

ULASAN

Transformasi Oenetik pada Tanaman: Beberapa Teknik dan Aspek Penting

INEZ H.S. LOEDIN

Puslitbang Bioteknologi LIPI, Jalan Raya Bogor Km. 46, Cibinong 16911

Diterima 28 November 1994/Disetujui 30 November 1994

PENDAHULUAN

Berbagai gen yang menyandikan sifat keunggulan agronomi maupun yang berperan penting pada sistem metabolisme tumbuhan telah berhasil diisolasi dalam dekade terakhir. Sejalan dengan perkembangan ini, berbagai kiat telah dilakukan untuk menemukan cara yang paling efisien agar gen yang diisolasi dari suatu jenis organisme dapat dipindahkan dan diekspresikan pada organisme lain. Dalam dunia tumbuhan, lajunya perkembangan teknik transformasi genetik selama tahun-tahun terakhir telah memungkinkan peningkatan kualitas beberapa tanaman budidaya. Beberapa perusahaan bahkan telah mulai memasarkan tanaman hasil rekayasa genetik. Meskipun terdapat berbagai cara transformasi, tetapi secara garis besar teknik transformasi genetik dapat dipisahkan atas transformasi melalui *Agrobacterium* dan transformasi secara langsung.

TRANSFORMASI MELALUI *AGROBACTERIUM*

Transformasi menggunakan *Agrobacterium* adalah sistem transformasi yang paling umum digunakan pada tanaman. Bakteri ini secara alami menginfeksi tanaman dikotil yang menyebabkan penyakit nyali tajuk (*crown gall*). Kemampuan untuk menimbulkan penyakit nyali tajuk ini berkaitan dengan keberadaan plasmid yang disebut Ti yang berukuran sekitar 200 kilo pasang basa pada sel bakteri. Ketika *Agrobacterium* menginfeksi tanaman, bagian dari molekul DNANYA yang disebut T-DNA terintegrasi pada DNA kromosom tanaman. Sifat unik ini memungkinkan plasmid Ti menjadi alat transpor dari gen lain dengan cara menyisipkan gen asing tersebut pada T-DNA. Kemudian *Agrobacterium* dengan sengaja diinokulasikan @ sel atau jaringan tanaman yang memiliki menjadi tanaman utuh. Teknik ini telah berhasil diterapkan secara rutin pada beberapa spesies tanaman seperti tembakau, tomat dan tanaman dikotil lainnya. Keuntungan teknik ini antara lain ialah gen yang terintegrasi umumnya hanya satu kopi atau sedikit karena disisipkan pada T-DNA, sedangkan pemasalannya secara alami tanaman ini hanya menginfeksi tanaman jenis dikotil sehingga sulit diterapkan pada tanaman monokotil. Meskipun demikian, ada beberapa tanaman monokotil yang telah berhasil ditransformasi dengan menggunakan *Agrobacterium* seperti misalnya asparagus. Baru-baru ini sebuah perusahaan di Jepang (*Japan Tobacco Inc.*) telah berhasil memperoleh tanaman transgenik dari tiga kultivar padi jenis *japonica* melalui infeksi *Agrobacterium*

Transformasi padi tersebut menggunakan sistem yang disebut vektor ganda (*binary-vector*). Dalam sistem vektor ganda digunakan dua plasmid, plasmid A mengandung bagian virulen dari *Agrobacterium* dan bagian lain dari plasmid Ti tetapi tanpa T-DNA; plasmid B yang lebih kecil mengandung

T-DNA dan gen yang disisipkan. Alasan penggunaan vektor ganda ialah selainnya memudahkan uji pemotongan yang unik dengan enzim restriksi pada plasmid Ti yang berukuran sangat

besar. Aspek lain yang banyak diperdebatkan dari transformasi *Agrobacterium* ialah pembuktian terintegrasinya gen asing. Umumnya gen penanda yang digunakan adalah gen *gus* penyandi β -glukuronidase. Hasil positif *gus*, yaitu timbulnya warna biru setelah uji histokimia, ternyata sering kali merupakan hasil semu. Warna biru yang diperoleh terjadi karena masih adanya sisa bakteri yang mengandung gen *gus* pada jaringan yang diinfeksi, meskipun telah dilakukan perlakuan antibiotika. Untuk menghindarkan hasil semu ini dikembangkan konstruksi plasmid yang menggunakan intron di depan gen penanda sehingga gen penanda ini hanya terekspresi apabila telah terjadi integrasi dengan DNA tanaman tetapi tidak terekspresi pada bakteri.

Terdapat pula teknik transformasi genetika yang agak serupa dengan transformasi *Agrobacterium* tetapi vektornya adalah DNA dari virus, namun teknik ini belum banyak dipakai.

TRANSFORMASI SECARA LANGSUNG

Teknik transformasi genetik yang disebut teknik transfer gen secara langsung antara lain ialah mikroinjeksi, fusi sferoplas, fusi liposom, imbibisi embrio, injeksi tabung putik, transformasi protoplas dan penembakan DNA dengan pendekatan biolistik. Teknik-teknik ini disebut teknik transformasi secara langsung oleh karena DNA diintroduksi tanpa melalui 'perantara'. Teknik protoplas dan teknik biolistik merupakan dua teknik yang paling banyak dipakai. Pada dekade yang lalu, hampir semua laporan keberhasilan transformasi tanaman monokotil jenis sereal diperoleh dari transformasi protoplas. Pada teknik ini DNA diintroduksi ke jaringan tanaman dengan menggunakan polietilen glikol (PEG) dan/atau elektroporasi. Dari segi teknik kultur jaringan metode ini memerlukan perlakuan intensif dan keberhasilan sangat bergantung pada kemampuan protoplas tanaman untuk meregenerasikan diri menjadi tanaman seutuhnya. Kemampuan regenerasi protoplas sangat bergantung pada jenis genotipe yang dipakai, sehingga sulit diaplikasikan pada

semua tanaman. Kelebihan teknik ini ialah sistemnya didasarkan pada sistem sel tunggal dan pada beberapa tanaman dapat diperoleh frekuensi transformasi yang tinggi, sedangkan kelemahannya selain keberhasilan terbatas pada genotipe tertentu, ialah tingginya variasi somaklonal karena banyaknya tahapan kultur jaringan yang harus dilalui.

Beberapa tahun terakhir ini metode biolistik yang pertama kali dipublikasikan oleh Klein dan kawan-kawan pada tahun 1987 pada majalah *Nature*, muncul sebagai alternatif yang lebih sederhana dari teknik protoplas. Pendekatan yang digunakan yaitu melapisi mikro projektil yang berupa partikel tungsten atau partikel emas dengan DNA yang mengandung gen yang akan diintroduksi. Mikro projektil yang berupa suspensi partikel ditetaskan di atas makro projektil plastik, kemudian ditembakkan pada jaringan tanaman. Makro projektil plastik akan tertahan oleh pelat penahan, sedangkan mikro projektil akan masuk pada jaringan. Transformasi akan terjadi bila partikel berakhir pada inti sel tanaman. Teknik ini menggunakan tenaga ledakan dari peluru bermesiu sebagai akselerator. Pada saat ini telah terdapat beberapa disain dari alat penembakan DNA yang menggunakan prinsip fisika berbeda untuk mengakselerasi partikel. Penggunaan peluru bermesiu mulai banyak diganti dengan gas helium, pada yang terakhir ini percepatan partikel dihasilkan oleh kompresi dari gas helium. Selain alat penembak yang menggunakan gas helium, terdapat pula alat penembak listrik (*electric-discharge particle acceleration*) dan alat penembak mikro (*micro gun*). Sebagai prasyarat dari teknik ini, target jaringan yang akan digunakan harus pula mempunyai kemampuan untuk beregenerasi dan kemampuan untuk menerima gen asing serta mengekspresikannya. Tetapi karena targetnya dapat berupa sel atau jaringan, maka teknik kultur yang dibutuhkan lebih sederhana dari teknik protoplas. Keuntungan teknik penembakan DNA ialah teknik ini secara teoritis dapat diterapkan pada semua jenis tanaman yang jaringannya dapat dibiakkan menjadi tanaman, tidak terbatas apakah tanaman tersebut jenis monokotil atau dikotil dan tidak diperlukan regenerasi protoplas. Kelemahan teknik ini kerap kali karena jumlah kopi gen yang terintroduksi tinggi, sehingga dikawatirkan mengganggu sistem lain pada tanaman.

Teknik transformasi lain yang menggunakan jaringan sebagai target yaitu elektroporasi jaringan. Teknik ini berhasil diterapkan pada jagung, tetapi kelemahannya ternyata banyak tanaman transgenik yang diperoleh bersifat kimerik (sebagian dari tanaman mengekspresikan gen yang diintroduksi sementara bagian lain tidak).

ANALISIS INTEGRASI DAN EKSPRESI GEN

Analisis yang tercepat untuk menunjukkan gen terintegrasi secara stabil pada tanaman ialah dengan analisis histokimia enzim gen penanda beta glukuronidase dan analisis DNA dengan penggunaan teknik PCR (*polymerase chain reaction*). Tetapi dua pembuktian ini saja tidak cukup, karena kadang-kadang diperoleh hasil positif semu.

Analisis integrasi gen pada level DNA yang lebih akurat ialah dengan menggunakan teknik hibridisasi DNA yang disebut metode hibridisasi Southern. Analisis hibridisasi Southern yang benar akan dapat menunjukkan keberadaan gen-gen yang diintroduksi pada DNA genom tanaman, keutuhan gen-gen tersebut dan jumlah kopi gen. Pada transformasi dengan *Agrobacterium* pembuktian yang lebih mendalam lagi ialah dengan pengurutan basa (*sequencing*) untuk membuktikan bahwa benar-benar terdapat sekuen

pembatas T-DNA (*T-DNA border sequence*) berurutan dengan gen yang disisipkan. Pendekatan ini dilakukan oleh karena adanya argumen yang mengatakan bahwa mungkin saja DNA asing masuk ke sel tanaman tetapi tidak terintegrasi pada kromosom (*non-chromosomal DNA*) yang akan memberikan hasil positif pada analisis hibridisasi Southern tetapi umumnya tidak akan dapat diturunkan pada generasi berikut. Selain analisis DNA, tingkat ekspresi gen yang diintroduksi tentunya dapat diuji sesuai dengan sifat agronomi yang disandikannya. Studi kebakaan diperlukan untuk memperlihatkan stabilitas keberadaan gen baru pada turunan berikutnya. Bila gen terintegrasi pada DNA kromosom tanaman maka gen tersebut akan tersegregasi pada turunan berikutnya mengikuti hukum Mendel.

KEBERHASILAN TRANSFORMASI TANAMAN

Teknologi RNA tak bermakna (*antisense RNA*) yang didasarkan pada prinsip bahwa ekspresi bakteri dan gen dari eukariot dapat diblokir secara *in vivo* dengan RNA tak bermakna, telah menghasilkan beberapa tanaman hasil rekayasa, antara lain penghambatan produksi etilena sehingga bunga dapat bertahan lebih lama dan pencegahan penyakit virus tanaman. Di bidang pencegahan penyakit virus ditemukan pula sistem proteksi menggunakan lapisan protein yang dinamakan protein pembungkus virus (*viral coat protein*) dan transformasi dengan gen *PR* (*pathogen related-genes*) atau gen penyandi ketahanan virus secara alami. Beberapa gen penyandi ketahanan terhadap kapang telah pula berhasil diisolasi, seperti gen penyandi kitinase dan glukonase yang berpotensi melarutkan dinding sel kapang serta gen penyandi fitoaleksin yang bersifat toksik pada kapang tertentu. Gen-gen penyandi toksin serangga seperti gen *cry* dari *Bacillus thuringiensis*, dan gen *gna* dari *Galanthus nivalis agglutinin* (penyandi sejenis lektin tanaman) telah pula diisolasi. Beberapa dari gen-gen ini telah berhasil diintroduksikan pada tanaman. Masih banyak contoh lain dari gen yang secara ekonomi menguntungkan telah berhasil diisolasi dan diintroduksikan pada tanaman lain seperti gen penyandi warna biru pada bunga dan penentu tipe karbohidrat pada padi-padian.

Di Amerika Serikat buah tomat yang telah direkayasa dapat bertahan segar 10 hari lebih lama daripada tomat biasa, dan telah dipasarkan oleh perusahaan *Calgene Fresh Inc.* dengan nama *Flavr Savr*. Calgene telah pula merekayasa minyak kanola yang telah dikurangi asam lemak jenuhnya untuk mengurangi bahaya penyakit jantung serta kapas yang tahan terhadap herbisida. Sementara semangka dan sayuran tahan terhadap virus dari perusahaan *Asgrow Seed* dan kacang kedele dari Monsanto sedang menunggu persetujuan pemasarannya. Namun, terlepas dari keberhasilan-keberhasilan ini sebenarnya masih banyak sekali tanaman penting yang belum dapat ditransformasi, atau hanya dapat ditransformasi dengan frekuensi yang sangat rendah. Disamping itu masih banyak aspek yang perlu diteliti berkaitan dengan introduksi dan ekspresi gen asing, seperti jenis promoter yang diinginkan untuk memperoleh ekspresi maksimum, ekspresi yang hanya ditujukan pada bagian jaringan tertentu, ekspresi yang dapat dihidupmatikan (*on-off*) pada fase pertumbuhan berbeda, atau hanya diaktifkan bila diperlukan. Lokasi integrasi gen yang terjadi pada tanaman selama ini juga masih bersifat acak. Penelitian tentang kemungkinan mengintegrasikan gen pada sisi yang dikehendaki pada kromosom tertentu sedang dilakukan.