Teknik Isolasi DNA dan Analisis PCR Gen *pin*II pada Genom Ubi Jalar

Atmitri Sisharmini, A. Dinar Ambarwati, Tri J. Santoso, Dwinita W. Utami, dan M. Herman

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Konfirmasi awal gen-gen target 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. Identifikasi terjadinya integrasi gen pada tanaman transgenik dapat dilakukan dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Untuk dapat mendeteksi ada tidaknya gen target yang tersisip dalam genom tanaman ubi jalar transgenik dengan teknik PCR, diperlukan DNA terekstrak dengan kualitas dan kuantitas yang baik. Pada tahun 2001 dilakukan penelitian analisis molekuler untuk mengkonfirmasi terjadinya integrasi gen *pin*II ke dalam genom ubi jalar. DNA diisolasi dari daun tanaman putatif transgenik ubi jalar menggunakan 2 metode ekstraksi, yaitu metode CTAB dari Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash yang dimodifikasi dan metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani. Modifikasi dilakukan untuk mengurangi kadar polifenol dan polisakarida. Dari kedua metode ekstraksi DNA tersebut, metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani mempunyai kualitas DNA yang lebih baik dibandingkan dengan metode CTAB yang dimodifikasi dari Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash. Pada analisis PCR, telah diamplifikasi sebanyak 13 tanaman ubi jalar putatif transgenik dan dari 13 tanaman tersebut, belum ada yang positif mengandung gen *pin*II.

Kata kunci: Ubi jalar, isolasi DNA, gen *pin*II, analisis PCR

ABSTRACT

The early confirmation of a target gene in the transformed plants could be very useful because plants that do not contains the target gene can be identified and be discarded early, so that only plants have an interest gene can be used for next observation. One of the techniques to determine the presence and integration of transferred target gene is PCR technique. The technique allows the *in vitro* synthesis and amplification of spesific fragment of target DNA using oligonucleotide primers so that the target gene can be detected in the genome of transgenic sweet potato. However this technique needed good quality of the DNA extracted. In the year of 2001, the experiment was conducted to identified the presence of *pin*II gene in the genome of putative transgenic sweet potato. The DNA was isolated from the leaves of putative transgenic plant using two DNA extraction methods i.e. modified CTAB method from Porebski *et al.* and Varadarajan and Prakash and modified CTAB method from Tanaka and Nakatani. The result showed that modified CTAB method from Tanaka and Nakatani gave the higher purity of DNA compared to the modified CTAB method from Porebski *et al.* and Varadarajan and Prakash. Based on PCR results, the *pin*II gene was not detected on the thirteen putative transgenic sweet potatoes.

Key words: Sweet potato, *pin*II gene, PCR identification

PENDAHULUAN

Ubi jalar (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) merupakan salah satu tanaman pangan penting yang menempati urutan keenam dunia setelah gandum, padi, jagung, kentang, dan barley. Dibandingkan dengan ubi kayu, potensi pemanfaatan ubi jalar sebagai bahan baku industri seperti untuk pembuatan tepung, gula cair, makanan ternak, dan alkohol sampai saat ini masih kurang direalisasikan (Greenberg dan Glick, 1993).

Kendala utama di dalam peningkatan produksi ubi jalar adalah serangan serangga hama, baik di lapang atau selama penyimpanan. Di antara serangga hama yang paling dikenal mengganggu ubi jalar adalah hama boleng (*Cylas formicarrius* F.). Sampai sekarang hama tersebut belum bisa dikendalikan. Penggunaan insektisida yang berlebihan untuk mengendalikan hama tersebut akan mengganggu lingkungan. Strategi pengelolaan dan pengendalian yang murah dan aman adalah dengan menggunakan varietas tahan. Akan tetapi program pemuliaan secara konvensional yang mendasarkan pada hibridisasi seksual belum bisa dikembangkan karena langkanya sumber gen ketahanan ubi jalar terhadap hama boleng pada plasma nutfah. Selain itu, dengan metode konvensional ini masih sulit karena tanaman ubi jalar bersifat heksaploid yang berakibat pada sterilitas dan inkompatibilitas. Untuk mengatasi keterbatasan ini, pendekatan bioteknologi atau rekayasa genetika seperti transformasi genetik harus dikembangkan untuk membantu program pemuliaan ubi jalar.

Rekayasa genetik akan memberikan perbaikan karakter penting pada tanaman. Sifat ketahanan terhadap beberapa cekaman biotik seperti gulma, virus, serangga, dan mikroorganisme telah dapat diperbaiki dengan pendekatan ini. Demikian pula terhadap cekaman abiotik dan modifikasi kualitas dan kuantitas produk tanaman (Bennet, 1993). Teknologi transformasi juga akan memberikan wahana baru bagi pemulia tanaman ubi jalar untuk memperoleh gen atau kelompok gen baru yang lebih luas. Suatu gen yang terdapat pada suatu spesies tanaman tertentu dimungkinkan untuk dapat diperoleh dari organisme lain seperti bakteri, virus, binatang, dan tanaman lain (Herman, 1996). Penelitian transformasi untuk memasukkan gen ketahanan terhadap hama boleng merupakan wahana baru untuk merakit tanaman transgenik ubi jalar tahan hama boleng.

Keberhasilan transformasi, yaitu memindahkan gen asing fungsional di dalam upaya memperoleh tanaman ubi jalar transgenik dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode yang ada, misalnya melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* (Newell *et al.*, 1995; Otani *et al.*, 1998) atau dengan penembakan partikel.

Untuk menghasilkan tanaman transgenik ubi jalar melibatkan beberapa tahap dalam teknik biologi molekuler dan atau seluler, salah satunya adalah dalam tahap karakterisasi atau identifikasi gen yang telah diintroduksi ke dalam jaringan tanaman (Bennet, 1993). Keberhasilan teknik transformasi ditandai dengan keberhasilan menyisipkan rangkaian gen yang diintroduksi ke dalam genom tanaman, dapat diekspresikan dan tetap terpelihara dalam seluruh proses pembelahan sel

berikutnya. Untuk itu, diperlukan upaya untuk mengkonfirmasi integritas gen yang diintroduksi dan menentukan jumlah kopinya di dalam genom tanaman, serta menentukan apakah 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 penggunaan teknik PCR.

Pada penelitian tahun 2000, telah dilakukan transformasi gen proteinase inhibitor (*pin*II) sebagai gen pengendali hama boleng melalui teknik *A. tumefaciens* dan telah diperoleh beberapa transforman yang lolos dari media seleksi dan berhasil diaklimatisasi. Selanjutnya dilakukan identifikasi terjadinya integrasi gen *pin*II tersebut ke dalam tanaman ubi jalar putatif transgenik menggunakan teknik PCR. Dengan teknik ini, sekuen DNA dari gen *pin*II 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, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor.

Bahan yang digunakan adalah tanaman hasil transformasi dengan gen *pin*II, sedangkan primer pelacak yang digunakan adalah primer spesifik untuk gen *pin*II.

Ekstraksi DNA Menggunakan Modifikasi Metode CTAB dari Porebski *et al.* (1997) dan Varadarajan dan Prakash (1991)

DNA diekstrak dari tanaman ubi jalar yang masih di test tube (*in vitro*) dan tanaman yang telah diperbanyak di rumah kaca. Daun tanaman yang akan diekstrak DNA-nya dipanen, disimpan di tempat gelap, selama 12-48 jam, kemudian dicuci untuk membersihkan kotoran (untuk daun tanaman yang diambil dari rumah kaca), kemudian dikeringkan. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggerus kurang lebih 0,5-2 g daun yang telah disimpan dalam ruang gelap tersebut dengan nitrogen cair, hingga berupa serbuk halus. Kemudian serbuk daun tersebut dipindahkan ke dalam tabung korning dan ditambahkan dengan bufer ekstraksi [100 mM Tris HCl (pH 7,4); 50 mM EDTA 9 (pH 8); 500 mM NaCl; 0,3% β-mercaptoethanol; 2% CTAB; dan 50 mg PVP/0,5 g daun]. Campuran tersebut kemudian digoyang perlahan dan disimpan pada *waterbath* 65°C, selama 25-60 menit. Setelah didinginkan pada suhu ruang selama 4-6 menit, ekstraksi kemudian dilanjutkan dengan menambahkan 6 ml chloroform dan octanol dengan perbandingan 24 : 1. Setelah supernatan akhir dipisahkan, campuran kemudian ditambah 1/2 volume 5 M NaCl sampai merata kemudian ditambahkan 2 volume 95% ETOH dingin, dicampur merata lagi dan disimpan pada suhu -20°C selama 10 menit. Pelet DNA dipisahkan dengan sentrifugasi 3000 rpm selama 6 menit. Purifikasi DNA pelet yang diperoleh dilakukan dengan menambahkan 3 μl RNase dan 3 ml proteinase K (1 mg/ml) 37°C selama 60 menit, kemudian ditambahkan 150 μl phenol dan 150 μl chloroform. Setelah itu, divortex dan disentrifus untuk memisahkan lapisan atas (supernatan). Setelah itu,

ditambahkan 1/10 volume 2 M Na acetat dan 2 volume ETOH absolut dan dicampur merata. Kemudian dibiarkan dalam freezer (-80°C) selama semalam dan dipisahkan pelet DNA-nya dengan sentrifugasi. Pelet DNA kemudian dicuci dengan ETOH 70% (v/v), dikeringkan dan dilarutkan dalam TE.

Ekstraksi Menggunakan Modifikasi Metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani (2001)

Sebelum ekstraksi, daun 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 ependorf. Setelah itu, ditambahkan 600 µl bufer ekstraksi CTAB dan dicampur dengan baik kemudian diinkubasi pada suhu 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 ependorf baru dan ditambahkan 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 ependorf 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 dilarutkan kembali dengan 100 µl TE (pH 8,0). DNA yang diperoleh siap digunakan untuk analisis PCR.

Proses PCR dan Analisis Hasil PCR

DNA tanaman ubi jalar hasil transformasi dengan gen *pin*II melalui vektor *A. tumefaciens* yang telah diekstrak, kemudian digunakan untuk analisis PCR. Reaksi PCR dilakukan dalam total bufer PCR, yang terdiri atas 10 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 Incorporation, Massachussetts, USA). Program PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari tahap denaturasi 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 *pin*II adalah primer 1 dengan sekuen basanya 5'-GGAAGTTAATTTCGTTGCTTACC-3' dan primer 2 dengan sekuen basanya 5'-GCCTTGGGCTCATCACTCTCTCTCCTTCAC-3'. Hasil amplifikasi PCR ini kemudian dipisahkan dengan elektroforesis menggunakan agarose 0,9% 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 yang antibiotik kanamisin belum diketahui apakah juga mengandung gen *pin*II. Konfirmasi awal pada tanaman putatif transgenik akan sangat berguna, karena tanaman yang tidak mengandung gen yang diintroduksi dapat langsung diketahui dan dibuang, sehingga hanya tanaman yang mempunyai gen yang diinginkan yang digunakan untuk penelitian selanjutnya.

Ekstraksi DNA Ubi Jalar Hasil Transformasi

Pada kegiatan ekstraksi DNA ubi jalar ini, dibandingkan 2 metode ekstraksi DNA, yaitu metode CTAB (Porebski *et al.*, 1997 dan Varadarajan dan Prakash, 1991) yang dimodifikasi dengan metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani (2001).

Di dalam pengujian integrasi gen *pin*II dengan teknik PCR sebaiknya menggunakan DNA yang murni untuk menjamin keakuratan pengujian karena tanaman ubi jalar memiliki kandungan polisakarida dan polifenol yang tinggi sehingga apabila tidak menggunakan DNA dengan kondisi yang murni maka dikhawatirkan akan mengganggu pengujian terutama dapat menghambat kerja enzim *Taq polymerase*. Apabila ini terjadi maka hasil yang optimal dari pengujian PCR mungkin tidak akan diperoleh.

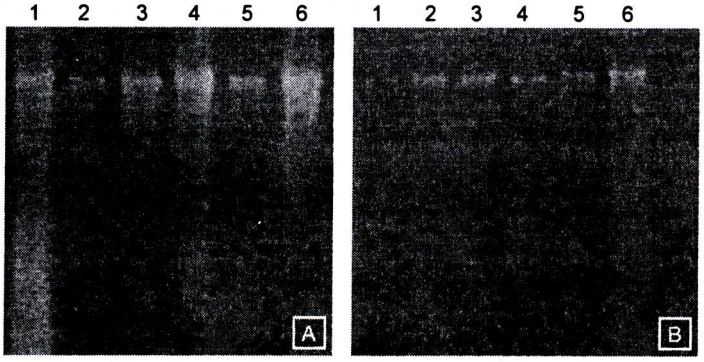
Perbedaan utama antara metode ekstraksi DNA yang digunakan dalam penelitian ini antara lain perlakuan awal sebelum daun ubi jalar diekstraksi. Pada metode CTAB yang dimodifikasi dari Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash, daun ubi jalar yang akan diekstraksi diinkubasi pada tempat gelap selama 12-48 jam sementara pada metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani sebelum diekstraksi daun ubi jalar dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama semalam. Kedua perlakuan dari metode tersebut dimaksudkan untuk mengurangi kadar getah (polifenol) di dalam jaringan daun ubi jalar, di samping itu pada metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani perlakuan tersebut dimaksudkan untuk membuat jaringan ubi jalar menjadi kering sehingga memudahkan ketika dilakukan penggerusan untuk memperoleh hasil gerusan yang lembut. Perbedaan lain dari kedua metode tersebut adalah metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani tidak menggunakan nitrogen cair sedangkan metode CTAB yang dimodifikasi dari Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash untuk menghancurkan sel-sel daun menggunakan nitrogen cair. Selain itu, pada metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani menggunakan penambahan 2 kali larutan CTAB dengan konsentrasi yang berbeda sementara pada metode CTAB yang dimodifikasi dari Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash hal tersebut tidak dilakukan. Penambahan CTAB konsentrasi tinggi (CTAB 10%) dimaksudkan untuk melarutkan atau mengeluarkan DNA dari inti sel sedangkan penambahan CTAB konsentrasi rendah (CTAB 1%) dimaksudkan untuk mempresipitasi DNA secara selektif.

Secara umum, dari kedua metode ekstraksi DNA yang dibandingkan, metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani menghasilkan kualitas DNA yang lebih baik dibandingkan dengan metode CTAB yang dimodifikasi dari Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash (Gambar 1). Dari gambar tersebut, terlihat bahwa metode CTAB yang dimodifikasi dari Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash (Gambar 1A) menunjukkan bahwa hasil DNA yang diperoleh masih terlihat adanya *smear* DNA dari sampel yang diekstraksi. Ini berarti bahwa sebagian DNA yang diperoleh sudah tidak utuh lagi, yang mungkin terpotong-potong saat proses ekstraksi berlangsung. Sementara *smear* DNA tidak terlihat pada DNA hasil ekstraksi menggunakan metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani (Gambar 1B).

Hasil pengujian kemurnian DNA ubi jalar dengan menggunakan spektrofotometer disajikan pada Tabel 1. Dari tabel tersebut terlihat bahwa kemurnian DNA sampel ubi jalar yang diekstraksi menggunakan metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani mempunyai kemurnian yang lebih baik dibandingkan dengan DNA hasil ekstraksi menggunakan metode Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash. DNA hasil ekstraksi dengan metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani mempunyai nilai kemurnian di antara 1,91-2,09. DNA dikatakan murni apabila mempunyai nilai kemurnian antara 1,80-2,00. DNA yang diperoleh menggunakan metode CTAB yang dimodifikasi dari Porebski *et al.* serta Varadarajan dan Prakash mempunyai nilai kemurnian antara 1,55-1,87.

Identifikasi Gen *pin*II dengan Analisis PCR

Analisis PCR merupakan metode deteksi secara cepat untuk mengetahui keberadaan gen yang kita introduksikan di dalam jaringan tanaman putatif transgenik. Pada analisis ini digunakan dua primer nukleotida spesifik untuk mengamplifikasi daerah spesifik dari gen *pin*II. Fragmen DNA yang dihasilkan dari amplifikasi PCR tersebut diharapkan mempunyai ukuran 600 bp. Pada pengujian PCR ini telah diamplifikasi sebanyak 13 sampel tanaman ubi jalar putatif transgenik. Pada peng-



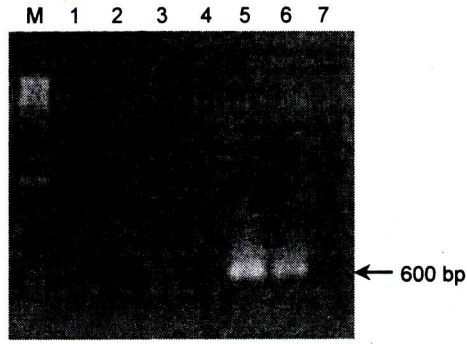
A = metode CTAB dari Porebski *et al.* (1997) dan Varadarajan dan Prakash (1991), B = metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani (2001), 1-6 = tanaman ubi jalar hasil transformasi

Gambar 1. Hasil ekstraksi DNA Ubi jalar

Tabel 1. Hasil pengujian kemurnian DNA ubi jalar dengan spektrofotometer

Sampel	OD 260		OD 280		Kemurnian (OD260/280)	
	A	B	A	B	A	B
1	0,90	0,04	0,55	0,02	1,84	2,05
2	0,59	0,05	0,38	0,03	1,55	2,00
3	0,89	0,03	0,50	0,01	1,78	2,08
4	0,14	0,05	0,62	0,02	1,78	2,09
5	0,56	0,12	0,34	006	1,65	1,91
6	1,48	0,11	0,79	0,06	1,87	1,95

A = metode CTAB dari Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash,
B = metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani



M = 1 Kb ladder, 1-3 = tanaman ubi jalar putatif transgenik, 4 = ubi jalar non transforman, 5-6 = kontrol positif, 7 = ddH_2O

Gambar 2. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik gen *pin*II

ujian I telah diamplifikasi sebanyak 10 tanaman dan hasil amplifikasi menunjukkan bahwa tidak ada sampel tanaman yang positif mengandung gen *pin*II. Pada pengujian II, telah diamplifikasi 3 tanaman dan dari 3 tanaman ini juga tidak ada yang menunjukkan positif mengandung gen *pin*II (Gambar 2). Dengan hasil ini (tidak diperolehnya transforman) maka proses transformasi harus dilanjutkan dengan memperbanyak eksplan untuk memperoleh transforman yang mengandung gen *pin*II.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Metode ekstraksi DNA dari Tanaka dan Nakatani menghasilkan DNA dengan tingkat kemurnian yang lebih baik dibandingkan dengan metode CTAB dari Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash.
2. DNA hasil ekstraksi metode CTAB dari Tanaka dan Nakatani lebih utuh (tidak *smear*) dan mempunyai nilai kemurnian berkisar antara 1,91-2,09, sementara dengan metode CTAB dari Porebski *et al.* dan Varadarajan dan Prakash terlihat *smear* dan mempunyai nilai kemurnian antara 1,55-1,87.

3. Dari 13 tanaman ubi jalar putatif transgenik, tidak ada yang positif mengandung gen *pin*II setelah diamplifikasi PCR menggunakan primer spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

Bennet, J. 1993. Genes for crops improvement. Genetic Engineering 16:93-116.

Gama, M.I.C.S., R.P. Leite Jr, A.R. Cordeiro, and D.J. Cantliffe. 1996. Transgenic sweet potato plants obtained by *Agrobacterium tumefasciens*-mediated transformation. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture 46:237-244.

Greenberg, B.M. and B.R. Glick. 1993. The use of recombinant DNA technology to produce genetically modified plants. *In* Gierson, D. (*Ed.*). Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. CRC Press. Inc. New York. N.Y. p. 1-10.

Herman, M. 1996. Rekayasa genetika untuk perbaikan tanaman. Buletin Agrobio 1(1):24-34.

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.

Porebski, S.L, L.G. Bailey, and B.R. Baum. 1997. Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. J. Plant Moleculer Biology Reporter 15(1).

Tanaka, M. and M. Nakatani. 2001. Protocol for RAPD analysis of sweet potato. apresiasi introduksi analisa DNA ubi jalar. Bogor, 6-7 Agustus 2001.

Varadarajan, U. and Prakash, C.S. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. Plant Mol. Biol. Rep. 9(1):6-12.