



Transfomasi Genetik : Peluang dan Tantangan

Retno Dwi Andayani*, Widyana Rahmatika, Nur Fitriyah

Program Studi Agroteknologi, Universitas Islam Kadiri, Kediri, Indonesia

* Email: retnodwiandayani@yahoo.co.id

ABSTRACT

Plants have an important role in the development of human civilization. Human civilization progresses along with the development of the agricultural system and vice versa. Therefore humans have been trying to improve cultivated plants for thousands of years by trial and error. Traditionally, mankind have improved plants through repeated selection. However, the human population is increasing so rapidly that it necessitates a doubling of the increase in world food production. The program is constrained by the fact that we cannot increase arable land. So one solution is through biotechnology which is expected to produce more food without demanding an increase in agricultural land. At present, the application of biotechnology in agriculture can be done by genetic engineering such as genetic transformation and gene editing which are almost entirely aimed at forming transgenic plants. One of the developments in biotechnology that has been widely used is GMO (Genetically Modified Organism) or plants that have been genetically modified or are popularly known as transgenic plants. Genetic modification of plants has become the most promising approach for increasing crop yields, providing nutrients, exploiting stressed land, overcoming the energy crisis, and for producing cost-effective biopharmaceuticals.

KEYWORD

Biotechnology, Genetic Modified, Transgenic

INFORMATION

Received : 25 August 2022
Revised : 26 November 2022
Accepted : 12 January 2023

Volume: 23
Number: 1
Year: 2023

Copyright © 2023

by JURNAL ILMIAH AGRINECA

This work is licensed under a
Creative Commons Attribution
4.0 International Licence

1. PENDAHULUAN

Sejak pengembangan tanaman hasil rekayasa genetika pertama tiga puluh tahun yang lalu, teknologi transgenik memiliki pengaruh yang signifikan terhadap perkembangan masyarakat kita dengan meningkatkan produksi tanaman secara luar biasa (Christou (2013); Gilbert (2013)). Teknologi modifikasi genetik memiliki beberapa keunggulan dibandingkan metode pemuliaan dan seleksi tradisional untuk memperbaiki sifat tanaman. Sebagai contoh, pemuliaan tradisional hanya dapat diterapkan jika suatu sifat yang diinginkan dimiliki oleh spesies yang sama, karena anggota dari dua spesies yang berbeda tidak dapat disilangkan. Teknologi modifikasi genetik memungkinkan untuk memasukkan gen ke tanaman untuk merekayasa sifat yang berbeda termasuk ketahanan serangga, toleransi kekeringan, toleransi

herbisida, meningkatkan fotosintesis, fitoremediasi, biofortifikasi dan ketahanan terhadap patogen seperti jamur, bakteri, dan virus (Ahmad, N., & Mukhtar, Z. 2017).

Rekayasa genetika dapat mempercepat pengembangan varietas tanaman. Tanaman hasil rekayasa genetika pertama kali dikomersialkan pada tahun 1996. Sejak saat itu, area budidaya meningkat 100 kali lipat dengan 28 negara menanam tanaman ini (Xiao et al., 2011). Hampir 2000 studi telah dipublikasikan mengevaluasi keamanan tanaman hasil rekayasa genetika, dan sejauh ini hasilnya menunjukkan bahwa dampak pada makanan dan keamanan lingkungan tidak jauh berbeda dengan tanaman yang dibudidayakan secara konvensional. Namun demikian, masih ada skeptisisme terhadap teknologi ini baik resiko terhadap budidaya tanaman dilapangan serta keamanan lingkungannya (James, 2014).

Generasi tanaman modifikasi genetik sejauh ini mengandalkan pengenalan sekuens DNA baru ke genom di lokasi acak. Sehingga gen yang disisipkan dapat mempengaruhi atau menonaktifkan aktivitas gen terdekat yang penting lainnya. Selain itu, banyak ketidaksetujuan atas tanaman modifikasi genetik yang semakin meningkat ketika gen yang disisipkan berasal dari organisme yang berkerabat jauh karena dianggap tidak wajar. Walaupun bukti yang muncul menunjukkan hasil sebaliknya. Misalnya, varietas ubi jalar alami sekarang diketahui mengandung gen-T dari *Agrobacterium tumefaciens* (Rastogi Verma, S. 2013).

Transgenik masuk dalam program pemuliaan tanaman untuk meningkatkan keragaman genetik dan pembentukan perakitan varietas baru (Shafiq et al., 2022). Tanaman transgenik pertama kali dikembangkan pada tahun 1977 yang diawali dengan penemuan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang diketahui berperan sebagai mediator untuk mentransfer DNA atau gen asing ke dalam tanaman melalui T-DNA. Tanaman transgenik pertama yang berhasil dikembangkan pada tahun 1983 yaitu bunga matahari yang disisipi gen dari tanaman buncis. Sementara itu, untuk produk rekayasa genetika pertama yang dipasarkan yaitu jagung dan kedelai transgenik pada tahun 1996 di Amerika Serikat. Sejak itu, pengembangan tanaman transgenik terus dilakukan hingga saat ini (Chumakov & Moiseeva (2012); Patil et al., (2012)).

Peningkatan terbaru dalam teknologi pengurutan DNA, ditambah dengan biaya yang semakin terjangkau, memfasilitasi studi yang tepat tentang genom tumbuhan, hewan, dan manusia yang mendorong ledakan dalam pengetahuan kita tentang genomik. Tantangannya tetap, bagaimanapun, untuk mengubah sejumlah besar data genom menjadi pengetahuan fungsional dan selanjutnya untuk menentukan bagaimana genotip mempengaruhi fenotip (Abdallah et al., 2015).

Transformasi genetik adalah sebuah metode mentransfer gen asing yang diperoleh dari tanaman, hewan, manusia atau mikroorganisme pada suatu spesies tanaman tertentu. Gen asing yang telah diperoleh kemudian direkayasa secara molekuler sehingga bisa disisipkan ke dalam genom tanaman. Gen asing yang telah direkayasa dan disisipkan kedalam tanaman dinamakan transgen, sedangkan tanaman yang tersisipi transgen dikenal sebagai tanaman transgenik.

Tujuan awal pembentukan tanaman transgenik adalah untuk membuat tanaman tahan terhadap hama dan penyakit sehingga dapat meningkatkan produksi tanaman. Seiring dengan perkembangan teknologi, maka tujuan pembentukan tanaman transgenik bukan hanya untuk meningkatkan produksi namun mulai mengarah pada peningkatan kualitas hasil tanaman misal kualitas beras ditingkatkan dengan mengatur kandungan amilosa melalui rekayasa gen Waxy (Wx) (Huang et al., 2021).

Transformasi genetik dapat dilakukan secara langsung dan tidak langsung. Metode secara langsung yaitu proses transformasi tidak melalui perantara untuk menyisipkan gen ke dalam

tanaman, salah satu caranya adalah menggunakan partikel bombardment. Metode transformasi secara tidak langsung dilakukan dengan bantuan perantara, yang paling banyak dilakukan adalah dengan menggunakan bakteri *A.tumefaciens*. *A. tumefaciens* merupakan bakteri gram negatif yang mengandung plasmid Ti yang terdiri dari gen penyandi faktor virulensi dan T-DNA. Bakteri ini menyebabkan infeksi berupa tumor (crown gall) pada tanaman.

Transformasi genetik secara langsung memiliki kelemahan yaitu hasil yang belum maksimal dan biaya yang mahal. Transformasi secara tidak langsung memiliki keunggulan yaitu biaya yang lebih murah, teknik lebih sederhana, memiliki efisiensi yang tinggi, dan mampu mentransfer gen dengan ukuran yang besar (Silalahi, et al., 2021), sehingga umumnya metode ini yang lebih banyak digunakan.

2. Tahapan Transformasi Genetik

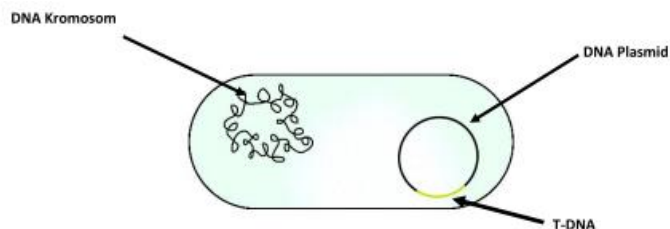
Tahapan proses transformasi genetik pada tanaman yaitu Inseri transgen, integrasi transgen dan ekspresi transgen. Pada proses inseri diperlukan metode tertentu agar transgen dapat masuk ke dalam sel tanaman. Metode inseri dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, diantaranya adalah (Opabode, 2006):

2.1. *Agrobacterium mediated transformation* (metode transformasi dengan bantuan agrobakterium)

A.tumefaciens memiliki DNA yang terletak didalam kromosom dan DNA plasmid yang terletak di luar kromosom dan berbentuk melingkar (Gambar 2). DNA yang telah disisipkan pada plasmid akan terintegrasi kedalam genom tanaman ketika *A.tumefaciens* menginfeksi tanaman. Proses ini memiliki efek samping menyebabkan tumor terutama pada tanaman dikotil. DNA yang terintegrasi pada tanaman disebut sebagai T-DNA (Transferred DNA), sedangkan plasmid yang membawa T-DNA disebut Ti-plasmid (Ti - tumor inducing). Plasmid tersebut diisolasi, kemudian dilakukan modifikasi sebagai berikut :

- a. Gen untuk sintesis auksin dan sitokinin dihilangkan supaya tidak terbentuk tumor
- b. Gen sintesis opine juga dihilangkan karena produksi opine oleh sel tanaman akan mengganggu pertumbuhan sel tanaman disebabkan terpakainya fotosintat untuk sintesis opine
- c. Ukuran plasmid yang besar (\pm 200 kbp) diperkecil dengan membuang segmen DNA yang tidak diperlukan
- d. Ori (*Origin of replication*) untuk *E.coli* harus ditambahkan, agar plasmid dapat diperbanyak dalam *E.coli*. Bakteri *E.coli* memiliki kemampuan yang cepat dalam replikasi plasmid, sehingga dalam rekayasa genetika digunakan untuk kloning
- e. Pada T-DNA kemudian disisipkan konstruksi gen yang diinginkan.

Selanjutnya, plasmid modifikasi yang sudah membawa gen yang diinginkan ditransformasi ke dalam *A. tumefaciens* kembali dan digunakan untuk mentransfer gen ke genom tanaman. Ketika sel *A. tumefaciens* diinfeksi ke dalam tanaman, maka T-DNA akan diintegrasikan ke dalam genom tanaman (Malke, 2004)



Gambar 2. DNA Plasmid [16]

Sebagian besar plasmid Ti memiliki beberapa kompleks gen yaitu :

a. T-DNA

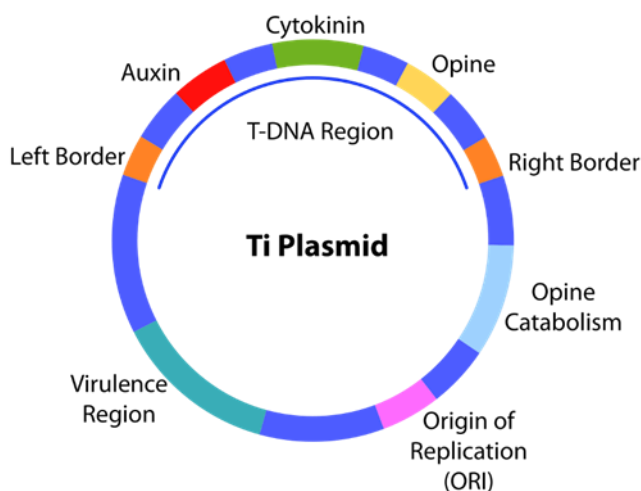
Merupakan bagian yang ditransfer dan menyatu dengan genom tanaman. T-DNA dalam plasmid dibatasi oleh Left Border (LB) serta Right Border (RB) yang panjangnya 25 bp. T-DNA berisi 2 kompleks gen, yang pertama gen pengkode pembentukan hormon auksin dan sitokinin. Ketika T-DNA berhasil terintegrasi ke dalam gen tanaman, maka gen ini akan terekspresi dan tanaman mulai memproduksi auksin dan sitokinin secara berlebihan yang menstimulasi pertumbuhan sel yang tidak terorganisir dan terbentuklah tumor. Yang kedua adalah kompleks gen yang mensintesis opine. Opine merupakan salah satu sumber karbon untuk pertumbuhan *Agrobacterium*.

b. Gen virulen (*vir*)

Terdiri dari 50 bp untuk mengatur proses transfer T-DNA ke dalam DNA tanaman namun gen ini tidak ikut ditransfer. Gen *vir* mengkode protein-protein yang bertugas untuk mentransfer T-DNA. Secara alamiah, pembentukan tumor akibat infeksi *A. tumefaciens* menyebabkan sel tanaman luka dan menghasilkan asetosiringon (AS) yaitu suatu senyawa yang berfungsi sebagai pemicu. AS mengaktifkan sekelompok gen Vir pada plasmid sehingga menyebabkan gen Vir terekspresi dan menghasilkan protein Vir. Protein Vir yang dihasilkan memungkinkan terjadinya transfer T-DNA ke genom tanaman. Protein Vir inilah yang membantu terlepasnya T-DNA sehingga masuk ke sitoplasma, kemudian ke inti sel dan terintegrasi ke DNA pada kromosom. Selanjutnya T-DNA terekspresi dan secara fenotipik terlihat sebagai tumor

c. Gen *tra/trb*

Berfungsi sebagai pengatur perpindahan plasmid Ti antar bakteri juga berfungsi sebagai bagian yang mengatur sistem replikasi plasmid



Gambar 3. Peta Plasmid Ti

2.2 Biolistic bombardment (penembakan dengan mikroproyektil)

Penggunaan plasmid *Ti A. tumefaciens* untuk transformasi sel untuk tanaman monokotil tidak memberikan hasil yang bagus seperti pada tanaman dikotil. Sehingga dikembangkan metode baru untuk memasukkan DNA asing ke dalam tanaman dengan menggunakan alat biolistic gun bombardment. Proses ini dilakukan dengan melapisi suatu proyektil berbahan tungsten dengan molekul DNA yang akan disisipkan dan kemudian ditembakkan ke dalam sel tanaman.

2.3 Electroporation (elektroforasi)

Proses ini diawali dengan membuat sel tanaman melepaskan dinding sel sehingga menjadi protoplas dengan cara memberikan kejutan listrik dengan voltase tinggi untuk membuka pori membran sel. DNA asing didekatkan ke protoplas dan masuk ke dalam sel agar terintegrasi dengan DNA tanaman. Kemudian dinding sel dikembalikan. Sel yang telah di elektroporasi kemudian di seleksi untuk mengetahui sel mana yang berhasil disisipi gen asing dengan cara menumbuhkan dalam media antibiotik melalui kultur jaringan.

2.4. Fusi Protoplas

Merupakan proses pemindahan gen dari satu tanaman ke tanaman yang lain. Sebelum difusikan, sel harus dibuat menjadi protoplas terlebih dahulu, baru kemudian protoplas-protoplas difusikan. Kemudian protoplas hasil fusi diregenerasi menjadi menjadi sel utuh. Teknik ini pada dasarnya mirip dengan teknik persilangan namun fusi protoplas mampu mengatasi kendala ketidaksesuaian genetik.

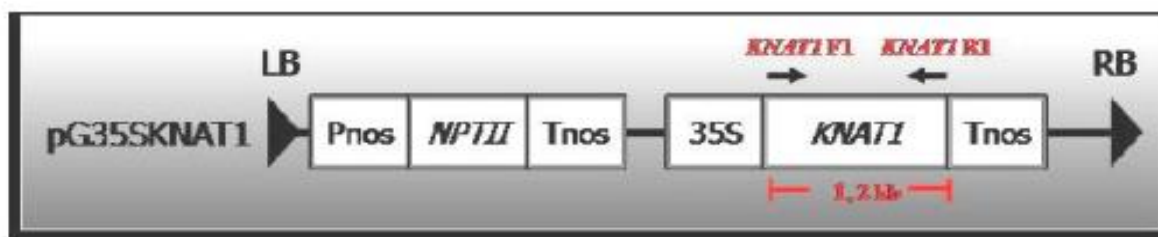
2.5. Konstruksi Gen

Konstruksi gen dibuat menyerupai kondisi gen di alam, yakni terdiri dari [Dwiyani et al.\(2016\)](#):

- a. **Promoter** sebagai penginisiasi dan pengarah ekspresi gen, contohnya adalah promoter yang berasal dari:
 - *A. tumefaciens* dan *A. rhizogones* : nos (nopaline synthase), ocs (octopine synthase), mas (mannopine synthase)
 - Dari Cauliflower mosaic virus (CaMV) : 35S RNA, 19S RNA
 - Dari Jagung : Adh1-Alcohol dehydrogenase1
- b. **Terminator** sebagai pengakhir ekspresi
- c. **Selectable marker** untuk seleksi awal dari sel tanaman yang ditransformasi, sehingga diketahui sel yang diduga terinsersi oleh transgen yang digunakan dalam transformasi. Yang baik digunakan untuk selectable marker adalah gen dimana secara alamiah tidak dimiliki oleh tanaman. Beberapa contoh selectable marker adalah :
 - lux : luciferase (firefly) : secara normal tanaman tidak ada yang memiliki aktivitas luciferase (visual marker)
 - gus : β -glucuronidase : mengkode enzim β glucuronidase dari *E.coli*, Enzim yang aktif bisa dideteksi dengan X-gal, yang dapat membentuk warna biru yang intensif akibat proses enzimatik
 - GFP (Green Fluorescent Protein) jellyfish : Sel yang mengekspresikan GFP akan memendar hijau pada cahaya biru. Tidak memerlukan substrat atau kofaktor
 - Gen ketahanan terhadap antibiotik : NPTII (terhadap kanamisin), HPT IV (terhadap higromisin)
 - Gen ketahanan terhadap herbisida : dhfr (resistant to methotrexate)

Contoh konstruksi T-DNA dalam *Agrobacterium* dapat dilihat pada Gambar 4. Pada konstruksi ini, gen KNAT1 adalah gene of interest, sebagai selectable marker digunakan gen

NPTII. Pada masing-masing gen, baik KNAT1 maupun NPTII, keduanya disertai dengan promoter (Pnos untuk gen NPTII dan 35S RNA dari CaMV untuk gen KNAT1). Konstruksi gen ini disisipkan ke dalam vektor pGreen (pG). Dari gambar konstruksi gen ini, jelas terlihat bahwa setiap gen yang disisipkan pada T-DNA harus memiliki promoter (Pnos untuk gen NPTII, 35S RNA dari CaMV untuk gen KNAT1) dan memiliki terminator (Tnos untuk gen NPTII dan gen KNAT1) (Dwiyani et al., 2016).



Gambar 4. Contoh konstruksi DNA

Ket : Plasmid biner pGreen digunakan sebagai vektor

Gen KNAT1 dikontrol oleh promoter 35S dari Cauli flower Mosaic Virus (CaMV)

RB = Right Border, LB = Left Border

Pnos = promoter dari gen nopal synthase

Tnos = polyadenylation site dari gen nopal synthase

NPTII = Gen neomycin phosphotransferase yaitu gen ketahanan untuk antibiotik kanamisin

KNAT1 F1 dan KNAT1 R1 = oligonukleotida primer spesifik untuk mengamplifikasi gen KNAT1 sepanjang 1,2 kb [17]

3. Terobosan Transformasi Genetik – In Planta

3.1. Terobosan Transformasi Genetik

Mekanisme transformasi genetik pada awalnya dilakukan secara in vitro, namun seiring perkembangan teknologi, transformasi genetik juga dapat dilakukan secara in vivo atau disebut juga dengan nama in planta. Teknologi ini sendiri masih jarang digunakan di Indonesia sehingga informasinya masih sulit diperoleh.

Perbedaan in vitro dan in planta adalah in vitro merupakan metode perbanyakan tanaman di dalam botol dengan kondisi lingkungan terkendali dan dalam kondisi aseptis. Efisiensi metode ini masih cukup rendah karena eksplan yang di infeksi rentan terhadap kontaminasi dan browning (Semiarti et al., 2007). Kontaminasi bisa disebabkan oleh mikroorganisme yang masih terbawa eksplan atau *A. tumefaciens* yang masih terbawa saat seleksi menggunakan cefotaxim yang kurang sempurna (Jakhar et al., 2019). Serta morfogenesis dan organogenesis membutuhkan waktu yang lama

Secara umum transformasi genetik in vitro membutuhkan tahapan yang panjang. Tahap pertama adalah inisiasi yaitu tahap perbanyakan eksplan berupa kalus, protoplas, tunas ataupun organ lainnya dan membutuhkan waktu 1-2 bulan. Tahap kedua yaitu infeksi untuk mentransfer T-DNA melalui *A. tumefaciens* dan dilanjutkan tahap ko-kultivasi dengan penambahan asetosiringone untuk mengoptimalkan infeksi yang membutuhkan waktu kurang lebih 3 hari (Dwiyani et al., 2016). Kemudian tahap resting dengan menambahkan cefotaxime untuk menonaktifkan atau menghilangkan *Agrobacterium*. Pada tahapan ini dapat dilakukan sampai 3 kali hingga eksplan steril dari bakteri. Setelah itu dilakukan seleksi sebanyak 3-5 kali. Tahap selanjutnya yaitu tahap pertumbuhan hingga membentuk tunas untuk dilakukan. Tahap terakhir adalah aklimatisasi dengan memperhatikan faktor lingkungan untuk mengurangi tingkat kematian planlet. Setelah tahap aklimatisasi biasanya akan ada analisis molekuler untuk memastikan apakah transgen sudah terintegrasi stabil kedalam genom tanaman, proses ini bisa dilakukan dengan PCR (polymerase Chain Reaction)

atau metode hybridisasi seperti southern blotted, northern blotted dan western blotted. Perolehan tanaman transgenik secara in vitro dibutuhkan waktu 5-6 bulan (Fauzi et al., 2014).

Transformasi genetik In planta adalah proses insersi gen dengan Agrobacterium yang dilakukan tanpa melalui proses in vitro dalam proses infeksi. Sehingga proses penginfeksi dilakukan secara langsung pada target organ tanaman di lapangan. Berbagai macam organ yang telah dikembangkan dengan teknik in planta adalah biji, kecambah, tunas, pucuk, bunga dan buah. Metode in planta memiliki keunggulan persentase tanaman transforman yang lebih tinggi tanpa memerlukan kondisi steril, dengan biaya terjangkau serta tanpa munculnya variasi somaklonal (Chumakov & Moiseeva (2012); Patil et al., (2012)). Tahapan dalam transformasi in planta hanya meliputi proses infeksi dan seleksi serta hanya membutuhkan waktu sekitar 1-2 bulan.

3.2. Metode Transformasi secara In Planta

3.2.1. Floral Dip

Floral dip merupakan metode transformasi genetik yang paling simpel dengan tingkat efisiensi yang tinggi (Irsyadi (2022); Yasmeen et al., (2009)) . Floral dip merupakan metode transformasi genetik dengan mencelupkan organ target (bunga) ke dalam suspensi Agrobacterium dengan waktu infeksi berkisar antara 5-10 detik [14]. Metode ini efektif untuk tanaman sereal atau tanaman yang menghasilkan biji secara langsung tanpa menunggu proses pematangan buah (Irsyadi, 2022). Teknik floral dip telah banyak digunakan pada tanaman jagung (Patil et al., 2012), bunga kosmos (Fatumi, N. C., 2020), Arabidopsis thaliana (Clough, S. J., & Bent, A. F. 1998), tomat (Yasmeen et al., 2009) dan padi (Rod-in et al., 2014)

3.2.2. Perendaman

Metode perendaman dapat digunakan untuk organ yang lunak pada tanaman, seperti meristematis, umbi atau bibit tanaman. Proses infeksi *A. tumefaciens* dapat dilakukan dengan merendam organ target selama beberapa waktu, beberapa penelitian menyebutkan bahwa perendaman 1–24 jam menunjukkan hasil yang optimal (Fatumi, N. C., (2020); Mertawan et al., (2018)) Metode perendaman telah banyak dilakukan pada bibit anggur bali selama 2 jam Mertawan et al., (2018), *A. thaliana* (Clough, S. J., & Bent, A. F. 1998) dan biji jeruk (Suputri et al., 2019).

3.2.3. Vakum Infiltrasi

Merupakan metode transformasi dengan menyerap udara di dalam tabung bertekanan dengan tujuan agar Agrobacterium dapat terinsersi lebih dalam. Pada metode ini membutuhkan tabung dan pompa semisal menggunakan vacum desikator yang disambungkan dengan pompa vakum. Tingkat efisiensi metode vakum infiltrasi lebih tinggi dibandingkan dengan metode perendaman, namun ketersediaan alat serta biaya yang cukup tinggi membuat metode ini kurang diminati

3.2.4. Injeksi

Injeksi merupakan salah satu metode transformasi genetik dengan cara memasukkan suspensi Agrobacterium ke dalam jaringan target dengan cara injeksi/ penyuntikan dengan tujuan untuk memaksimalkan tingkat infeksi. Metode ini lebih sering digunakan pada organ buah yang telah masak karena memiliki sel yang lebih besar dan dinding sel telah melunak. Perbandingan tingkat efisiensi pada berbagai metode transformasi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Prosentase Efisiensi pada berbagai metode transformasi

Metode	Kultivar	% Efisiensi	Referensi
--------	----------	-------------	-----------

Floral dip	<i>Solanum lycopersicum</i>	23,00	Yasmeen et al, (2009)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1,00	Zhang et al (2017),Bent (2006)
	<i>Citrus sulphureus</i>	60,00	Irsyadi, (2022)
	<i>Oriza sativa</i>	12,70	Rod-in et al, (2014)
	<i>Zea mays</i>	3,30	Patil et al, (2012)

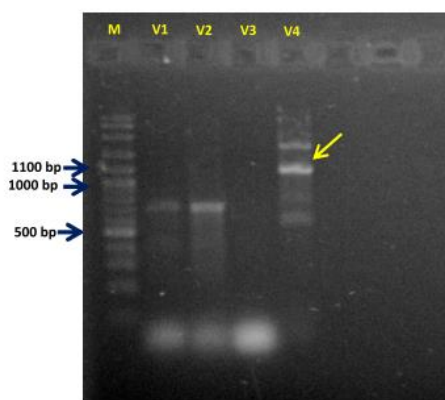
Perendaman	<i>Citrus maxima</i>	20,41	Zhang et al (2017)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,32	Feldmann, & David (1987)
	<i>Vitis vinivera L.</i>	0,20	Mertawan et al, (2018)
Vakum infiltrasi	<i>Saccharum officinarum</i>	29,60	Mayavan et al, (2015)
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,56	Clough, & Bent (1998)
	<i>Trichosanthes cucumerina</i>	19,60	Subramanyam et al, (2015)
Injeksi	<i>Citrus maxima</i>	5,00	Ahmad & Mirza (2005)
	<i>Solanum lycopersicum</i>	43,00	Yasmeen et al, (2009)
	<i>Oriza sativa</i>	40,00	Supartana et al, (2005)

3.3 Deteksi Gen Secara Molekuler

Deteksi molekuler digunakan untuk mengkonfirmasi introduksi T-DNA yang masuk ke dalam genom tanaman melalui deteksi gen penanda menggunakan mesin PCR (Polymerase Chain Reaction). Bahan yang dibutuhkan untuk reaksi PCR yaitu : DNA polymerase, Deoksiribonukleotida terifosfat (dNTPs), DNA template, sepasang primer forward dan reverse serta buffer (Yustinadewi et al., 2018).

Gen target disesuaikan dengan gen pada T-DNA. Gen target yang umum digunakan untuk deteksi gen dalam PCR yaitu nptII sebagai ketahanan genetik kanamisin, hpt untuk ketahanan genetik hygromisin serta β -Glucuronidase (gus A) dan gfp sebagai gen reporter ekspresi (Subramanyam et al., (2015), Zhang et al (2017)). Hasil PCR kemudian dielektroforesis pada gel agarose menggunakan elektroforasi dan kemudian divisualisasikan pada UV transilluminator (Irsyadi, 2022).

Sebagai contoh adalah konfirmasi keberadaan transgen PaFT dengan menggunakan PCR. Primer yang digunakan adalah primer Ubiquitin (forward: 5'-TTGTCGATGCTCACCCTG-3') dan tnos (reverse : 5'-GATCTAGTAACATAGATGACACCGCG-3'). Dengan menggunakan primer ini, maka DNA yang harus teramplifikasi sepanjang 1100 bp untuk konfirmasi bahwa transgen sudah terintegrasi ke genom tanaman. Dari 5 sampel kandidat yang dicoba, 4 sampel diantaranya mengamplifikasi pita DNA sepanjang 1100 bp (Gambar 5).



Gambar 5. Hasil Elektroforesis, M = marka, Vi,V2,V3,V4 = sampel, tanda panah menunjukkan panjang pita 110 bp yang teramplifikasi [27]

4. KESIMPULAN

Teknologi transformasi genetik akan terus berkembang. Teknologi ini menunjukkan potensi besar dalam memperbaiki sifat-sifat agronomi atau menciptakan sifat agronomi baru dan meningkatkan produksi obat dengan mengubah jalur metabolisme atau membangun jalur metabolisme baru seperti pada kedelai dengan kandungan minyak oleat yang tinggi. Transformasi genetik juga berperan dalam meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman biotik dan abiotik. Namun demikian masih banyak yang perlu dilakukan untuk memperbaiki teknologi transformasi genetik seperti bagaimana meningkatkan efisiensi transformasi genetik pada berbagai metode. Selain itu juga diperlukan strategi untuk menghilangkan penanda seleksi dari tanaman transgenik.

Penanda berbasis antibiotik adalah penanda seleksi yang paling banyak digunakan. Namun penggunaan antibiotik yang berlebihan menimbulkan masalah kesehatan dan menjadi hambatan untuk aplikasi komersial tanaman GMO. Selain itu penanda antibiotik juga menimbulkan gangguan metabolisme pada kapasitas sintesis protein. Sehingga perlu diupayakan dengan berbagai pendekatan untuk mengatasi masalah ini

DAFTAR PUSTAKA

- Abdallah, N. A., Prakash, C. S., & McHughen, A. G. (2015). Genome editing for crop improvement: challenges and opportunities. *GM Crops & Food*, 6(4), 183-205.
- Ahmad, M., & Mirza, B. (2005). An efficient protocol for transient transformation of intact fruit and transgene expression in Citrus. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23, 419-420.
- Ahmad, N., & Mukhtar, Z. (2017). Genetic manipulations in crops: Challenges and opportunities. *Genomics*, 109(5-6), 494-505.
- Bent, A. (2006). Arabidopsis thaliana floral dip transformation method. *Agrobacterium protocols*, 87-104.
- Christou, P. (2013). Plant genetic engineering and agricultural biotechnology 1983–2013. *Trends in biotechnology*, 31(3), 125-127.
- Chumakov, M. I., & Moiseeva, E. M. (2012). Technologies of Agrobacterium plant transformation in planta. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 657-666.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The plant journal*, 16(6), 735-743.
- Dwiyani, R., Yuswanti, H., Darmawati, I. A. P., & Mayadewi, N. N. (2016). Transformasi Genetik pada Tanaman Melalui Agrobacterium tumefaciens. *Swasta Nulus. Bali*.
- Fatumi, N. C. (2020). *pengembangan metode transformasi genetik secara in planta pada tanaman kosmos (Cosmos sulphureus Cav.)* (Doctoral dissertation, Universitas Gadjah Mada).
- Fauzi, M. I., Yelli, F., Edy, A., & Utomo, S. D. (2014). Regenerasi in vitro empat varietas kedelai (Glycine max [L.] Merr.) melalui organogenesis menggunakan eksplan biji yang diimbibisi dan dikecambahkan. *Jurnal Agrotek Tropika*, 2(2).
- Feldmann, K. A., & David Marks, M. (1987). Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of Arabidopsis thaliana: a non-tissue culture approach. *Molecular and General Genetics MGG*, 208(1-2), 1-9.
- Gilbert, N. (2013). A hard look at GM crops. *Nature*, 497(7447), 24.
- Huang, X., Su, F., Huang, S., Mei, F., Niu, X., Ma, C., ... & Zhang, J. (2021). Novel Wx alleles generated by base editing for improvement of rice grain quality. *Journal of integrative plant biology*, 63(9), 1632-1638.

- Irsyadi, M. B. (2022). *Penyisipan gen SoSPS1 secara floral dip melalui Agrobacterium tumefaciens pada tanaman kosmos (Cosmos sulphureus Cav.)* (Doctoral dissertation, Thesis]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.[Indonesia].
- Jakhar, M. L., Verma, R., & Dixit, D. (2019). Effect of antioxidants on in vitro degree of browning and culture establishment of Guggul [*Commiphora wightii* (Arnott)]: A valuable desert medicinal plant. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(5S), 250-254.
- James, C. (2014). ISAAA Briefs brief 49 Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014.
- Malke, H. (2004). Plasmid Biology. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(6), 372.
- Mayavan, S., Subramanyam, K., Jaganath, B., Sathish, D., Manickavasagam, M., & Ganapathi, A. (2015). *Agrobacterium*-mediated in planta genetic transformation of sugarcane setts. *Plant Cell Reports*, 34, 1835-1848.
- Mertawan, I. G. A. I., Dwiyani, R., & Yuswanti, H. (2018). Transformasi Gen SoSPS1 Melalui *Agrobacterium tumefaciens* Pada Tanaman Anggur Bali (*Vitis Vinifera* L. Var. Alphonso Lavalle) Secara In Planta. *Agrotrop*, 8(1), 93-102.
- Opabode, J. T. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(1), 12-20.
- Patil, S., Nayak, G., Barve, S., Tembe, R., Khan, R., & Trivedi, M. (2012). Impact of biofield treatment on growth and anatomical characteristics of *Pogostemon cablin* (Benth.). *Biotechnology*, 3(11), 154-162.
- Rastogi Verma, S. (2013). Genetically modified plants: public and scientific perceptions. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Rod-in, W., Sujipuli, K., & Ratanasut, K. (2014). The floral-dip method for rice (*Oryza sativa*) transformation. *J. Agric. Technol*, 10(2), 467-474.
- Semiarti, E., Indrianto, A., Purwantoro, A., Isminingsih, S., Suseno, N., Ishikawa, T., ... & Machida, C. (2007). *Agrobacterium*-mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Biotechnology*, 24(3), 265-272.
- Shafiq, M., Ashraf, T., Mushtaq, S., Anjum, N., Asim, M., Feroze, M. A., ... & Aziz, M. (2022). Response of Different (*Capsicum annuum* L.) Genotypes for Callus Induction, Plant Regeneration and Plant Transformation. *Sarhad Journal of Agriculture*, 38(4), 1332-1343.
- Silalahi, D., Wirawan, I. G. P., & Sritamin, D. M. (2021). Transformasi Genetik Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) dengan Gen *acvB* Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumefaciens*. *Agrotrop J. Agric. Sci*, 11(1), 63.
- Subramanyam, K., Arunachalam, C., Thaneswari, R. M., Sulaiman, A. A., Manickavasagam, M., & Ganapathi, A. (2015). Highly efficient *Agrobacterium*-mediated in planta genetic transformation of snake gourd (*Tricosanthes cucumerina* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123, 133-142.
- Supartana, P., Shimizu, T., Shioiri, H., Nogawa, M., Nozue, M., & Kojima, M. (2005). Development of simple and efficient in planta transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 100(4), 391-397.
- Suputri, N. P. A. E. O., Dwiyani, R., Darmawanti, I. A. P., & Sugiharto, B. (2019). *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated in Planta Transformation Method for the SoSPS1 Gene in Citrus Plants (*Citrus nobilis* L.). *Int. J. Biosci. Biotechnol*, 7(1), 31-44.
- Xiao, X., Wu, Z. C., & Chou, K. C. (2011). A multi-label classifier for predicting the subcellular localization of gram-negative bacterial proteins with both single and multiple sites. *PloS one*, 6(6), e20592.
- Yasmeen, A., Mirza, B., Inayatullah, S., Safdar, N., Jamil, M., Ali, S., & Choudhry, M. F. (2009). In planta transformation of tomato. *Plant molecular biology reporter*, 27, 20-28.

- Yustinadewi, P. D., Yustiantara, P. S., & Narayani, I. (2018). MDR-1 gene 1199 variant primer design techniques in pediatric patient buffy coat samples with LLA. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*.
- Zhang, Y. Y., Zhang, D. M., Zhong, Y., Chang, X. J., Hu, M. L., & Cheng, C. Z. (2017). A simple and efficient in planta transformation method for pommelo (*Citrus maxima*) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Scientia Horticulturae*, 214, 174-179.