

## OPTIMASI KONDISI REAKSI PCR GEN *CpTI* (*Cowpea trypsin inhibitor*) PADA TANAMAN JARAK PAGAR

Poppy Rahmatika Primandiri, Maftuchah

Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Nusantara PGRI Kediri, Pusat Pengembangan  
Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang

E-mail : [primandiripoppy@gmail.com](mailto:primandiripoppy@gmail.com)

### ABSTRAK

Kebutuhan bahan bakar minyak yang semakin meningkat mengakibatkan perlu adanya upaya memanfaatkan sumber energi terbarukan. Alternatif yang ideal adalah memanfaatkan jarak pagar karena potensi minyak bijinya yang dapat dipakai sebagai biodiesel dan dapat mereduksi emisi gas CO<sub>2</sub>. Sebelum melakukan analisis lebih lanjut, perlu dilakukan optimasi kondisi reaksi PCR dengan primer gen *CpTI*. Optimasi prosedur PCR merupakan proses yang kompleks dan memakan banyak waktu karena meliputi pengaturan beberapa parameter yaitu MgCl<sub>2</sub>, DNA template, konsentrasi primer, dan suhu annealing selama amplifikasi. Optimasi ini berguna untuk menghindari produk amplifikasi yang tidak spesifik seperti munculnya smear dan tidak adanya kesesuaian dengan ukuran gen *CpTI* yaitu 415 bp. Hasil penelitian ini adalah menemukan suhu annealing yang cocok digunakan yaitu pada suhu 48 °C karena menghasilkan pita DNA yang sesuai dan tidak terlalu banyak smear.

**Kata kunci :** Jarak Pagar, Optimasi, PCR, gen *CpTI*

### PENDAHULUAN

Kebutuhan minyak nasional cenderung bertambah setiap tahunnya, sedangkan minyak bumi yang semakin langka mengakibatkan harga minyak dunia tidak menentu dan terus mengalami kenaikan. Kelangkaan minyak fosil menyebabkan perlu adanya upaya memanfaatkan sumber energi terbarukan. Pengembangan energi alternatif berasal dari tanaman yang berpotensi menghasilkan minyak. Jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) merupakan tanaman penghasil energi yang ramah lingkungan karena dapat mereduksi emisi gas CO<sub>2</sub> (menghambat dan memperlambat terjadinya efek rumah kaca) (Heller, 1996; Ferry dkk., 2006) dan dapat diperbarui (*renewable*) sehingga terjamin keberlanjutannya. Biji jarak pagar mengandung minyak sekitar 25-30% dan dari kernel mengandung minyak 50-60% (Mardjono dkk, 2006). Hal ini karena karakter minyak jarak tidak banyak berbeda dengan karakteristik minyak diesel, kecuali memiliki kadar sulfur yang lebih rendah serta nilai *cetane* yang lebih tinggi, sehingga aman terhadap lingkungan (Pranowo dkk, 2006).

Keuntungan lain mengembangkan jarak pagar yaitu, minyak jarak pagar termasuk *non edible oil* sehingga tidak bersaing dengan kebutuhan konsumsi manusia seperti pada minyak kelapa sawit, minyak jagung dan minyak nabati lainnya (Achten *et al.*, 2007). Perakaran jarak pagar dapat menahan air dan mengendalikan erosi (Sardjono, 2007). Relatif mudah dibudidayakan oleh petani, dapat ditanam secara monokultur, tumpang sari atau sebagai pagar karena daunnya tidak disukai ternak (Sudjindro, 2008). Jarak pagar dikenal sangat tahan kekeringan (Tushar *et al.*, 2010) dan mudah diperbanyak dengan *stek*. Selain itu, tanaman jarak pagar juga dapat digunakan sebagai bahan antimikroba dan molluscisida serta berpotensi sebagai bahan pestisida nabati (Soetopo, 2007).

Pemuliaan jarak pagar dilakukan secara konvensional maupun modern dengan memanfaatkan teknologi molekuler. Teknik dasar penelitian molekuler adalah PCR yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA secara *in vitro* dengan cepat dan singkat. Kebanyakan PCR akan mencapai amplifikasi yang cukup setelah 20 hingga 40 siklus (Grunenwald, 2003). Optimasi prosedur PCR merupakan proses yang kompleks dan memakan banyak waktu karena meliputi pengaturan beberapa parameter. Oleh karena itu perlu memastikan reaksi PCR yang dilakukan sudah optimal sehingga dapat menekan biaya dan waktu serta mendapatkan *amplicon* DNA dengan kualitas yang baik.

Penelitian ini menggunakan primer gen *CpTI*. Gen *CpTI* banyak digunakan dalam generasi tahan hama (Deng *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2003; Rong *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2006; Ismail *et al.*, 2010). *CpTI* banyak digunakan dalam merakit tanaman tahan serangga yang sudah diterapkan pada



padi (Xu *et al.*, 1996; Rong *et al.*, 2005), kelapa sawit (Ismail *et al.*, 2010), tembakau (Ussuf *et al.*, 2001; Habib *et al.*, 2007).

Sebelum melakukan analisis lebih lanjut, perlu adanya optimasi reaksi PCR untuk mendapatkan hasil yang optimal karena reaksi dalam proses amplifikasi perlu pengaturan beberapa parameter yaitu magnesium klorida, DNA *template*, konsentrasi primer, dan suhu *annealing* selama amplifikasi. Berdasarkan uraian tersebut, maka penelitian ini bertujuan menentukan optimasi reaksi PCR dengan menggunakan primer gen *CpTI* dan untuk mengetahui pengaruh macam-macam kondisi selama memperbanyak dan mendeteksi DNA agar memperoleh produk amplifikasi yang spesifik dalam ukuran pita DNA sehingga memudahkan dalam analisis selanjutnya.

## METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Molekuler Tanaman Pusat Pengembangan Bioteknologi, Universitas Muhammadiyah Malang. Alat yang digunakan adalah autoklaf, gunting, botol semprot, neraca analitik "AA-250 Denver Instrument Company", mortar dan pistil, rak tube, sentrifus "Hettich", pipet, tabung *ependorf* 1,5 ml, mikropipet "PhysioCare" (10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, dan 1000  $\mu$ l), tip ukuran 10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, dan 1000  $\mu$ l, *gel ice*, *power supply*, vorteks "Heildoph", inkubator "Binder", *spatula*, *beaker glass* "Duran", tabung Erlenmeyer, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, pH meter, box plastik, *freezer*, kompor gas, botol selai, *combs* dan *tray*, *microwave*, perangkat elektroforesis, rak tube, pinset, *shaker*, *cutter*, alat pemotret gel (*geldock*) "Major Science", tube PCR, mesin PCR "Biometra". Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel daun jarak pagar, sarung tangan karet "sens", aluminium foil, tissue, spidol, nitrogen cair, buffer ekstraksi (1 M glukosa, PVP, 2 M Tris-HCl (pH 8), 0,5 M EDTA (pH 8) dan H<sub>2</sub>O steril), Na-bisulfit, buffer lisis (5% CTAB, PVP, 2 M Tris-HCl (pH 8), 0,5 M EDTA (pH 8), 5 M NaCl, dan H<sub>2</sub>O steril), 3 M NaOAc, kloroform-isoamil (24:1), ethanol absolut, ethanol 70%, kantung plastik, dH<sub>2</sub>O, *Agarose*, *loading dye*, kertas parafilm, *ethidium bromide* (*EtBr*), dan marker 100 bp.

Sampel tanaman jarak pagar yang dipergunakan adalah dua aksesori tanaman jarak pagar koleksi Universitas Muhammadiyah Malang. Kedua nomor hasil persilangan ini diambil dari hasil persilangan aksesori jarak pagar unggul yang dikembangkan oleh Maftuchah dkk. (2008), yaitu nomor persilangan 5 (persilangan antara aksesori jarak pagar unggul SP-8 dan SP-16) dan 18 (persilangan antara aksesori jarak pagar unggul SM-35 dan SP-38). DNA genom jarak pagar diisolasi dari daun muda tanaman jarak pagar. Isolasi DNA dilakukan berdasarkan metode dari Doyle & Doyle (1990) yang dimodifikasi oleh Maftuchah & Zainudin (2007) dengan menggunakan buffer CTAB. Setelah DNA hasil isolasi dimurnikan kemudian dilakukan analisis melalui *running* gel agarose 0,8% dengan voltase 50 volt selama 45 menit.

Pada reaksi PCR, DNA jarak pagar hasil isolasi digunakan sebagai cetakan. Primer yang digunakan dalam reaksi PCR ini yaitu sepasang primer gen *CpTI* dengan urutan basa *CpTI*-F (5' GCA TGG ATG ATG GTG CTA AAG GTG TGT 3') dan *CpTI*-R (5' GCT AGC TTA CTC ATC ATC TTC ATC CCT 3'). Volume total reaksi PCR yang dipergunakan adalah sebanyak 25  $\mu$ l, terdiri dari campuran larutan yang terdiri dari DNA *taq* polimerase dan 10X buffer *Taq* Polimerase (100 mM Tris-Cl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% gelatin); dNTP'S mix (dGTP, dATP, dTTP dan dCTP) (Recho); dH<sub>2</sub>O; dan DNA cetakan.

Kondisi untuk reaksi PCR dirancang dengan suhu pradenaturasi 94°C (5 menit), denaturasi 94°C (1 menit), penempelan primer dengan beberapa variasi suhu (1 menit), perpanjangan 72°C (2 menit) dan pasca PCR 4°C (2 menit). Untuk perbanyak, siklus reaksi PCR diulang sebanyak 40 kali. Hasil amplifikasi PCR kemudian dirunning dalam proses elektroforesis pada 1,5% gel agarose dengan voltase 25 Volt selama 2,5 jam dan selanjutnya dilakukan pemotretan gel.

Analisis data dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif yaitu data genotip DNA jarak pagar dilakukan dengan menentukan posisi pita DNA yang dilakukan secara manual dan membandingkan posisi ukuran pita yang terbentuk dengan marker 100 bp.

## HASIL DAN PEMBAHASAN



PCR memerlukan satu pasang primer oligonukleotida pendek dan berupa untai ganda yang akan komplementer dengan ujung sekuen DNA template. Primer diperpanjang menggunakan *deoxynucleoside triphosphates* (dNTPs), dan dikatalis oleh DNA polimerase di bawah kondisi reaksi yang sesuai. Hasilnya adalah untai DNA baru yang komplementer terhadap untai cetakan. Untai ini berupa molekul DNA untai ganda. Setiap pengulangan sintesis untai meliputi satu siklus amplifikasi. Setiap DNA baru yang disintesis menjadi cetakan untuk siklus amplifikasi selanjutnya (Grunenwald, 2003).

Tahapan PCR yaitu denaturasi, *annealing*, dan pemanjangan primer membutuhkan pengaturan waktu dan suhu yang berlainan. Pada penelitian ini digunakan suhu denaturasi 94 °C selama 1 menit, suhu *annealing* 45 °C, 48 °C, dan 50 °C selama 1 menit dan suhu pemanjangan primer 72 °C selama 2 menit. Selain ketiga tahapan di atas diperlukan juga pradenaturasi yaitu 94 °C selama 5 menit dan pemanjangan primer 72 °C selama 5 menit pada siklus terakhir PCR. Hal ini sesuai dengan saran Grunenwald (2003) menggunakan tahapan *final extension* pada suhu 72 °C selama 5-10 menit untuk memastikan semua *amplicon* terekstensi dengan sempurna.

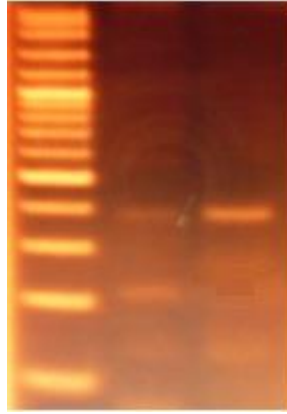
Adanya *smear* pada hasil amplifikasi menunjukkan bahwa ada hasil amplifikasi yang tidak spesifik pada proses PCR. Hal ini terjadi karena suhu *annealing* yang kurang optimal atau primer yang digunakan kurang spesifik. Primer yang digunakan pada penelitian ini memiliki panjang 27 basa. Menurut Grunenwald (2003) primer yang lebih pendek biasanya kurang spesifik tetapi lebih efisien, sedangkan primer yang lebih panjang dapat meningkatkan spesifisitas tetapi mengurangi efisiensi. Ukuran primer yang optimal biasanya antara 18 hingga 28 basa. Sehingga primer yang dipakai sudah sesuai untuk menghasilkan *amplicon* yang sesuai dengan ukuran.

Suhu *annealing* merupakan parameter yang penting untuk dioptimasi. Suhu *annealing* yang digunakan umumnya 5 °C lebih rendah dari *melting temperature* ( $T_m$ ). Nilai  $T_m$  dapat dihitung dengan mengalikan 2 °C untuk setiap nukleotida adenin dan timin serta 4 °C untuk setiap nukleotida guanin dan sitosin. Hasil penelitian ini yaitu pada suhu 48 °C menghasilkan pita DNA yang lebih jelas dengan ukuran yang spesifik daripada suhu *annealing* lainnya, menggunakan gel agarosa dengan pewarnaan *ethidium bromide*. Hasil penelitian optimasi suhu *annealing* 48 °C yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 1.

Berdasarkan Gambar 1, hasil PCR dengan menggunakan gen *CpTI* menunjukkan bahwa pada tanaman nomor persilangan 5 dan 18 yang terdapat pita DNA dan setelah dibandingkan dengan marker 100 bp, ukuran pita adalah 415 bp (*base pair*). Menurut Zhang *et al.* (2005) ukuran gen *CpTI* adalah 415 bp, sehingga produk hasil PCR tersebut sesuai dengan ukuran gen *CpTI*.

Parameter lainnya yaitu konsentrasi  $MgCl_2$ . Konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  berpengaruh terhadap hasil PCR yaitu jika kekurangan ion  $Mg^{2+}$  maka akan menghambat kerja enzim sehingga pita DNA yang dihasilkan tidak spesifik dan *smear*. Bahan kimia yang dapat menyebabkan konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  berkurang adalah EDTA karena EDTA dapat mengikat  $Mg^{2+}$ . Penyimpanan DNA sampel dalam TE (tris/EDTA), menyebabkan kemungkinan ada sisa EDTA dalam reaksi amplifikasi. Tetapi konsentrasi ion  $Mg^{2+}$  yang terlalu besar dapat menyebabkan meruahnya dNTP disekitar *Taq* Polimerase sehingga bias terjadi kesalahan dalam sintesis DNA baru yaitu membentuk produk yang tidak spesifik (Asy'ari & Noer, 2005). Penelitian ini menggunakan PCR mix, sehingga konsentrasi  $MgCl_2$  sudah diatur dan diasumsikan adanya *smear* bukan pengaruh dari konsentrasi  $MgCl_2$ .





Gambar 1 Pola Pita DNA Tanaman Jarak Pagar Nomor Persilangan 18 (lajur 1), 5 (lajur 2), Hasil PCR Menggunakan Primer Gen *CpTI*

### KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan pada penelitian ini adalah suhu *annealing* yang cocok digunakan yaitu pada suhu 48 °C karena menghasilkan pita DNA yang sesuai dan tidak terlalu banyak *smear*. Selain itu, parameter lainnya yang perlu diperhatikan yaitu konsentrasi  $MgCl_2$ , panjang dan konsentrasi primer, serta hasil isolasi DNA yang murni. Parameter-parameter tersebut sebaiknya diperhatikan sebelum dilakukan analisis lebih lanjut agar didapatkan produk amplifikasi yang spesifik dalam ukuran pita DNA sehingga memudahkan dalam analisis selanjutnya.

### DAFTAR PUSTAKA

- Achten, W.M.J. & Mathjis, E. (2007). *Jatropha Biodiesel Fueling Sustainability?*. *Biofuels, Bioprod. Bioref.*, 1: 283-291.
- Asy'ari, A., Noer, A.S. (2005). Optimasi Konsentrasi  $MgCl_2$  dan Suhu Annealing pada Proses Amplifikasi Multifragment mtDNA dengan Metode PCR. *JKSA*, 8(1): 24-28.
- Deng, C. Y., Song, G. S., Xu, J. W. & Zhu, Z. (2002). A Novel Three Primers PCR (TP-PCR) Method to Obtain Recombinant DNA Molecule Independent of Restriction Enzyme. *Chinese Science Bulletin*, 47 (24): 2067-2070.
- Deng, C. Y., Song, G. S., Xu, J. W. & Zhu, Z. (2003). Increasing Accumulation Level of Foreign Protein in Transgenic Plants Through Protein Targetting. *Acta Botanica Sinica*, 45 (9): 1084-1089.
- Ferry, Y., Pranowo, D., & Herman, M. (2006). *Pengaruh Setek Tanam Langsung Terhadap pertumbuhan dan Produksi Jarak Pagar (Jathopha curcas L.)*. Prosiding Lokakarya II Status Teknologi Tanaman Jarak Pagar, Bogor, 29 November.
- Grunenwald, H. 2003. Optimization of Polymerase Chain Reactions. Dalam Bartlett & Stirling (Eds.), *Method in Molecular Biology: PCR Protocols Second Edition* (hlm. 89-99). Humana Press.
- Habib, H & Fazili, K. M. 2007. Plant Protease Inhibitors: A Defense Strategy in Plants. *Biotechnology and Molecular Biology*, 2 (3): 68-85.
- Han, J. H., Yang, Y. X., Men, J. H., Bian, L. H. & Guo, J. 2006. Comparison of Ileal Digested Production of Parental Rice and Rice Genetically Modified with Cowpea Trypsin Inhibitor. *Biomedical and Environmental Sciences*, 19: 42-46.
- Heller, J. (1996). *Physic nut: Jatropha curcas L.* Gatersleben: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).
- Ismail, I., Lee, F. S., Abdullah, R., Fei, C. K., Zainal, Z., Sidik, N. M. & Zain, C. R. C. M. 2010. Molecular ang Expreassion Analysis of Cowpea Trypsin Inhibitor (CpTI) Gene in Transgenic *Elaeis guineensis* Jacq Leaves. *Australian Journal of Crop Science*, 4 (1): 37-48.
- Maftuchah, Heliyanto, B., Purwati, R.D. & Zainudin, A. 2008. *Perbaikan Sifat Ketahanan Terhadap Kekeringan pada Klon Unggul Harapan Jarak Pagar (Jatropha curcas L.)*. Laporan Hasil Kegiatan. Kerjasama Universitas Muhammadiyah Malang dengan Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian-RI. 142 Halaman.



- Mardjono, R., Sudarmo, H. & Sudarmadji. (2006). *Uji Daya Hasil Beberapa Genotipe Terpilih Jarak Pagar (Jathopha curcas L.)*. Prosiding Lokakarya II Status Teknologi Tanaman Jarak Pagar, Bogor, 29 November.
- Pranowo, D., Herman, M. & Ferry, Y. (2006). *Pengaruh Pengolahan Tanah dan Pemupukan Terhadap Pertumbuhan dan Produksi Awal Jarak Pagar*. Prosiding Lokakarya II Status Teknologi Tanaman Jarak Pagar, Bogor, 29 November.
- Rong, J., Song, Z., Su, J., Xia, H., Lu, B. R., & Wang, F. 2005. Low Frequency of Transgene Flow from Bt/CpTI Rice to Its Nontransgenic Counterparts Planted at Close Spacing. *New Phytologist*, 168: 559-566.
- Sardjono, M. (2007). *Upaya Pengembangan Jarak Pagar (Jathopha curcas L.) (Kondisi, Kebijakan, dan Pelaksanaan Pengembangan, Permasalahan yang Dihadapi dan Dukungan yang Diperlukan)*. Lokakarya Nasional III Inovasi Teknologi Jarak Pagar untuk Mendukung Program Desa Mandiri Energi, Malang, 5 November.
- Soetopo, D. (2007). *Potensi Jarak Pagar sebagai Bahan Pestisida Nabati*. Lokakarya Nasional III Inovasi Teknologi Jarak Pagar untuk Mendukung Program Desa Mandiri Energi, Malang, 5 November.
- Sudjindro. (2008). *Permasalahan Benih Jarak Pagar (Jathopha curcas L.)*. Prosiding Lokakarya Nasional IV Akselerasi Inovasi Teknologi Jarak Pagar Menuju Kemandirian Energi, Malang, 6 November.
- Tushar, B., Manoj, K. & Sushama, C. (2010). Evaluation and Genetic Polymorphism Studies of *Jatropha (Jatropha curcas L.)* for Water Stress Tolerance. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 6 (2): 11-16.
- Ussuf, K. K., Laxmi, N. H. & Mitra, R. 2001. Proteinase Inhibitor: Plant-derived Genes of Insecticidal Protein for Developing Insect-resistant Transgenic Plants. *Current Science*, 80 (7): 847-853.
- Xu, D., Xue, Q., Elroy, D., Mawal, T., Hilder, V. A. & Wu, R. 1996. Constitutive Expression of A Cowpea Trypsin Inhibitor Gene CpTI in Transgenic Rice Plants Confers Resistance to Two Major Rice Insect Pests. *Mol Breed*, 2: 167-173.
- Zhang, Q., Zhang, Z. Y., Lin, S. Z. & Lin, Y. Z. 2005. Resistance of Transgenic Hybrid Triploids in *Populus tomentosa* Carr. Against 3 Species of Lepidopterans Following Two Winter Dormancies Conferred by High Level Expression of Cowpea Trypsin Inhibitor Gene. *Silvae Genetica*. 54 (3): 108-116.

## **DISKUSI**

**Penanya 1 : Ira**

**Pertanyaan :**

Mengapa gen CPTI penting? Primer 27 Bp → mengkonstruksi ulang?

**Jawaban :**

CPTI merupakan program Deftan karena gen ini didapatkan dari tumbuhan. Primer gen tidak mengkonstruksi ulang tetapi mengambil dari literatur.

