

GAGASAN: AKSELERASI PEMULIAAN KELAPA SAWIT VIRESCENS MEMANFAATKAN TEKNOLOGI *GENOME EDITING* DAN NANO PARTIKEL

Heri Adriwan Siregar

Abstrak - Salah satu pendekatan rekayasa DNA adalah pengeditan genom CRISPR/Cas9 yang digunakan untuk perbaikan sifat diinginkan. Teknologi ini telah didemonstrasikan dan berhasil diterapkan untuk mengedit gen target pada berbagai spesies tanaman. Namun, kendala muncul pada proses memasukkan komponen CRISPR/Cas9 ke dalam sel tanaman yang tebal dan termasuk kendala proses mengkultur sel tanaman yang sudah diedit. Baru-baru ini dilaporkan keberhasilan nanobioteknologi dengan salah satu pendekatannya yang dikenal dengan magnetik nanopartikel pada upaya rekayasa DNA tanaman kapas. Gagasan memanfaatkan dan menggabungkan kedua paket teknologi tersebut muncul pada berbagai publikasi ilmiah terutama pada tanaman disebabkan kelemahan dan kekuatan masing-masing teknologi yang saling melengkapi. Hingga saat ini memang belum ada yang melaporkan keberhasilan memanfaatkan penggabungan kedua teknologi tersebut, namun pembahasan ilmiahnya dapat dengan mudah ditemukan dan sangat menarik perhatian para pemulia tanaman termasuk kelapa sawit. Kedua teknologi tersebut tampaknya layak diujicoba demi keberhasilan dan akselerasi pemuliaan tanaman tahunan kelapa sawit *virescens* atau pada karakter agronomis lainnya.

Kata kunci: bionanopartikel, edit genom, kelapa sawit, pemuliaan, *virescens*

PENDAHULUAN

Kelapa sawit *virescens*

Bahan tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) saat ini adalah berupa kelapa sawit jenis tenera (T) yang merupakan hasil persilangan kelapa sawit jenis dura (D) dengan tanaman kelapa sawit jenis pisifera (P). Kelapa sawit dura memiliki ciri utama cangkang buah tebal dan daging tipis, sehingga rendemen CPO lebih sedikit. Jenis pisifera memiliki ciri utama tanpa cangkang buah dan daging tebal sehingga rendemen CPOnya tinggi, namun biasanya mengalami aborsi. Sementara itu, jenis tenera memiliki ciri utama cangkang buah tipis dan daging tebal. Oleh karena itu, kelapa sawit jenis tenera memiliki produktivitas lebih tinggi karena sifat heterosis dari jenis dura dan pisifera.

Berdasarkan warna buah, kelapa sawit dibedakan atas tiga yaitu, *nigrescens*, *virescens*, dan *albescens*.

Karakter buah *nigrescens* mentah berwarna ungu tua hingga hitam dan hanya berubah menjadi sedikit merah dengan semburat ungu saat matang (Rao dan Chang, 2020). Sementara itu, karakter buah *virescens* mentah berwarna hijau pekat dan berubah menjadi oranye pekat saat matang panen. Sedangkan, jenis *albescens* memiliki warna buah pucat dan sangat jarang dibudidayakan saat ini. Sebagian besar tanaman kelapa sawit yang dibudidayakan berasal dari jenis *nigrescens*, sedangkan jenis *virescens* tidak banyak dibudidayakan.

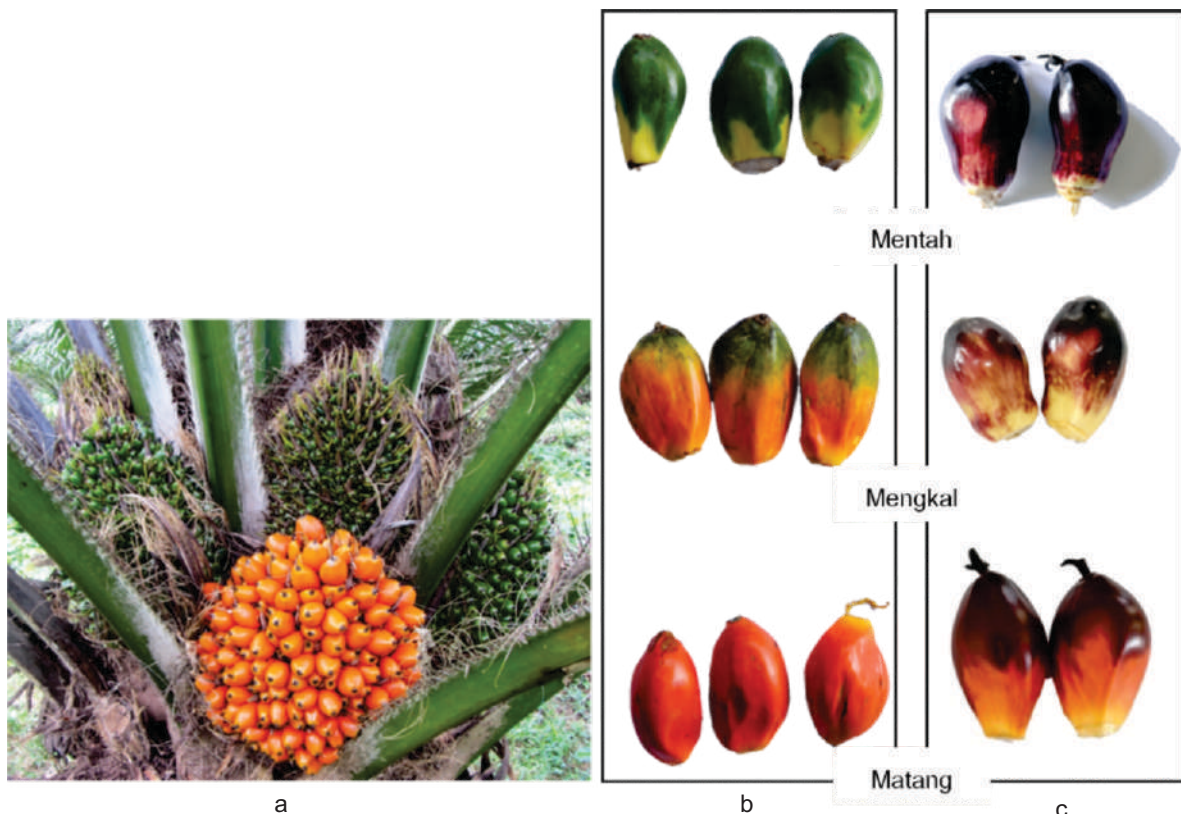
Hasil penelitian menunjukkan bahwa komposisi gizi dan nutrisi antara buah *virescens* dan *nigrescens* tidak jauh berbeda. Di sisi lain, kelapa sawit *virescens* memiliki keunggulan dalam hal penentuan buah matang secara visual dibanding *nigrescens*. Hal ini disebabkan perubahan warna menjadi oranye terang lebih mudah dilihat saat mengidentifikasi buah matang dari kejauhan dibandingkan *nigrescens* yang berwarna ungu gelap kemerahan. Oleh karena itu, kriteria matang panen jenis buah *nigrescens* adalah sejumlah buah lepas dan jatuh ke tanah yang menyebabkan potensi kehilangan hasil dan pekerjaan tambahan untuk mengumpulkan buah (Siregar et al., 2020; Mohd Ramadhan et al., 2021).

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Heri Adriwan Siregar (✉)
Pusat Penelitian Kelapa Sawit
Jl. Brigjen Katamsno No. 51 Medan 20158, Indonesia
Email: heri_adriwan@me.com

Warna buah hijau saat mentah menjadi oranye secara bertahap saat matang dikendalikan oleh gen *VIRESCENS*, kemudian dikenal sebagai gen *VIR*. Lima alel mutan independen gen *VIR* telah diidentifikasi dari lebih dari 400 aksesori asal Afrika sub-Sahara yang menjelaskan fenotipe *virescens* dominan-negatif. Setiap mutasi pada alel tersebut menghasilkan

penghentian prematur pada domain karboksiterminal gen *VIR* (Singh et al., 2014). Sifat *virescens* adalah dominan, namun penyebaran kelapa sawit *virescens* jauh lebih rendah daripada *nigrescens*, yaitu kurang dari 1% di Nigeria dan Angola dan hampir 50% di daerah Kongo (Rajanaidu, 1985; Rao dan Chang, 2020).



Gambar 1. Kelapa sawit *virescens* menunjukkan warna buah oranye pekat pada tandan matang dan warna buah hijau pekat pada tandan mentah. Tandan buah segar *virescens* (a); berondolan *virescens* (b); berondolan *nigrescens* (c) (Siregar et al., 2020)

Jenis tenera *virescens* komersial berpotensi dihasilkan melalui persilangan antara pohon induk kelapa sawit dura *virescens* terpilih dengan pisifera *virescens* terpilih, namun terkendala pada status genetik kelapa sawit dura atau pisifera *virescens* yang umumnya mengandung gen *VIR* heterozigot. Secara terori persilangan antaradura dan pisifera *virescens* heterozigot akan menghasilkan projeni berupa kelapa sawit tenera yang terdiri atas sebagian *virescens* (~75%) dan *nigrescens* (~25%). Untuk memperoleh kelapa sawit tenera *virescens*

sepenuhnya (100%), maka pohon induk kelapa sawit dura atau pisifera *virescens* mengandung gen *VIR* homozigot sangat dibutuhkan. Dengan demikian, tantangan utama adalah menemukan calon pohon induk kelapa sawit dura, pisifera, atau tenera *virescens* yang memiliki gen *VIR* homozigot sekaligus dengan nilai potensi produksi tinggi.

Beberapa pendekatan bioteknologi cukup potensial dimanfaatkan untuk mempercepat perakitan kelapa sawit varietas *virescens* 100% (DxP *Virescens* 100) seperti *genome editing* dan

nanobioteknologi. Di bawah ini diuraikan sekilas mengenai kedua pendekatan tersebut dan kemungkinan aplikasinya pada kelapa sawit berdasarkan keberhasilannya pada tanaman lain.

TEKNOLOGI CRISPR-CAS9

Teknologi *genome editing* dikembangkan untuk memungkinkan perubahan tertentu pada bagian genetik suatu organisme (Budiani et al., 2018). Bagian utama teknologi ini adalah nuklease spesifik lokasi (SSN, *site-specific nuclease*) yang dapat direkayasa untuk menargetkan urutan gen tertentu secara tepat. Salah satu teknik pengeditan adalah *clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated 9 nuclease* (CRISPR-Cas9). Sistem CRISPR bergantung pada RNA yang berfungsi sebagai bagian penargetan dan juga mengarahkan nuklease ke urutan DNA tertentu. Selain itu, nuklease juga berfungsi menginduksi *double-strand break* (DSB) di lokus genom yang telah ditentukan. Pembentukan DSB kemudian merangsang perbaikan DNA inang yang memiliki dua jalur yaitu: homologous recombination (HR) dan *non-homologous end-joining* (NHEJ). Mekanisme HR memperbaiki DSB melalui integrasi *sequence* yang mengandung *sequence homology* yang mengapit DSB. Perbaikan yang dimediasi HR dapat digunakan untuk memasukkan urutan yang diinginkan melalui rekombinasi perbaikan eksogen atau *template* donor dengan lokus target. Sementara itu, mekanisme NHEJ cukup rawan kesalahan karena menyisipkan atau menghapus secara acak (indel) dengan berbagai ukuran, sehingga menghasilkan mutasi frameshift pada coding *sequence*, lalu terjadi knockout gen (Montecillo et al., 2020).

Mekanisme NHEJ terjadi dengan frekuensi yang lebih tinggi di sebagian besar organisme, termasuk tanaman. Sistem CRISPR-Cas9 diklaim memiliki pendekatan yang relatif sederhana, murah, dan fleksibel karena berdasarkan nuklease yang dipandu RNA. Keberhasilan sistem CRISPR-Cas9 untuk menginduksi mutagenesis bergantung pada beberapa hal antara lain, efisiensi vektor yang sesuai serta komponen molekuler lainnya seperti urutan gen Cas9, promotor, desain RNA pemandu, metode transformasi dan kemampuan regenerasi tanaman (Montecillo et al., 2020).

TEKNOLOGI NANO PARTIKEL

Nanobioteknologi menggunakan serat nano, kapsul nano, dan partikel nano sebagai wadah pembawa gen dan substansi ke dalam tubuh tanaman akan memicu ekspresi gen serta mengontrol materi genetik di dalam tanaman. Dengan memanfaatkan pendekatan baru, mendesain ulang DNA benih dapat dilakukan untuk memasukkan sifat-sifat yang diinginkan seperti perubahan hasil, musim pertumbuhan, dan warna tanaman.

Nanomaterial dapat dikategorikan menjadi empat jenis antara lain: 1. berbasis anorganik; 2. berbasis karbon; 3. berbasis organik; dan 4. berbasis komposit. Secara umum, nanomaterial berbasis anorganik terdiri atas material nano logam dan oksida logam. Beberapa nanomaterial anorganik berbasis logam adalah material nano perak (Ag), emas (Au), aluminium (Al), kadmium (Cd), tembaga (Cu), besi (Fe), seng (Zn), dan timbal (Pb), sedangkan contoh nanomaterial anorganik berbasis oksida logam adalah seng oksida (ZnO), oksida tembaga (CuO), magnesium aluminium oksida (MgAl₂O₄), titanium dioksida (TiO₂), selenium oksida (SeO₂), oksida besi (Fe₂O₃), silika (SiO₂), dan oksida besi (Fe₃O₄), dan sebagainya. Bahan nano berbasis karbon meliputi graphene, fullerene, tabung nano karbon berdinding tunggal, tabung nano karbon berdinding banyak, serat karbon, karbon aktif, dan karbon hitam. Sementara itu, nanomaterial berbasis organik terbentuk dari material organik yang tidak termasuk material karbon, misalnya dendrimer, siklodekstrin, liposom, dan misel. Sedangkan, nanomaterial komposit adalah kombinasi apa pun dari nanomaterial berbasis logam, berbasis oksida logam, berbasis karbon, dan/atau berbasis organik, dan material nano ini memiliki struktur yang rumit seperti kerangka logam-organik.

Hampir semua metode modifikasi genetik saat ini membutuhkan regenerasi dari kultur jaringan, yang melibatkan proses rumit, panjang dan melelahkan. Banyak spesies tanaman seperti kapas sulit untuk diregenerasi. Zhao et al. (2017) melaporkan bahwa magnetofeksi serbuk sari, secara langsung menghasilkan benih transgenik tanpa regenerasi kultur jaringan. DNA eksogen dimuat dengan nanopartikel magnetik yang disisipkan ke serbuk sari

dengan adanya medan magnet. Selanjutnya, tanaman transgenik berhasil diperoleh melalui penyerbukan dan dari benihnya yang diubah. DNA eksogen berhasil diintegrasikan ke dalam genom, diekspresikan secara efektif dan diwariskan secara stabil pada keturunannya. Proses magnetofeksi serbuk sari dapat mengubah hampir semua tanaman dan memudahkan proses pemuliaan varietas baru tanaman transgenik.

Magnetofeksi menggunakan gaya magnet dapat membantu pengambilan DNA yang terkait dengan nanopartikel magnetik (MNPs, *magnetic nanoparticles*) ke dalam sel target. Tidak seperti sel mamalia atau bakteri, sel tumbuhan memiliki dinding sel yang membuat pertahanan terhadap pengiriman DNA eksogen. Sementara itu, serbuk sari memiliki permukaan dengan diameter sekitar 5-10 μm dengan dinding serbuk sari relatif tipis atau bahkan tidak ada. Dinding serbuk sari yang lebih tipis dengan permeabilitas lebih tinggi memungkinkan untuk mengirimkan gen eksogen melintasi membran ke bagian dalam serbuk sari. Dalam teknologi magnetofeksi polen, MNP Fe_3O_4 berlapis polietilenimin bermuatan positif digunakan sebagai pembawa DNA untuk mengikat dan mengembun dengan DNA yang bermuatan negatif untuk membentuk kompleks MNP-DNA. Setelah pencampuran kompleks MNP-DNA dengan serbuk sari, medan magnet kemudian diterapkan untuk mengarahkan kompleks MNP-DNA ke dalam serbuk sari melalui lubang sebelum penyerbukan (Gambar 1). Kemudian, tanaman transgenik akan diperoleh setelah penyaringan kanamisin dari biji yang diubah.

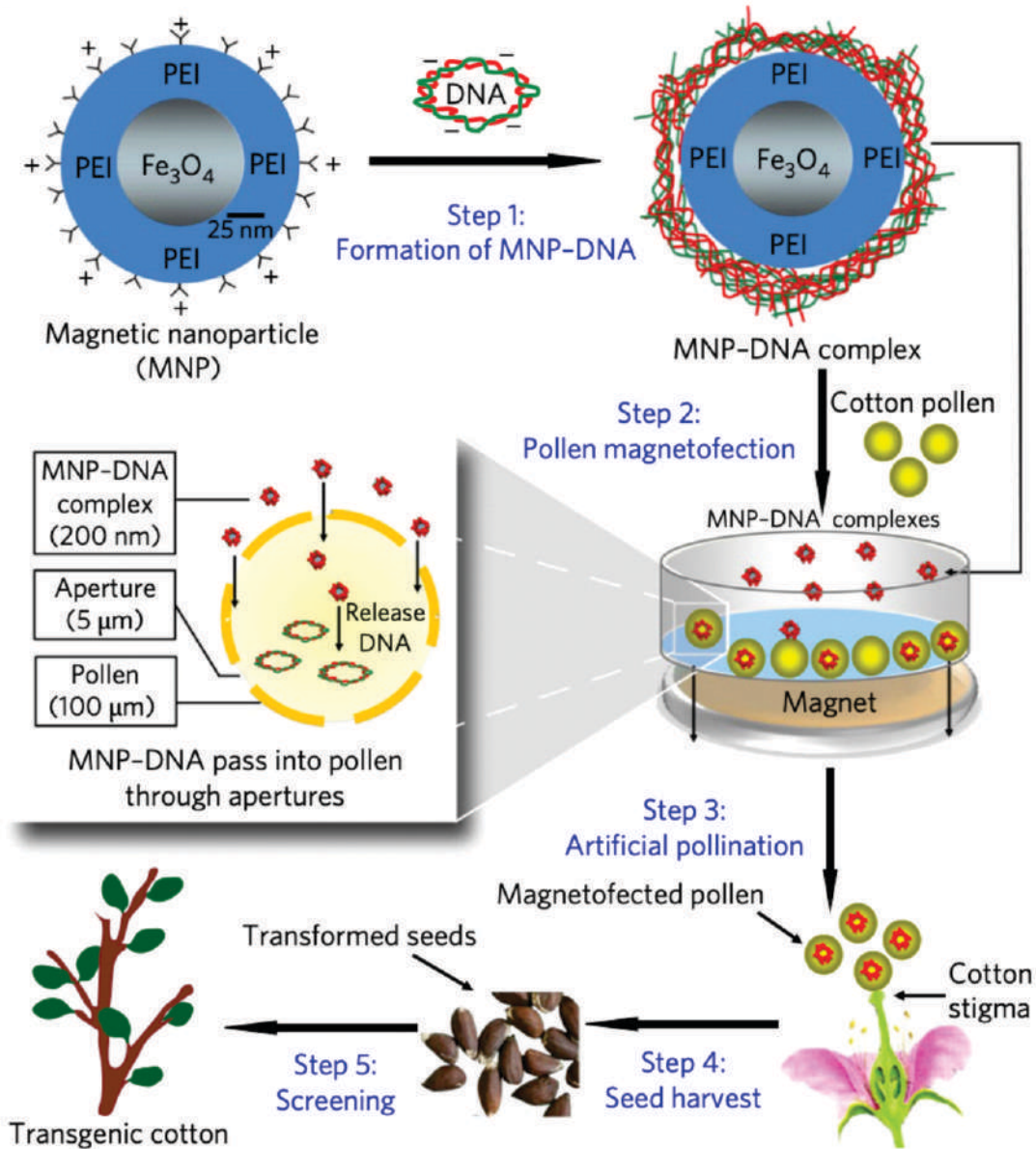
Kompleks MNP-DNA disiapkan dengan memuat DNA plasmid pada MNP. MNP adalah partikel berbentuk bola dengan diameter rata-rata 168 nm dan bermuatan positif +48,2mV. Sifat magnetik MNP diukur dengan alat magnetometer dan menunjukkan perilaku superparamagnetik yang khas dari MNP. Berdasarkan pengukuran potensi zeta dan DLS, diameter rata-rata kompleks MNP-DNA meningkat dengan penurunan potensi zeta, tergantung pada rasio antara DNA pada MNP, misalnya rasio massa 1:1, 1:0,5 dan 1:0,1 DNA terhadap MNP.

GAGASAN AWAL NANOBIO TEKNOLOGI PEMULIAAN KELAPA SAWIT

Kaur et al. (2022) berhasil meningkatkan daya kecambah jagung dengan memanfaatkan nanopartikel

MgO yang disintesis secara biologi dengan menggunakan magnesium asetat dan larutan ekstrak tanaman *Cissus quadrangularis* sebagai zat pereduksi pengganti senyawa kimia. Hal tersebut membuktikan bahwa nanopartikel tidak merusak sel tanaman hingga menyebabkan kematian sel secara signifikan. Selain itu, keberhasilan penerapan MNP pada polen telah dilaporkan seperti pada kapas (Zhao et al., 2017; Zhang et al., 2019). Atas keberhasilan tersebut, layak dicoba transformasi DNA serbuk sari kelapa sawit dengan menggunakan teknologi nanopartikel yang membawa konstruk CRISPR/Cas9 dengan sgRNA yang secara khusus ditargetkan untuk gen VIR. Hingga saat ini memang belum ada laporan mengenai keberhasilan magnetifikasi polen yang dikombinasikan *genome editing*, namun keuntungan dari metode ini adalah kita dapat langsung mentransfer ribonukleoprotein CRISPR/Cas9 ke dalam polen yang kemudian akan diserbukkan ke putik. Metode ini akan dapat menghemat waktu, biaya dan tenaga yang dibutuhkan untuk kultur jaringan dan seleksi transgenik yang merupakan prosedur lanjutan dari *genome editing* (Sandhya et al., 2020).

Ide awal memanfaatkan pendekatan CRISPR-Cas9 dalam membantu percepatan perakitan DxP Virescens 100 adalah melalui jalur NHEJ. Diawali dengan konstruksi sistem CRISPR-Cas9 yang secara khusus akan ditargetkan pada gen VIR dengan menentukan situs target (protospacer). Primer yang terdiri atas 20 nukleotida dan desain RNA panduan tunggal (sgRNA) dan protein Cas9 kemudian disiapkan dengan memanfaatkan perangkat lunak (Hwang et al., 2013; Ran et al. 2013). Mutasi yang akan terjadi pada nukleotida gen VIR akan menghasilkan domain karboksit-terminal pada gen VIR dan diharapkan akan mengekspresikan fenotipe virescens. Kompleks MNP-DNA kemudian disiapkan dengan memuat DNA konstruk pada MNP dan prosedur yang dijelaskan Zhao et al. (2017) diterapkan pada polen kelapa sawit yang akan diedit. Pada akhirnya serbuk sari yang sudah diedit akan digunakan untuk menyerbuki bunga betina kelapa sawit jenis dura virescens. Projeni yang dihasilkan diharapkan berupa kelapa sawit jenis tenera virescens (100%) disebabkan sifat dominan dari gen VIR terhadap nigrescens.



Gambar 2. Skema magnetofeksi serbuk sari pada tanaman kapas (Zhao et al., 2017)

KESIMPULAN

Keberhasilan pendekatan *genome editing* dan bionanoteknologi khususnya *magnetic nanoparticle* polen pada beberapa tanaman cukup menggembirakan. Penerapannya pada kelapa sawit untuk penelitian pemuliaan akan sangat membantu dalam hal efisiensi biaya dan waktu. Oleh karena itu, dengan tetap memantau kemajuan teknologi ini sembari memulai penerapannya pada kelapa sawit perlu dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Budiani, A., Putranto, R. A., Riyadi, I., Minarsih, H., & Faizah, R. (2018, August). Transformation of oil palm calli using CRISPR/Cas9 System: toward genome editing of oil palm. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 183, No. 1, p. 012003). IOP Publishing.
- Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M. L., Tsai,

- S. Q., Sander, J. D., ... & Joung, J. K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(3), 227-229.
- Mohd, R. K., Abd Rahim, S., & Norman, K. (2021). Mechanising Oil Palm Loose Fruits Collection-A Review. *Journal of Oil Palm Research*, 33(1), 1-11. <https://doi.org/10.21894/jopr.2020.0069>
- Montecillo, J. A. V., Chu, L. L., & Bae, H. (2020). CRISPR-Cas9 system for plant genome editing: Current approaches and emerging developments. *Agronomy*, 10(7), 1033.
- Rajanaidu, N. (1985). Proceedings of the International Workshop on Oil Palm Germplasm and Utilization. contour analysis. *Biosyst. Eng.* 171, 78-90
- Ran, F. A. F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281-2308.
- Rao, V., and Chang, K. C. (2020). Breeding virescens oil palm. *Journal of Oil Palm Research*. <https://doi.org/10.21894/jopr.2020.0098>.
- Sandhya, D., Jogam, P., Allini, V. R., Abbagani, S., & Alok, A. (2020). The present and potential future methods for delivering CRISPR/Cas9 components in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1), 1-11.
- Singh, R., Low, E. T. L., Ooi, L. C. L., Ong-Abdullah, M., Nookiah, R., Ting, N. C., ... & Sambanthamurthi, R. (2014). The oil palm VIRESCENS gene controls fruit colour and encodes a R2R3-MYB. *Nature communications*, 5(1), 1-8. DOI: 10.1038/ncomms5106
- Siregar, H. A., Yenni, Y., Setiowati, R. D., Supena, N., Suprianto, E., & Purba, A. R. (2020). Cameroon virescens oil palm (*Elaeis guineensis*) from IOPRI's Germplasm. *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 42(2), 283-294.
- Zhang, R., Meng, Z., Abid, M. A., & Zhao, X. (2019). Novel pollen magnetofection system for transformation of cotton plant with magnetic nanoparticles as gene carriers. In *Transgenic cotton* (pp. 47-54). Humana Press, New York, NY.
- Zhao, X., Meng, Z., Wang, Y., Chen, W., Sun, C., Cui, B., ... & Cui, H. (2017). Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers. *Nature plants*, 3(12), 956-964.