

**BIOTEKNOLOGI TANAMAN
(BAHAN AJAR)**

**OLEH:
RINDANG DWIYANI**

**JURUSAN AGROEKOTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS UDAYANA
SEPTEMBER 2014**

BIOTEKNOLOGI PERTANIAN (AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY)

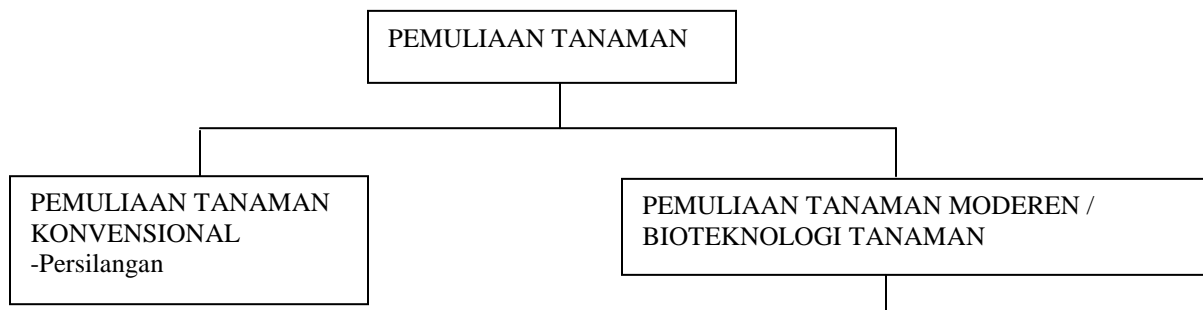
Menurut Schmid (2003), 'Agricultural biotechnology' memiliki arti yang luas, sehingga cakupan bahasannya meliputi 'animal breeding' (konvensional dan moderen) dan 'Plant breeding'. Aplikasi 'Plant breeding' (pemuliaan tanaman) dapat dilakukan secara konvensional, yang kita kenal dengan pemuliaan tanaman konvensional, dan dengan cara

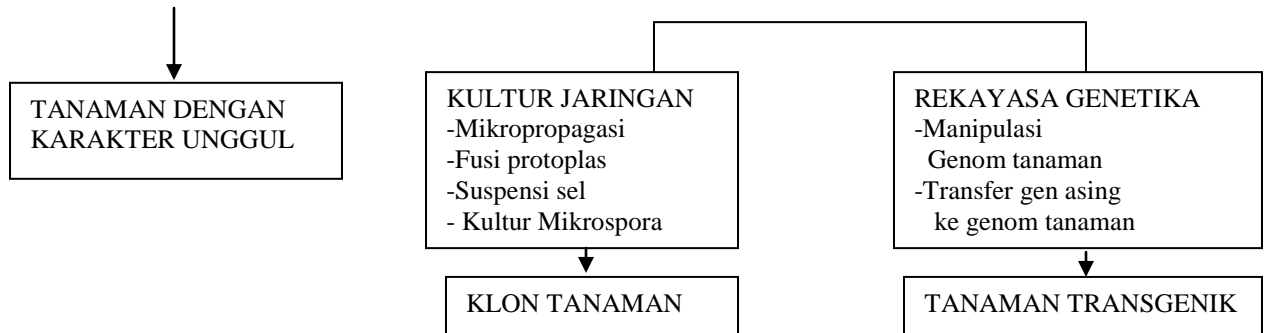
moderen atau dikenal dengan Bioteknologi tanaman. Bahasan berikut ini akan menjelaskan cakupan bahasan dalam ilmu bioteknologi tanaman.

BIOTEKNOLOGI TANAMAN

Gambar 1 memperlihatkan bahwa Bioteknologi tanaman masuk dalam ilmu Pemuliaan tanaman, namun dilakukan secara moderen. Bioteknologi tanaman meliputi Kultur Jaringan dan Rekayasa Genetika. Kultur jaringan erat kaitannya dengan rekayasa genetika, karena pengerjaan rekayasa genetika juga kebanyakan dilakukan secara *in vitro* di laboratorium. Selain itu, sistem regenerasi tanaman transgenik juga membutuhkan ilmu kultur jaringan, sehingga orang yang bekerja di bidang rekayasa genetika wajib mengetahui prinsip-prinsip kerja dalam kultur jaringan.

Kultur jaringan adalah metode perbanyakan secara vegetatif yang dilakukan secara *in vitro*, sehingga hasil akhirnya adalah klon tanaman atau yang biasa disebut somaklon (karena berasal dari sel-sel somatik). Metode perbanyakan ini dilakukan secara aseptik di laboratorium, membutuhkan bahan awal tanaman (biasa disebut eksplan) yang relatif berukuran kecil untuk menghasilkan somaklon dalam jumlah banyak dan dalam waktu yang relatif singkat. Somaklon ini memiliki karakter morfologi dan molekuler yang identik dengan induknya. Kadangkala modifikasi genetis bisa terjadi pada kultur jaringan melalui variasi somaklonal, akan tetapi hal ini bukan menjadi tujuan, meskipun variasi somaklonal ini bisa bersifat positif.





Gambar 1. Kerangka Ilmu Pemuliaan Tanaman

Pemuliaan tanaman konvensional dan rekayasa genetika sama-sama bertujuan mendapatkan individu tanaman dengan karakter unggul yang secara genetis sudah mengalami modifikasi. Akan tetapi terdapat perbedaan antara pemuliaan tanaman konvensional dengan rekayasa genetika dalam hal modifikasi yang terjadi pada genom tanaman. Pemuliaan tanaman secara konvensional menggunakan cara persilangan untuk mendapatkan individu tanaman unggul, sehingga membutuhkan waktu yang relatif lama. Sedangkan rekayasa genetika melakukan modifikasi genetis tersebut secara langsung dengan melakukan insersi gen asing (yang membawa sifat unggul yang kita inginkan) langsung ke genom tanaman. Perbedaan antara Pemuliaan tanaman secara konvensional dan Rekayasa genetika dirangkum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Perbedaan mendasar antara Pemuliaan Tanaman Konvensional dengan Rekayasa Genetika dalam melakukan modifikasi genetis

Pemuliaan Tanaman Konvensional	Rekayasa Genetika
-Lambat	-Sangat cepat
-Terjadi secara alamiah	-Dilakukan secara buatan dengan mengintroduksi gen baru pada tanaman sesuai dengan yang kita inginkan

-Modifikasi genetis terjadi secara acak	-Secara terarah
---	-----------------

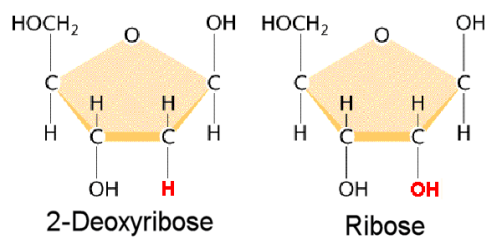
Bahasan selanjutnya adalah Rekayasa genetika sebagai bagian dari Bioteknologi tanaman atau Pemuliaan tanaman moderen. Kultur Jaringan tidak dibahas secara detail dalam perkuliahan ini karena merupakan mata kuliah tersendiri. Sebelum membahas mengenai Rekayasa genetika secara detail, terlebih dahulu akan dijabarkan pengetahuan dasar molekuler seperti struktur DNA, replikasi DNA, proses transkripsi dan translasi serta pengertian gen..

PENGETAHUAN DASAR MOLEKULER

Struktur DNA (Deoxyribonucleic Acid)

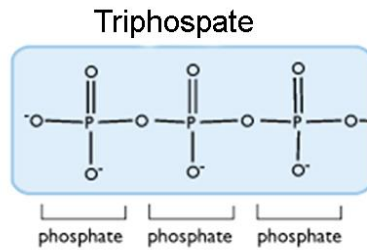
Selama pembelahan sel, informasi genetik dari sebuah sel ditransfer dari sel induk ke sel anakan. Informasi genetik ini secara kimia disebut Asam deoxiribonukleat (ADN) atau Deoxyribonucleic acid (DNA). Secara kimiawi DNA terdiri dari 3 komponen:

1. Gula 2-deoxyribose, yaitu gula ribosa (gula penyusun RNA) yang kehilangan atom oksigennya pada gugus karbon nomor 2 sehingga menjadi 2-deoxyribosa. (Gambar 2).



Gambar 2. Gula penyusun DNA (kiri) dan RNA (kanan)

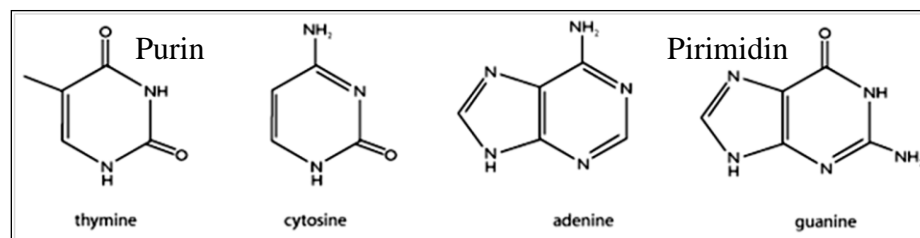
2. Gugus fosfat. Gugus fosfat terikat pada atom karbon (C) no 5 pada gugus gula dari mononukleotida (Gambar 3).



Gambar 3. Gugus fosfat pada DNA

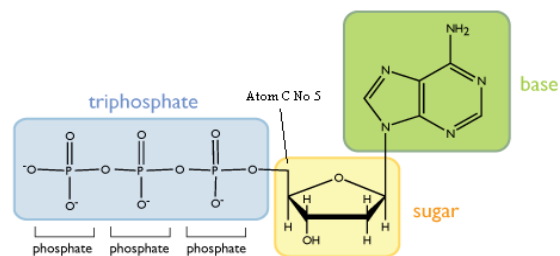
3. Basa nitrogen.

Basa nitrogen ada 2 macam, yaitu basa dengan 1 cincin yaitu purin (Thimin dan Cytosine) dan basa dengan 2 cincin yaitu pirimidin (Adenine dan Guanine). Gugus basa ini terikat pada atom C no 1 dari gugus gula (Gambar 4).



Gambar 4. Basa Purin dan Pirimidin

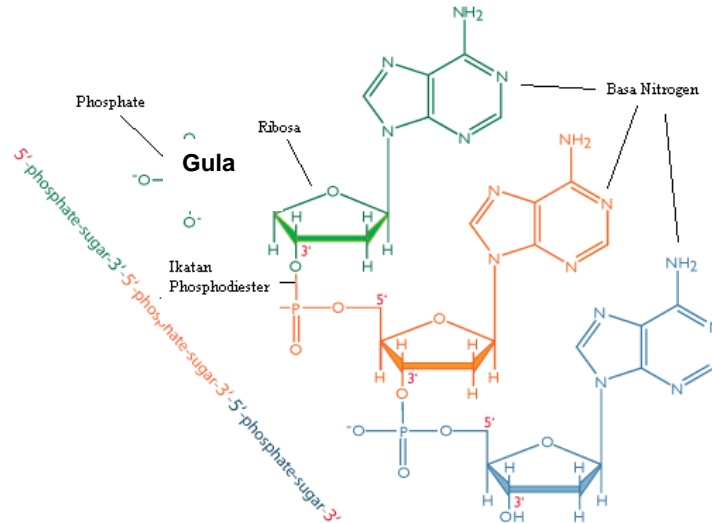
Ketiga komponen tersebut membentuk nukleotida (Gambar 5):



Gambar 5. Mononukleotida

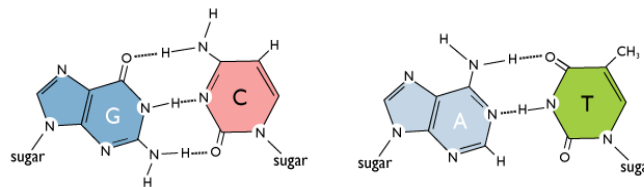
Selanjutnya gugus nukleotida ini berikatan dengan gugus nukleotida lainnya melalui ikatan fosfodiester membentuk rantai nukleotida, atau polynukleotida (poly=banyak). Pada rantai nukleotida, atom karbon ke 3 pada cincin suatu gula (3'OH) dan atom karbon kelima pada gula lainnya (5'P) akan berikatan melalui ikatan fosfodiester. Begitu seterusnya sehingga terbentuk suatu rantai nukleotida yang panjang.

Pada suatu rantai nukleotida tentunya akan ada 2 ujung dari nukleotida yang tidak berikatan atau lepas, disebut ujung 5' P (fosfat) atau biasa disebut ujung 5' saja dan ujung 3' OH (hidroksil) atau ujung 3' (Gambar 6).



Gambar 6. Rantai nukleotida

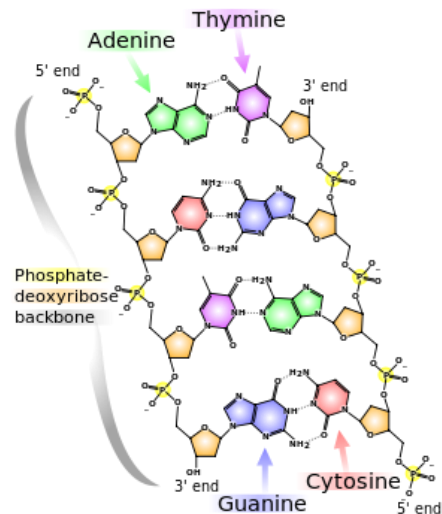
DNA berbentuk rantai ganda (double strand), artinya satu untai nukleotida akan berikatan dengan nukleotida lain yang berhadapan, dengan arah yang berlawanan (rantai dengan arah $5 \rightarrow 3$ akan berikatan dengan rantai arah $3 \rightarrow 5$). Ikatan tersebut terjadi melalui ikatan antar basa-basa yang disebut ikatan hidrogen. Guanine (G) selalu berikatan dengan Cytosine (C) yang membentuk ikatan hidrogen rangkap 3; Adenine (A) selalu berikatan dengan Timine (T) membentuk ikatan hidrogen rangkap 2 (Gambar 7).



Gambar 7. Ikatan hidrogen antar basa nitrogen

Jadi , orientasi rantai nukleotida pada satu untai berlawanan dengan orientasi nukleotida untai lainnya, yang disebut sebagai *antiparalel* (Gambar 8). Pada setiap

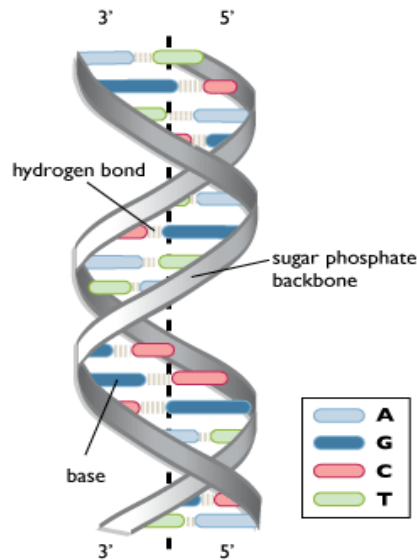
molekul DNA, jumlah adenin (A) selalu sama dengan jumlah timin (T). Demikian pula jumlah guanin (G) dengan sitosin (C) selalu sama. Fenomena ini dinamakan ketentuan **Chargaff**.



Gambar 8. Orientasi antipararel antara untai tunggal nukleotida

Gugus mononukleotida dalam suatu rantai polinukleotida memiliki gugus gula dan fosfat yang sama, hanya gugus basa yang berbeda, sehingga dalam penamaan dari urutan nukleotida, yang disebut hanya nama gugus basanya.

Pasangan rantai nukleotida ini membentuk struktur berpilin yang disebut double helix seperti terlihat pada gambar 9 (Hasil penelitian Rosalind Franklin, James Watson and Francis Crick pada tahun 1953). Gula-fosfat merupakan kerangka utama kedua untai DNA, yang keduanya dihubungkan dengan ikatan hydrogen antar basa.



Gambar 9. DNA *double helix*

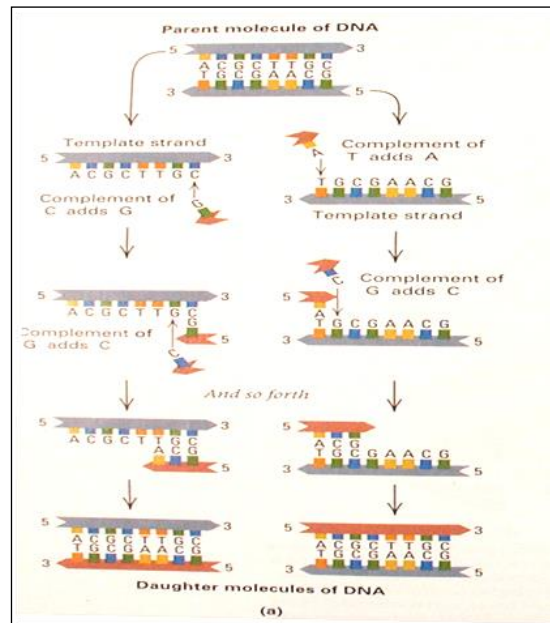
Ikatan antar basa G-C (rangkap 3) lebih kuat dibandingkan dengan A-T (rangkap 2), akan tetapi ikatan hidrogen ini bisa lepas dengan pemanasan (denaturasi) yang menyebabkan DNA double strand (rantai ganda) bisa terurai menjadi single strand (rantai tunggal). Ikatan fosfodiester adalah ikatan yang sangat kuat dan tidak bisa terpotong dengan pemanasan, namun bisa terpotong oleh aktivitas enzim restriksi.

Di dalam sel, DNA dari organisme eukaryot (tumbuhan, hewan) terdapat di dalam inti (DNA kromosomal) dan sebagian ada pada organel seperti kloroplas dan mitokondria (DNA ekstra kromosomal). DNA kromosomal (DNA yang berada pada kromosom dalam inti) pada organisme eukaryot merupakan DNA yang membawa informasi genetik. Sedangkan di dalam sel organisme prokaryot yaitu organisme yang tidak memiliki dinding inti (seperti bakteri), maka DNA kromosomal dan DNA ekstra kromosomal (plasmid) nya berada di dalam sitoplasma.

Replikasi DNA

Replikasi DNA adalah proses penggandaan DNA untai ganda. Ada 3 teori replikasi DNA, namun yang dianggap paling mendekati adalah teori semi konservatif. Teori semi konservatif dapat dijelaskan sebagai berikut: Replikasi terjadi diawali dengan

terpisahnya untai ganda DNA induk menjadi dua untai tunggal. Kemudian masing-masing untai tunggal tersebut akan menjadi template untuk terbentuknya untai ganda DNA yang baru, begitu seterusnya terjadi secara berulang, seperti terlihat pada Gambar 11.

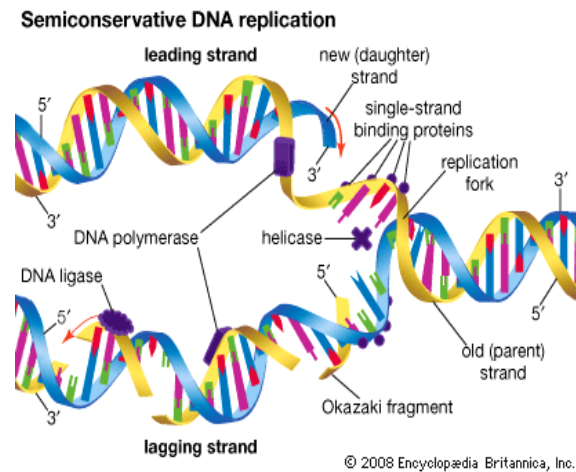


Gambar 11. Replikasi DNA menurut teori semi konservatif

Replikasi DNA menurut teori semikonservatif dijelaskan secara rinci sebagai berikut. Replikasi DNA diawali dengan terbentuknya garpu replikasi (replication fork) oleh enzim helicase, sehingga DNA untai ganda terlepas menjadi dua DNA untai tunggal, yakni DNA untai tunggal dengan arah $5' \rightarrow 3'$ dan DNA untai tunggal $3' \rightarrow 5'$. Keduanya akan menjadi DNA *template* untuk terbentuknya DNA untai tunggal pasangannya. Basa-basanya akan berikatan dengan basa-basa yang ada di dalam *template*, yang berdasarkan aturan Chargaff, akan berpasangan hanya dengan basa lain yang merupakan pasangannya.

Terbentuknya DNA untai tunggal pasangan DNA template tersebut terjadi dengan bantuan enzim DNA polymerase, yang menambah panjang rantai nukleotida dengan arah $5' \rightarrow 3'$, sehingga terbentuknya rantai nukleotida dapat terjadi secara langsung untuk DNA template $3' \rightarrow 5'$. DNA untai tunggal template dengan arah $3' \rightarrow 5'$ ini disebut *leading strand*. Sebaliknya untuk DNA template $5' \rightarrow 3'$, pembentukan rantai nukleotida pasangannya akan terputus-putus membentuk penggalan-penggalan nukleotida yang

disebut *fragmen okazaki*. Fragmen okazaki ini akhirnya akan tersambung menjadi satu dengan bantuan enzim DNA ligase. DNA template dengan arah $5' \rightarrow 3'$ ini disebut *lagging strand* (Gambar 12).



Gambar 12. *Leading strand* (untai $3 \rightarrow 5$) dan *lagging strand* (untai $5 \rightarrow 3$)

TRANSKRIPSI DAN TRANSLASI

Menurut sentral dogma genetik, molekul DNA akan ditranskripsi menjadi RNA, selanjutnya akan ditranslasi menjadi protein.

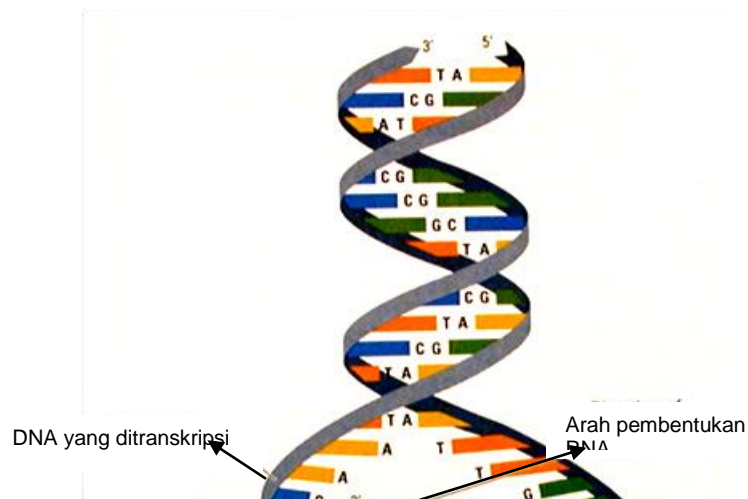


DNA dibuat transkripnya atau salinannya dalam bentuk RNA, peristiwa ini disebut **transkripsi**. Molekul RNA terdiri dari gugus gula ribosa, gugus fosfat dan basa nitrogen. Bedanya dengan molekul DNA adalah terletak pada gugus gulanya, jika RNA adalah ribosa, DNA adalah deoxyribosa; serta gugus basanya yaitu Timin (T) pada DNA

menjadi Urasil (U) pada RNA. Dengan demikian, A pada DNA akan berpasangan dengan U pada RNA dalam proses transkripsi.

RNA adalah single strand (rantai tunggal) dan terbentuk dengan orientasi $5' \rightarrow 3'$, sehingga rantai tunggal DNA dengan orientasi $3' \rightarrow 5'$ akan menjadi template untuk pembentukan RNA, disebut *template strand*. *Template strand* inilah yang ditempel oleh RNA polimerase pada saat transkripsi.. Sementara untai DNA pasangannya, yaitu yang

Pembentukan RNA dalam transkripsi ini dibantu oleh enzim RNA polymerase. mRNA (messenger RNA) yang terbentuk melalui proses transkripsi ini selanjutnya akan menjadi penentu asam amino yang akan terbentuk, karena jenis asam amino ini ditentukan oleh urutan basa yang ada pada mRNA. Asam amino ini akan membentuk polimer yang disebut polipeptida atau protein. Proses penerjemahan urutan nukleotida yang ada pada molekul mRNA menjadi rangkaian asam-asam amino yang menyusun suatu polipeptida atau protein ini disebut **translasi**.



Gambar 13. Transkripsi

Satu set dari 3 nukleotida yang ada pada mRNA ini mengkode satu jenis asam amino, disebut “the genetic code” (kode genetik) atau kodon. Transfer RNA (tRNA) adalah suatu adaptor yang memiliki antikodon (pasangan basa dari kodon yang ada pada mRNA) untuk membentuk suatu asam amino yang spesifik dan selanjutnya dibawa ke ribosom untuk memperpanjang rantai polypeptida yang terbentuk di ribosom. Ribosom adalah tempat terjadinya translasi, merupakan suatu ‘mesin’ untuk pembentukan polypeptide atau protein, yang menggunakan mRNA sebagai template. Proses translasi ini terjadi dari arah 5’P ke 3’OH pada mRNA.

Kode genetik atau kodon bersifat universal, artinya semua makhluk hidup menggunakan kode genetik yang sama. Hal inilah yang membuat dimungkinkannya transfer gen dari satu makhluk hidup yang satu ke makhluk hidup lainnya.

Pada sel organisme eukaryot dan prokaryot terdapat perbedaan pada proses transkripsi serta translasi tersebut. Perbedaan tersebut dirangkum pada Tabel 2.

Tabel 3. Perbedaan sel organisme prokaryot dan eukaryot

Sel organisme prokaryot	Sel organisme Eukaryot
Sel tidak memiliki dinding inti sehingga tidak ada batas yang jelas antara inti dan sitoplasma	Sel dengan dinding inti sehingga ada batas yang jelas antara inti dan sitoplasma
DNA tidak mengandung intron, konsekuensinya proses transkripsi hanya berlangsung 1 tahap	DNA mengandung intron, konsekuensinya proses transkripsi berlangsung 2 tahap. Tahap 1 adalah pembentukan transkrip primer RNA yang masih memiliki intron, tahap 2 adalah proses splicing yaitu proses penghilangan intron sehingga akhirnya dihasilkan mRNA yang tidak memiliki intron
Seluruh proses, yakni transkripsi dan translasi berlangsung di dalam sitoplasma/inti	Proses transkripsi hingga terbentuknya mRNA berlangsung di dalam inti, sedangkan translasi yakni perubahan mRNA menjadi protein berlangsung di sitoplasma

Gen dan Genom

Gen adalah urutan nukleotida atau fragmen DNA tertentu yang ada dalam kromosom yang mengkode protein penentu karakter suatu organisme. Gen merupakan unit pewarisan sifat dari suatu organisme hidup. Gen akan diturunkan dari suatu individu

kepada anaknya melalui reproduksi atau perbanyakan. Ekspresi dari gen dimulai saat DNA ditranskripsi menjadi RNA, kemudian ditranslasi menjadi protein.

Gen dari suatu organisme eukaryot terdiri dari:

- Regulatory region (sekuen regulator) : promoter, enhancer
Promoter adalah suatu sekuen DNA yang posisinya sedemikian rupa sehingga dengan mudah dapat dikenali oleh faktor transkripsi untuk memulai proses transkripsi ketika suatu gen ditranskripsi dan diekspresikan. Untuk memulai transkripsi, pertama-tama polymerase mengenali dan ‘binds’ (menempel) pada suatu sekuen pada promoter region. Promoter menentukan kapan, dimana dan berapa banyak ekspresi gen terjadi. “Strong promoter” adalah suatu promoter kuat yang dapat dikenali dengan baik oleh faktor transkripsi dan melekat dengan kuat padanya. Namun sebaliknya ada suatu promoter yang bersifat lemah, sehingga dalam hal ini membutuhkan ‘enhancer’ untuk menguatkannya.
- Coding region atau disebut Unit transkripsi yang terdiri dari Ekson, intron, dan sisi 5’ dan 3’. Intron adalah sekuen DNA (yang ada pada suatu gen) yang hanya ditranskripsi menjadi RNA awal tapi tidak menjadi mRNA dan tidak ditranslasi menjadi peptida atau protein. Melalui proses splicing, intron dihilangkan. Ekson adalah bagian gen yang ditranskripsi menjadi mRNA dan ditranslasi menjadi protein.
- Domain regulasi akhir transkripsi (terminator)

Genom adalah totalitas DNA dalam suatu sel organisme. Jadi genom terdiri dari gen dan DNA non gen. Yang termasuk DNA non-gen adalah sekuen berulang (*repeated sequences*), *junk DNA*, *inserted sequences*, transposon.

REKAYASA GENETIKA TANAMAN

Rekayasa genetika tanaman adalah manipulasi genom tanaman dengan bioteknologi. Atau dengan kata lain, pengetahuan dan metode tentang pembuatan tanaman transgenik. Tanaman transgenik adalah tanaman yang telah disisipi gen

asing yang berasal dari makhluk hidup lainnya, bisa sesama tanaman, hewan, ataupun bakteri.

Tujuan dari pembuatan tanaman transgenik adalah untuk mendapatkan tanaman unggul yang lebih baik dari tanaman aslinya. Pada awal dibuatnya tanaman transgenik sebenarnya adalah untuk mengatasi masalah pangan dunia. Meningkatnya jumlah penduduk menyebabkan produksi pangan tidak mampu memenuhi kebutuhan pangan mereka. Untuk meningkatkan luas areal pertanian tidak memungkinkan karena semakin sempitnya luas lahan pertanian. Sementara intensifikasi budidaya pertanian (melalui penggunaan pupuk kimia dan pestisida) menimbulkan dampak buruk pada lingkungan dan dampak residu pada produk yang membahayakan konsumen. Diketahui bahwa kehilangan produksi pertanian sebagian besar disebabkan oleh hama, penyakit dan gulma. Dengan demikian dilakukanlah upaya pembuatan tanaman transgenik yang tahan terhadap hama, penyakit dan tahan terhadap herbisida. Jadi tujuan utamanya adalah peningkatan produksi pangan.

Seiring dengan perkembangan teknologi yang semakin pesat sehingga memudahkan dilakukannya metode transfer gen pada tanaman, maka mulailah dibuat tanaman transgenik dengan kualitas yang lebih baik. Berikut adalah beberapa contoh tanaman transgenik yang dibuat untuk peningkatan kualitas produk.

- **Padi : golden rice**
- Dibuatnya tanaman transgenik golden rice ini dilatarbelakangi oleh rendahnya kandungan nutrisi pada beras dan banyaknya orang di dunia ketiga yang mengalami defisiensi vitamin A. Tanaman transgenik padi golden rice disisipi gen Phytoene synthase (psy) dari tanaman daffodils (bunga narsis) dan Lycopene cyclase (crt1) dari bakteri tanah *Erwinia uredovora* sehingga memproduksi enzim untuk biosintesis karotenoid (β -carotene) atau pro vitamin A dalam endosperm.
- **Tomat : buah tomat dengan storage life yang panjang (Gambar 19).**

Dilatarbelakangi dengan mudahnya buah tomat menjadi lembek dan busuk (softening and rotting) dan cepat masak (premature ripening) pada penyimpanan. Enzim yang bertanggung jawab terhadap proses senescence adalah cellulase dan polygalacturonase. Maka untuk mencegah terjadinya senescence produksi kedua enzim ini harus diturunkan. Caranya yaitu dengan jalan menyisipkan antisense gen dari gen untuk sintesis enzim cellulase dan polygalacturonase. Antisense gen adalah cermin dari gen yang ada. Dengan demikian gen tersebut tidak dapat diekspresikan (membuat enzim) karena proses transkripsinya terganggu karena adanya transkrip RNA yang dihasilkan dari antisense gen.

TRANSFORMASI GENETIK PADA TANAMAN

Transformasi genetik pada tanaman adalah mentransfer gen asing yang diperoleh dari tanaman, virus, bakteri, hewan, atau manusia pada suatu spesies tanaman tertentu. Atau bisa juga dikatakan suatu proses untuk mendapatkan tanaman transgenik. Gen asing yang diperoleh dari makhluk hidup tertentu tersebut direkayasa secara molekuler sehingga bisa disisipkan ke dalam genom tanaman. Gen asing hasil rekayasa genetika yang disipkan pada spesies tanaman tertentu disebut transgen, sehingga tanaman yang tersisipi transgen disebut tanaman transgenik.

Tahapan transformasi pada tanaman meliputi : Inseri transgen, integrasi transgen ke genom tanaman dan ekspresi transgen yang terintegrasi pada genom. Inseri transgen dapat dilakukan dengan beragam metode, diantaranya adalah :

1. *Agrobacterium*-mediated transformation (metode transformasi dengan bantuan *Agrobacterium*)
2. Microprojectile bombardment (penembakan dengan peluru mikro)
3. Direct protoplast transformation (transformasi protoplas secara langsung)
4. Electroporation
5. Silicon carbide-mediated transformation (transformasi dengan media karbid silikon)

Metode 1 dan 2 adalah yang paling banyak digunakan. Namun dalam bahasan selanjutnya akan menekankan pada metode 1 yaitu transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai mediator. Metode ini memiliki kelebihan dibanding metode lainnya, yakni relatif mudah dilakukan, biaya murah dan transgen yang disisipkan ke genom tanaman dapat diturunkan kepada progeninya melalui hukum Mendel. Selanjutnya setelah diinsersi ke dalam sel tanaman, maka transgen tersebut harus benar-benar terintegrasi ke genom tanaman. Artinya transgen benar-benar bersatu dengan DNA kromosom yang ada di dalam inti sel. Setelah itu, DNA dari gen tersebut harus dapat ditranskripsi menjadi mRNA, selanjutnya ditranslasi menjadi protein.

Transfer gen melalui *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens adalah bakteri gram negatif yang secara alamiah menginfeksi tanaman dikotil dan menyebabkan tumor pada batang. *A.tumefaciens* memiliki 2 macam DNA, yakni DNA yang terletak di dalam kromosom dan DNA plasmid yang berbentuk circular (melingkar) yang terletak di luar kromosom. Pada saat *A.tumefaciens* menginfeksi sel tanaman, ada sepenggal DNA yang ada pada plasmid tersebut yang terintegrasi dengan stabil ke genom tanaman, kemudian terekspresi dan menyebabkan tumor. Sepenggal DNA tersebut dikenal sebagai T-DNA (Transferred-DNA). Sedangkan plasmid yang membawa T-DNA disebut Ti plasmid (Ti=tumor inducing). Tumor terbentuk, karena pada T-DNA tersebut terdapat gen yang mengkode untuk pembentukan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin. Produksi dari auksin dan sitokinin ini terjadi ketika gen diekspresikan sehingga menimbulkan bentuk fenotip tumor.