

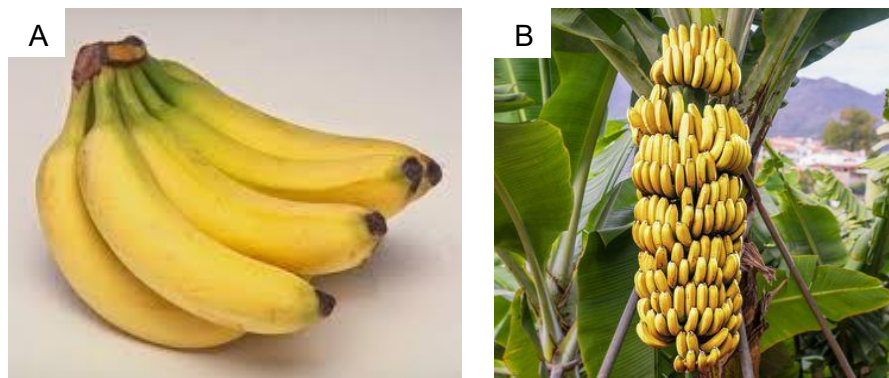
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Pisang Cavendish (*Musa acuminata* L.)

Pisang (*Musa* spp.) adalah tanaman monokotil yang umumnya ditemukan di negara beriklim tropis dan sub-tropis. Pisang cavendish (*Musa acuminata* L.) termasuk dalam Famili *Musaceae* yang berasal dari Asia Tenggara. Pisang merupakan salah satu bahan pangan yang memiliki peranan penting bagi kesehatan masyarakat di Indonesia. Pisang merupakan salah satu buah yang memiliki peranan penting dalam ketahanan pangan. Pisang memiliki peranan penting dalam ketahanan pangan karena termasuk ke dalam tanaman pangan utama nomor empat di dunia setelah padi, gandum, dan jagung dengan jumlah ekspor tertinggi (Nelson *et al.*, 2006). Menurut *Food and Agriculture Organization of the United Nations* atau FAO (2019), produksi pisang Cavendish menyumbang sekitar 50 miliar ton atau 47% dari total produksi jenis pisang di seluruh dunia, sehingga menjadikannya jenis pisang yang paling diminati di dunia dan pasar global.



Gambar 2. 1 Pisang (*Musa acuminata*) cv. Cavendish. A) Pisang cv. Cavendish yang telah dipanen dan sudah matang; B) Pisang Cavendish yang masih belum dipanen

Indonesia memiliki memiliki tingkat keragaman kultivar pisang yang tinggi, sehingga Indonesia memiliki potensi sebagai negara pengeksport pisang dengan jumlah yang besar. Indonesia memiliki pisang dengan jumlah kultivar lebih dari 325 jenis, termasuk pisang budidaya maupun pisang jenis liar (Setyadjit *et al.*, 2004). Indonesia menjadi negara produsen ketiga tertinggi di dunia dengan jumlah produksi sebesar 7,3 juta ton, namun hanya mampu mengeksport sekitar 1.600 ton pisang dengan peringkat eksportir ke-30 di dunia (Food and Agriculture Organization, 2020). Adanya kultivar pisang yang beragam dapat menghasilkan kandungan nutrisi yang beragam dan manfaat yang beragam, salah satunya kandungan karotenoid pada pisang (Calberto *et al.*, 2015). Pisang kultivar Cavendish memiliki karakteristik yang berbeda dengan pisang yang lain, yakni memiliki aroma yang kuat, rasa pisang dengan tingkat kemanisan yang tidak terlalu manis dan tekstur daging buah yang tidak terlalu lembek (Ramdani *et al.*, 2017).

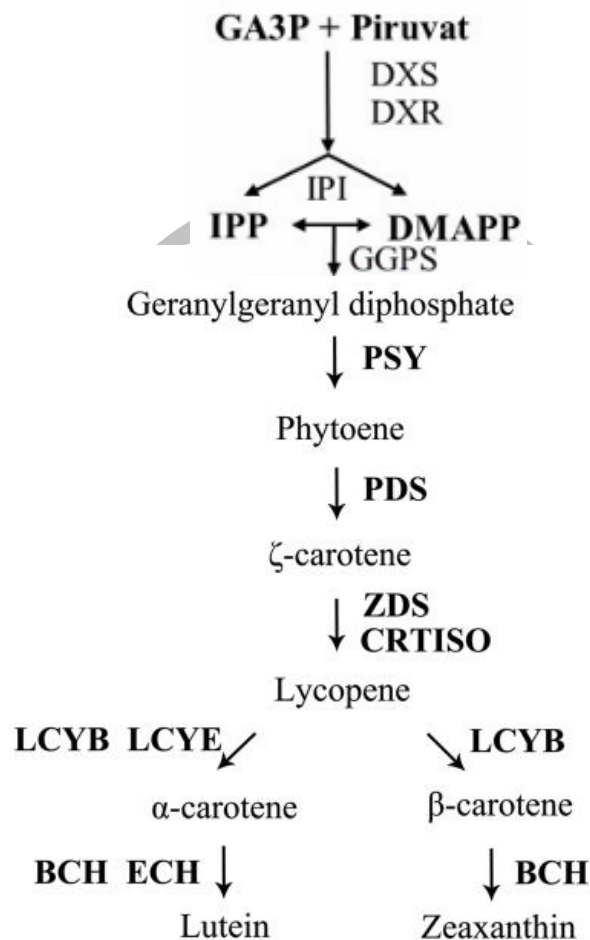
Pisang Cavendish memiliki beragam kultivar dengan kandungan nutrisi dan senyawa yang beragam. Kandungan nutrisi pada pisang Cavendish yaitu memiliki riboflavin, mangan, vitamin A, vitamin B3, vitamin B6, vitamin C, serat, protein, besi, kalium, folat, dan magnesium (Saepudin *et al.*, 2023). Kandungan nutrisi pada pisang Cavendish per 100 g daging buah adalah energi (116-128 kcal), protein (1%), lemak (0,3%), karbohidrat (27%), mineral seperti kalsium (15 mg), kalium (380 mg), zat besi (0,5 mg), natrium (1,2 mg), kalium (380 mg), zat besi (0,5 mg), natrium (1,2 mg), dan vitamin seperti vitamin A (0,3 mg), vitamin B1 (0,1 mg), vitamin B2 (0,1 mg), vitamin B6 (0,7 mg), dan vitamin C (20 mg) (Suhartanto *et al.*, 2015). Salah satu senyawa yang terdapat pada pisang adalah β -karoten. β -karoten merupakan salah satu senyawa karotenoid, yaitu pigmen yang disintesis pada tumbuhan dan organisme lainnya yang berperan penting dalam fotosintesis (Dwivany *et al.*, 2021). Senyawa karotenoid memiliki peran yang sangat penting pada manusia terutama dalam pembentukan vitamin A.

2.1.2 Karotenoid

Karotenoid merupakan pigmen alami yang memberikan warna cerah pada buah dan sayuran seperti kuning, oranye, dan merah (Fendiyanto *et al.*, 2023). Karotenoid merupakan salah satu pigmen penting pada tumbuhan yang berperan sebagai indikator dalam melihat kualitas sayur maupun buah. Sayur maupun buah yang mengandung karotenoid dengan jumlah yang cukup tinggi, akan berwarna oranye atau hijau tua, seperti yang terlihat pada wortel, mangga, pepaya, dan bayam (Zulkifli, 2007). Karotenoid merupakan senyawa bioaktif yang berperan penting dalam kesehatan manusia. Karotenoid memiliki potensi untuk menghilangkan atau menjaga keseimbangan, tingkat spesies oksigen reaktif (ROS) dan terkait dengan penurunan penyakit kanker, penyakit kardiovaskular, dan penyakit mata (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2006). Senyawa turunan karotenoid yang terdapat dalam sumber makanan, terdiri dari berbagai jenis, seperti lutein, likopen, zeaxanthin, α -karoten, dan β -karoten (Eldahshan & Singab, 2013). Karotenoid juga dikenal sebagai sumber prekursor utama dalam pembentukan vitamin A. Lebih dari 80% konsumsi vitamin A di negara berkembang berasal dari sumber nabati dalam bentuk provitamin A karotenoid (pVAC), kemudian diubah menjadi retinol (vitamin A) dalam tubuh manusia (Rodriguez-Amaya *et al.*, 2006).

Biosintesis karotenoid terjadi di dalam organel plastida dengan membentuk prekursor isoprenoid (terpenoid), yaitu senyawa isopentenil difosfat (IPP) dan dimetilalil porofosfat (DMAPP) melalui jalur non-mevalonat (MEP). Kedua senyawa ini kemudian dikonversi menjadi geranylgeranyl difosfat (GGPP) yang dibantu oleh enzim geranylgeranyl pirofosfat (GGPS). Senyawa GGPP dikonversikan menjadi fitoen (*phytoene*) oleh enzim PSY (*phytoene synthase*). Fitoen merupakan senyawa perantara dalam proses biosintesis karotenoid. Fitoen kemudian dikonversi menjadi likopen dengan bantuan enzim zeta-karoten desaturase (ZDS) dan karoten isomerase (CRTISO). Likopen yang sudah terbentuk dapat dikonversi menjadi α -karoten dengan bantuan enzim likopen beta-

siklase (LCYB) dan likopen epsilon-siklase (LCYE). Likopen yang akan dikonversikan menjadi β -karoten dibantu oleh enzim likopen beta-siklase (LCYB) (Sun *et al.*, 2018).



Gambar 2. 2 Jalur biosintesis karotenoid pada tanaman (Zhu *et al.*, 2020).

IPP, isopentenil difosfat; DMAPP, dimetilalil difosfat; GGPS, geranylgeranyl pirofosfat; GGPP, geranylgeranyl difosfat; PSY, phytoene synthase; PDS, phytoene desaturase; ZDS, zeta karoten desaturase; CRTISO, karoten isomerase; LCYB, likopen beta-siklase; LCYE, likopen epsilon siklase; BCH, beta-karoten hidroksilase; dan ECH, epsilon-karoten.

Beta-karoten adalah salah satu jenis karotenoid yang memiliki peran sebagai antioksidan dan pengatur sistem imun, yang dapat mengurangi risiko terjadinya berbagai penyakit, seperti kanker. Selain itu, beta-karoten juga berperan sebagai pro-vitamin A, yaitu senyawa yang berfungsi sebagai prekursor dalam sintesis vitamin A. Vitamin A sangat penting untuk kesehatan mata, dan kekurangan vitamin A dapat mengakibatkan penyakit *xerophthalmia*, yakni kondisi mata yang menyebabkan mata kering, rabun senja, sampai kebutaan. Komposisi dan kandungan karotenoid dapat bervariasi tergantung dari kondisi lingkungan dan pertumbuhan, tahap pematangan buah, dan varietas atau kultivar tumbuhan (Rodriguez-Amaya & Kimura, 2004).

2.1.3 *Lycopene β -cyclase (LCYB)*

Gen *LCYB* sangat penting dalam biosintesis karotenoid yang dapat menjadi penghubung konversi likopen menjadi beta-karoten dan mempengaruhi nilai karotenoid (Li *et al.*, 2008). Gen *LCYB* mengkodekan enzim likopen beta siklase, yang mengontrol jalur pembentukan beta-karoten pada tanaman pisang. Konversi ini merupakan tahap yang penting untuk biosintesis beta-karoten yang berfungsi sebagai prekursor pada karotenoid yang lain seperti lutein dan zeaxanthin. Ekspresi gen *LCYB* membantu dalam mengkode informasi genetik pada gen *LCYB* untuk memperoleh enzim *LCYB*. Proses ini melibatkan transkripsi dan translasi, serta sintesis protein *LCYB*. Gen *LCYB* mengkode enzim yang terlibat dalam sintesis karotenoid pada tanaman pangan, termasuk pisang (Diretto *et al.*, 2007). Secara khusus, gen *LCYB* bertanggung jawab untuk memproduksi enzim likopen β -cyclase, yang sangat penting dalam jalur biosintesis karotenoid, yang menghasilkan berbagai pigmen karotenoid pada tanaman (Diretto *et al.*, 2006; Poerba *et al.*, 2019). *Lycopene β -cyclase* adalah enzim yang membantu konversi likopen menjadi beta-karoten, jenis karoten lainnya (Cunningham dan Gant, 1998; Li *et al.*, 2014).

Ekspresi gen *LCYB* khususnya pada pisang dapat mempengaruhi besarnya kandungan likopen dan karotenoid lainnya yang terdapat pada

buah. Ekspresi gen *LCYB* menunjukkan proses pengkodean informasi genetik pada gen *LCYB* yang kemudian digunakan untuk memproduksi enzim *LCYB* pada genotip *Musa acuminata* (Sun *et al.*, 2007; Asif *et al.*, 2013). Karotenoid merupakan prekursor untuk membentuk vitamin A yang digunakan untuk memenuhi nilai gizi pada tubuh. Karotenoid juga memiliki peran yang penting dalam tanaman pangan, khususnya untuk melindungi tanaman terhadap intensitas cahaya yang tinggi, aktivitas antioksidan, dan peran dalam melakukan proses fotosintesis. Studi genetik gen *LCYB* telah dilakukan dengan karakterisasi *in silico* pada pisang aksesori DH-Pahang (*M. Acuminata*, *A genome*) dan aksesori DH-PKW (*M. Balbisiana*, *B. genome*) (Wiprayoga *et al.*, 2023).

Berdasarkan data hasil penelitian sebelumnya yang telah dilakukan, data sekuen gen *LCYB* pada *Musa acuminata* telah dimasukkan dalam bentuk fasta dari NCBI dan dianotasi pada *Musa acuminata* lokus NC_025210.1 (18023820..18026039) pada database gen NCBI, kemudian disesuaikan dengan prediksi struktur gen (ekson dan intron) melalui FGENESH+. Gen *LCYB* berada pada kromosom 9 yang berada pada untai positif (*forward*) yang memiliki satu ekson panjang dan satu intron. Gen *LCYB* memiliki panjang total 1633 bp dengan urutan daerah pengkodean protein atau disebut *coding sequence* (CDS) (urutan ekson) dari 220-1492 bp (Fendiyanto *et al.*, 2023).

2.1.4 Protoplas

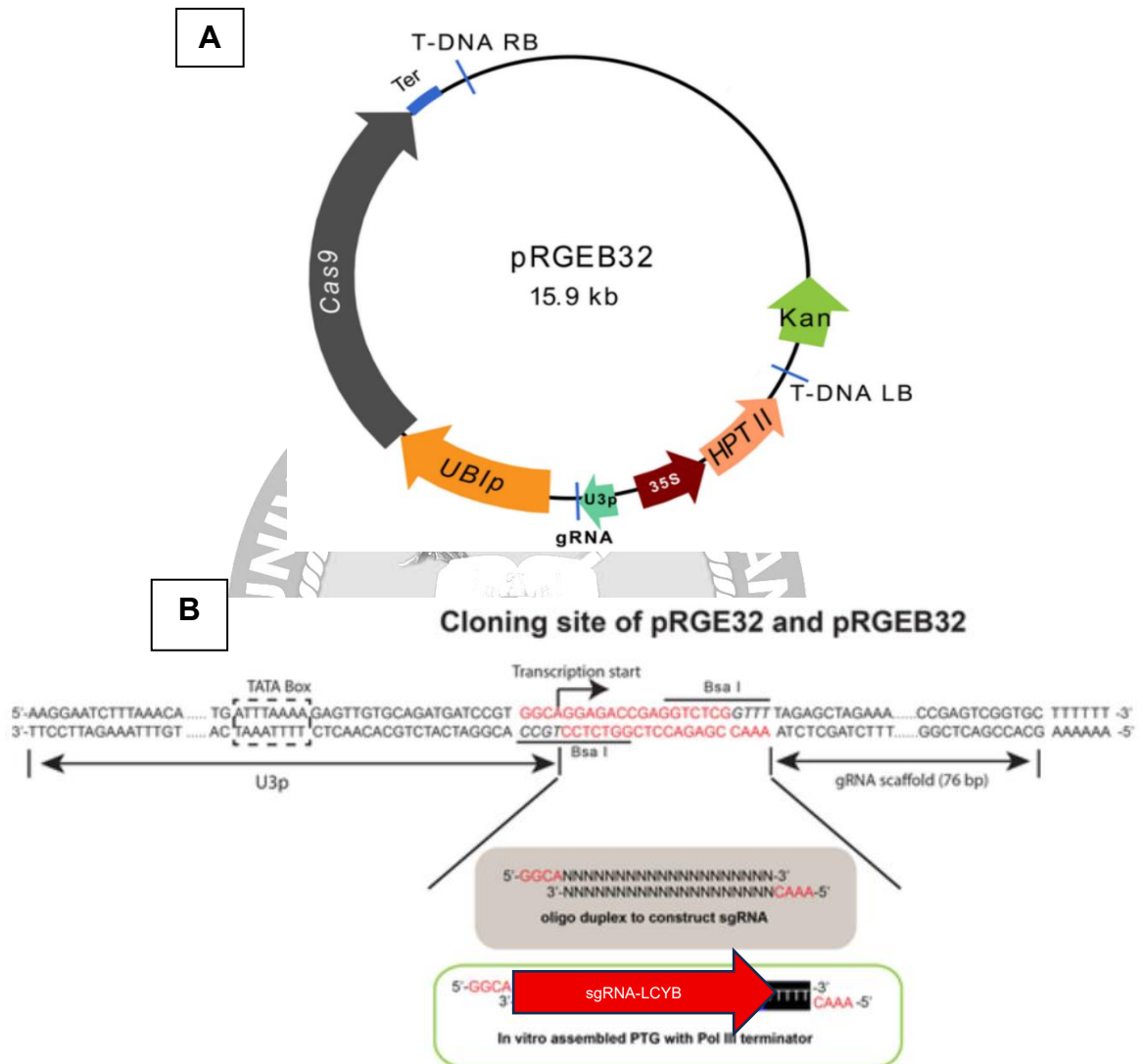
Protoplas adalah sel dari tanaman, jamur, bakteri, atau arkaea yang dinding selnya telah dihilangkan secara mekanis maupun enzimatis. Protoplas yang terisolasi mampu menggabungkan bahan asing, seperti DNA, atau dapat diinduksi untuk mentransfer materi genetik. Hal ini menarik perhatian para peneliti yang bekerja dalam bidang transfer gen melalui transformasi dan hibridisasi somatic, serta para fisiolog tumbuhan yang menyelidiki fisiologi sel dan perilaku membran. Protoplas sel pisang dapat diperoleh dari jaringan *in vivo* atau kultur *in vitro* (Krikorian & Scott, 1995). Saat ini, kultur pisang secara *in vitro* dan regenerasi mudah untuk dilakukan

melalui organogenesis (Khatri *et al.*, 2010), embriogenesis (Novak *et al.*, 1989), kultur anther (Assani *et al.*, 2003) dan kultur protoplas (Megia *et al.*, 1992; Panis *et al.*, 1993).

Isolasi protoplas dapat berasal dari daun muda (berasal dari tanaman *in vitro*) *Musa* spp. cvs. Dwarf Cavendish dan Valery (sub-kelompok AAA) dan regenerasi tanaman hijau melalui kultur protoplas (Partovi *et al.*, 2017). Menurut (Bakry, 1984), isolasi pertama yang berhasil dari protoplas pisang yang dapat tumbuh dari kalus bunga *Musa* cv. Cavendish (AAA). Hal utama dalam melakukan isolasi protoplas terletak pada penggunaan jaringan tanaman yang sesuai dan larutan enzim untuk pencernaan jaringan. Tunas pisang dapat menjadi bahan pilihan yang optimal untuk isolasi protoplas (Zhao *et al.*, 2022). Aplikasi dari protoplas yang terisolasi dapat digunakan untuk menghasilkan tanaman transgenik dan hibrida somatik.

2.1.5 Plasmid pRGEB32

Plasmid merupakan DNA untai ganda ekstrakromosomal yang berbentuk sirkuler dan/atau linear yang dapat bereplikasi secara independen (Wiley *et al.*, 2008). Plasmid sering digunakan sebagai alat untuk memasukkan gen asing ke dalam bakteri dengan tujuan memproduksi protein rekombinan dan cloning gen yang diinginkan (Yusuf *et al.*, 2014). pRGEB32 menjadi salah satu plasmid vektor yang digunakan dalam transformasi melalui perantara agrobakterium pada padi. pRGEB32 sering digunakan dalam teknologi pengeditan genom CRISPR/Cas 9 (Xie *et al.*, 2015; Simanjuntak, 2021), memiliki U3 snoRNA promoter (U3p) yang dapat mengekspresikan sgRNA dan *rice ubiquitin* promoter (UBIp) dengan ujung 5 *untranslated region conserved* yang dapat mengekspresikan *Cas9* (Xie *et al.*, 2015). Plasmid pRGEB32 memiliki ukuran 15.888 bp, dimana besarnya ukuran plasmid ini menuntut suatu optimasi metode dalam proses transformasinya (Patigu, *et al.*, 2021).



Gambar 2. 3 Peta konstruksi plasmid pRGE32-sgLCYB: A. Wilayah utama konstruksi plasmid pRGE32; (sitasi) B. Daerah cloning sgRNA LCYB dalam vektor pRGE32 rekombinan.

2.1.6 *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) Cas9

Sistem CRISPR-Cas9 merupakan alat penyuntingan genom yang praktis dan hanya memerlukan dua faktor, yakni protein Cas9 dan molekul RNA pemandu (gRNA) (Feng *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013). Cas 9 berfungsi membelah DNA pada situs target yang telah ditentukan dan dipandu oleh gRNA, yang sejajar dengan urutan target (Asmamaw & Zawdie, 2021). RNA pemandu (gRNA) memiliki 20 urutan nukleotida, yang menunjukkan spesifitas gen yang tinggi dengan mengikat DNA target yang berdekatan dengan *Protospacer Adjacent Motif* (PAM) (Asmamaw & Zawdie, 2021). RNA pemandu dapat mengatur pemutusan untai ganda pada DNA target yang berada dalam urutan tiga pasang basa sebelum urutan PAM. Pemutusan ini umumnya diperbaiki melalui penggabungan ujung non-homolog yang sering mengakibatkan mutasi penyisipan (insersi) atau penghapusan (delesi) yang dapat mengganggu fungsi gen (Xue & Greene, 2021). Proses pengeditan genom menggunakan CRISPR-Cas9 dapat dilakukan dengan beberapa langkah. Pertama. Komponen CRISPR-Cas9 dimasukkan ke dalam sel target, biasanya melalui vektor virus atau injeksi langsung. Cas9 dan gRNA yang berada di dalam sel, membentuk sebuah kompleks yang mengarahkan genom, mencari urutan DNA target berdasarkan komplementaris Grna Hwang & Maxwell, 2023; Li *et al.*, 2023).

CRISPR-Cas9 memiliki pengaruh yang besar terhadap pertanian dan ketahanan pangan global. Melalui genom tanaman yang dimodifikasi dengan CRISPR-Cas9, dapat meningkatkan sifat-sifat tanaman yang berkualitas, meningkatkan hasil panen, meningkatkan kandungan nutrisi, dan ketahanan terhadap penyakit (Aljabali *et al.*, 2024). Sistem CRISPR/Cas9 memiliki kelebihan, yakni mutasi DNA dapat dilakukan pada genom yang berukuran besar melalui pendekatan transgenik dengan integrasi T-DNA yang membawa CRISPR/Cas9, dimana keduanya dapat dipisahkan dengan metode segregasi sehingga tidak meninggalkan marker genetik (Sophia *et al.*, 2023).

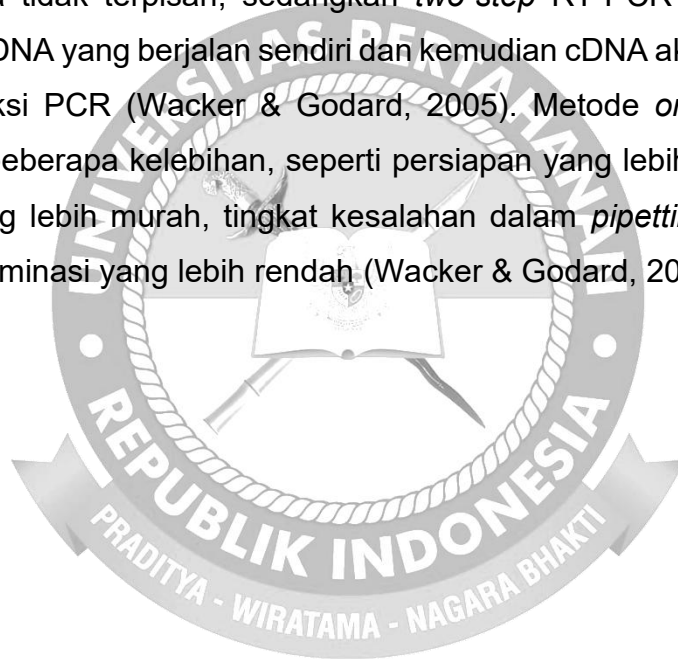
2.1.7 DNA komplementer (cDNA)

cDNA merupakan singkatan dari *copy* DNA yang disebut juga sebagai DNA komplementer. DNA komplementer (cDNA) adalah urutan DNA yang disintesis melalui transkripsi balik menggunakan molekul RNA sebagai template (Guigo, 2013). RNA merupakan molekul yang mudah terdegradasi saat dilepaskan dari sel selama proses ekstraksi berlangsung. Hal ini menjadi salah satu penghambat dalam melakukan proses ekspresi gen, sehingga dilakukan penyalinan RNA menjadi DNA komplementer. Hal ini disebabkan karena cDNA memiliki sifat yang lebih stabil, tidak mudah terdegradasi dan mudah dimanipulasi dengan teknik DNA rekombinan. Hanya mRNA yang dapat disintesis menjadi cDNA karena mRNA memiliki poli A pada ujung 3', sedangkan rRNA dan tRNA tidak memiliki poli A sehingga tidak dapat disintesis menjadi cDNA. mRNA merupakan molekul yang diproduksi sebagai bentuk ekspresi dari suatu gen dan mengandung informasi yang akan ditranslasikan untuk membentuk suatu protein (Campbell *et al.*, 2008). cDNA hanya berisi urutan pengkodean. cDNA yang diperoleh dari RNA yang berkaitan dapat dikloning ke dalam vektor yang tepat dan klon yang dihasilkan dapat diurutkan. cDNA pada umumnya dapat digunakan untuk membuat pustaka cDNA, koleksi permanen cDNA yang dapat disalin dan disimpan dalam jangka panjang yang akan digunakan untuk mengkloning gen eukariotik dalam prokariota, sehingga protein yang diekspresikan dalam organisme eukariotik dapat dimasukkan ke dalam prokariota.

2.1.8 *Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan salah satu teknik amplifikasi asam nukleat *in vitro* yang paling banyak dipelajari dan digunakan secara luas. PCR berfungsi untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan menganalisis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target melalui enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu *thermocycle*. Sementara itu, RT-PCR merupakan salah satu teknik amplifikasi yang mengkombinasikan

antara sintesis cDNA dan PCR. Metode RT-PCR juga cocok digunakan untuk mendeteksi dan kuantifikasi ekspresi mRNA, dan RNA (Santos *et al.*, 2004). Metode RT-PCR berdasarkan tahapan kerjanya dibagi menjadi dua jenis, yaitu *one-step* RT-PCR dan *two-step* RT-PCR. Perbedaan kedua metode tersebut terdapat pada reaksinya. *One-step* RT-PCR memiliki proses reaksi sintesis cDNA dan PCR yang berjalan dalam satu tabung dan prosesnya tidak terpisah, sedangkan *two-step* RT-PCR memiliki proses sintesis cDNA yang berjalan sendiri dan kemudian cDNA akan ditambahkan pada reaksi PCR (Wacker & Godard, 2005). Metode *one-step* RT-PCR memiliki beberapa kelebihan, seperti persiapan yang lebih cepat, memiliki biaya yang lebih murah, tingkat kesalahan dalam *pipetting* lebih rendah, dan kontaminasi yang lebih rendah (Wacker & Godard, 2005).



2.2 Hasil Penelitian Terdahulu

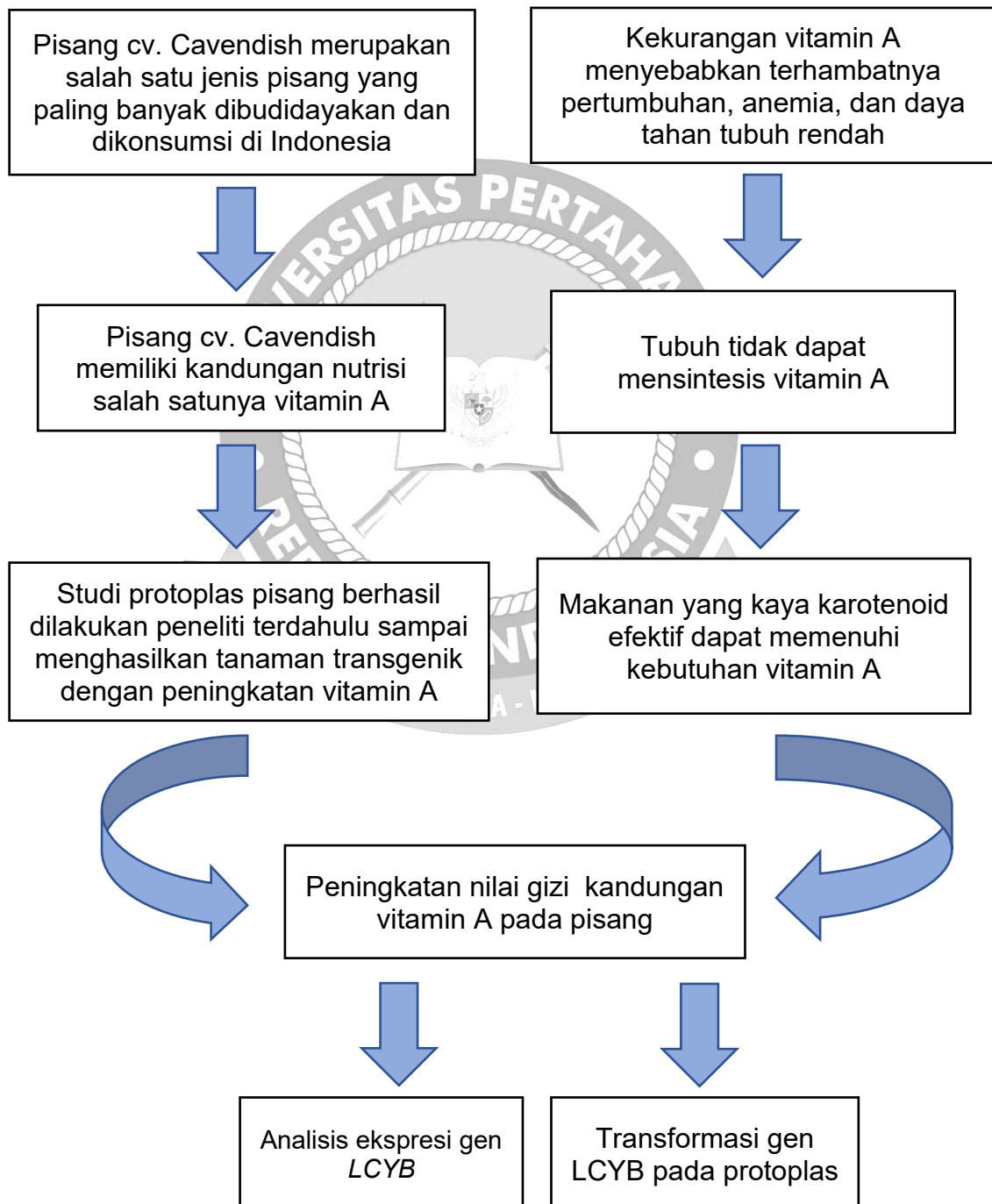
Penelitian terdahulu berfungsi sebagai referensi penelitian sebelumnya yang berkaitan dengan topik penelitian yang dilakukan. Penelitian terdahulu juga dapat membantu dalam menemukan kebaruan dari penelitian yang akan dilakukan.

Tabel 2. 1 Penelitian Terdahulu

No	Judul Penelitian	Hasil Penelitian	Tahun
1	<i>Establishment of a PEG-mediated protoplast transformation system based on DNA and CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes for banana</i>	Efisiensi sistem transformasi protoplas sel pisang yang dimediasi PEG memiliki keberhasilan yang optimal dan efektif dalam uji ekspresi gen dan validasi sgRNA pada pisang. Melalui sistem CRISPR/Cas9 RNP juga dapat membuat tanaman pisang yang direkayasa melalui pengeditan gen bebas DNA.	(Wu et al., 2020)
2	<i>Establishment of a Protoplasts-Based Transient Expression System in Banana (Musa spp.)</i>	Berdasarkan hasil penelitian, efisiensi transformasi protoplas pisang tertinggi dapat dicapai dengan menggunakan PEG sebanyak 45% dan waktu inkubasi PEG optimal untuk transfeksi adalah sekitar 10-15 menit. Selain itu, jumlah plasmid yang optimal untuk transfeksi protoplas sel pisang adalah 20 µg.	(Zhao et al., 2022)
3	<i>The lycopene β-cyclase plays a significant role in provitamin A biosynthesis in wheat endosperm</i>	Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa inaktivasi <i>TaLCYB</i> menyebabkan penurunan kandungan β -karoten dan mengubah profil serta akumulasi karotenoid disertai perubahan dalam ekspresi gen.	(Zeng et al., 2015)

2.3 Kerangka Berpikir

Berikut merupakan kerangka berpikir yang akan dilakukan pada penelitian secara garis besar.



Gambar 2. 4 Kerangka Berpikir