

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Gen adalah DNA fungsional sebagai komponen penyimpan sifat makhluk hidup. Secara struktural, gen terdiri atas tiga bagian, yaitu promotor, bingkai baca (*open reading frame*), dan terminator. Bingkai baca merupakan daerah pengkode protein, sedangkan promotor dan terminator berfungsi sebagai regulator ekspresi gen. Promotor memiliki dua daerah yang disebut sebagai daerah promotor distal (*distal promoter*) dan promotor inti (*core promoter*). Pada penelitian sebelumnya, Oktavioni *et al.* (2019) berhasil mengisolasi sebagian promotor distal dari gen *NPRI* tanaman cabai genotipe *Berangkai*, selanjutnya dinamai *PD_CbNPRI*. Kemudian Jamsari *et al.* (2019) berhasil mengisolasi *full-length* promotor distal dengan ukuran 5.950 bp dan berhasil mengkarakterisasi elemen-elemen yang ada pada keseluruhan sekuen *PD_CbNPRI* tersebut. Elemen-elemen tersebut terdiri dari 9 jenis elemen *cis-acting*, 1 *silencer*, dan 1 *enhancer*.

Elemen *cis-acting* dari *PD_CbNPRI* yang potensial digunakan untuk meningkatkan regulasi ekspresi gen di antaranya yaitu *W-Box*, *WLE1*, dan *RAV1AAT*. Elemen-elemen ini sama-sama berfungsi dalam regulasi ekspresi gen yang diinduksi oleh adanya akumulasi asam salisilat (*SA*) dan serangan patogen pada sel tanaman. *W-Box* berfungsi sebagai *binding site* dari protein faktor transkripsi *WRKY* sebagaimana dilaporkan oleh Yu *et al.* (2001). Hasil penelitian Hwang dan Hwang (2010) menunjukkan terjadi peningkatan ketahanan tanaman terhadap *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* sebanyak 4,3 kali ketika elemen *W-Box* ada pada promotor *OsNPRI* dan menurun ketika elemen *W-Box* dieliminasi. Konsensus penyusun *W-Box* yang ditemukan pada *PD-CbNPRI* terdiri dari *TTGAC*, *TGACC*, dan *TGACT* (Jamsari *et al.*, 2019). *W-Box* ini selanjutnya dinamakan dengan *W-Box 1*, *W-Box 2*, dan *W-Box 3*. Elemen *WLE1* (*W-Box like elements*) merupakan elemen yang mempunyai fungsi analog dengan *W-Box* (Hwang dan Hwang, 2010). Konsensus penyusun *WLE1* yang ditemukan pada *PD_CbNPRI* yaitu *TGACA* (Jamsari *et al.*, 2019). Sedangkan elemen *RAV1AAT* berfungsi sebagai *binding site* dari faktor transkripsi *RAVI* (Hwang dan Hwang, 2010). Zhong *et al.* (2015) melaporkan bahwa modifikasi dengan penambahan

ulangan keberadaan elemen *RAVIAAT* pada promotor *GhNPR1* menyebabkan ketahanan terhadap *Curvularia gladioli* meningkat 18,6 kali lebih besar. Konsensus penyusun *RAVIAAT* yang ditemukan pada *PD_CbNPR1* yaitu TGTTG (Jamsari *et al.*, 2019). Namun, fungsi elemen-elemen dari *PD_CbNPR1* ini dalam regulasi ekspresi gen perlu divalidasi secara *in-vitro*.

Hybrid promoter adalah salah satu teknik rekayasa promotor sintetik melalui penggabungan *minimal promoter* dengan fragmen yang mengandung elemen *cis-acting*. *Hybrid promoter* juga berfungsi sebagai alat validasi elemen *cis-acting* (Venter, 2007; Hernandez-Garcia dan Finer, 2014; Rushton, 2016). Sejauh ini, *minimal promoter* yang memiliki tingkat efektivitas yang cukup tinggi dalam regulasi ekspresi gen yaitu promotor CaMV 35S. Promotor CaMV 35S umumnya digunakan dalam konstruksi plasmid untuk kegiatan transformasi dan uji ekspresi pada sel tanaman. Akumulasi hormon tanaman dan infeksi patogen bisa mengaktifkan fungsi promotor CaMV 35S karena memiliki elemen *cis-acting*, baik yang sudah ada pada sekuens *native* plasmidnya maupun yang dikonstruksi tambahan. Namun, promotor CaMV 35S menurut Jiang *et al.* (2018) hanya memiliki regulasi ekspresi yang kuat pada tanaman dikotil dan lemah pada tanaman monokotil. Sementara promotor sintetik yang digunakan untuk ekspresi gen target ke sistem ekspresi sel bakteri umumnya menggunakan T7 Promotor. T7 Promotor tidak memiliki elemen *cis-acting* yang regulasinya diinduksi oleh hormon tumbuhan dan infeksi patogen. Oleh karena itu, pengembangan promotor sintetik yang memiliki elemen *cis-acting* yang bisa digunakan dalam ekspresi pada sistem sel bakteri dan sel tanaman sekaligus perlu dilakukan.

Perakitan *hybrid promoter* dari berbagai penelitian terdahulu dilakukan dengan mensintesis fragmen yang mengandung beberapa ulangan satu jenis elemen *cis-acting* saja. Lalu fragmen sintetik difusikan pada bagian *upstream MP*. Namun level ekspresi gen yang diregulasi masih belum efektif. Belcher *et al.* (2020) melakukan perakitan *hybrid promoter* dengan memperbanyak keragaman elemen *cis-acting* yang digunakan dalam satu fragmen sintetik. *Hybrid promoter* yang dirakit dari fragmen dengan beragam elemen *cis-acting* memiliki kemampuan regulasi yang lebih tinggi dibanding *hybrid promoter* dengan satu jenis elemen *cis-acting* atau promotor *native*. Oleh karena itu, dalam penelitian ini

fragmen yang difusikan pada *upstream minimal promoter* adalah fragmen yang mengandung elemen *W-Box* (3 varian), *WLE1*, dan *RAVIAAT* dari *PD_CbNPR1* sekaligus. Ketiga varian *W-Box* digunakan karena fungsi tiap varian dalam regulasi ekspresi gen secara *in-vitro* belum diketahui. *Hybrid promoter* yang mengandung lima elemen *cis-acting* tersebut diharapkan mampu meningkatkan level ekspresi gen yang diregulasinya. Menurut Rushton (2016), *hybrid promoter* memiliki peranan penting dalam peningkatan level ekspresi gen-gen target dalam dunia bioteknologi dan berpotensi dalam pengembangan bidang biosintesis dan bioindustri.

Pada penelitian ini, fragmen sintetik yang mengandung elemen *W-Box*, *WLE1*, dan *RAVIAAT* dari *PD_CbNPR1* difusikan di *upstream* T7 Promotor pada plasmid *pET28a(+)*. Sehingga *hybrid promoter* pada plasmid *pET28a(+)* dapat digunakan untuk meregulasi ekspresi gen target yang difusikan pada daerah *multi cloning site (MCS)* plasmid tersebut. Plasmid *pET28a(+)* yang telah dikonstruksi dengan *hybrid promoter* tersebut selanjutnya akan dinamakan dengan *pET28a(+)_HP*. Konstruksi *pET28a(+)_HP* dilakukan sebagai langkah awal pemvalidasian peran elemen-elemen *cis-acting* potensial dari *PD_CbNPR1* dalam regulasi ekspresi gen.

Salah satu penelitian terdahulu yang menggunakan T7 Promotor pada plasmid *pET28a(+)* untuk regulasi ekspresi gen adalah penelitian Gozalia *et al.* (2020). Gen *Rep (CI)* dari geminivirus *PepYLCV (Pepper Yellow Leaf Curl Virus)* dikonstruksikan ke dalam plasmid *pET28a(+)* dan selanjutnya diekspresikan pada sistem bakteri *E. coli BL21*. Protein *Replicase* dengan berat molekul 40,03 kDa berhasil diekspresikan, tetapi konsentrasinya masih rendah. Salah satu upaya peningkatan ekspresi gen bisa dilakukan dengan penggunaan *hybrid promoter* untuk meregulasi ekspresi gen tersebut (Rushton, 2016). Oleh karena itu, pada penelitian ini gen *Rep* digunakan sebagai gen target yang difusikan pada konstruksi plasmid *pET28a(+)_HP*.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah *hybrid promoter* yang mengandung elemen *W-Box*, *WLE1*, dan *RAVIAAT* dari *PD_CbNPR1* dapat dikonstruksi ke plasmid *pET28a(+)*?

2. Apakah konstruk plasmid *pET28a(+)*_HP dapat difusikan dengan gen *Rep*?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengkonstruksi *hybrid promoter* yang mengandung elemen *W-Box*, *WLE1*, dan *RAVIAAT* dari *PD_CbNPR1* pada plasmid *pET28a(+)*. Konstruksi tersebut sebagai langkah awal dalam proses validasi fungsi masing-masing elemen *cis-acting* dalam regulasi ekspresi gen secara *in-vitro*.

D. Manfaat Penelitian

1. Penelitian ini bermanfaat sebagai informasi awal mengenai metode perakitan *hybrid promoter* yang bisa mengatur regulasi peningkatan level ekspresi gen dan alat validasi fungsi elemen *cis-acting* potensial.
2. Manfaat penelitian dalam jangka panjang diharapkan konstruksi *hybrid promoter* yang dihasilkan bisa berperan dalam peningkatan level ekspresi gen-gen target dalam bidang biosintesis dan bioindustri.

