

Analisis Molekuler Gen *pinII* pada Tanaman Kedelai Transgenik R2

Toto Hadiarto, Tri Indraini R. Utami, Saptowo J. Pardal, dan M. Herman

Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian

ABSTRAK

Kegiatan ini bertujuan melakukan analisis molekuler gen *pinII* pada tanaman kedelai transgenik R1 dan R2. Sebanyak 127 tanaman kedelai transgenik menggunakan modifikasi metode CTAB, 57 sampel tanaman dari event WP2 (varietas Wilis-penembakan, R1), 18 sampel tanaman dari event WP1 (varietas Wilis-penembakan, R2), 9 sampel tanaman dari event TP1, dan 16 sampel tanaman dari event TP2 (varietas Tidar-penembakan, R2) serta 27 sampel tanaman dari event AT1 (varietas Tidar-*Agrobacterium*, R2) dan 2 tanaman non transgenik dari potongan daun muda dilakukan isolasi DNA. Keberadaan gen *pinII* pada tanaman yang diuji dideteksi menggunakan teknik PCR dan gel elektroforesis. Digunakan sepasang primer spesifik untuk mendeteksi keberadaan gen *pinII*. Sebagai pembanding digunakan sampel DNA tanaman kedelai non transgenik dan DNA plasmid yang mengandung *pinII* (*pTWa*) berukuran 600 bp. Hasil analisis terhadap foto gel elektroforesis menunjukkan adanya 11 tanaman positif mengandung pita berukuran 600 bp, yaitu dari event WP2 dan event AT1.

Kata kunci: Analisis molekuler, gen *pinII*, kedelai transgenik R2

ABSTRACT

Objectives of this research is molecular analysis of *pinII* gene in transgenic soybean R1 and R2. 127 plant samples of WP2 (Wilis variety with gene gun treatment, R1), 18 plant samples of WP1 (Wilis variety with gene gun treatment, R2), 9 plant samples of TP1 and 16 samples of TP2 (Tidar variety with gene gun treatment, R2) and 27 plant samples of AT1 (Tidar variety with *Agrobacterium* treatment, R2) and 2 non transgenic plants were isolated DNA. The presence of *pinII* gene in the plants is examined by means of PCR and gel electrophoresis. A pair of specific primers that can detect the *pinII* gene is used in the PCR. The controls for the PCR applies DNA of non-transformed soybean (as negative control), ddH₂O (as negative control) and plasmid *pTWa* that contains *pinII* gene (as positive control). The analysis results show that there are 11 plant DNA samples that produce DNA fragment of 600 bp. These samples are from WP2 and AT1.

Key words: Molecular analysis, *pinII* gene, transgenic soybean R2

PENDAHULUAN

Proses transfer suatu gen asing ke dalam genom suatu tanaman target di-mulai dengan pemasukan gen asing ke dalam sitoplasma sel tanaman target. Selanjutnya gen ini akan masuk ke dalam inti sel tanaman melalui pori-pori membran inti sel. Apabila gen asing tersebut berhasil masuk atau menyisip ke dalam kromosom tanaman target dan berintegrasi dengan baik

(berada pada bagian yang aktif ditranskripsi), maka gen itu akan dapat diekspresikan oleh tanaman trans-forman.

Tahap penting dalam mengetahui keberhasilan suatu proses transfer gen asing ke dalam genom suatu tanaman target adalah melalui analisis secara mole-kuler. Analisis molekuler dapat dilakukan pada tahap transisi (*transient*) di mana gen/DNA asing belum terintegrasi dalam kromosom tanaman target (Lonsdale *et al.*, 1990) ataupun pada tahap stabil (*stable transformant*) di mana gen/DNA asing telah terintegrasi dalam kromosom tanaman target (Mc Cabe *et al.*, 1988).

Teknik molekuler yang biasa digunakan untuk mengkonfirmasi keberadaan gen di antaranya dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) atau dengan Southern Blot. Teknik PCR dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan suatu gen sisipan pada tanaman hasil transformasi (McGarvey dan Kaper, 1991). Teknik ini merupakan prosedur cepat untuk menggandakan atau memperbanyak urutan basa DNA spesifik secara *in vitro* (Coen, 2000) sehingga dengan teknik ini me-mungkinkan analisis sampel dalam jumlah banyak dengan waktu relatif singkat untuk mengetahui keberadaan gen yang diintroduksi (Casas *et al.*, 1995). Selain itu, test PCR terhadap tanaman transgenik dapat dilakukan secara dini, yaitu pada tahap kalus atau planlet (Listanto *et al.*, 1996; Pardal *et al.*, 1996), dan merupakan metode yang sangat sensitif sehingga dengan hanya satu molekul DNA dapat mem-perbanyak DNA jutaan kali lipat setelah 30-an siklus PCR. Sedangkan analisis Southern Blot dapat digunakan untuk mengetahui pola integrasi dan jumlah salin-an (*copy number*) gen asing yang disisipkan (Hadi *et al.*, 1996) dan kejadian trans-formasi yang berbeda setelah pemotongan DNA sampel tanaman transgenik dengan enzim restriksi tertentu yang memotong pada situs tunggal dalam DNA plasmid (Casas *et al.*, 1995).

Kegiatan penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan gen *pinII* pada tanaman kedelai transgenik generasi R2 menggunakan teknik PCR.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Rekayasa Genetik, Kelompok Peneliti Biologi Molekuler, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan. Bahan yang digunakan adalah potongan daun dari tanaman kedelai transgenik varietas Wilis R1 (turunan dari tanaman R0, event WP2), varietas Wilis dan Tidar R2 (turunan dari tanaman R1, event WP₁, TP₁, TP₂, dan AT₁) dan non transgenik (kontrol).

Ekstraksi DNA (modifikasi metode CTAB)

DNA diekstrak dari daun tanaman kedelai transgenik R1 dan R2 yang telah ditanam di rumah kaca Fasilitas Uji Terbatas. Ekstraksi DNA dilakukan dengan cara menggerus kurang lebih 0,5-2 g daun yang telah disimpan dalam ruang gelap ber-suhu -20°C dengan nitrogen cair hingga menjadi serbuk halus.

Serbuk daun tersebut dipindahkan ke dalam tabung corning dan ditambah dengan bufer ekstraksi 1 M Tris HCl (pH 7,5); 0,5 M EDTA (pH 8); 5 M NaCl; 1% CTAB; 140 mM Na-bisulfite. Campuran tersebut kemudian digoyang perlahan dan disimpan pada inkubator 65°C, selama 15 menit. Setelah didinginkan pada suhu ruang selama 4-6 menit, ekstraksi kemudian dilanjutkan dengan menambahkan 6 ml chloroform : isoamil-alkohol (24 : 1). Campuran tersebut digoyang kembali selama 20 menit. Setelah supernatan akhir dipisahkan, campuran kemudian ditambahkan 2 vol. 95% EtOH dingin. Setelah dicampur merata, kemudian pelet DNA diambil dengan pipet pasteur dan dipindahkan ke dalam eppendorf 1,5 ml. Endapan DNA dicuci dengan alkohol 70% dingin (2 kali), kemudian dikeringkan dengan mesin evaporator VWR 1410. Endapan DNA kemudian dilarutkan dalam 1x TE bufer (10 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA pH 8). Purifikasi DNA pelet yang diperoleh, dilakukan dengan menambahkan 3 µl RNase dan 3 ml proteinase K (1 mg/ml) 37°C, 60 menit. Kemudian tambahkan 1/10 vol. 3 M NaOAc. Tambahkan 2 vol. EtOH absolut, dicampur merata. Pelet DNA dipindahkan ke eppendory baru, kemudian dicuci dengan EtOH 70% (v/v), selanjutnya dikeringkan dan dilarutkan dalam TE (1 kali) dan disimpan dalam suhu -20°C.

Proses PCR dan Analisis Hasil PCR

DNA tanaman sampel yang telah dimurnikan digunakan untuk analisis PCR. Volume yang digunakan dalam PCR untuk 1 kali reaksi adalah 25 µl dengan komposisi bahan 1 kali bufer PCR yang mengandung MgCl₂ 0,25 mM; 200 µM dNTP; 100 nM primer forward dan reverse *pinII*; 1,5 u/µl enzim *Taq DNA polymerase* (Promega, Madison, Wisconsin, USA); 5 ng DNA hasil isolasi dan ddH₂O bebas nuklease ditambahkan agar volume reaksi mencapai 25 µl. Primer yang digunakan untuk mendeteksi gen *pinII* mempunyai urutan basa forward 5'-GCCTTGGGCTCATCACTCTCTCCTTCAC-3' dan reverse 5'-GGAAGTTAATTTTCG TTGCTTACC-3'. Deteksi gen *pinII* melalui PCR ini menggunakan mesin PCR Programable Thermal Controller (MJ Research Incorporation, Massachussetts, USA) dalam 35 siklus yang terdiri 94°C selama 5 menit, 94°C selama 1 menit, 55°C selama 2 menit, dan 72°C selama 1 menit. Hasil amplifikasi PCR kemudian di-separasi dengan 0,8% (w/v) elektroforesis agarose gel dan pewarnaan dengan ethidium bromide (McGarvey dan Kaper, 1991; Listanto *et al.*, 1996). Hasil PCR positif ditunjukkan dengan munculnya pita DNA pada gel hasil elektroforesis pada posisi 600 bp.

HASIL DAN PEMBAHASAN

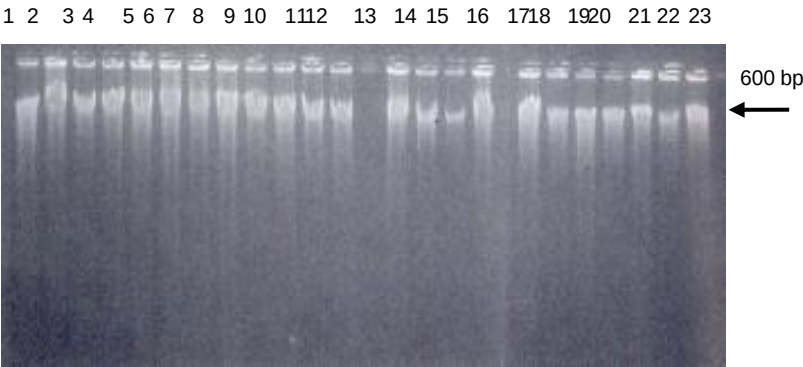
Isolasi DNA Total Genom Kedelai Transgenik R2

DNA total genom berhasil diisolasi dengan baik dari sampel daun tanaman kedelai transgenik R1, R2, dan non transgenik. Hal ini ditunjukkan dengan hasil kemurnian DNA yang telah memenuhi syarat, yaitu sekitar 1,5-2. Kemurnian DNA yang baik untuk uji molekuler berkisar antara 1,6-1,8.

Sampel DNA murni hasil ekstraksi tersebut selanjutnya diseparasi pada gel Agarose elektroforesis (0,8%), kemudian hasilnya difoto dengan film polaroid. Dari hasil foto gel terlihat bahwa DNA semua sampel dapat muncul/terdeteksi. Contoh hasil foto DNA dari beberapa sampel tanaman dapat dilihat pada Gambar 1 sedangkan hasil isolasi DNA seluruh sampel tanaman kedelai transgenik disajikan pada Tabel 1. Sampel DNA ini selanjutnya siap digunakan untuk deteksi gen *pinII* menggunakan teknik PCR.

Deteksi Gen *pinII* dengan Teknik PCR

Setelah proses transformasi dengan *biolistic gun* atau *Agrobacterium*, PCR dilakukan untuk melihat keberadaan gen *pinII* yang telah dimasukkan ke dalam tanaman. Plasmid *pTWa* yang mengandung gen *pinII* digunakan sebagai kontrol positif. Amplifikasi bagian dari gen *pinII* dengan primer yang spesifik akan menghasilkan pita DNA dengan ukuran 600 bp. Dua buah kontrol negatif juga digunakan dalam eksperimen ini. Kontrol negatif pertama menggunakan tanaman yang tidak ditransformasi sebagai template untuk PCR, sedangkan kontrol negatif yang kedua menggunakan ddH₂O sebagai



1-23 urutan sampel daun AT1-1 sampai AT1-23, tanda panah menunjukkan posisi pita DNA sampel

Gambar 1. Foto DNA total dari sampel daun kedelai transgenik R1 event AT1 (*Agrobacterium*) pada gel agarose 1%

Tabel 1. Hasil isolasi DNA total daun tanaman kedelai transgenik dan non transgenik

Event tanaman	Generasi tanaman	Metode transformasi	Jumlah sampel	Hasil DNA
WP2	R1	Penembakan	57	Bagus
WP1	R2	Penembakan	18	Bagus
TP1	R2	Penembakan	9	Bagus
TP2	R2	Penembakan	16	Bagus
AT1	R1	<i>Agrobacterium</i>	27	Bagus
Wilis	Kontrol	Non transformasi	1	Bagus
Tidar	Kontrol	Non transformasi	1	Bagus

Bagus = kemurnian DNA antara 1,5-2

template.

Hasil PCR dan photo gel agarose disajikan pada Tabel 2 dan Gambar 2, 3, dan 4. Pengujian keberadaan gen *pinII* ini menghasilkan 11 tanaman positif mengandung pita berukuran 600 bp dari 129 tanaman yang diuji.

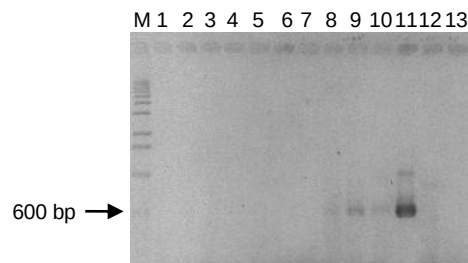
Penembakan varietas Wilis dan Tidar dilanjutkan dengan pengujian ekspresi gen penanda (GUS) pada tahap transisi dan penyeleksian tanaman transforman dengan menggunakan basta. Dari penyeleksian varietas Wilis dihasilkan dua tanaman WP1 dan WP2 (generasi R0). Dari tanaman ini diperoleh biji (18 WP1 dan 57 WP2) yang sebagian ditanam sebagai generasi pertama (R1). Tiga tanaman positif menghasilkan pita yang diduga sebagai gen *pinII* (Tabel 2 dan Gambar 2). Tiga tanaman tersebut adalah hasil dari penanaman biji yang diperoleh dari WP2 No. 44, 45, dan 46.

Penelitian generasi kedua (R2) dari WP1 tidak menghasilkan pita DNA dari proses PCR. Hasil yang sama ditunjukkan oleh TP1 dan TP2 generasi kedua (Tabel 2) dari total TP yang diuji sebanyak 25 tanaman. Gambar 3 menunjukkan tidak ada amplifikasi genom TP1 generasi kedua. Selain itu, foto gel ini juga menunjukkan tidak adanya *endogenous* gen *pinII* pada varietas Wilis dan Tidar.

Tabel 2. Hasil deteksi gen *pinII* tanaman kedelai transgenik R1 dengan teknik PCR

Event tanaman	Generasi tanaman	Metode transformasi	Jumlah sampel	Hasil PCR
WP2	R1	Penembakan	57	3 positif
WP1	R2	Penembakan	18	Negatif
TP1	R2	Penembakan	9	Negatif
TP2	R2	Penembakan	16	Negatif
AT1	R2	<i>Agrobacterium</i>	27	8 positif
Wilis	Kontrol	Non transformasi	1	Negatif
Tidar	Kontrol	Non transformasi	1	Negatif

Positif = ada pita DNA *pinII* (600 bp), negatif = tidak ada pita DNA *pinII*

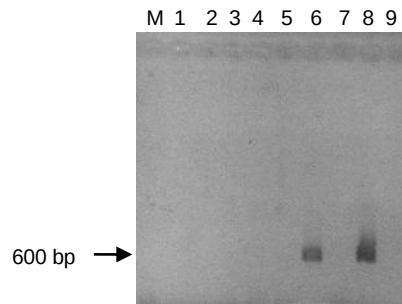


Lane M = 1 Kb DNA ladder, lane 1 = WP2-48, lane 2 = WP2-7, lane 3 = WP2-13, lane 4 = WP2-16, lane 5 = WP2-17, lane 6 = WP2-18, lane 7 = WP2-19, lane 8 = WP2-44, lane 9 = WP2-45, lane 10 = WP2-46, lane 11 = kontrol positif (pTWa), lane 12 = 'non-treated' varietas Wilis, lane 13 = kontrol negatif tanpa template DNA

Gambar 2. Hasil PCR dari DNA genom WP2 generasi R1

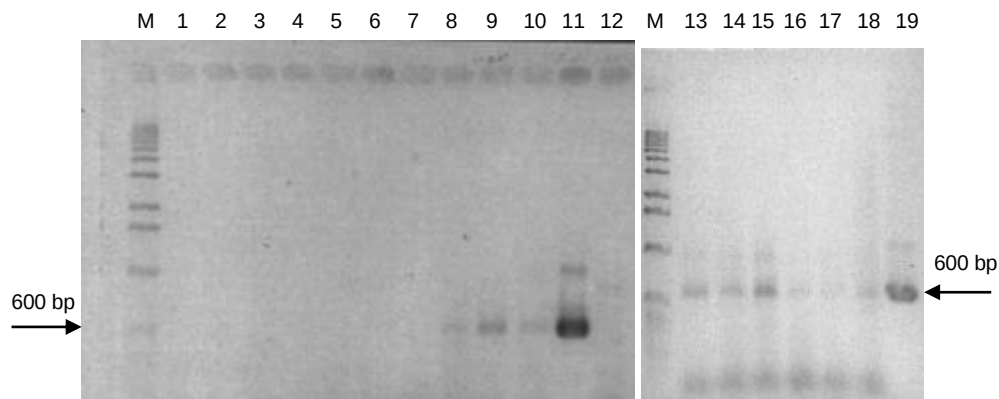
Hasil negatif yang ditunjukkan oleh varietas Tidar menunjukkan bahwa varietas ini kemungkinan besar sulit untuk ditransformasi dengan teknik penembakan. Sebaliknya varietas Wilis yang menghasilkan tiga tanaman positif PCR mengindikasikan kemungkinan mudahnya varietas ini untuk ditransformasi melalui penembakan.

Transformasi dengan *Agrobacterium* dilaksanakan untuk kedelai varietas Tidar dan Wilis. DNA genom dari generasi kedua varietas Tidar menunjukkan adanya amplifikasi pita berukuran 600 bp pada 8 tanaman (Gambar 4) dari total 27 varietas Tidar generasi kedua, yaitu AT1-1.15 (2), AT1-6.8, AT1-9, AT1-11.14, AT1-11.14 (2), AT1-7, AT1-21, dan AT1-11.8. Enam dari delapan tanaman positif berasal dari generasi pertama (R1) yang juga positif PCR. Hasil yang konsisten ini menunjukkan bahwa gen *pinII* pada varietas Tidar kemungkinan besar telah terintegrasi dengan stabil pada genom tanaman tersebut.



Lane M = 1 Kb DNA ladder, lane 1 = TP1-1 12, lane 2 = TP1-1 2, lane 3 = TP1-1 3, lane 4 = TP1-1 9, lane 5 = kontrol negatif tanpa template DNA, lane 6 dan 8 = kontrol positif (*pTWa*), lane 7 = 'non-treated' varietas Wilis, lane 9 = 'non-treated' varietas Tidar

Gambar 3. Hasil PCR dari DNA genom TP1



Lane M = 1 Kb DNA ladder, lane 1 = 'non-treated' varietas Wilis, lane 2 = 'non-treated' varietas Tidar, lane 3 = TP1-1 2, lane 4 = TP1-1 3, lane 5 = AT1-11.19(3), lane 6 = AT1-11.19(3), lane 7 = AT1-6.8(2), lane 8 = AT1-1.15(2), lane 9 = AT1-6.8, lane 10 = AT1-9, lane 13 = AT1-11.14, lane 14 = AT1-11.8, lane 15 = AT1-7, lane 16 = AT1-14(2), lane 17 = AT1-21, lane 18 = WP2 (R0), lane 11 dan 19 = kontrol positif (*pTWa*), lane 12 = kontrol negatif tanpa template DNA, lane 8-19 (kecuali lane 12) positif PCR

Gambar 4. Hasil PCR dari DNA genom TP1

Primer-primer PCR telah mengamplifikasi DNA yang diduga sebagai gen *pinII*. Hasil dari proses PCR ini adalah pita DNA berukuran 600 bp. Namun, hasil PCR yang positif ini tidak bisa memastikan keberadaan gen *pinII*. Harus dilakukan konfirmasi dengan teknik Southern Blot. Hasil dari Southern Blot ini juga harus di *sequence* untuk memastikan bahwa pita DNA yang diperoleh adalah benar gen *pinII*. Selain itu, bioasai akan dapat membantu memperkuat hasil dari teknik molekuler.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari uji molekuler teknik PCR terhadap 129 tanaman untuk melihat keberadaan gen *pinII* diperoleh hasil bahwa 11 tanaman positif mengandung pita DNA berukuran 600 bp delapan tanaman adalah hasil transformasi dengan *Agrobacterium* pada varietas Tidar dan sisanya adalah hasil transformasi dengan penembakan (*biolistic gun*) pada varietas Wilis. Hal ini menunjukkan bahwa varietas Tidar lebih mudah ditransformasi dengan teknik infeksi *Agrobacterium* dan varietas Wilis lebih mudah ditransformasi dengan penembakan.

Adanya konsistensi hasil dari varietas Tidar yang ditransformasi dengan teknik *Agrobacterium* mengindikasikan bahwa gen *pinII* telah terintegrasi dengan stabil pada DNA genom tanaman tersebut.

Saran

Pita DNA berukuran 600 bp ini belum pasti menunjukkan keberadaan gen *pinII* sehingga perlu adanya konfirmasi dengan teknik Southern Blot dan *sequencing*. Selain itu, hasil dari uji bioasai akan membantu konfirmasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Casas, A.M., A.K. Kononowiz, U.B. Zehr, D.T. Tomes, J.D. Axtell, L.G. Butier, R.A. Bressan, and P.M. Hasegawa. 1995. Cereal transformation through particle bombardment. In Janick J. (Eds.). Plant Breeding Reviews. John Willey and Sons, Inc.
- Coen. 2000. The polymerase chain reaction. In Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl (Eds.). Current Protocol in Molecular Biology. John Willey and Sons, Inc.
- Hadi, M.Z., M.D. McMullen, and J.J. Finer. 1996. Transformation of 12 different plasmids into soybean via particle bombardment. Plant Cell Report (15):500-505.
- Listanto, E., S.J. Pardal, and Kan Wang. 1996. A simple method of DNA isolation from transgenic maize plant for polymerase chain reaction. Indonesian Journal of Agricultural Biotechnology (1):33-38.
- Lonsdale, D., S. Onde, and A. Cumming. 1990. Transient expression of exogenous DNA in intact, viable wheat embryos following particle bombardment. J. Exp. Bot. (41):1161-1165.
- Mc Cabe, D.E., W.F. Swain, B.J. Martinell, and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max* L.) by particle acceleration. Bio/Technology (6):923-926.

- McGarvey, P. and J.M. Kaper. 1991.** A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *Biotechniques* 11(4):428-432.
- Pardal, S.J., E. Listanto, Pam Robeff, Kim Hagemann, Kan Wang, and Jan Tippett. 1996.** Maize transformation with cry genes for European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hub.) resistance. *Indonesian Journal of Agricultural Biotechnology* (1)1:1-11.