

# BAB I PENDAHULUAN

## A. Latar Belakang

Pemuliaan tanaman memiliki definisi kompilasi seni, ilmu, dan teknologi/metode (konvensional dan nonkonvensional) dalam merakit karakteristik genetik tanaman menjadi suatu hal yang lebih bermanfaat bagi kebutuhan masyarakat (Swasti, 2019). Selaras dengan perkembangan zaman, teknologi, dan pemahaman mengenai kontribusi *quantitative trait locus* (QTL) dalam skala *whole genome*, pemuliaan tanaman juga mengalami perkembangan dimana saat ini telah mencapai 4.0 yang terfokus pada *genome editing* (Ramstein *et al.*, 2019). Salah satu teknik yang sedang populer dalam *genome editing* akibat fleksibilitas terhadap organisme targetnya adalah mutasi terarah (*site-directed mutagenesis*) menggunakan *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated 9* (CRISPR-Cas9).

Teknologi CRISPR-Cas9 pertama kali ditemukan secara tidak sengaja oleh Ishino *et al.* (1987) ketika beliau menganalisis sekuens gen *iap* dari *Escherichia coli* dan dipopulerkan sebagai alat dalam *genome editing* pada tahun 2012 (Jinek *et al.*, 2012). Penggunaan teknologi CRISPR-Cas9 dan turunan lainnya telah berkembang ke seluruh *kingdom* organisme (termasuk tumbuhan). Beberapa contoh karakteristik unggul yang telah dihasilkan melalui teknologi ini antara lain produksi benih klonal (benih hibrida tanpa melalui persilangan) padi (Wang *et al.*, 2019), peningkatan ketahanan tanaman kentang dan padi terhadap penyakit (Kieu *et al.*, 2021; Oliva *et al.*, 2019), perakitan tanaman tembakau (*Nicotiana benthamiana*) yang menyerang genom virus secara aktif (Baltes *et al.*, 2015), peningkatan kadar  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) pada tanaman tomat (Nonaka *et al.*, 2017), dan perakitan jagung ketan dalam waktu yang lebih singkat serta memiliki karakter agronomis yang lebih unggul (Gao *et al.*, 2020).

CRISPR-Cas9 memiliki tiga komponen penting agar dapat berfungsi sebagai enzim nuklease spesifik yang dapat mendorong terjadinya mutasi terarah oleh mekanisme perbaikan untaian DNA dari organisme target. Pertama adalah protein Cas9 yang terdiri dari beberapa *domain* (REC I, REC II, HNH, RuvC, dan PAM *Interacting*) dan berfungsi sebagai pemotong untaian DNA (Nishimasu *et al.*,

2014). Kedua, peran sebagai “pemandu” protein Cas9 ke lokasi DNA spesifik yang diinginkan oleh peneliti dipegang oleh *single guide* RNA (sgRNA). Adapun sgRNA ini merupakan fusi dari CRISPR RNA (crRNA) sepanjang 20 nukleotida yang bertindak sebagai “pencari DNA target” dan *trans activating* CRISPR RNA (tracrRNA) yang bersifat struktural. Persyaratan terakhir adalah sekuens *protospacer adjacent motif* (PAM) pada DNA organisme target (umumnya 5'-NGG-3' untuk penggunaan WT-SpCas9). Secara spesifik, sekuens ini terletak di akhir crRNA dan pada untaian DNA yang berlawanan dengan tempat terjadinya penempelan sgRNA.

Salah satu cara untuk mengaplikasikan dua komponen eksternal (*Cas9* dan sgRNA) diatas adalah dengan menggunakan plasmid biner (*binary plasmid*) yang akan ditransformasikan oleh *Agrobacterium tumefaciens* dalam proses insersi daerah T-DNA plasmid ke dalam genom tanaman. Ukuran plasmid yang diinsersikan menjadi salah satu faktor utama dalam menentukan keberhasilan transformasi (Chan *et al.*, 2002). Hal ini tentu saja menjadi penghalang pada aspek sgRNA jika menargetkan banyak lokasi di dalam genom dan menggunakan sistem konvensional (*promoter* Pol III – sgRNA<sub>1</sub> – *terminator*, *promoter* Pol III – sgRNA<sub>2</sub> – *terminator*, dan seterusnya). Oleh karena itu, pendesainan plasmid yang dimodifikasi melalui rekayasa genetika dengan tujuan agar menjadi *template* dalam kegiatan *upstream* (disebut juga *backbone* plasmid), bersifat fleksibel dalam perubahan sekuens gen target (melalui modifikasi sekuens crRNA) serta mampu mengakomodasi sistem “hemat ukuran” tRNA – gRNA (TGR-CRISPR) menjadi target utama dari penelitian dengan judul **Konstruksi Backbone Plasmid Single Target dan tRNA-gRNA (TGR) Sistem CRISPR-Cas9 untuk Tanaman.**

## B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. Apakah konstruksi *backbone* plasmid berhasil dilakukan?
2. Apakah metode yang paling tepat untuk digunakan dalam konstruksi *backbone* plasmid?

### C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk

1. Mendapatkan konstruk *backbone* plasmid bersifat fleksibel dan dapat dimodifikasi sesuai keinginan.
2. Mendapatkan metode paling tepat untuk menghasilkan konstruk *backbone* plasmid yang bersifat fleksibel dan dapat dimodifikasi sesuai keinginan.

### D. Hipotesis Penelitian

Konstruksi *backbone* plasmid *single target* dan tRNA-gRNA (TGR) sistem CRISPR-Cas9 untuk tanaman berhasil dilakukan serta didapatkannya metode yang paling tepat.

### E. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan kemudahan kepada peneliti selanjutnya yang menggunakan teknologi CRISPR-Cas9 dengan fleksibilitas *backbone* plasmid yang dapat dimodifikasi sesuai tujuan penelitian masing-masing.

