C. DNA untai tunggal digunakan sebagai tempat hibridisasi untuk primer melalui proses annealing pada suhu sekitar 42-65°C. Hibridisasi primer dengan DNA terjadi pada urutan DNA yang komplemen. Ukuran spesifiknya

primer terjadi di sini. Semakin panjang oligonukleotidanya, maka semakin spesifik terhadap urutan DNA tertentu. Primer biasanya terdiri dari 10-30 nukleotida. Setelah proses annealing DNA akan diperpanjang dengan menggunakan DNA untai tunggal sebagai cetakan dan *Taq* polimerase sebagai pencetak. *Elongation* ini dilakukan pada suhu 72-74°C. Tahap-an dari denaturasi sampai dengan elongasi merupakan satu siklus. Pada PCR terjadi pengulangan siklus dari 20-50 kali untuk memperbanyak jumlah fragmen DNA yang spesifik.

PCR merupakan teknik yang sensitif. Sampel yang terkontaminasi DNA dalam jumlah nano gram bisa terdeteksi sehingga proses ini harus dilakukan secara steril. Selain itu, komponen dari PCR mempengaruhi hasil amplifikasi. Komponen ini terdiri dari konsentrasi DNA, primer, DNA polimerase, MgCl₂, dNTP, dan temperatur. Misalnya, konsentrasi yang terlalu tinggi biasanya menyebabkan terjadinya perbanyakan fragmen DNA yang tidak spesifik. Jadi, pada penelitian ini langkah pertama yang dilakukan adalah mencari kondisi yang optimum untuk PCR (Watson *et al.*, 1992b).

Uji stabilitas integrasi gen *cryIac* dalam tanaman transforman jagung dijadikan sebagai topik dari ROPP untuk penelitian tahun anggaran 2001. Dari penelitian ini diharapkan diperoleh tanaman jagung yang mempunyai hasil PCR positif mengandung gen ketahanan tersebut.

BAHAN DAN METODE

DNA untuk analisis PCR diperoleh dari daun jagung hasil penanaman selama kurang lebih 1 bulan. Daun yang diambil untuk ekstraksi DNA adalah daun yang masih muda sebanyak dua sampai tiga helai.

Untuk ekstraksi DNA dibutuhkan bahan-bahan kimia yang terdiri dari nitrogen cair, CTAB, Na-bisulfida, basa Trizma, EDTA, SDS, HCl, NaOH, NaCl, chloro-form, isoamil alkohol, dan ethanol absolut. Basa Trizma dan EDTA diperoleh dari perusahaan Sigma, CTAB, Na-bisulfida, HCl, NaOH, NaCl, chloroform, isoamil alkohol, dan ethanol diperoleh dari Merck sedangkan lainnya diperoleh dari Bio-rad.

RNase yang diperoleh dari perusahaan Promega digunakan untuk pemurnian DNA. Untuk teknik elektroforesis digunakan gel agarosa dari Gibco BRL, asam borat dari Merck, 1 Kb DNA ladder dari Sigma, etidium bromida dari Merck, dan photo polaroid untuk memvisualisasi hasil. Tabung-tabung yang digunakan selama isolasi DNA adalah tabung corning ukuran 50 ml dan tabung eppendorf ukuran 1,5 ml.

PCR dilakukan dengan menggunakan PCR core yang diperoleh dari Promega. PCR core mempunyai komponen *Taq* polimerase, PCR bufer yang mengandung atau tidak mengandung MgCl₂, MgCl₂, dan dNTPs. Urutan pasangan primer spesifik proses PCR diperoleh dengan memesan pada IDT dan PCR mix diletakkan pada well berukuran 0,5 ml.

Isolasi DNA

Isolasi DNA diawali dengan persiapan bufer ekstrak CTAB yang *fresh* dengan cara mencampurkan 10 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5, 14 ml 5 M NaCl, 10 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; 1 g CTAB, 65 ml ddH₂O dan 1,4; 6 g Na-bisulfida. Bufer ekstrak ini dipanaskan pada suhu 65°C di dalam *water bath*.

Penggerusan dilakukan dengan menambahkan nitrogen cair pada daun padi yang diletakkan pada mortar. Nitrogen cair berguna untuk mempermudah penggerusan dan proses ini akan membuka (merusak) dinding sel daun. Penggerusan dilakukan secara cepat dan terus menerus sampai daun menjadi serbuk yang halus. Serbuk dipindahkan ke dalam botol corning berukuran 50 ml dan kemudian dimasukkan ke dalam freezer selama kurang lebih 20 menit. Selanjutnya ke dalam tabung corning ditambahkan 27 ml bufer ekstrak yang sudah dipanaskan, kemudian tabung ini dimasukkan ke dalam *water bath* yang bersuhu 65°C selama kira-kira 60 menit. Untuk mendapatkan campuran yang homogen maka tabung corning dibolak-balik perlahan-lahan beberapa kali selama masa inkubasi.

Setelah inkubasi selesai, 13 ml chloroform isoamil alkohol ditambahkan ke dalam tabung corning. Untuk mencampurkan secara rata, tabung corning ditutup rapat dan diletakkan horisontal pada *shaker* selama kurang lebih 30 menit. Selanjutnya tabung ini disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 20 menit pada suhu ruang. Dari proses ini akan terbentuk 2 fase. Fase cair di bagian atas yang mengandung asam nukleat diambil dan dimasukkan ke dalam tabung corning yang baru. Pengambilan cairan ini dilakukan dengan menggunakan tip yang ujungnya digunting (sehingga permukaannya lebih luas untuk menghindari patahnya DNA yang berukuran besar).

18 ml isopropanol yang sudah didinginkan di dalam freezer kemudian dicampurkan ke dalam fase cair ini. Tabung kemudian dibolak-balik hingga mendapatkan gumpalan DNA. DNA hasil presipitasi ini dikail secara steril dan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf ukuran 1,5 ml. Setelah itu, DNA dicuci dengan menambahkan *wash* 1 sebanyak 1 ml. *Wash* 1 ini kemudian dibuang dan menyisakan gumpalan DNA dan untuk keduanya dicuci dengan 1 ml *wash* 2. Setelah itu *wash* 2 bisa dibuang.

Jika pada tahap penambahan isopropanol tidak didapatkan gumpalan DNA, maka setelah mencampurkan isopropanol, larutan kita masukkan ke dalam freezer selama 30-60 menit. Tabung corning disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Pelet hasil sentrifugasi dicuci dengan larutan *wash* 1 seperti telah dijelaskan pada paragraf sebelumnya.

DNA yang telah diperoleh dikeringkan dengan cara meletakkan tabung eppendorf secara terbalik di atas kertas tissue selama 30 menit. DNA yang telah kering dilarutkan ke dalam 200 µl larutan bufer TE.

DNA yang telah diisolasi masih mengandung RNA yang perlu dihilangkan. Untuk proses ini digunakan RNase dari perusahaan Promega.

RNase mendegradasi RNA yang berada dalam larutan dengan bantuan bufer dan direaksikan pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah itu, proses isolasi DNA dimulai lagi dengan penambahan isopropanol yang prosedurnya sama dengan yang telah dijelaskan sebelumnya. Untuk melarutkan DNA yang sudah kering, digunakan hanya 50 µl bufer TE (bukan 200 µl seperti sebelumnya).

Penggunaan Spektrofotometer

Untuk melihat kemurnian dan konsentrasi DNA, digunakan spektrofotometer pada OD 260 nm untuk membaca keberadaan asam nukleat dan pada OD 280 nm untuk membaca keberadaan protein. Kemurnian larutan DNA dapat dihitung dengan menghitung hasil OD 260 nm dibagi OD 280 nm. Hasil perbandingan antara 1,8-2,0 menunjukkan kemurnian yang tinggi. Sampel DNA dilarutkan dalam double-distilled H₂O dengan perbandingan 1 : 500 dan volume akhir 2,5 ml. Dari sini dapat dihitung konsentrasi DNA

$$\text{konsentrasi } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{OD 260 nm} \times 500 (\text{dilution factor}) \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{l}}{1000}$$

dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

Elektroforesis Gel Agarosa

Keberadaan DNA hasil isolasi juga dicek pada gel agarosa elektroforesis. Gel dibuat dengan konsentrasi 1% dan tiap larutan DNA sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam 'sumur' yang berbeda. Elektroforesis dilakukan pada voltase sekitar 90 V selama kurang lebih 60 menit. Untuk melihat hasil elektroforesis, gel agarosa direndam dalam etidium bromida selama kira-kira 10 menit dan hasilnya bisa dilihat pada alat *UV lighter*.

PCR

Setelah mengetahui konsentrasi DNA, maka larutan diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi akhir sebesar 10 ng/µl untuk proses PCR. Proses PCR dilakukan dengan membuat campuran DNA dengan berat 50 ng, 1 x PCR bufer yang mengandung 25 Mm MgCl₂, dNTPs dengan konsentrasi akhir 0,2 Mm, primer spesifik dengan konsentrasi akhir (masing-masing) 400 µM, Taq polimerase 1,25 unit, dan air untuk memperoleh volume akhir 25 µl.

Kondisi PCR yang digunakan adalah denaturasi awal dilakukan pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi untuk siklus dilakukan pada suhu yang sama selama 45 detik, kemudian diikuti oleh annealing pada suhu 45°C selama 45 detik dan elongasi pada suhu 72°C selama 2 menit. Siklus ini diulang dan diikuti dengan elongasi akhir dengan suhu yang sama selama 5 menit.

Hasil PCR dilihat dengan menggunakan elektroforesis gel agarosa dengan metode seperti yang telah dijelaskan sebelumnya. Hasil PCR yang positif ditunjukkan oleh adanya pita DNA dengan ukuran tertentu sesuai dengan jenis primer spesifik yang digunakan. Primer *cryIAC* akan menghasilkan

fragmen yang besarnya 490 bp sedangkan primer *cryIAb/Ac* akan mengamplifikasi fragmen sebesar 450 bp.

DAFTAR PUSTAKA

- Sutrisno, T.J. Santoso, dan E. Widyasari. 2000.** Identifikasi gen *cry 3* Bt isolat Indonesia. Laporan Hasil Penelitian Balitbio Tanaman Pangan TA 2000. hlm. 13-14.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. 1992a.** Genetic engineering of plants in *Recombinant DNA*. Pub. Scientific American Books. p. 273-290.
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. 1992b.** The polymerase chain reaction in *Recombinant DNA*. Pub. Scientific American Books. p. 79-95.