

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Geminivirus merupakan salah satu virus penyebab penyakit kuning keriting pada tanaman cabai. Virus ini bagian dari genus Begomovirus dan famili Geminiviridae yang memiliki DNA berbentuk utas tunggal atau *single-stranded* DNA. Penularan virus dari genus Begomovirus umumnya dilakukan oleh serangga vektor. Serangga vektor akan menghisap cairan tanaman yang terserang virus dan menularkannya ke tanaman sehat. Virus ini berkembang dalam waktu sekitar 40-60 hari pasca infeksi (Aisyah *et al*, 2016).

Gejala yang khas dari serangan geminivirus berupa daun yang keriting, tulang daun berubah menebal, warna pucuk daun berubah menjadi kuning, dan daun menggulung ke atas. Beberapa sentra produksi sayuran seperti di Jawa-Bali, Sumatera Barat, Sumatera Utara, Lampung, Bengkulu, Kalimantan, dan NTB mengalami kerugian ekonomi yang besar akibat serangan geminivirus tersebut. Berdasarkan informasi dari petani yang menyatakan bahwa akibat dari serangan virus ini yaitu kehilangan hasil tani berkisar 20-100% (Litbang pertanian, 2018).

Upaya pengendalian yang telah dilakukan untuk mengatasi serangan virus ini berupa penggunaan pestisida, sanitasi lingkungan, pelepasan predator dan teknologi rekayasa genetika. Aplikasi teknologi rekayasa genetika memiliki potensi untuk menghasilkan resistensi terhadap patogen.

Pengembangan tanaman tahan terhadap virus merupakan salah satu aplikasi dari teknologi rekayasa genetika di dalam bidang pertanian khususnya pemuliaan tanaman. Metode yang digunakan dalam rangka pengembangan tanaman tahan virus ini yaitu *genome editing* yang dilakukan melalui proses mutasi. Metode tersebut mampu mengubah DNA secara spesifik dan terarah, sehingga hasil dari pengeditan genom ini akan sesuai dengan yang diinginkan.

Pada *genome editing* terdapat beberapa metode editing di antaranya yaitu *Zinc Finger Nuclease* (ZFN) (Urnov *et al*, 2005), *Transcription Activator-Like Effector Nuclease* (TALEN) (Christian *et al*, 2010) dan *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat* (CRISPR) yang berasosiasi dengan Cas9 (CRISPR/Cas9). Secara umum mekanisme mutasi pada ketiga metode tersebut

sama yaitu menggunakan protein nuklease untuk memotong kedua sisi pita DNA. Namun terdapat perbedaan dari jumlah protein nukelase yang digunakan untuk memotong kedua sisi pita DNA, yaitu pada metode ZFN dan TALEN digunakan 2 protein nuclease dan metode CRISPR menggunakan 1 protein nuclease (Council, 2018). Selain itu, perbedaan lainnya yaitu metode ZFN dan TALEN membutuhkan protein faktor transkripsi untuk mengarahkan mutasi, sedangkan CRISPR menggunakan *guide* RNA (gRNA) yang memiliki struktur molekul lebih sederhana dan mudah disintesis dan Cas9 yang bertindak sebagai gunting (Jinek *et al*, 2012)).

Selanjutnya untuk menerapkan metode CRISPR/Cas9 tersebut, maka terlebih dahulu komponen Cas9 yang bertindak sebagai gunting di transformasi ke dalam tanaman. Sebelumnya fragmen Cas9 ini telah di desain untuk berada di dalam plasmid p53 (p53 rekombinan Cas9). Sehingga tahapan selanjutnya yaitu transformasi fragmen Cas9 ke dalam tanaman.

Beberapa metode transformasi plasmid yang digunakan yaitu elektroporasi, *heat shock* dan *freeze thaw*. Metode elektroporasi yaitu metode transformasi plasmid yang memanfaatkan listrik arus pendek untuk melemahkan membran sel bakteri sehingga plasmid dapat terintroduksi ke dalam sel bakteri (Tu *et al*, 2016). Metode *heat shock* atau kejutan panas yang memanfaatkan suhu panas (42°C) untuk membuka membran sel bakteri (Brown 2006). Metode *freeze thaw* dilakukan dengan inkubasi sel kompeten bakteri dan vektor plasmid secara bersamaan di dalam nitrogen cair (Wise *et al*, 2006). Setelah plasmid rekombinan ditransformasi ke dalam bakteri, selanjutnya dilakukan transformasi ke dalam kalus. Transformasi dilakukan untuk memindahkan daerah T-DNA ke dalam sel kalus.

Salah satu metode transformasi genetik yang digunakan untuk perakitan tanaman tahan virus adalah transformasi menggunakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Metode ini memanfaatkan kemampuan bakteri *A. tumefaciens* untuk mentransfer T-DNA ke dalam genom tanaman. Renfiyeni (2015) telah melakukan transformasi menggunakan *A. tumefaciens* pada beberapa gen geminivirus ke dalam genom tanaman cabai. Gen-gen tersebut berhasil diintroduksi ke dalam genom melalui kalus, yang dibuktikan dengan hasil amplifikasi gen target

menggunakan primer spesifik. Namun terdapat kendala pada proses regenerasi, dimana kalus transforman tersebut tidak mampu tumbuh dan berkembang. Hal ini diduga karena proses inokulasi pada kalus mengakibatkan kondisi kalus menjadi lemah, sehingga pemberian antibiotik dapat membuat kondisi kalus menjadi semakin lemah.

Mengacu pada latar belakang di atas, penulis tertarik untuk melakukan penelitian yang berjudul “**Transformasi Plasmid p53/Cas9 Melalui Cabai dengan *Agrobacterium tumefaciens***”. Melalui penelitian ini diharapkan efisiensi dan efektivitas regenerasi transforman dapat ditingkatkan dalam rangka mendukung upaya perakitan tanaman cabai tahan virus.

B. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* transforman yang membawa plasmid p53/Cas9 dan kalus transforman yang membawa fragmen Cas9.

C. Rumusan Masalah

1. Apakah transformasi plasmid p53/Cas9 ke *Agrobacterium tumefaciens* berhasil dilakukan?
2. Apakah transformasi *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa plasmid p53/Cas9 ke berhasil dilakukan?
3. Bagaimana pengaruh transformasi *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa plasmid p53/Cas9 terhadap kalus cabai transforman?

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat sebagai langkah awal dalam rangka perakitan tanaman tahan virus. Tanaman yang telah membawa komponen dari sistem CRISPR tersebut dapat dilanjutkan untuk mengaplikasikan metode *genome editing* ini.

