



BERITA UTAMA

Tidak dipungkiri bahwa pupuk N mampu membantu mewujudkan keinginan petani dalam mencapai hasil panen yang tinggi. Kontribusi pupuk N dalam dunia pertanian semakin meningkat setiap tahunnya. Kebutuhan dunia terhadap pupuk N diprediksi akan mencapai 100 juta ton per tahun (IFA-Int'l Fertilizer Industri Association). Sayangnya, kontribusi pupuk N-anorganik dalam meningkatkan performa hasil tanaman diikuti pula dengan pengaruh negatifnya terhadap lingkungan, seperti pencemar-

Warta *Biogen*

Penanggung Jawab
Kepala BB Biogen
Karden Mulya

Redaksi

Tri Puji Priyatno
Joko Prasetyono
Ida N. Orbani

Alamat Redaksi

Seksi Pendayagunaan Hasil
Penelitian BB Biogen
Jl. Tentara Pelajar 3A
Bogor 16111
Tel. (0251) 8337975, 8339793
Faks. (0251) 8338820
E-mail: borif@indo.net.id

Tanaman NUE, Tanaman Efisien-N

an tanah, udara maupun air akibat "sisa" pupuk N berupa N_2O yang tidak terserap oleh tanaman.

Nitrat (NO_3^-) dan ion-ion amonium (NH_4^+) merupakan sumber nitrogen utama yang dapat diserap oleh tanaman. Pada sistem budi daya tanaman, sumber N di alam dapat berasal dari tanah, nitrogen hasil mineralisasi material organik dan sisa tanaman, fiksasi N oleh mikroflora di rizosfer, penangkapan N dari atmosfer serta air irigasi. Namun, secara keseluruhan hanya merepresentasikan 1-4% nitrogen total dalam tanah. Nitrogen *indigenous* tersebut ditambah pemupukan N-organik berkontribusi penyediaan *N-pool* di dalam tanah yang tidak semuanya terserap oleh tanaman. Sisa N yang tidak terserap akan dilepas ke atmosfer atau hilang melalui volatilisasi, denitrifikasi maupun pencucian oleh hujan. Oleh karena itu, ada sinyalemen, sektor pertanian dianggap bertanggung jawab sebagai penyumbang efek rumah kaca (emisi GHG) terbesar kedua di dunia setelah sektor transportasi, di mana 1/3 dari emisi GHG tersebut diproduksi oleh pupuk N.

Arcadia Bioscience, sebuah perusahaan benih dari USA yang misi dan tujuannya menghasilkan tanaman yang ramah lingkungan dan kesehatan memiliki komitmen untuk membuat teknologi yang

dapat diaplikasikan di negara berkembang. Dari sekitar 80 lisensi teknologi yang dimiliki oleh *Arcadia*, tanaman efisien-N (NUE) adalah salah satu yang sudah diintroduksi ke berbagai negara seperti India, Cina, Bangladesh, dan negara-negara di Afrika. Melalui seminar pada tanggal 25 April 2012 di BB Biogen, Dr. Josette Lewis, seorang peneliti dari perusahaan tersebut menyampaikan pengalamannya mengintroduksi teknologinya ke berbagai negara berkembang di dunia.

Kenapa Pupuk Nitrogen Menjadi Salah Satu Penyebab Pemanasan Global

Hasil penelitian dari Universitas California, Berkeley, yang dimuat pada isu April 2012 di *Journal Nature Geo-science* telah menemukan bukti bahwa peningkatan penggunaan pupuk lebih dari 50 tahun yang lalu bertanggung jawab terhadap kenaikan signifikan kandungan nitro oksida N_2O di atmosfer. Ada tiga jenis gas utama yang sering disebut gas rumah kaca (GRK), yaitu CO_2 , CH_4 , dan N_2O , yang masing-masing kandungannya di atmosfer mencapai 55%, 15%, dan 6%. Gas tersebut dianggap sebagai lapisan gas yang berperan sebagai perangkap gelombang panas dan akhir-akhir ini konsentrasinya di atmosfer terus meningkat sam-



pai dua kali lipat. Setiap jenis GRK mempunyai masa hidup yang berbeda-beda, seperti gas CO₂ yang paling pesat laju peningkatannya memiliki masa hidup paling panjang (5-200 th), diikuti gas N₂O (114 th) dan CH₄ (12-17 th). Tetapi dari ketiga GRK, N₂O mempunyai kemampuan menyerap panas 300 kali lebih besar dibandingkan dengan CO₂. Oleh karena itu N₂O dianggap sebagai GRK utama yang menjadi penyebab pemanas global.

Para peneliti berasumsi bahwa penyebab utama peningkatan signifikan nitro oksida adalah nitrogen yang terkandung dalam pupuk, yang menstimulasi mikroba di tanah untuk mengkonversi nitrogen menjadi nitro oksida lebih cepat dari biasanya. Asumsi ini tidak bermaksud mendiskreditkan pupuk nitrogen, tetapi menjadi langkah ke depan yang lebih bijak dalam perubahan penggunaan pupuk dan praktik pertanian yang akan membantu memitigasi pelepasan nitro oksida ke atmosfer. Pada lahan sawah, efisiensi serapan pupuk N oleh tanaman padi kurang dari 50% meskipun dengan pengelolaan yang baik. Sisanya hilang akibat tervolatilisasi dalam bentuk amonia, pencucian, dan pengairan. Pada lapisan reduksi, pupuk N hilang menguap dalam bentuk gas N₂O karena proses nitrifikasi dan denitrifikasi. Gas N₂O juga dapat terbentuk melalui proses oksidasi biologi NH₄⁺ menjadi NO₂⁻ oleh bakteri Nitrosomonas dalam tanah kondisi aerob.

Bagaimana Membuat Tanaman Menjadi Efisien dalam Memanfaatkan Pupuk Nitrogen

Di tanah, nitrat dan amonium adalah senyawa utama yang dihasilkan oleh pupuk N. Senyawa ini masuk ke dalam akar dimediasi oleh minimal dua sistem transport

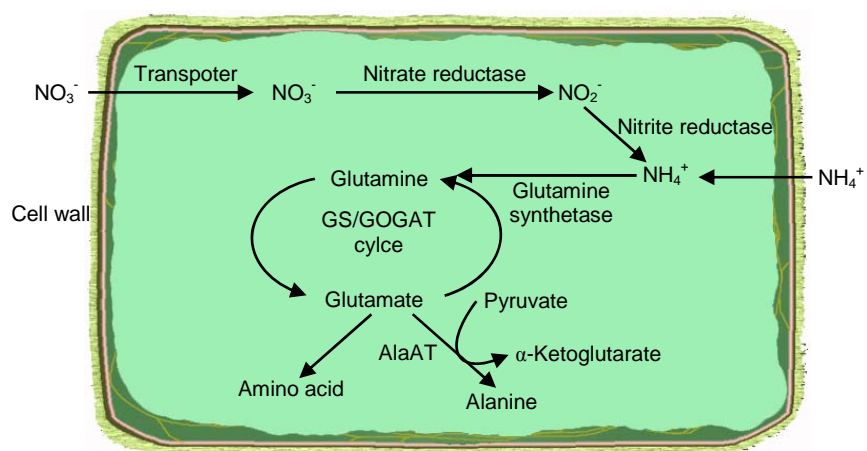
ion. Begitu nitrat masuk ke dalam sel tanaman, senyawa akan direduksi oleh enzim nitrat reduktase menjadi nitrit dan ditransport ke plastid. Di dalam plastid, nitrit di-konversi menjadi amonium oleh nitri reduktase. Amonium masuk dalam siklus glutamin dan glutamat sintase untuk menghasilkan glutamin dan glutamat. Golongan amino glutamat dapat ditransfer menjadi beragam asam amino oleh enzim aminotransferase (Gambar 1).

Umumnya, usaha meningkatkan efisiensi penggunaan N oleh tanaman dilakukan pada tahapan awal serapan N dan metabolismenya, seperti memanupilasi enzim nitrat reduktase dan glutamin sintase atau bagian nitrat transporter-nya. Overekspresi dari gen yang menyandikan glutamin sintase pada jagung dan padi diketahui meningkatkan pertumbuhan, akumulasi N, dan pengisian bulir. Faktor transkripsi Dof1 dari jagung juga diketahui mempunyai peran sangat penting dalam pertumbuhan tanaman pada kondisi kekurangan N. Misalnya, tanaman *Arabidopsis* yang membawa gen ini mampu tumbuh baik pada kondisi N rendah.

Arcadia merakit tanaman NUE dengan memanfaatkan gen *AlaAt* (*alanine Aminotransferase*) meng-

gunakan *root epidermal-specific promoter* dari brassica (*btg*) atau *tissue-specific promoter* padi (*OsAnt*). Enzim *AlaAt* terlibat dalam sintesis alanin dari transaminasi piruvat dengan glutamat sebagai donor amino, dan degradasi alanin melalui reaksi sebaliknya. Alanin diketahui dapat berfungsi sebagai sumber nitrogen intraseluler dan pengangkut karbon, serta memainkan peranan penting dalam metabolisme nitrogen dan karbon pada tanaman. Alanin juga dilaporkan sebagai nitrogen utama yang ditransportasi dari nitrogen yang difiksasi oleh bakteri ke dalam perakaran tanaman. Pada saat tanaman mengalami tekanan abiotik, jumlah alanin yang disintesis mencapai 94% dari total nitrogen yang diasimilasi tanaman. Di samping itu, aktivitas tinggi *AlaAt* berperan penting untuk translokasi alanin atau piruvat yang memungkinkan tanaman bisa memelihara keseimbangan karbon-nitrogen di dalam keseluruhan jaringannya.

Tanaman transgenik *Brassica napus* yang memiliki overekspresi *AlaAt* dengan promoter *btg26* menunjukkan peningkatan total biomasa dan pengisian biji. Yang menarik, produktivitas tanaman tersebut tetap stabil pada kondisi pupuk N 40% lebih rendah dibanding-



Gambar 1. Lintasan metabolisme nitrogen di dalam sel tanaman. GS/GOGAT = glutamin sintetase dan glutamat sintetase (Good, 2004).

kan dosis pupuk normalnya. Hasil yang sama juga ditunjukkan tanaman padi transgenik yang menggunakan gen tersebut tetapi di bawah kendali *OsAnt1*. Tanaman padi transgenik *AlaAt* mempunyai biomasa perakaran tinggi, yang berarti memiliki luas permukaan untuk penyerapan dan metabolisme nitrogen lebih baik. Over ekspresi *AlaAt* juga diketahui meningkatkan aliran nitrogen menjadi glutamin, glutamat, asparagin, dan alanin, yang sangat penting sebagai sumber N simpanan, biosintesis asam amino, dan senyawa-senyawa lain yang mengandung nitrogen.

Perspektif ke Depan

Terlepas dari realita tanaman transgenik masih menjadi pro-kontra di masyarakat dan tanaman NUE dianggap *non-cost effective* dan tidak praktis, upaya mitigasi untuk menurunkan emisi N_2O harus terus dilakukan. Memang dam-

pak pemanasan global terjadi dalam jangka panjang, tetapi upaya pencegahan dan pengurangan harus dilakukan sejak dini, agar dampaknya pada masa mendatang tidak merugikan generasi selanjutnya. Selain mengembangkan tanaman yang adaptif pada kondisi tanah rendah N, banyak cara bisa dilakukan untuk mengurangi emisi N_2O yang sesuai dengan agroekosistem Indonesia, seperti:

1. Dalam budi daya tanaman usahakan pemberian pupuk sesuai dengan kebutuhan tanaman dan ketersediaan nitrogen dalam tanah, residu N dan sumber N lainnya.
2. Pengolahan tanah dilakukan secara minimum atau menerapkan sistem tebar benih langsung juga dapat mengurangi emisi gas N_2O .
3. Air irigasi harus dialirkan sesuai kebutuhan tanaman.

4. Gunakan pupuk N yang telah diberi bahan penghambat nitrifikasi dan diformulasikan dalam bentuk *controls-released nitrogen*. Beberapa jenis penghambat nitrifikasi yang mampu mereduksi dan meningkatkan produktivitas tanaman adalah dicycendiamide, nitrapyrin, encapsulated calcium carbide, dan N-2,5-dichlorophenil succinamic acid.
5. Tidak memberakan lahan terlalu lama juga dapat mengurangi konsentrasi nitrat dan amonia di dalam tanah. Oleh sebab itu, penanaman palawija di antara musim tanam padi tidak saja akan menambah penghasilan petani, tetapi juga mengurangi emisi gas N_2O .

Lina Herlina dan Tri Puji Priyatno

Kegiatan Klub Jurnal bulan Juni 2012 diisi oleh Dr. Kurniawan Rudi Trijatmiko dengan mengkaji karya tulis ilmiah dari *International Rice Genome Sequencing Project* (2005) yang berjudul *The map-based sequence of the rice genome* [*Nature* 436(7052):793-800] dan paper Krishnan *et al.* (2009). *Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses* dalam *Plant Physiol.* 149(1):165-170.

Metode Sekuensing

Pada dasarnya sekuensing genom makhluk hidup bisa dilakukan menggunakan dua metode, yaitu *whole genome shotgun* (WGS) atau *hierarchical clone-by-clone* (*map-based sequencing*). Dalam metode WGS, DNA keseluruhan genom dipotong menjadi fragmen-fragmen

Klub Jurnal: Sekuen Genom Acuan, Prediksi Model Gen, dan *Reverse Genetics* pada Padi

kecil berukuran 3.000-4.000 pasang basa dan masing-masing diklon dalam vektor plasmid. Selanjutnya, semua fragmen sisipan disekuen, dan sekuen DNA di-*assembling* (diurutkan dan disambungkan menjadi satu) berdasar kesamaan sekuen antar fragmen yang *overlap* satu sama lain menggunakan perangkat lunak bioinformatik khusus yang didukung kapasitas perangkat keras yang memadai. Keberadaan sekuen-sekuen repetitif seperti elemen transposon dalam proporsi yang besar dalam genom tanaman (85% pada jagung dan 35% pada padi) menyulitkan proses pengurutan sekuen DNA yang bisa berakibat pada penempatan sekuen bukan

pada tempatnya yang tepat (*mis-assembly*) dan banyaknya sekuen yang tidak bisa dimasukkan di dalam sekuen genom yang tersusun. Dengan mempertimbangkan hal ini, *International Rice Genome Sequencing Project* (IRGSP), sebuah konsorsium yang terdiri dari 10 negara (dibentuk pada tahun 1998) memutuskan untuk menggunakan metode *hierarchical clone-by-clone* dalam melakukan sekuensing genom padi menggunakan padi *japonica* varietas Nipponbare. Meskipun lebih lama dan lebih mahal dibandingkan dengan WGS, penggunaan metode ini bisa meminimalisasi terjadinya kesalahan pengurutan sekuen.

Dalam metode *hierarchical clone-by-clone*, pertama dibuat peta keterpautan marka molekuler dengan kerapatan tinggi (2275 marka) pada genom padi, kemudian genom dipotong menjadi fragmen-fragmen berukuran besar (100.000-150.000 pasang basa) dan masing-masing diklon dalam vektor *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC). Selanjutnya masing-masing klon BAC diurutkan (ditempatkan dalam konteks genom) berdasarkan pola hibridisasi dengan marka molekuler, pola sidik jari hasil pemotongan klon-klon BAC dengan enzim restriksi, dan kesamaan sekuen dari ujung masing-masing BAC. Berdasarkan pengurutan ini, kemudian ditentukan minimum set klon BAC yang diperlukan untuk mencakup keseluruhan genom (*tiling path*). Klon-klon BAC terpilih ini masing-masing disekuen menggunakan cara seperti WGS yang sudah diuraikan tadi. Kemudian sekuen utuh dari masing-masing BAC disambungkan secara berurutan untuk menyusun sekuen kontinyu untuk masing-masing dari 12 kromosom padi (*pseudomolecules*).

Pada tahun 2005, IRGSP telah mempublikasikan sekuen genom padi acuan dengan kualitas mendekati sempurna, yang mengandung kurang dari satu kesalahan dalam 10.000 basa, dan sudah dilakukan upaya maksimal untuk menutup kesenjangan (lubang-lubang) dalam sekuen genom yang dihasilkan. Ketika proses sekuensing genom padi oleh IRGSP ini sedang berjalan, dua kelompok mempublikasikan sekuen genom padi kualitas draf menggunakan metode WGS pada tahun 2002, yaitu *Beijing Genomics Institute* (BGI) dengan padi *indica* varietas 93-11 dan Syngenta dengan padi *japonica* varietas Nipponbare. Hasil perbandingan sekuen yang dihasilkan IRGSP dengan sekuen yang dihasil-

kan BGI dan Syngenta menunjukkan 30-40% dari total jumlah gen yang diidentifikasi pada sekuen IRGSP hilang pada kedua sekuen WGS, dan 32-68% dari sekuen-sekuen yang mengandung *CentO* (sekuen khusus di daerah sentromer) dari kedua sekuen WGS ditemukan di luar wilayah sentromer, yang mengindikasikan sudah terjadi *mis-assembly* pada kedua sekuen WGS. Hasil analisis sekuen genom IRGSP menunjukkan bahwa ukuran genom padi sekitar 389.000.000 pasang basa, dan sekuen yang dihasilkan IRGSP adalah 370.733.456 pasang basa (mencakup 95% dari genom keseluruhan). Berdasarkan prediksi model gen menggunakan perangkat lunak khusus dan dengan didukung database sekuen *full length* cDNA, diperkirakan padi memiliki 37,544 gen yang bukan transposon, dengan rata-rata ditemukan 1 gen setiap 10.000 pasang basa, dan ukuran rata-rata dari gen adalah 2.699 pasang basa. Dari sekuen genom IRGSP ini diidentifikasi 18.828 marka SSR, dan dari perbandingan sekuen ujung klon-klon BAC dari padi *aus* varietas Kasalath (yang mencakup 3% dari sekuen genom) dengan sekuen Nipponbare diidentifikasi 80.127 marka SNP.

Karakterisasi Gen

Setelah sekuen genom acuan pada padi tersedia, untuk melakukan karakterisasi fungsional genom padi secara lengkap, dibentuk *International Rice Functional Genomics Consortium* (IRFGC) yang beranggotakan 9 negara. Konsorsium ini bertujuan untuk menghasilkan koleksi mutan padi untuk menyingkapkan fungsi dari setiap gen padi terutama melalui pendekatan *reverse genetics*. Sebelum sekuen genom tersedia, penyingkapan fungsi gen sering dilakukan dengan pendekatan *forward*

genetics. Pendekatan ini dilakukan dengan mencari variasi fenotipe pada koleksi plasma nutfah, dan berdasar variasi fenotipe tersebut peneliti melakukan studi-studi genetik seperti pemetaan genetik atau analisis mutan untuk mengidentifikasi dan mengisolasi sekuen gen yang bertanggung jawab. Sebaliknya pada pendekatan *reverse genetics*, peneliti memulai dengan mengetahui sekuen gen yang fungsi putatifnya diduga berdasar kesamaan sekuen protein dengan gen yang sudah dikarakterisasi pada spesies lain, kemudian peneliti membuat mutasi pada gen tersebut. Berdasar karakterisasi mutan yang dihasilkan peneliti mengambil kesimpulan tentang fungsi dari gen tersebut. IRGFC sudah menghasilkan lebih dari 2.000.000 mutan sisipan, namun baru 206.668 mutan yang sudah diketahui letak sisipannya dalam genom melalui data *Flanking Sequence Tag* (FST), yaitu sekuen genom padi yang mengapit sekuen DNA sisipan, yaitu T-DNA atau transposon. Dari total 41.753 gen pengkode protein pada padi, sebanyak 28.545 (68,4%) gen sudah tersedia mutan yang menyisip di dalam gen. Koleksi mutan ini tersedia di lembaga-lembaga riset anggota IRFGC yang menghasilkan mutan bersangkutan, dan informasinya bisa diunduh pada beberapa website, seperti RiceGE/SIGnAL (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE>), Ory GenesDB (<http://orygenesdb.cirad.fr>), dan Gramene (<http://www.gramene.org>).

Untuk membuat sekuen genom acuan pada spesies tanaman yang mengandung sekuen-sekuen repetitif dengan proporsi yang besar, penggunaan metode WGS rawan terhadap kesalahan pengurutan sekuen, baik menggunakan teknik sekuensing konvensional Sanger (mesin ABI 3730xl yang menghasilkan bacaan sekuen sam-

pai 1.100 basa), apalagi menggunakan teknologi *next generation sequencing* (NGS) (Illumina HiSeq 2000) yang menghasilkan bacaan sekuen sepanjang hanya 2 x 100 basa. Namun teknologi NGS sangat berguna dan murah untuk resequencing (melakukan sekuensing pada spesies tanaman yang sudah tersedia sekuen genom acuannya, sehingga penyusunan sekuen genom utuh untuk sampel bisa dilakukan dengan mencocokkan bacaan-bacaan sekuen yang kita hasilkan dengan sekuen genom acuan). Untuk pendekatan *forward genetics*, analisis mutan sisipan

T-DNA atau transposon dan pemetaan genetik menggunakan populasi hasil persilangan yang diturunkan dari tetua-tetua dengan fenotipe yang kontras merupakan cara yang sudah terbukti berhasil selama ini. Untuk mutan-mutan kimia (misalkan dengan EMS) lebih cocok digunakan dalam *reverse genetics*. Teknik TILLING (*Targeted Induced Local Lesions in Genomes*) bisa digunakan untuk menyeleksi individu-individu yang memiliki mutasi titik pada gen yang kita inginkan. Agen mutasi fisik seperti iradiasi sinar gamma bisa menghasilkan 30-40 delesi pada genom dari satu

tanaman. Identifikasi posisi delesi dalam genom ini bisa dilakukan dengan *resequencing* mutan dan non-mutan menggunakan teknologi NGS, dengan syarat sudah tersedia sekuen genom acuan untuk spesies tanaman yang diteliti. Namun untuk mengidentifikasi posisi delesi yang mana dari 30-40 posisi delesi ini yang bertanggung jawab terhadap fenotipe mutan masih perlu dilakukan tahapan lain, yaitu pemetaan genetik.

Kurniawan R. Trijatmiko

Pada tahun 2007, BB Biogen telah menghasilkan galur terseleksi tahan penyakit blas yang berasal dari populasi pemetaan untuk gen *Pir4* hasil persilangan lanjut (BC₅) antara IR64 dan spesies padi liar *Oryza rufipogon*. Pada tahun 2009-2010 galur ini telah diuji secara multilokasi (UML) melalui Konsorsium Padi Nasional, dan dinamai sebagai varietas padi sawah tahan blas, BIOSA (Bio110-BC-Pir4). Kelebihan dari varietas BIOSA (Bio110-BC-Pir4) ini adalah:

- GKG rata-rata (5,74 t/ha) tidak berbeda nyata dengan varietas pembandingan (INPARI-1 (5,99 t/ha), Ciherang (6,27 t/ha) dan Gilirang (6,15 t/ha).
- Tahan terhadap tiga ras patogen blas

Varietas	Ras 033	Ras 133	Ras 073	Ras 173
BIOSA	T	T	T	R
Gilirang	R	R	R	R
Ciherang	T	AT	R	R
INPARI-1	R	T	AT	R

Ketahanan terhadap penyakit blas terutama untuk ras-ras blas yang memiliki alel virulensi

Status Terkini (Tahun 2012) Hasil Penelitian Terkait dengan Penyakit Blas

- CM28 (kebanyakan di lokasi endemik blas di Sumsel), tahan terhadap Ras 033, Ras 073, dan Ras 133.
- Agak tahan terhadap hama wereng batang coklat, Biotipe 1, 2, dan 3.
 - Memiliki sifat ketahanan terhadap patogen blas yang berasal dari spesies padi liar *O. rufipogon*, *Pir4* yang dirakit melalui seleksi berbasis marka molekuler (MAS).
 - Varietas BIOSA ini sekarang sudah dimanfaatkan sebagai bahan persilangan dalam program pembentukan galur-galur harapan yang baru dan telah disosialisasikan ke petani di Prambanan di Dusun Polangan, Desa Sumberharjo, Kecamatan Prambanan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta melalui UPTD BPTP DIY, dengan peneliti pendamping Ir. Kristamtini, MSi dan Ir. Setyorini. Di lokasi ini BIOSA ditanam dengan sistem

Legowo 2 : 1, dan diperoleh hasil ubinan 8 t/ha GKP, dengan umur kurang lebih 105 hari setelah sebar. Dengan hasil ini petani merasa senang dan menyatakan bahwa hasil panennya akan digunakan sebagai benih untuk ditanam pada musim berikutnya. Di samping itu, petani lain dari Kabupaten Bantul, DIY juga sudah menyatakan keinginannya untuk menanam varietas BIOSA. Dengan adanya minat petani untuk menanam varietas BIOSA diharapkan varietas hasil perakitan dengan seleksi berbasis marka molekuler ini pada akhirnya dapat bermanfaat bagi petani. Beberapa keragaan varietas BIOSA ini di lokasi pertanaman petani (Bapak Yanto) di Prambanan, Sleman, DIY adalah seperti pada Gambar 1.

Sebagai pengembangan hasil penelitian kerja sama dengan CIRAD, saat ini melalui penelitian RIPP tahun 2010-2011, telah diaplikasikan marka molekuler SSR



A = fase vegetatif, B = fase generatif, C = petani (Bapak Yanto) saat panen, D = malai BIOSA.

Gambar 1. Keragaan BIOSA di lokasi pertanaman petani, Bapak Yanto di Prambanan, Kabupaten Sleman, DIY.

(*simple sequence repeat*) dari genom patogen blas untuk mendeteksi keragaman genetik yang berkembang pada galur-galur tahan penyakit blas. Di samping itu, juga telah diaplikasikan marka molekuler penanda gen *avr ACE1* dan penanda *mating type* patogen blas sebagai hasil dari kerja sama dengan CIRAD, untuk mendeteksi keragaman genetik patogen blas. Informasi yang diperoleh dari kegiatan ini bermanfaat dalam memprediksi tingkat durabilitas galur tahan yang ditanam di lokasi tertentu.

Saat ini telah diinisiasi penelitian kerja sama antara BB Biogen-BB Padi dengan JIRCAS-Jepang, untuk periode April 2012 sampai Maret 2015, dengan tema penelitian “Rice Innovation for Environmentally Sustainable Production Systems”. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan sistem seleksi berdasarkan *Standard Differential System*. Beberapa kegiatan terkait dengan penelitian kerja sama dengan JIRCAS ini adalah identifikasi gen tahan blas pada padi lokal Indonesia serta pembentukan galur

baru berdasarkan *Standard Differential System*. Sebagai informasi awal, saat ini telah teridentifikasi 27 isolat blas sebagai isolat standar yang telah diketahui reaksinya pada *LTH* dan *US2 monogenic lines*. Isolat-isolat standar ini bermanfaat sebagai isolat penskrining plasma nutfah padi sehingga dapat diketahui gen ketahanan yang dimilikinya. Namun demikian isolat-isolat standar ini masih terkait dengan penelitian JIRCAS-BB Padi sehingga belum dapat digunakan secara bebas.

Dwinita W. Utami

ARTIKEL

Gambaran Sederhana Tanaman Transgenik Toleran terhadap Cekaman Biotik dan Abiotik

Cekaman biotik maupun abiotik merupakan salah satu kendala utama dalam peningkatan produksi tanaman pangan di dunia. Secara global, produktivitas tanaman akan menurun akibat cekaman tersebut. Cekaman abiotik yang dominan adalah kekeringan, salinitas tinggi serta temperatur ekstrim, sedangkan cekaman biotik pada tanaman padi yang umum ditemukan adalah penyakit blas dan hama penggerek batang. Banyak penelitian yang diperlukan untuk meningkatkan kemampuan tanaman menghadapi cekaman tersebut.

Penelitian perakitan tanaman transgenik untuk hal ini sudah banyak mengalami kemajuan dengan target utama cekaman kekeringan, penyakit blas dan salinitas tinggi. Tanaman transgenik dirakit dengan memasukkan gen yang berkaitan dengan karakter tanaman yang ingin diperbaiki. Selain itu, dengan adanya kemajuan teknik genetika, ekspresi dari gen yang dimasukkan dapat dikontrol dari sisi waktu, spesifisitas jaringan, serta tingkat ekspresinya, melalui pemilihan promotor yang tepat.

Pemilihan promotor merupakan salah satu pertimbangan yang penting dalam perakitan tanaman transgenik. Promoter yang paling sering digunakan dalam perakitan tanaman transgenik adalah promoter “konstitutif” atau promoter yang selalu mengekspresikan gen setiap saat. Promoter jenis ini mungkin cocok untuk mengekspresikan gen-gen yang produknya dibutuhkan dalam jumlah yang banyak oleh tanaman pada saat terjadi cekaman. Namun ia tidak cocok untuk mengekspresikan gen yang produknya dapat membahayakan pertumbuhan

an tanaman dalam jumlah yang banyak. Maka, bila gen tersebut diekspresikan secara terus menerus, tanaman dapat mengalami kematian. Sehingga, gen-gen yang ingin diekspresikan hanya pada waktu dan/atau organ tertentu, dapat menggunakan promoter yang lebih spesifik yang tidak konstitutif. Beberapa promoter spesifik yang hanya mengekspresikan gen pada organ-organ tertentu sudah diidentifikasi, dan demikian juga dengan promoter yang hanya bekerja pada saat-saat tertentu seperti pada saat terjadi cekaman suhu tinggi.

Promoter pada gen-gen yang terkait dengan cekaman abiotik pada umumnya memiliki lebih dari satu elemen cis atau trans yang mempengaruhi ekspresi gen. Karakter ini banyak dimanfaatkan oleh peneliti untuk mengetahui spesifisitas promoter dan juga faktor/molekul lain (seperti faktor transkripsi) yang mempengaruhi ekspresi gen.

Gen yang diekspresikan pada penelitian perakitan tanaman transgenik untuk meningkatkan keta-

hanan tanaman terhadap cekaman abiotik bisa merupakan gen tunggal yang dapat meningkatkan atau menurunkan salah satu metabolit tanaman yang berpengaruh terhadap ketahanan terhadap cekaman. Artinya ekspresi gen-gen yang membuat enzim-enzim dalam *pathway* suatu metabolit tadi dapat ditingkatkan (atau diturunkan), dan hal ini akan meningkatkan produksi dari metabolit tersebut. Beberapa contoh yang termasuk dalam gen jenis ini adalah gen yang memproduksi *water channel protein*, osmoprotektan (seperti proline, glycinebetain, dan polyamines), *late embryogenesis abundant* (LEA), transproter, serta gen untuk biosintesis lipid.

Gen lain yang menarik dalam penelitian perakitan tanaman transgenik ini adalah gen yang mengkode *regulatory protein* seperti faktor transkripsi dan protein yang terlibat dalam sinyal transduksi. Faktor transkripsi dapat meregulasi ekspresi dari beberapa gen sekaligus melalui interaksinya dengan promoter dari gen yang akan diregu-

lasi. Sehingga, cara ini dianggap paling efektif dalam menyelesaikan masalah cekaman terutama cekaman abiotik yang sebagian besar memang melibatkan ekspresi lebih dari satu gen. Sebagai contoh adalah suatu *pathway* yang diinduksi oleh *abscisic acid* (ABA) pada saat terjadi kekeringan. ABA akan mengaktifkan beberapa faktor transkripsi yang secara kompleks, namun spesifik, akan mengaktifkan ekspresi dari gen-gen yang ada pada mekanisme ini. Sedangkan sinyal transduksi melibatkan sinyal yang diteruskan ke beberapa protein *downstream* sampai pada faktor transkripsi yang akan mempengaruhi ekspresi gen. Seperti halnya faktor transkripsi, sinyal yang disampaikan pada sistem sinyal transduksi dari satu molekul ke molekul berikutnya sangatlah kompleks, namun spesifik, untuk mengubah mekanisme tanaman dalam menghadapi cekaman.

Toto Hadiarto

Transformasi tanaman menggunakan bantuan *Agrobacterium tumefaciens* sudah menjadi pekerjaan rutin di laboratorium-laboratorium bioteknologi yang melakukan kegiatan perakitan tanaman transgenik. *A. tumefaciens* adalah sejenis bakteri tanah dan bersifat patogen terhadap tanaman, dan umumnya menyerang pada tanaman kelompok dikotil dengan ditandai munculnya tumor pada tanaman (*crown gall tumor*). Munculnya penyakit tersebut telah dikenal sejak 1907 dan telah memicu para peneliti dalam mengungkap terjadinya penyakit tersebut. Penelitian tentang *crown gall tumor* mulai

Mengenal T-DNA *Agrobacterium tumefaciens*

berkurang semenjak fokus penelitian berpindah pada mekanisme terbentuknya tumor yang mungkin disebabkan oleh pindahnya gen tertentu dari *A. tumefaciens* ke genom sel tanaman.

Sejak tahun 1984, para peneliti telah mengetahui kemampuan *A. tumefaciens* mentransfer segmen DNA tertentu (T-DNA) dari *Tumor-inducing* (Ti) plasmid ke dalam inti sel tanaman. Integrasi dan ekspresinya secara stabil menyebabkan pembentukan *crown gall* pada tanaman yang terinfeksi *A. tumefaciens* (Gambar 1). Hasil penelitian

membuktikan bahwa T-DNA mengandung 2 tipe gen (gen *oncogenic* dan gen pengkode sintesis *opine*). Gen *oncogenic* mengkode protein enzim yang terlibat dalam sintesis auksin dan sitokinin. Kedua enzim ini bertanggung jawab dalam proses pembentukan *crown gall*. Senyawa *opine*, dihasilkan dari kondensasi antara asam amino dan gula, disintesis dan diekspresikan ke dalam sel-sel tumor sebagai sumber C dan N bagi *A. tumefaciens*. Selain T-DNA, Ti plasmid juga mengandung gen-gen yang terlibat dalam proses transfer

T-DNA dari sel bakteri ke dalam sel tanaman dan juga terlibat dalam proses konjugasi antar sel bakteri.

T-DNA diapit oleh sekuen basa nukleotida berulang yang berukuran 25 bp disebut **border** dan berperan sebagai elemen signal *cis* saat terjadi transfer ke inti sel tanaman. Proses transfer T-DNA dibantu oleh adanya aksi bersama dari beberapa protein virulensi yang dikode oleh gen-gen Virulen (*Vir*) yang berada di daerah plasmid Ti dan gen-gen pada kromosom bakteri. Daerah *Vir* (30 kb) merupakan regulon yang tersusun dari 6 operon penting dalam transfer T-DNA (*VirA*, *VirB*, *VirD*, dan *VirG*) serta faktor peningkat efisiensi transfer (*VirC* dan *VirE*). Sedangkan, gen-gen yang terdapat pada kromosom bakteri terlibat dalam penempelan *A. tumefaciens* pada sel tanaman dan kolonisasi bakteri seperti *chvA*, *chvB*, *chvE*, *cel*, *pscA*, dan *att*. Elemen lokus *chvA* dan *chvB* terlibat dalam sintesis serta ekskresi β -1,2 glucan; elemen *chvE* dibutuhkan untuk peningkatan gula selama proses induksi dari gen-gen *Vir* serta kemotaksis bakteri; lokus *cel* bertanggung jawab dalam sintesis

serabut-serabut selulose; lokus *pscA* (*exoC*) berperan dalam sintesis *cyclic glucan* dan *acid succinoglycan*; juga lokus *att* berperan dalam protein permukaan sel.

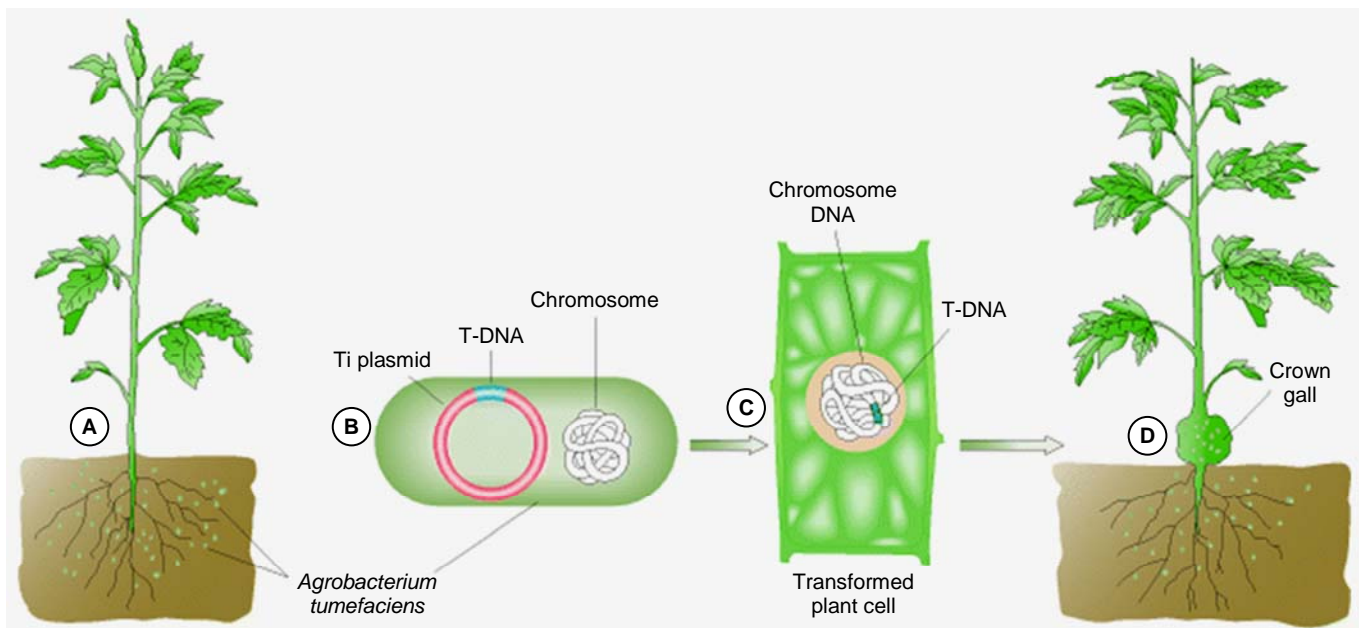
Penelitian awal tentang proses transfer T-DNA ke dalam sel tanaman menunjukkan adanya 3 bukti penting yang bermanfaat dalam proses transformasi tanaman. Faktor pertama, pembentukan tumor sebagai akibat integrasi T-DNA yang diikuti adanya ekspresi gen-gen yang ada di dalamnya. Faktor kedua, gen-gen yang terdapat di dalam T-DNA hanya diekspresikan di dalam sel tanaman dan tidak terlibat dalam proses transfer. Faktor ketiga, sepotong DNA asing yang disisipkan di antara border T-DNA dapat tertransfer ke dalam sel tanaman, tidak peduli berasal dari organisme apa. Tiga faktor tersebut yang akhirnya diikuti dalam konstruksi vektor untuk transformasi tanaman.

Tahun 1983, penelitian yang melibatkan *A. tumefaciens* telah dimulai pada tanaman tembakau. Namun pengetahuan pada saat itu belum banyak. Setelah itu, perkem-

bangun pemahaman terhadap pemanfaatan *A. tumefaciens* mulai menemui titik terang meskipun secara alami bakteri ini hanya menginfeksi tanaman dikotil dan beberapa tanaman yang secara ekonomi penting; termasuk tanaman sereal. Tahun-tahun berikutnya dikembangkan teknik transformasi tanaman secara langsung di antaranya menggunakan polyethylene-glycol (PEG) sejak tahun 1985, mikroinjeksi (1987), elektroporesis protoplas (sejak 1985), dan juga teknologi penembakan partikel (1988). Meskipun begitu, sistem transformasi tanaman melalui *A. tumefaciens* memiliki kelebihan dibandingkan dengan transformasi secara langsung. Beberapa kelebihan tersebut antara lain memiliki jumlah kopi gen rendah, menekan kosupresi dan instabilitas, dan menekan terbentuknya tanaman abnormal.

Proses Transfer T-DNA *A. tumefaciens*

Beberapa tahapan penting transfer gen dari *A. tumefaciens* ke dalam sel tanaman antara lain (1) kolonisasi bakteri, (2) induksi



Gambar 1. Proses terbentuknya penyakit *crown gall* (<http://www.bio.davidson.edu/courses/molbiro/>).

virulensi bakteri, (3) pembentukan kompleks T-DNA, (4) transfer T-DNA, (5) integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman. Langkah ini secara detail dijabarkan dalam 10 tahapan pada Gambar 2.

Kolonisasi bakteri

Kolonisasi bakteri merupakan tahap awal dan penting dalam proses induksi tumor oleh *A. tumefaciens* saat menempel pada permukaan sel tanaman. Penempelan bakteri pada permukaan sel tanaman dipengaruhi oleh adanya senyawa *acidic polysaccharide* yang berperan dalam interaksi antara bakteri dengan inang. Di samping itu, di dalam kromosom bakteri terdapat lokus *att* berukuran 20 kb yang mengandung gen yang dibutuhkan untuk proses penempelan bakteri pada tanaman. Apabila lokus *att* mengalami mutasi maka bakteri akan kehilangan kemampuan untuk melakukan penempelan pada permukaan sel tanaman.

Induksi virulensi bakteri

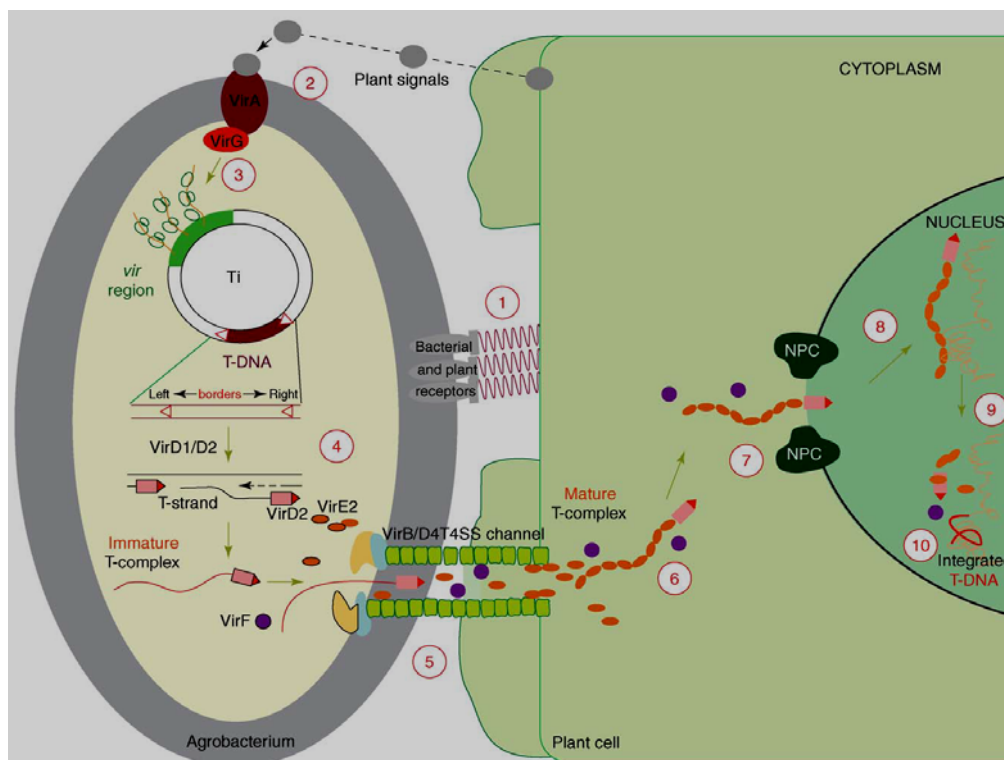
Transfer T-DNA dimediasi oleh adanya senyawa yang diproduksi oleh daerah *Vir* (30-40 kb) pada plasmid Ti (Gambar 3). Daerah *Vir* mengandung sekitar 6 operon penting (*VirA*, *VirB*, *VirC*, *VirD*, *VirE*, dan *VirG*) dan 2 operon kurang penting (*VirF* dan *VirH*). Operon konstitutif hanya *VirA* dan *VirG* yang mengkode dua komponen (*VirA-VirG*) sebagai transkripsi gen *Vir*. Kedua komponen tersebut memiliki struktur dan fungsi yang sama. *VirA* merupakan protein sensor transmembran yang mendeteksi signal molekul dari senyawa fenolik dari tanaman terluka. Signal tersebut termasuk pH asam, senyawa fenol seperti *acetosyringone*, dan klas tertentu dari monosakarida yang sinergi dengan senyawa fenol.

VirA yang telah aktif mempunyai kemampuan untuk mentransfer fosfat ke residu aspartat dari DNA yang mengikat protein sitoplasma. *VirG* berfungsi sebagai

faktor transkripsi yang mengatur ekspresi gen *Vir* yang difosforilasi *VirA*. Aktivasi sistem *Vir* dipengaruhi oleh faktor eksternal seperti pH dan temperatur. Pada temperatur lebih tinggi (>32°C), gen *Vir* tidak akan terekspresi karena adanya perubahan pengaruh induksi *VirA*. Akibat pengaruh suhu yang tinggi ini berakibat transfer T-DNA tidak akan terjadi.

Pembentukan kompleks T-DNA

Aktivasi gen *Vir* menghasilkan molekul untai tunggal (*single-stranded; ss-*) sebagai turunan salah satu untai T-DNA. Sepotong DNA yang disisipkan di antara border T-DNA akan ditransfer ke dalam sel tanaman sebagai untai tunggal. Pada kondisi T-DNA seperti ini, protein *VirD1* dan *VirD2* mulai bekerja dengan mengenali sekuen border dan memotong sisi dasar border dengan enzim *endonuclease*. Setelah terbentuk potongan T-DNA, protein *VirD1* menempel ujung 5' secara kovalen pada untai tunggal



Gambar 2. Sepuluh langkah penting transfer T-DNA ke inti sel tanaman (Tzfira dan Citorsky, 2006).

T-DNA membentuk suatu kompleks (Gambar 2). Komplek T-DNA mampu mencegah aksi enzim *exonuclease* pada ujung 5' ss-T-DNA.

Transfer T-DNA

Komplek protein-ss-T-DNA ditransfer ke inti sel melalui membran sel, dinding sel tanaman, dan rongga seluler (sitoplasma). Komplek tersebut dilindungi dengan protein *VirE2* yang berguna untuk mencegah aksi *nuclease*. Protein *VirE2* mengandung 2 signal lokasi nucleus (*nuclear location signals-NLS*) dan *VirD2* hanya satu. Berdasarkan penelitian kedua protein tersebut sangat berperan dalam pemasukan T-DNA ke inti sel tanaman dan proses transfer tidak akan terjadi bila kedua protein tersebut diadukan. Keberadaan protein *VirE2* tergantung adanya protein *VirE1*. Strain mutan bakteri yang tidak menghasilkan protein *VirE1* tidak mampu mentransfer ss-T-DNA ke sel tanaman. Selain protein-protein tersebut, juga ada keterlibatan protein *VirD4* yang berperan dalam transfer kompleks protein-ss-T-DNA ke tanaman. Protein ini berperan sebagai protein *ATP-dependent linked* untuk proses translokasi T-DNA.

Integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman

Di dalam sel tanaman, peran *VirD2* dan *VirE2* masih penting dalam memandu kompleks ss-T-DNA menembus membran inti sel. Dalam proses menembus membran inti sel dibantu adanya peran dari fungsi NLS yang dimiliki oleh protein *VirD2* dan *VirE2*. Dua NLS-*VirE2* yang berasosiasi dengan protein tertentu juga penting dalam mengimpor kompleks ss-T-DNA dan dimungkinkan berperan pada dua sisi pori membran inti sehingga terbuka secara bersamaan. Tahap akhir transfer T-DNA adalah integrasi pa-

da genom tanaman. Mekanisme integrasinya masih belum diketahui jelas dan diduga melalui mekanisme perpasangan beberapa basa; dikenal sebagai *micro-homology* yang melibatkan tahap *pre-annealing* antara untai T-DNA yang dibungkus *VirD2* dengan DNA tanaman.

Homologi sekuen tersebut lemah dan hanya memiliki spesifitas sangat kecil dalam proses rekombinasinya yang dibantu *VirD2* untuk ligasinya. Dan ujung 3' T-DNA akan mendapatkan komplemennya dengan DNA tanaman melalui proses homologi dalam kontakannya (sinapsis) yang menimbulkan gap 3'-5' pada DNA tanaman. Gap DNA tersebut dipotong oleh *endonuclease* atau *exonuclease* 3'-5'. Tahap selanjutnya, ujung 5' ss-T-DNA (yang mengandung *VirD2*) dan ujung 3' ss-T-DNA menyisip pada rantai DNA tanaman yang terpotong. Saat, ss-T-DNA telah bergabung dengan DNA tanaman, akan diikuti dengan pemotongan DNA tanaman pada sisi lainnya. Keadaan ini memicu proses mekanisme repair DNA tanaman berdasar insert ss-T-DNA

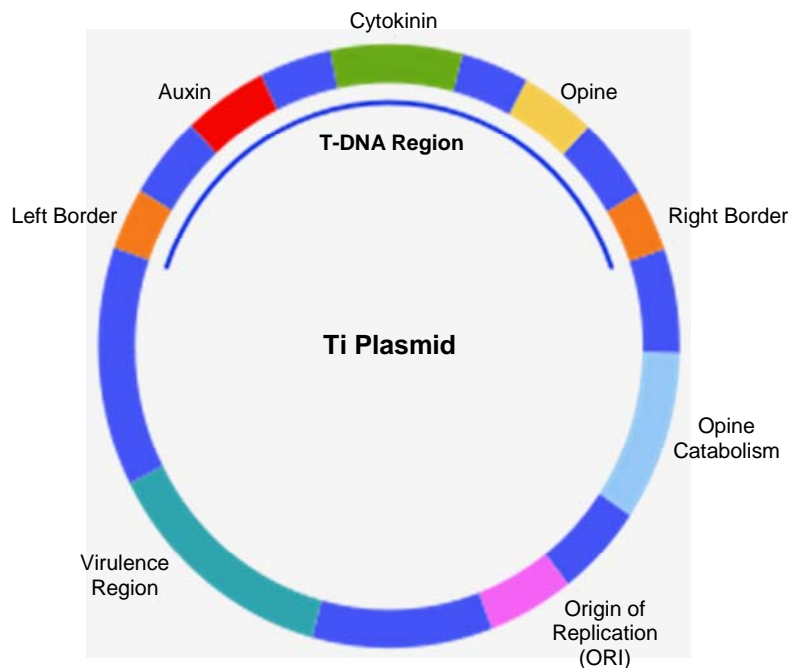
sebagai cetakan. Penyempurnaan integrasi T-DNA tersebut dipandu oleh *VirD2* hingga rantai T-DNA sempurna pada kromosom tanaman. Setelah selesai integrasi, *VirD2* dilepas dan menghasilkan energi dalam membentuk ikatan fosfodiester berupa substrat elektrofilik untuk ikatan 3'-OH dari DNA tanaman. T-DNA yang telah terintegrasi secara utuh akan terekspresi seperti gen-gen lain yang ada pada kromosom tanaman.

Demikianlah sekelumit uraian tentang T-DNA *A. tumefaciens*, semoga ada manfaatnya.

Sumber Bacaan

- de la Riva, G.A., J. González-Cabrera, R. Vázquez-Padrón, and C. Ayra-Pardo. 1998. *Electronic J. Biotechnology* 1(3).
- Tzfira, T. and V. Citovsky. 2006. *Current Opinion in Biotechnology* 17:147-154.
- http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/talbert/favorite_molecular_tool.html

Edy Listanto



Gambar 3. Plasmid Ti (de la Riva et al., 1998).

Judul Penelitian di BB Biogen Tahun 2012

APBN

1. Konservasi 40 aksesori mikroba pertanian dan dokumentasi plasma nutfah mikroba dan spesifik serangga pertanian.
2. Penelitian dan pengembangan konservasi, karakterisasi, dan dokumentasi 4.610 plasma nutfah tanaman pertanian.
3. Pengembangan dan penyimpanan ubi minor (*Dioscorea* sp.) melalui metode kriopreservasi.
4. Pembentukan 220 galur M₅, 50 galur M₆, 40 galur M₇ kedelai serta 5 galur generasi T₁ untuk karakter umur genjah.
5. Pembentukan 20 galur padi BC₅F₁-Ciherang dan BC₅F₁-Situ Bagendit untuk efisiensi pupuk N dan P 30% serta potensial hasil 6-8,5 t/ha.
6. Perbaikan ketahanan padi varietas unggul baru terhadap wereng coklat metode NABC berbasis marka gen bph3.
7. Transformasi gen *cryIAC* dengan berbasis *Agrobacterium* untuk pembentukan padi tahan penggerek batang.
8. Pembentukan 4 galur tanaman transgenik kentang tahan penyakit hawar daun (*Phytophthora infestans*) yang dapat mengurangi 50% aplikasi fungisida.
9. Karakterisasi ketahanan galur-galur cabai mutan somaklonal (M₂) hasil kultur *in vitro* yang dikombinasikan dengan mutagen kimia EMS.
10. Karakterisasi ketahanan transforman putative dan mutan beberapa pisang ambon kuning terhadap penyakit layu Fusarium.
11. Perakitan 16 galur transforman putative gandum yang adaptif panas.
12. Pembentukan empat peta genetik sawit, jarak pagar, padi, dan kedelai dan identifikasi marka SNP kakao dan sapi.
13. Kloning 2 gen kandidat toleran kekeringan dan 2 gen kandidat produktivitas tinggi dari 2 gen umur genjah tanaman padi.
14. Sentra gen penyandi kompleks toksin A dan D (Tos dan Tod) dari bakteri entomopatogen wereng batang coklat (*Serratia marcescens*).
15. Analisis sidik jari DNA 288 aksesori plasma nutfah pertanian (padi, kedelai, dan manggis) dalam hubungan kekerabatan sebagai pendiri spesifik plasma nutfah.
16. Bioprospeksi senyawa bioaktif untuk pengendalian serangga hama *Spodoptera litura* sehingga tingkat serangga lebih rendah dari 10%.

KERJA SAMA DALAM NEGERI

Program Insentif Riset Lanjutan

1. Identifikasi struktur populasi wereng coklat di sentra produksi padi di Jawa berdasarkan marka molekuler dan seleksi galur padi produk bioteknologi tahan wereng coklat berdaya hasil 9 ton/hektar.
2. Sinergisitas dan stabilitas ekspresi gen *OsERF1* dan *OsDREB1A* pada progeni silangan padi Ciherang x Nipponbare transgenik untuk toleransi terhadap salinitas tinggi.

Program Insentif Peningkatan Kemampuan Peneliti dan Perekayasa (PKPP)

1. Produksi massal bibit tebu (PS 864 dan PS 881) dengan stabilitas genetik tinggi dan bebas virus hasil kultur apeks untuk pengembangan di Sulawesi.
2. Pengendalian penggerek batang padi kuning dan HDB dengan biorational pestisida (feromon, entopatogen, endofit) dalam skala luas (20-30 ha).
3. Observasi daya hasil galur-galur padi turunan Code dan Ciherang berumur genjah dan produksi tinggi hasil MAB (*Marker Assisted Backcrossing*).
4. Uji adaptasi dan stabilitas hasil galur harapan mutan dihaploid padi tipe baru di kawasan Indonesia Timur.
5. Uji daya hasil lanjutan galur-galur mutan M_8 dari kedelai varietas Grobogan dan M_8 Anjasmoro berumur genjah dan toleran terhadap kekeringan.
6. Uji daya hasil pendahuluan galur harapan padi sawah introduksi IRRI dan galur dihaploid hasil silang ganda tahan terhadap HDB dan/atau wereng coklat.
7. Uji daya hasil pendahuluan galur-galur mutan M_5 kedelai Sindoro dan Wilis hasil seleksi *in vitro* toleran kekeringan dan berdaya hasil tinggi.

Program Kerja Sama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T)

1. Perakitan padi hibrida berumur sangat genjah (90-104 HSS) berpotensi hasil tinggi (10 t/ha) untuk meningkatkan produksi lahan sawah tadah hujan.
2. Formula konsorsium mikroba ramah lingkungan untuk pengendali penyakit blas, hawar daun bakteri, dan hawar pelepah padi dalam upaya meningkatkan produktivitas tanaman padi organik.
3. Diferensiasi DNA mitokondria dan karakterisasi gen pengikat feromon seks penggerek batang padi kuning untuk meningkatkan efektifitas pengendalian hama padi.

KERJA SAMA LUAR NEGERI

1. *Drought from a different perspective: Improved tolerance through phosphorus acquisition.*
2. *Capacity building and enhanced regional collaboration for the conservation and sustainable use of plant genetic resources in Asia.*
3. *Development of late blight resistant (LBR) potato for Indonesia-Confined Field Trials and Associated Studies.*
4. *Regeneration of rice, sweetpotato, taro (Colocasia) and maize collections, Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (ICABIOGRAD), Indonesia.*