

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sorgum (*Sorghum bicolor* (L.)) merupakan salah satu tanaman sereal penting di dunia setelah padi, jagung, gandum, dan barley. Tanaman ini memiliki daya adaptasi tinggi terhadap kondisi lingkungan ekstrem seperti kekeringan dan suhu tinggi, sehingga dapat tumbuh baik pada lahan marginal dengan input rendah. Selain kandungan karbohidratnya yang tinggi, sorgum juga bernilai ekonomi penting sebagai bahan pangan, pakan ternak, serta bahan baku bioetanol dan industri pangan. Di berbagai negara Afrika dan Asia, sorgum menjadi makanan pokok bagi jutaan masyarakat, sedangkan di negara maju seperti Amerika Serikat dan Australia, tanaman ini banyak digunakan sebagai bahan baku pakan dan bioenergi. Dengan ketahanannya terhadap perubahan iklim dan beragam potensi pemanfaatannya, sorgum berperan penting dalam mendukung ketahanan pangan dan energi berkelanjutan (Srivastava *et al.*, 2025). Namun demikian, pengembangan sorgum di Indonesia masih belum optimal akibat terbatasnya varietas unggul yang adaptif dan teknologi budidaya yang sesuai dengan kondisi lokal (Suarni, 2016; Siantar *et al.*, 2019).

Salah satu kultivar sorgum lokal yang potensial dikembangkan adalah sorgum hitam yang memiliki kandungan antosianin, flavonoid, dan fenolik total yang lebih tinggi dibandingkan sorgum putih. Senyawa-senyawa tersebut berfungsi sebagai antioksidan alami dan memberi warna gelap pada bijinya (Pontieri *et al.*, 2022). Kandungan metabolit sekunder yang tinggi ini tidak hanya memberikan manfaat kesehatan, tetapi juga dapat mempengaruhi respon fisiologis jaringan terhadap perlakuan kultur *in vitro*. Oleh karena itu, sorgum hitam menjadi genotipe yang

menarik untuk dikaji dalam konteks transformasi genetik dan regenerasi jaringan tanaman.

Salah satu pendekatan rekayasa genetik presisi yang berkembang pesat dalam sepuluh tahun terakhir adalah teknologi CRISPR/Cas9, yang memungkinkan modifikasi sekuens gen target secara spesifik melalui pemanduan *single guide RNA* (sgRNA) menuju lokus genom yang diinginkan (Namata *et al.*, 2025). Pada sorgum, salah satu gen target yang berpotensi diedit untuk memperbaiki arsitektur tanaman adalah *Non-dormant Axillary Bud I (NABI)*, yang mengatur pertumbuhan tunas aksiler (*tillering*) melalui jalur biosintesis strigolakton (Chen *et al.*, 2018). Modifikasi ekspresi *NABI* berpotensi menghasilkan fenotipe percabangan yang lebih terkendali, yang bermanfaat baik untuk peningkatan hasil biomassa maupun efisiensi panen. Penelitian ini menggunakan tiga konstruksi *single guide RNA* (sg1.1, sg2.3, dan sg3.1) yang dirancang menargetkan sekuens berbeda pada gen *NABI* melalui sistem CRISPR/Cas9 yang disisipkan menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105::pRGEB32. Oleh karena itu, keberhasilan transformasi genetik pada tahap awal ini sangat ditentukan oleh efektivitas proses seleksi *Hygromycin* bertingkat dalam memisahkan eksplan yang benar-benar membawa konstruksi sgRNA target dari eksplan non-transforman, sebelum dilakukan konfirmasi molekuler lebih lanjut terhadap keberhasilan penyisipan maupun aktivitas edit pada gen *NABI*.

Upaya peningkatan mutu genetik sorgum dapat dilakukan melalui pemuliaan tanaman, baik secara konvensional maupun molekuler. Pemuliaan konvensional dilakukan melalui persilangan antar varietas unggul untuk memperoleh kombinasi sifat yang diinginkan, sedangkan pemuliaan molekuler memanfaatkan teknologi

DNA dan rekayasa genetik untuk memperbaiki sifat tanaman secara lebih spesifik (Budaya *et al.*, 2022). Salah satu pendekatan pemuliaan molekuler yang banyak digunakan adalah transformasi genetik, yaitu proses pemindahan gen asing yang diisolasi dari organisme lain ke dalam genom tanaman target (Khatimah *et al.*, 2025).

Metode transformasi yang paling umum digunakan pada tanaman adalah sistem berbasis *Agrobacterium tumefaciens*, yaitu bakteri tanah gram negatif yang berperan sebagai vektor alami dalam transfer gen. Bakteri ini memiliki kemampuan mengintegrasikan segmen DNA dari plasmid Ti (tumor-inducing plasmid) ke dalam genom sel tanaman melalui mekanisme alami (Khatimah *et al.*, 2025). Penggunaan *A. tumefaciens* dinilai lebih efisien dibandingkan metode langsung seperti particle bombardment karena menghasilkan integrasi gen tunggal yang stabil, jumlah salinan gen yang sedikit, serta menekan risiko ko-supresi dan instabilitas genetik (Ahmed *et al.*, 2018).

Transformasi genetik pada tanaman sorgum berpotensi besar untuk meningkatkan kandungan gizi, ketahanan terhadap cekaman abiotik, serta produktivitas tanaman. Salah satu contoh penerapannya adalah peningkatan pencernaan protein melalui penekanan ekspresi gen γ - dan α -kafirin menggunakan teknik RNA-silencing (Elkonin *et al.*, 2018). Meskipun demikian, efisiensi transformasi sorgum masih rendah karena tanaman ini dikenal sebagai spesies yang sulit diregenerasikan (*recalcitrant species*). Hambatan yang umum terjadi meliputi tingginya produksi senyawa fenolik, pencoklatan jaringan, dan rendahnya kemampuan regenerasi kalus (Dreger *et al.*, 2019).

Keberhasilan transformasi genetik tidak hanya bergantung pada tahapan infeksi dan integrasi gen, tetapi juga sangat dipengaruhi oleh proses seleksi dan regenerasi jaringan tanaman. Setelah proses infeksi dengan *Agrobacterium tumefaciens*, jaringan hasil transformasi diseleksi menggunakan agen antibiotik untuk memisahkan jaringan transforman dari jaringan non-transforman. Salah satu antibiotik yang paling umum digunakan ialah *Hygromycin*, antibiotik golongan aminoglikosida yang bekerja dengan cara menghambat sintesis protein pada ribosom tanaman (Ahmed *et al.*, 2018). *Hygromycin* berfungsi memastikan hanya jaringan yang membawa gen resistansi (Hpt atau Hph) yang mampu bertahan hidup. Konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menyebabkan klorosis, penurunan viabilitas, hingga kematian jaringan kalus, sedangkan konsentrasi yang terlalu rendah menyebabkan proses seleksi tidak efektif karena jaringan non-transforman masih dapat tumbuh. Oleh karena itu, optimasi konsentrasi *Hygromycin* sangat penting agar seleksi berjalan efisien tanpa menghambat regenerasi jaringan.

Selain itu, efisiensi transformasi juga ditentukan oleh kemampuan jaringan untuk beregenerasi menjadi tanaman sempurna. Regenerasi tanaman *in vitro* sangat bergantung pada jenis eksplan dan karakteristik kalus yang digunakan. Eksplan yang umum digunakan antara lain tunas muda, embrio imatur, atau kalus embriogenik. Kalus embriogenik memiliki struktur remah, berwarna putih dan bening, dan mengandung sel-sel meristematik aktif yang mampu membelah cepat, sehingga berpotensi tinggi sebagai target transformasi genetik (Sari *et al.*, 2014). Kalus dengan tekstur remah juga lebih mudah ditembus oleh bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dan lebih responsif terhadap perlakuan seleksi antibiotik karena luas permukaannya lebih besar.

Skripsi ini melaporkan tentang hasil penelitian optimasi konsentrasi *Hygromycin* terhadap ketahanan seleksi kalus/tunas/planlet putatif transforman secara *in vitro*. Penelitian ini berupaya menentukan konsentrasi optimum *Hygromycin* dan cara seleksinya, sehingga dapat meningkatkan efisiensi transformasi. Selanjutnya hasil penelitian ini dapat digunakan oleh para pekerja rekayasa genetik tanaman sorgum.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dapat ditarik beberapa rumusan masalah yaitu:

1. Bagaimanakah pengaruh konsentrasi *Hygromycin* terhadap viabilitas kalus hasil putatif transforman pada sorgum hitam?
2. Bagaimanakah pengaruh konsentrasi *Hygromycin* terhadap daya generatif kalus hasil putatif transforman pada sorgum hitam?
3. Berapakah konsentrasi *Hygromycin* yang optimum untuk seleksi antibiotik kalus sorgum hitam putatif transforman tanpa menghambat regenerasi kalus sorgum hitam?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah maka tujuan penelitian ini yaitu:

1. Untuk mengetahui pengaruh konsentrasi *Hygromycin* terhadap ketahanan seleksi kalus, tunas, dan planlet putatif transforman sorgum hitam secara *in vitro*.
2. Untuk menganalisis pengaruh konsentrasi *Hygromycin* terhadap kemampuan regenerasi kalus putatif transforman sorgum hitam.

3. Untuk menentukan konsentrasi *Hygromycin* yang optimum beserta cara seleksinya guna meningkatkan efisiensi transformasi genetik sorgum hitam.

1.4 Keaslian Penelitian

Penelitian yang berjudul “Optimasi Seleksi *Hygromycin* Bertingkat Pada Regenerasi Sorgum Hitam Putatif Transforman sgRNA *Sorghum bicolor*” adalah benar benar penelitian yang dilaksanakan di Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Jember. Adapun pendapat penelitian lain yang tercantum dalam tulisan ini sebagai pendukung dalam penelitian ini yang ditulis dengan menyertakan sumber pustaka asli.

1.5 Luaran Penelitian

Penelitian ini menghasilkan luaran berupa: skripsi, artikel ilmiah pada jurnal bereputasi dan poster ilmiah.

1.6 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan atau informasi ilmiah bagi para pembaca, peneliti, atau laboran yang ingin mengembangkan sektor pertanian yang berhubungan dengan “Optimasi Seleksi *Hygromycin* Bertingkat Pada Regenerasi Sorgum Hitam Putatif Transforman sgRNA *Sorghum bicolor*.”