

TANAMAN TRANSGENIK

CARA MANIPULASI KROMOSOM

▣ Seleksi galur murni

Memilih galur dari sejumlah populasi yg mempunyai variabilitas genetik besar untuk mendapatkan galur tanaman yang memiliki sifat-sifat yg dikehendaki.

Kelemahannya perlu waktu cukup lama tentukan galur terpilih (tahunan).

CARA MANIPULASI KROMOSOM

▣ Hibridisasi

Melakukan persilangan/hibridisasi antar dua individu galur homozigot (hasil inbreeding self-pollinating plants) atau dengan fusi protoplas.

Kelemahan metoda hibridisasi:

1. hanya bisa dilakukan untuk tanaman yang mempunyai hubungan kekerabatan dekat
2. sifat genetik & fisiologis baru hasil hibrid tidak dapat diatur dan dikendalikan
3. Umumnya perlu waktu lama utk peroleh galur dengan sifat baru yg diinginkan

Teknik fusi protoplasma:

- ▣ Degradasi dinding sel (dg enzim) → + PEG (polietilen glikol) atau
- ▣ Rangsangan listrik (electric fusion) → kontak protoplas; dapat mengatasi masalah inkompatible

Kelemahan Metode fusi protoplasma

1. Pemunculan sifat baru juga tidak dapat diprediksi atau dikendalikan
2. Sangat tergantung pada proses rekombinasi genetik yg terjadi selama proses fusi.

CARA MANIPULASI KROMOSOM

▣ Mutasi

Menginduksi mutasi secara spontan atau dengan gunakan agensia mutagen kimia/fisik (radiasi) sehingga diperoleh tanaman mutan dan dilanjutkan dengan menguji dan menyeleksi tanaman mutan.

Kelemahan metoda radiasi:

1. Sifat baru tidak dapat diprediksi, bahkan mungkin merusak sifat-sifat genetis/fisiologis yang unggul (radiasi merusak komposisi genetik)
2. Biaya mahal dan relatif sulit bila radiasi dilakukan dengan menggunakan unsur radioaktif
3. Sifat-sifat yang muncul akibat radiasi mungkin tidak stabil

CARA MANIPULASI KROMOSOM

▣ Poliploidi

Menduplikasi kromosom dengan menggunakan kolkisin yang dapat merusak pembentukan benang gelendong pada pembelahan sel

Tanaman poliploid cenderung mempunyai ukuran lebih besar, daun lebih tebal dan respons terhadap lingkungan

SEJARAH TANAMAN TRANSGENIK

- ▣ Diawali oleh kegiatan seleksi genetik untuk pemuliaan tanaman sejak tahun 8000 SM
- ▣ Ditemukannya bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang dapat mentransfer DNA ke tanaman pada tahun 1977
- ▣ Dikembangkannya tanaman transgenik pada tahun 1983
- ▣ Dipublikasikan hasil tanaman transgenik untuk pertama kalinya pada tahun 1996

DEFENISI TANAMAN TRANSGENIK

Tanaman transgenik adalah tanaman yang telah memiliki gen asing dari spesies tanaman yang berbeda atau makhluk hidup lainnya untuk memperoleh sifat-sifat yang diinginkan

TAHAPAN PEMBUATAN TANAMAN TRANSGENIK

A. Isolasi DNA yang akan di klon



B. Pemotongan DNA dengan endonuklease restriksi



C. Penyambungan DNA - DNA vektor gunakan DNA ligase



D. Tranformasi sel inang dengan DNA rekombinan hasil ligasi



E. Analisis & konfirmasi DNA rekombinan dlm sel inang



F. Karakterisasi fungsional gen yg diklon

ISOLASI DNA

- 1) Isolasi DNA genom, Memecah sel dg beberapa agensia, baik secara fisik maupun kimiawi :
 - a) secara fisik: gunakan sonikator, alat yg hasilkan suara dg frekuensi ultra tinggi. Sel disuspensikan dlm senyawa buffer → ujung sonikator masukkan ke dlm suspensi sel. Cara ini efektif untuk memecahkan sel bakteri, tetapi kurang efektif untuk sel eukariota tingkat tinggi (tanaman) .
 - b) Menggunakan enzim lizozim yang dikombinasi dg perlakuan fisik (mis. pemanasan) → lebih mudah pecah
 - c) Menggunakan CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide); biasanya untuk jaringan tanaman

2) Pemurnian DNA;

Dilakukan dengan kit yg terdiri dari partikel sangat halus yang dapat mengikat DNA tapi tidak ikat molekul lain yg ada di dalam sel

3) Pembersihan genom dari RNA, protein, dan sisa-sisa sel

4) Isolasi fragmen DNA tertentu dengan memotong DNA genom menggunakan:

- Enzim endonuklease restriksi tertentu
- Cara mekanis; mis.degan menggunakan sonikator (jarang dilakukan karena ujung tidak beraturan).

Teknik kloning dengan cara isolasi DNA genom disebut juga sbg kloning secara acak atau kloning genomik.

2) Isolasi mRNA dan pembuatan cDNA

Isolasi mRNA → diubah jadi turunan DNA (cDNA) menggunakan bantuan transkriptase balik (reverse transcriptase)

3) Pembuatan gen sintetis

Gen-gen berukuran besar harus sintesis secara bertahap untuk memperoleh urutan nukleotidanya dg teknik DNA sequencing.

Mungkin bisa dihasilkan “gen” baru yg sama sekali blm pernah ada di alam → blm tentu dpt diekspresikan jadi rangkaian as.amino suatu protein fungsional.

4) Amplifikasi DNA dengan teknik PCR (Polymerase Chain Reaction), reaksi berantai polimerase. Amplifikasi ini dilakukan secara in vitro dg gunakan:

1. Enzim DNA polimerase; umumnya dari bakteri thermotoleran, enzim Taq DNA polymerase; tahan thd suhu sangat tinggi (95 - 100 °C); DNA cetakan hrs didenaturasi (dipisahkan ikatan antar untaiannya) dg perlakuan panas. Kini juga ada Tth DNA polymerase dan Pwo DNA polymerase.
2. dNTP - dinukleotida triphosphat: dATP, dTTP, dCTP, dan dGTP; sbg bahan dasar utk buat untai DNA karena mol. DNA disusun oleh keemoat nukleotida tsb.
3. Oligonukleotida primer, molekul nukleotida berukuran pendek (10-30 basa nukleotida); yg diperlukan dlm awali proses sintesis DNA, urutan basa tsb ditentukan agar dpt nempel (komplementer) pd mol. DNA detakan yg akan disalin / amplifikasi; dpt dibuat sintesis kimiawi.

4. Molekul DNA cetakan / DNA template, molekul DNA yg urutan nukleotidanya akan disalin. DNA cetakan diisolasi dari sel → digunakan sebagai cetakan yg akan dibaca oleh enzim DNA polimerase utk membuat salinan urutan nukleotida.

- Campur keempat komponen tersebut dalam tabung Eppendorf
- Masukkan ke dlm thermo-cycler (dpt diatur utk buat suatu siklus perubahan suhu yg diperlukan dlm amplifikasi DNA). Suhu alat diatur $95-100^{\circ}\text{C}$, ± 5 menit untuk denaturasi DNA sehingga kedua untaiannya terpisah. Pemisahan untaiian diperlukan agar oligonukleotida primer dapat menempel.

Pemisahan untai diperlukan agar oligonukleotida primer dapat menempel.

- Suhu alat diturunkan sesuai utk penempelan primer pd DNA cetakan ($\pm 50-60$ °C); tepatnya tergantung urutan basa nukleotida primernya.
- Naikkan 72 °C utk polimerisasi.

Siklus perubahan suhu berulang-ulang (25-35 kali) untuk mendapatkan molekul DNA baru berlipat ganda

PEMOTONGAN DNA

Pemotongan DNA menggunakan enzim endonuklease restriksi yang diisolasi terutama dari sel prokariota; diklasifikasi (3 tipe) berdasarkan titik pengenalan dan titik potong (recognition site and restriction site). Hasil pemotongan: ujung tumpul (lebih sulit disambung lagi oleh DNA ligase) dan ujung kohesif (sticky → mudah disambung).

Bila 2 macam DNA yg asalnya beda tapi punya daerah pengenalan oleh enzim yg sama dipotong dengan enzim restriksi yg sama sehingga kedua molekul DNA akan mempunyai ujung-ujung yang komplementer.

PENYAMBUNGAN DNA (ligasi DNA)

Penyambungan molekul DNA dapat menggunakan enzim DNA ligase yang gennya berasal dari:

1. Genom virus (bakteriofag) T4 → T4 DNA ligase mampu menyambungkan DNA ujung kohesif maupun tumpul dan mampu menyambungkan RNA dan DNA
2. Genom bakteri E. coli yang hanya mampu menyambungkan 2 ujung yang kohesif.

Bila molekul DNA yg akan diligasi mempunyai ujung-ujung yg tdk sama (karena merupakan hasil pemotongan enzim restriksi yg berbeda), maka penyambungan dilakukan dengan beberapa modifikasi:

- 1) Penambahan adaptor atau penyambung / linker
- 2) Pembentukan ekor homopolimer pd ujung DNA
- 3) Pengisian ujung-ujung DNA kohesif
- 4) Penghilangan ujung DNA kohesif

Adaptor: molekul oligonukleotida sintetik yg urutan nukleotidanya dirancang → masing-masing ujung adaptor bersifat komplementer dg masing-masing ujung DNA yg akan disambung.

Linker : molekul oligonukleotida sintetik yg dpt penyambungan sendiri membentuk molekul untai ganda berujung tumpul tetapi mempunyai urutan nukleotida yg dikenali oleh enzim restriksi tertentu.

Linker difosforilasi dengan enzim polinukleotida kinase → disambung dg DNA berujung tumpul dg metoda penyambungan ujung tumpul.

Ekor homopolimer: molekul deoksiribonukleotida yg terdiri atas 1 macam nukleotida dan ditambahkan pd ujung 3' suatu molekul DNA untai tunggal/ ganda sehingga DNA tersebut dapat membentuk rekombinan dengan DNA lain yang mempunyai ekor homopolimer yg komplementer.

Penambahan Ekor homopolimer dilakukan dengan menggunakan aktivitas enzim calf thymus terminal deoxynucle-otidyl transferase.

Pengisian ujung kohesif dilakukan dengan menggunakan aktivitas enzim DNA polimerase.

DNA vektor; merupakan vektor buatan yang struktur dasarnya dari komponen genetik alami dan yang secara khusus dirancang untuk bawa molekul DNA asing yang akan dimasukkan ke dalam organisme target yang digunakan dalam kloning DNA.

DNA vektor berasal dari Plasmid bakteri atau DNA virus tertentu yang dimodifikasi dg menambah komponen genetik lain hingga dapat digunakan untuk membawa molekul DNA yang akan dipindahkan ke jasad target.

DNA vektor dapat melakukan replikasi secara otonom di dalam sel sehingga dapat memperbanyak molekul DNA asing yang disisipkan di dalamnya.

Komponen penting suatu DNA vektor:

- 1) Ori, titik awal replikasi
- 2) Sisi penyisipan fragmen DNA asing
- 3) Penanda genetik
- 4) Sinyal transkripsi dan translasi

1) Titik awal replikasi: Suatu urutan nukleotida pada vektor untukawali proses replikasi DNA vektor tersebut. Replikasi penting untuk mempertahankan keberadaan vektor itu di dalam sel.

Sering > 1 ori/vektor → biasanya digunakan utk kloning dan ekspresi gen asing pd organisme eukariot.

- Sekuens ori I utk replikasi vektor pada inang (biasanya prokariota); berperan dalam perbanyak DNA untuk keperluan manipulasi genetik.
- Sekuens ori II utk replikasi DNA dalam organisme tempat dilakukannya ekspresi gen asing tersebut.

2). Sisi penyisipan DNA asing:

Sekuens DNA pada vektor yg dpt dipotong enzim restriksi tertentu → dpt digunakan utk menyisipkan fragmen DNA asing yg diklon. Sisi penyisipan/sisi kloning dapat terdiri atas beberapa urutan nukleotida khusus yg dapat dipotong oleh beberapa enzim restriksi yg berbeda.

3). Penanda genetik (genetic marker)

suatu gen vektor yg dpt digunakan utk tentukan koloni sel yg dpt digunakan sbg penanda genetik (misal: ketahanan thd antibiotik, ampisilin).

kadang > 1 penanda genetik/vektor; misal vektor untuk kloning gen pada eukariot:

- dpt diekspresikan pd sel prokariota → bantu proses identifikasi rekombinan pada tahapan perbanyakan DNA asing yg disisipkan (bagian proses dalam manipulasi)
- khusus yg hanya dpt diekspresikan pd sel eukariota

4). Sinyal transkripsi dan translasi

Urutan nukleotida yang ditambahkan pada vektor, khusus digunakan utk ekspresikan gen asing yang disisipkan; diambil dari daerah pengatur (regulatory region) pada suatu gen & digabungkan dengan vektor → gen asing yg disisipkan berada tepat pada bagian hilir sinyal transkripsi & translasi itu (downstream). Tidak selalu ada pada setiap vektor, karena ada vektor yg dirancang utk memperbanyak DNA asing saja.

Umumnya ada 3 kelompok vektor utk kloning DNA:

- vektor DNA plasmid
- vektor DNA bakteriofag
- vektor hibrid DNA plasmid dan bakteriofag

a) Vektor DNA plasmid → paling umum utk kloning; struktur dasar vektor ini berasal dari DNA plasmid alami dlm prokariota dan eukariota. Plasmid yg digunakan umumnya modifikasi plasmid alami dg penambahan komponen-komponen genetik berbagai sumber; misalnya sisi kloning, ori tambahan, dan penanda genetik.

Vektor DNA plasmid dibedakan 3 kelompok:

1. Vektor perbanyakan; Vektor untuk amplifikasi fragmen DNA asing yg disisipkan ke dalam plasmid tersebut (hanya pada sel prokariotik);
2. Vektor ekspresi; Vektor untuk perbanyak gen yg dapat mengekspresikan gen dengan promoter pd bagian hulu dari sisi restriksi dan ditambah terminator pada hilir.

3. Vektor ulang-alik (shuttle vector); Vektor yang mengekspresikan gen asing dalam sel eukariota, diperbanyak dulu dlm sel prokariota.

2 macam ori dalam vektor ulang alik:

- yg dpt digunakan utk replikasi DNA dlm sel prokariota
- yg dpt digunakan utk replikasi DNA dlm sel eukariota

b) Vektor DNA bakteriofag

Struktur dasar berasal dari DNA genom bakteriofag yang dimodifikasi lanjut. Vektor yang sering digunakan: DNA bakteriofag λ dan M 13.

Bakteriofag λ dpt melisiskan sel inang *E. coli* untuk membentuk plaque kumpulan partikel-partikel virus yg bebas dari sel. Sel lisis membentuk zona jernih;

Bakteriofag M 13 tidak melisis/membunuh sel inang, hanya turunkan laju pertumbuhannya.

c) Vektor DNA hibrid

Dikonstruksi menggunakan komponen DNA plasmid & DNA bakteriofag; ada 2 vektor DNA hibrid yg sering digunakan;

- 1) cosmid: vektor yg tersusun atas ori suatu plasmid, penanda genetik, & ujung kohesif bakteriofag λ
- 2) phasmid: vektor yg dikonstruksi dg DNA plasmid ukuran kecil berturunan banyak serta DNA bakteriofag tertentu. MIs.: bakteriofag P4. Phasmid dpt bereplikasi sbg plasmid atau bersifat litik (menyebabkan lisisnya sel inang)

TRANSFORMASI SEL INANG

Setelah proses ligasi DNA asing dg DNA vektor, maka tahap berikutnya adalah memasukkan DNA rekombinan ke dalam sel inang yang sesuai (proses transformasi),

Pemasukan DNA dari luar ke dalam sel inang akan menyebabkan perubahan (**transformasi**) pada sifat-sifat genetik sel inang.

Transfer gen suatu jasad ke tanaman dapat dilakukan dengan:

(A) transformasi protoplas,

(B) transformasi sel / jaringan tanaman

Transformasi protoplas

Protoplas mempunyai kelebihan untuk digunakan sebagai bahan awal transfer gen asing ke dalam tanaman. karena transfer gen (plasmid rekombinan) terjadi hanya melalui membran sel (dinding sel sudah dihilangkan), dan semua sel tanaman transgenik yg diregenerasi dari protoplas akan mengandung gen asing target yang diinginkan membentuk tanaman yang mempunyai genetik yg seragam.

Transformasi protoplas dengan gen asing dapat dilakukan dg beberapa cara:

- a. Menggunakan senyawa kimia tertentu, mis.PEG
- b. Teknik elektroporasi
- c. Menggunakan perantara bakteri *A. tumefaciens*
- d. Transfer gen dengan sonifikasi
- e. Transfer gen dengan perantara liposome.

Liposome dpt digunakan utk transfer gen asing ke dlm protoplas tanaman; liposome yg bawa plasmid difusikan dg protoplas menggunakan PEG; kelebihan teknik ini: (1) DNA terlindungi dari kemungkinan adanya aktivitas nuklease, (2) toksisitas liposome rendah, (3) DNA yg ada dlm liposome lebih stabil dalam penyimpanan, dan (4) dapat diaplikasikan pd banyak tanaman.

Terdapat 2 kelompok sel inang yg ditransformasi:

- 1) Sel inang sementara (temporer), hanya utk memperbanyak jumlah molekul DNA rekombinan
- 2) Sel inang tetap → utk ekspresikan gen asing yg diklon tsb

Bila ekspresi gen asing dilakukan dlm sel bakteri E. coli, maka sel E. coli dpt berperan sbg sel inang utk perbanyak molekul DNA rekombinan, sekaligus utk ekspresikan gen asing yg diklon.

Sel E. coli yang digunakan adalah sel yang sdh dikembangkan di lab, bukan strain alami; sdh dimutasi → “aman” karena hanya dpt hidup di lingkungan laboratorium secara terkendali → utk security → lepas dari lab → tdk mampu tumbuh di lingkungan bebas.

Proses transformasi sel inang E. coli dapat dilakukan dengan cara:

- 1) Teknik induksi kompetensi sel secara kimiawi; diikuti kejutan panas
- 2) Teknik elektroporasi, dg kejutan aliran listrik bertegangan tinggi dlm waktu pendek → terbentuk “lubang” pada permukaan sel → DNA masuk

(B). Transformasi sel atau jaringan tanaman yg utuh. Transfer sel atau jaringan utuh dapat digunakan dengan metoda:

Transformasi tan.dg perantaraan *A. tumefaciens*.
Plasmid rekombinan dibuat dengan menyisipkan gen asing ke dalam T-DNA yg ada pada plasmid Ti
→ pindahkan plasmid rekombinan ke dalam bakteri *A. tumefaciens*. Hal ini dpt dilakukan dengan menggunakan teknik konyugasi antara bakteri *E. coli* yg membawa plasmid rekombinan dengan bakteri *A. tumefaciens* yang membawa plasmid Ti sebagai plasmid pembantu (helper plasmid).

Sel *A. tumefaciens* yang sudah membawa gen rekombinan selanjutnya ditumbuhkan bersama jaringan tanaman yang akan ditransformasi (disebut **teknik ko-kultivasi**).

Jaringan tanaman yang akan dikokultivasi dengan *A. tumefaciens* dapat diambil dari irisan daun (leaf disc) → celupkan sebentar ke dalam kultur *A. tumefaciens* berumur semalam → letakkan pada kertas filter steril → letakkan pada medium selektif (mengandung antibiotik yg sesuai, herbisida atau bahan kimia lain yg bersifat selektif) untuk proses ko-kultivasi dg bakteri *A. tumefaciens* 2-3 hari. → hanya jar. tan. yg telah mengalami transformasi saja yg tetap dapat tumbuh.

Jaringan tanaman yg tumbuh tersebut diteruskan sampai berkembang membentuk bakal tanaman (plantlet) → pindahkan ke pot berisi tanah utk pertumbuhan lanjut.

Analisis keberhasilan dilakukan dengan melakukan uji dengan teknik DNA blotting, PCR, atau analisis ekspresi gen asing yg disisipkan.

Bila sel inang adalah sel tumbuhan → proses transformasi beda; yaitu dengan cara:

- 1) Infeksi sel tumbuhan dengan patogen, mis. dengan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* atau virus tumbuhan tertentu.
- 2) Pemasukan DNA secara langsung menggunakan alatbiolistic gun bombardment
- 3) Transformasi langsung dg induksi kimia dg senyawa polietilen glikol (PEG)
- 4) Fusi protoplas
- 5) Mikroinjeksi dan makroinjeksi

- 1) Infeksi dengan *A. tumefaciens* ; bakteri patogen terhadap tan.dikotil. Bila tanaman dikotil terinfeksi → tumor crown gall yang menghasilkan senyawa turunan as.amino: opine berperan sebagai sumber karbon dan nitrogen oleh *A. tumefaciens*.

Kemampuan membentuk tumor dan metabolisme opine ditentukan oleh **plasmid Ti** yang ada dlm sel *A. tumefaciens*. Plasmid Ti mengandung suatu fragmen DNA yg disebut T-DNA yg dpt diintegrasikan ke dalam DNA inti sel tanaman.

T-DNA bertanggungjawab terhadap kemampuan menginduksi pembentukan sel tumor serta sintesis opine → plasmid Ti dalam sel *A. tumefaciens* yg kini dikembangkan sebagai vektor utk memasukkan DNA asing ke dalam sel tanaman.

Tahapan Kerjanya.

- a) Terlebih dulu isolasi DNA yang akan disisipkan
- b) Diklon ke dalam vektor ulang alik khusus yang dapat direplikasikan di dalam sel *E. coli* (utk perbanyak dan manipulasi) serta dlm sel *A. tumefaciens*.
- c) Setelah didisipasi; vektor ulang alik dipindahkan ke dalam sel *A. tumefaciens* yg membawa plasmid Ti alami yang mengandung T-DNA alami. Di dalam sel *A. tumefaciens* akan terjadi rekombinasi antara fragmen T-DNA yg sudah disisipi oleh DNA asing dengan T-DNA yg ada pada plasmid Ti alami.

Pada waktu sel *A. tumefaciens* yang membawa plasmid Ti rekombinan itu digunakan utk infeksi sel tanaman → bag. T-DNANYa akan diintegrasikan ke dalam DNA inti sel tanaman → DNA asing akan ikut terintegrasikan ke dalam DNA genom tanaman.

Penyisipan DNA asing ke dalam DNA genom tanaman dapat pula menggunakan DNA virus tanaman sebagai vektor → CaMV (cauliflower mosaic virus).

2). Pemindahan DNA secara langsung dengan biolistic gun bombardment (BGB); Lapisan proyektil berbahan tungsten dengan molekul DNA yg akan dimasukkan ke sel tanaman, tembakkan proyektil ke dalam sel tanaman. → sukses pada transformasi kloroplas *Chlamydomonas*.

Transfer gen ke dlm tanaman dg teknik biolistik

Dlm teknik biological ballistic, sel / jaringan tanaman ditembaki dengan alat tembak mikroprojektil yg membawa DNA rekombinan (dikembangkan th.1987 oleh Prof.Stanford cs. Un. Cornell).

Teknik ini sesuai utk diterapkan pd tanaman yang sulit mengalami regenerasi dg teknik kultur in vitro atau yang tidak kompatibel dengan teknik kokultivasi dg *A. tumefaciens* spt padi dan jagung.

Microcarrier mengandung partikel tungsten yang dilapisi DNA yang akan ditembakkan. Sel / jaringan diletakkan di bawah stopping plate ; penembakan dg alirkan gas helium pd kecepatan tinggi → dorong microcarrier mengandung DNA melewati stopping plate → tembus sel / jar. → regenerasi pada medium yg sesuai → tanaman transgenik utuh.

3) Transformasi dg induksi kimiawi; \approx transformasi pd E. coli, PEG (polyethylene glycol); dapat dilakukan untuk tanaman dikotil dengan menghilangkan dulu dinding sel !

4) Fusi protoplas; fusi protoplas antara 2 tanaman \rightarrow menghilangkan dinding sel secara enzimatik \rightarrow difusikan secara kimiawi atau elektrofusi \rightarrow protoplas hasil fusi diregenerasi jadi sel utuh & jaringan lengkap; \approx pemuliaan konvensional; namun dpt mengatasi inkompatibilitas!

5) Mikroinjeksi \rightarrow injeksi langsung ke dlm sel tanaman.

Metoda mikroinjeksi dan makroinjeksi jaringan tanaman

Mikroinjeksi: injeksikan DNA asing ke dlm sel-sel embrio, gunakan alat mikromanipulator dan alat khusus lain; injeksi ke nukleus / sitoplasma. Seblmnya DNA dimobilkan misal dengan agarose, agar, atau Na-alginat. Bagi yang berpengalaman dapat menginjeksi 100-200 sel /jam.

Makroinjeksi dilakukan dg menginjeksikan DNA total dari 1 varietas, misalnya kapas, ke dalam varietas kapas lainnya.

ANALISIS DNA REKOMBINAN

Setelah proses transformasi sel inang dengan DNA hasil ligasi Dilakukan analisis keberadaan DNA rekombinan di dalam sel inang (sebagai contoh, analisisDNA rekombinan pada E. coli yg biasa sebagai inang sementara maupun tetap.

Secara umum, cara analisis keberadaan DNA rekombinan dalam sel yg ditransformasi:

1. Analisis restriksi DNA
2. Hibridisasi dg pelacak DNA
3. Analisis ekspresi gen asing yg diklon
4. Amplifikasi DNA dengan teknik PCR (Polymerase Chain Reaction)
5. Penentuan urutan nukleotida (DNA sequencing)

1. Analisis restriksi DNA

Praktis & cepat dilakukan bila jumlah koloni transforman yg dianalisis tdk terlalu banyak. Isolasi DNA dari koloni-koloni transforman yg tumbuh pd medium selektif. Setelah lakukan isolasi DNA plasmid, potong DNA itu dg enzim restriksi spesifik → dpt bedakan antara sel yg bawa DNA rekombinan dg yg bawa DNA vektor saja tanpa sisipan DNA asing.

Hasil pemotongan DNA dielektroforesis pd gel agarose → pita-pita DNA → analisis pita

2. Hibridisasi dg pelacak DNA (DNA probe)

DNA probe: molekul DNA yg dilabel dg radioaktif atau non-radioaktif; urutan DNAnya dibuat mirip urutan nukleotida DNA rekombinan yg akan dilacak.

Pindahkan koloni-koloni transforman yang muncul pada medium selektif ke atas membran nitroselulosa / nilon → dilisis dg alkali → DNA dlm sel terpapar keluar; lalu membran diinkubasi dg pelacak DNA. Bila ada DNA mirip pelacak; terjadi hibridisasi → gunakan sinyal radioaktif pelacak → dihasilkan image berupa noktah hitam pd film setelah diproses. Hanya bila tersedia pelacak DNA yg sesuai.

3. Analisis ekspresi gen asing

Ekspresi gen asing dalam tanaman transgenik dpt dianalisis secara in vivo maupun in vitro. Analisis in vitro dpt dilakukan dengan:

(1) uji enzimatik,

(2) uji aktivitas protein pada gel

(3) uji imunokimia

Uji enzimatik dilakukan dengan ukur aktivitas produk ekspresi gen reporter yg berupa enzim dengan gunakan metode kolorimetri, fluorometri, atau luminometri. Aktivitas enzim tsb dikuantifikasi dengan menambahkan substrat yg dpt diubah oleh aktivitas katalitik enzim tersebut menjadi suatu produk.

Misal aktivitas protease diuji dg menambahkan suatu protein yg dapat didegradasi enzim menjadi peptida; jumlah peptida yg terbentuk dianalisis untuk mengetahui gambaran aktivitas proteolitik enzim itu.

Uji aktivitas protein pd gel; Protein-protein hasil ekspresi gen pd jaringan tanaman dapat dianalisis dengan cara melakukan elektroforesis pd gel poliakrilamid → muncul pita-pita berbagai ukuran → analisis aktivitas enzimatisnya dengan fluorometri.

Uji imunokimia, Digunakan untuk uji protein asing yang bukan enzim → menggunakan antibodi terhadap protein itu → uji imunokimia dg teknik ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) atau immunoblotting.

4. Amplifikasi DNA dg teknik PCR; hasil amplifikasi dianalisis dg elektroforesis: pita-pita DNA
5. DNA sequencing; lakukan penentuan urutan nukleotida fragmen DNA asing secara rinci.

Karakterisasi fungsional gen yg diklon

Dilakukan dengan merancang sistem ekspresi yg sesuai untuk gen asing tersebut pada sel inang dengan memperhatikan stabilitas gen tersebut dalam sel inang.

Tan. transgenik → uji pada lingkungan terkendali → uji lapangan → lepas untuk dibudidaya.

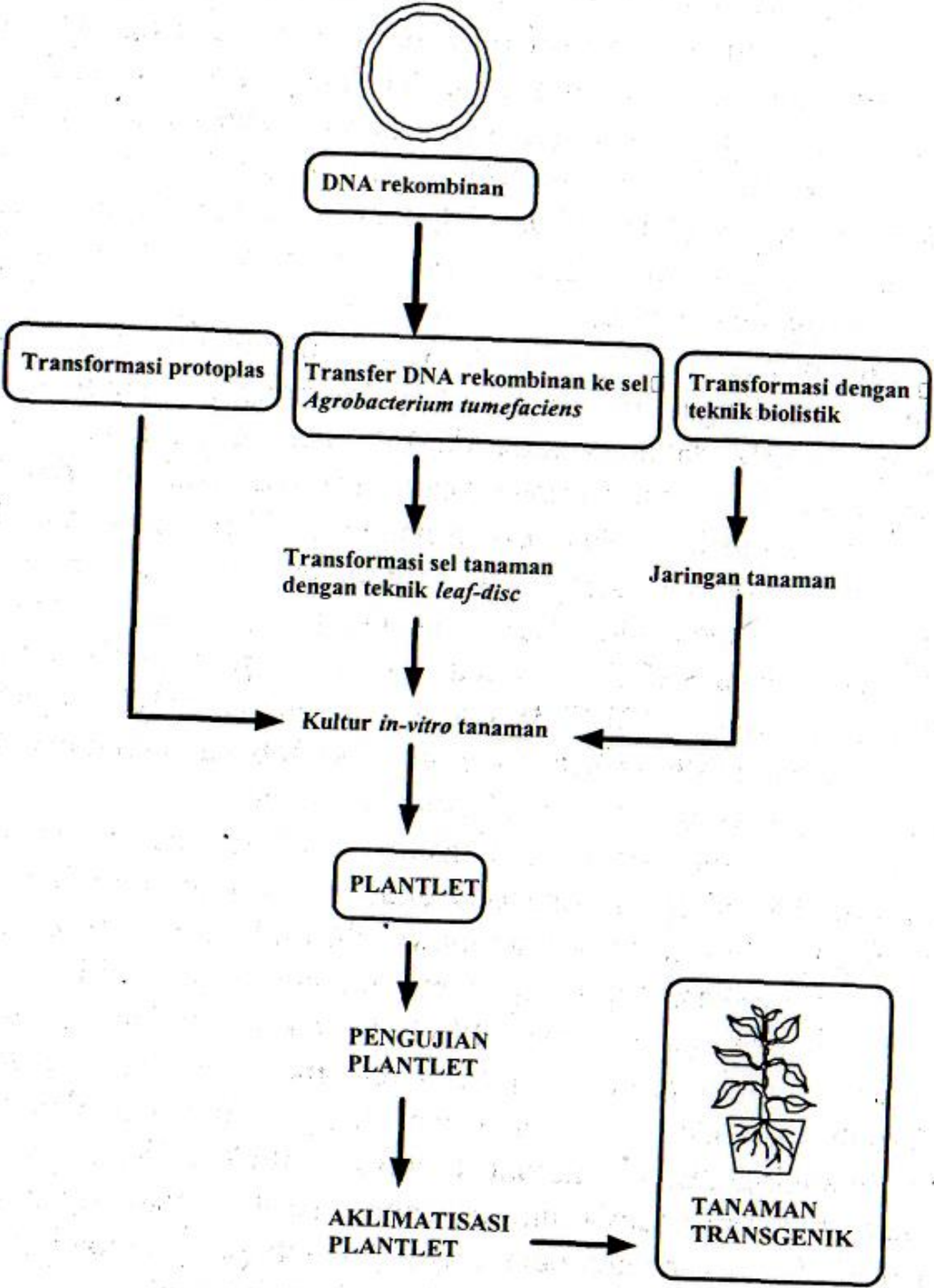
Teknik transfer gen asing ke dlm tanaman

Transfer gen suatu jasad ke tana. dpt dilakukan dg (A) transformasi protoplas, (B) transformasi sel / jar.tanaman → sifat totipotensi sel tanaman.

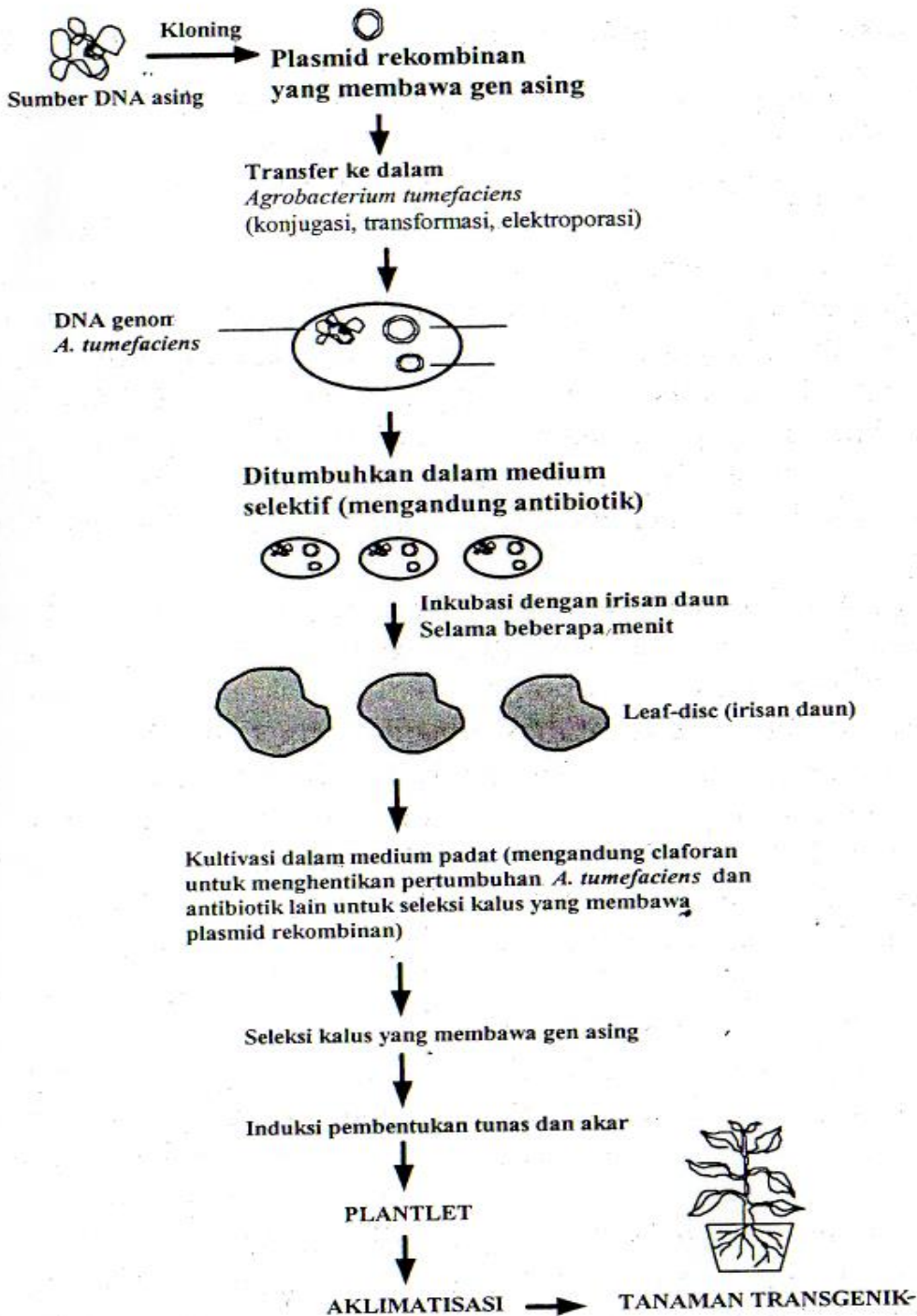
(A) Transformasi protoplas

Protoplas memp.kelebihan utk digunakan sbg bahan awal transfer gen asing ke dlm tan.: Krn transfer gen (plasmid rekombinan) terjadi hanya melalui membran sel (ddg sel sdh dihilangkan), dan semua sel tan.transgenik yg diregenerasi dr prtoplas akan mengandung gen asing yg diinginkan → tan.memp.komposisi genetik yg seragam. Transformasi protoplas dg gen asing dpt dilakukan dg bbrp cara:

- a. gunakan senyawa kimia tertentu, mis. PEG
- b. teknik elektroporasi
- c. gunakan perantara bakteri *A. tumefaciens*
- d. transfer gen dg sonifikasi
- e. transfer gen dg perantaraan liposome.



Skema Transfer Gen Asing (DNA Rekombinan) ke dalam Sel Tanaman untuk Menghasilkan Tanaman Transgenic. Selain ketiga metode tersebut masih ada metode lain yaitu mikroinjeksi dan makroinjeksi.



Skema Transformasi Tanaman Menggunakan Teknik Ko-kultivasi dengan Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang Membawa Plasmid Rekombinan. Dalam skema di samping digunakan contoh penggunaan sistem plasmid biner untuk kloning gen asing ke dalam tanaman.

(2) Transfer gen ke dlm tanaman dg teknik biolistik

Dlm teknik biological ballistic, sel / jar.tan.ditembakidg alt tembak mikroprojektil yg membawa DNA rekombinan (dikembangkan th.1987 oleh Prof.Stanford cs. Un. Cornell).

Teknik ini sesuai utk diterapkan pd tan.yg sulit alami regenerasi dg teknik kultur in vitro atau yg tdk kompatibel dg teknik ko-kultivasi dg *A. tumefaciens* spt padi dan jagung. Alat ± spt di halaman berikut. Microcarrier mengandung partikel tungsten yg dilapisi DNA yg akan ditembakkan. Sel / jar.diletakkan di bawah stopping plate ; penembakan dg aliran gas helium pd kecepatan tinggi → dorong microcarrier mengandung DNA lewati stopping plate → tembus sel / jar. → regenerasi pd medium yg sesuai → tan.transgenik utuh.

(3) Metoda mikroinjeksi dan makroinjeksi jaringan tanaman

Mikroinjeksi: injeksikan DNA asing ke dlm sel-sel embrio, gunakan alat mikromanipulator & alat khusus lain; injeksi ke nukleus / sitoplasma. Seblmnya DNA di-amobilkan mis. dg agarose, agar, atau Na-alginat. Yg berpengalaman,dpt injeksi 100-200 sel /jam.

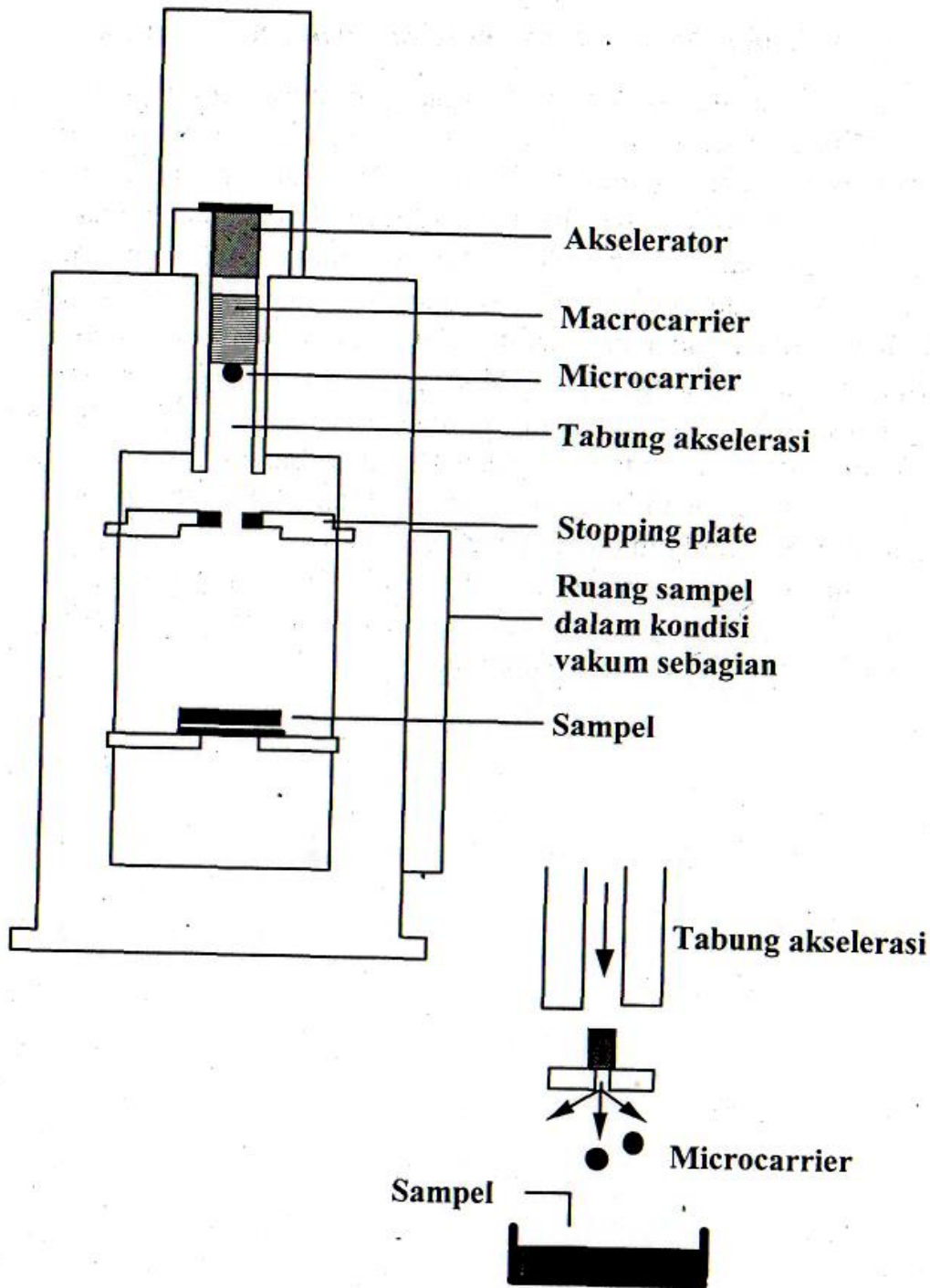
Makroinjeksi dilakukan dg menginjeksikan DNA total dari 1 varietas, misalnya kapas, ke dlm varietas kapas lainnya.

Aplikasi rekayasa genetik pada tanaman

Pengembangan teknologi DNA rekombinan utk tan.transgenik → implikasi sangat besar pd bidang pertanian → pemuliaan tanaman sesuai yg diinginkan. Aspek yg dikembangkan meliputi

- perbaikan sifat fisiologis tan. Mis. Pengubahan kandungan as.lemak, tingkatkan kandungan provit.A., ubah warna bunga, penundaan pemasakan
- pengembangan resistensi tan.thd hama dan penyakit tanaman
- pengembangan resistensi tan.thd herbisida
- hasilkan protein terapeutik, antibodi monoklonal maupun vaksin rekombinan yg diekspresikan di dlm bag. tan. tertentu misalnya buah

Melakukan Transformasi Sel Tanaman

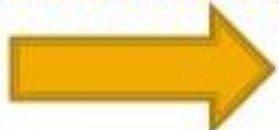


Beberapa macam tanaman transgenik yg sudah dikembangkan

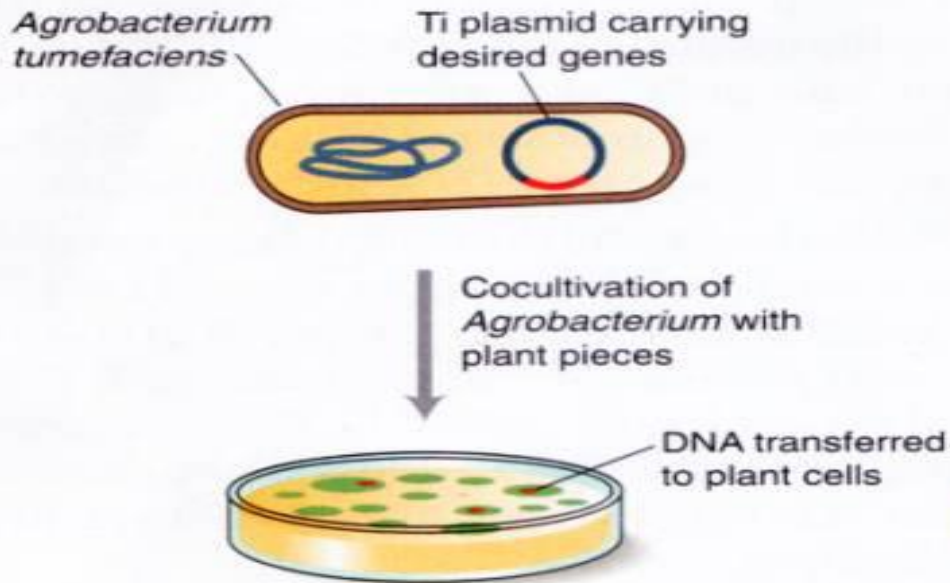
Spesies tanaman	Gen yg disisipkan	Asal gen	Karakterbaru yg diperoleh
<i>Oryza sativa</i> (<i>Golden rice</i>)	Gen pengkode: Phyton synthase Lycopene cyclase Phytoene desaturase	Daffodil Daffodil <i>Erwinia carotovora</i>	Produksi provitamin A (β -karoten) pd endo- sperm
<i>Oryza sativa</i>	Gen phosphinothricin N-acetyltransferase	<i>Streptomyces</i> <i>hygroscopicus</i>	Toleransi thd herbisida phosphinothricin, khusus nya glufosinate amonium
<i>Lycopersicum</i> <i>esculentum</i>	Gen pengkode S-ade Nosylmethionine hydrolase	Bakteriofag T3	Penundaan pemasakan krn biosintesis etilen ber- kurang
<i>Zea mays</i>	Gen pengkode toksin CryIAb	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i>	Resisten thd pengerek Batang <i>Ostrinia subilalis</i>
<i>Carica papaya</i>	Gen pengkode coat protein <i>Papaya Ring-</i> <i>spot Virus</i> (PRSV)	<i>Papaya Ringspot</i> <i>Virus</i>	Resisten thd PRSV
<i>Glycine max</i> L.	Gen pengkode δ -12 Desaturase (<i>fad 2</i>)	Kedelai	Akumulasi as.lemak oleat →as.lemak tak jenuh

D. PEMBUATAN TANAMAN TRANSGENIK

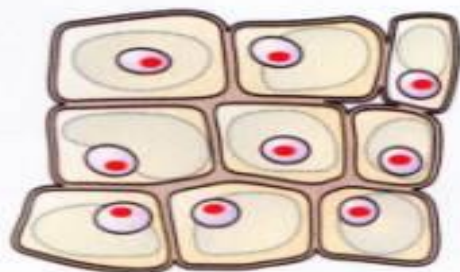
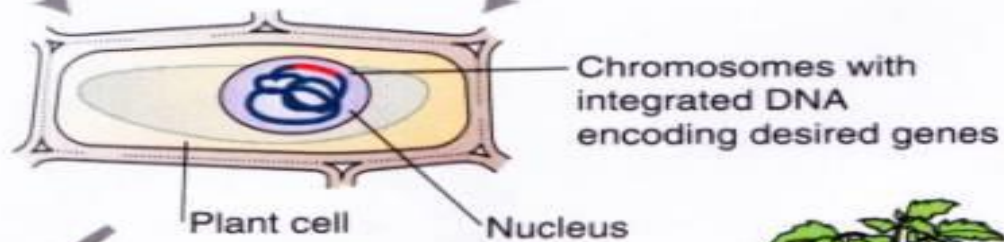
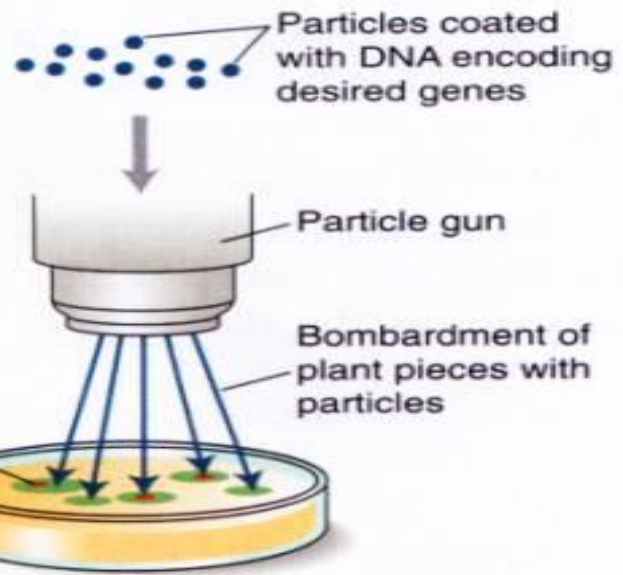
Transfer gen ini dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu:

- metode senjata gen
- metode transformasi DNA yang diperantarai bakteri *Agrobacterium tumefaciens*  fokus pembahasan
- elektroporasi (metode transfer DNA dengan bantuan listrik).

Agrobacterium method



Particle gun method



Cell multiplication (callus)

Shoot regeneration followed by root regeneration

Plant with new trait

Teknologi Transgenik

1. Teknologi transgenik langsung

a. Metode elektroporasi.

- ❖ *Polythylene glycol* (PEG) memudahkan presipitasi DNA dan membuat kontak lebih baik dengan protoplas, juga melindungi DNA plasmid mengalami degradasi dari enzim nuklease.
- ❖ Elektroporasi dengan perlakuan listrik voltase tinggi menyebabkan permeabilitas tinggi untuk sementara pada membran sel dengan membentuk pori-pori sehingga DNA mudah penetrasi ke dalam protoplas. Integritas membran kembali membaik seperti semula dalam beberapa detik sampai semenit setelah perlakuan listrik. Jagung dan padi telah berhasil dengan sukses ditransformasi melalui elektroporasi dengan efisien antara 0,1 – 1 %.

E. CONTOH TANAMAN TRANSGENIK

- Jagung tahan Hama
- Tembakau tahan terhadap cuaca dingin
- **Tomat tahan lama** → **Fokus pembahasan**
- Kedelai tahan terhadap herbisida
- Melon, buahnya tidak cepat busuk



Contoh tanaman transgenik



Tanaman jeruk transgenik memiliki daya tahan terhadap penyakit busuk akar