

TRANSFORMASI MENGGUNAKAN *Agrobacterium tumefaciens* PADA TUNAS DAUN *Kalanchoe mortagei* DAN *Kalanchoe daigremontiana* 1 DAN 2

Hamami Alfasani Dewanto^{1,*}, Sony Suhandono²

¹Universitas Muhammadiyah Purwokerto. Jl. Raya Dukuh Waluh, Kembaran, Purwokerto, Jawa Tengah. 53182

²Institut Teknologi Bandung. Jl. Ganesha No.10, Lb. Siliwangi, Coblong, Kota Bandung, Jawa Barat. 40132

*Alamat Korespondensi: sanidewanto@gmail.com

Abstrak: Cocor bebek adalah tumbuhan sukulen yang mampu memproduksi tunas adventif (reproduksi vegetatif) pada tepian daunnya. Kemampuan reproduksi vegetatif ini menghasilkan tanaman yang sama dalam waktu yang singkat, sehingga memungkinkan untuk dijadikan sebagai bioreaktor protein rekombinan. Transformasi dilakukan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* pada tunas daun cocor bebek dari spesies *Kalanchoe mortagei* dan *Kalanchoe daigremontiana*. Optimasi dilakukan mencakup: galur *A. tumefaciens*, kerapatan optis dari kultur *A. Tumefaciens*, konsentrasi acetosyringone, teknik ko-kultivasi, pH medium dan komposisi medium ko-kultivasi. Hasil optimasi transformasi secara transien menunjukkan bahwa perbedaan galur *A. tumefaciens*, kerapatan optis, konsentrasi acetosyringone menghasilkan ekspresi transien yang relatif sama secara kualitatif. Berdasarkan uji GUS teknik ko-kultivasi dengan infiltrasi vakum dan pH medium 5,5 menghasilkan ekspresi transien lebih baik dibandingkan dengan perendaman dan pH medium 7,0. Medium ko-kultivasi M9 menghasilkan ekspresi transien yang lebih baik dibandingkan dengan medium ½MS0. Tunas daun *K. daigremontiana* 2 menunjukkan ekspresi transien yang lebih baik dibandingkan *K. mortagei* dan *K. daigremontiana* 1.

Kata kunci: Transformasi, *Kalanchoe sp*, *Agrobacterium tumefaciens*

Abstract: Cocor bebek is a succulent plant that is capable of producing adventitious buds (vegetative reproduction) at the edges of the leaves. The ability has resulted in the production of identical plant in a short time, thus allowing it to be used as bioreactors for production of recombinant proteins. Transformation is done using *Agrobacterium tumefaciens* on its leaf buds from two spesies, *Kalanchoe mortagei* & *Kalanchoe daigremontiana*. Optimization is done by: *A. tumefaciens* strain, the optical density of the culture of *A. tumefaciens*, the concentration of acetosyringone, co-cultivation technique, the pH of the medium & the composition of the co-cultivation medium. Optimization results by transient transformation shows that differences in strains of *A. tumefaciens*, optical density, concentration of acetosyringone produce transient expression is same qualitatively. Based on the GUS assay co-cultivation techniques with vacuum infiltration & medium with pH 5.5 resulted in better transient expression than soaking in the medium & medium with pH 7.0. Co-cultivation medium M9 produce transient expression better than the medium ½MS0. *K. daigremontiana* 2 leaf buds showed transient expression better than *K. mortagei* & *K. daigremontiana* 1.

Keywords: Transformation, *Kalanchoe sp*, *Agrobacterium tumefaciens*

PENDAHULUAN

Produksi protein rekombinan telah menjadi topik yang ramai dibicarakan para peneliti. Tumbuhan menjadi salah satu pilihan inang terbaru untuk produksi protein rekombinan. Adapun yang menjadi pertimbangan menggunakan tumbuhan sebagai inang adalah biaya produksi yang lebih murah dibandingkan dengan hewan, mikroba dan sistem yang didasarkan pada kultur sel lainnya. Sistem tumbuhan dapat dibuat menjadi skala besar dengan cepat, tumbuhan tidak menghasilkan patogen hewan dan manusia. Selain itu tumbuhan dapat melakukan pelipatan protein, glikosilasi dan proses *post-translasi* lainnya dengan tepat sehingga dihasilkan protein rekombinan yang sesuai. Kelebihan lainnya adalah sel tumbuhan dapat mengeluarkan produk proteinnya pada lingkungan untuk mengurangi degradasi dan meningkatkan stabilitasnya (Horn *etal*, 2004). Proses pemindahan informasi genetik pada tumbuhan dapat dilakukan melalui beberapa cara,

diantaranya transformasi protoplasma, biolistik dan transformasi menggunakan *Agrobacterium*. Transformasi menggunakan *Agrobacterium* merupakan metode yang paling sering digunakan untuk men-transformasi tumbuhan. Tingkat keberhasilan metode transformasi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya, galur bakteri, plasmid, media kultur, lamanya ko-kultivasi, *acetosyringone*, pelukaan, dan kompetensi sel inang untuk terinfeksi (Salas *etal*, 2001). Genus *Kalanchoe* meliputi kurang lebih 125 spesies yang memiliki bentuk daun dan pola perkembangan planlet yang bervariasi sehingga sangat berguna untuk penelitian regenerasi sel tumbuhan. Transformasi tunas pada dua jenis cocor bebek *K. daigremontiana* dan *K. mortagei* belum pernah dilaporkan. Pada penelitian ini, dilakukan optimasi transformasi tunas daun *K. daigremontiana* dan *K. mortagei* dengan menggunakan *A. tumefaciens* yang memiliki vektor ekspresi tumbuhan pBI 121 kosong dengan

mengamati tingkat kebiruan ekspresi gen reporter GUS pada plasmid pBI 121.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Tanaman cocor bebek spesies *K. daigremontiana* dan *K. mortagei*. Media pertumbuhan tanaman berupa campuran tanah dan pupuk kandang. Koloni tunggal *A. tumefaciens* galur LBA4404, AGL1, dan GV3101, vektor ekspresi pBI 121. Rifampicin, kanamycin, medium YEP (10 g/L yeast extract, 10 g/L, Bacto peptone, 5 g/L NaCl) dan medium M9 (200 mL garam medium M9 (64 g/L Na₂HPO₄·7H₂O 15 g/L KH₂PO₄, 2,5 g/L NaCl, 5,0 g/L NH₄Cl), 2 mL/L MgSO₄ 1 M, 20 mL Glukosa 20%, 100 µl/L CaCl₂ 1M)). 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxyacetopnenone (*acetosyringone*), dimetil sulfoksida, 0,5 mM

K₃Fe(CN)₆, 0,5 mM K₄Fe(CN)₆, 0,3%, Triton-X 100, 50 mM buffer fosfat pH 7. Medium ½MS0 (Murashige & Skoog, 1962) dengan setengah konsentrasi garam dan vitamin, medium M9 (Sambrook *et al.* 1989)

Pemeliharaan tanaman dalam rumah kaca

Tanaman cocor bebek (Gambar 1) didapatkan disekitar daerah Bandung, Jawa Barat. Media pertumbuhannya berupa campuran tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 4:1. dipelihara dalam rumah kaca dengan penyinaran normal sinar matahari, suhu rumah kaca berkisar antara 19-33°C. Penyiraman dilakukan dengan ± 300 mL air, dua kali dalam setiap minggu.



(A)



(B)



(C)

Gambar 1. Jenis Kalanchoe yang digunakan dalam penelitian: (A) *K. Mortagei*, (B) *K. daigremontiana* 1, (C) *K. daigremontiana* 2.

Optimasi transformasi tunas daun tanaman cocor bebek

Tunas tanaman cocor bebek diambil dari rumah kaca. Tunas kemudian dicuci pada air mengalir selama kurang lebih 5-10 menit dan dikeringkan menggunakan kertas tisu, kemudian ditransformasi dengan *A. tumefaciens* yang mengandung pBI 121.

Transformasi vektor ekspresi pBI 121 kedalam *A. tumefaciens* menggunakan metode kalsium klorida (Dagert & Ehrlich 1979). Koloni tunggal *A. tumefaciens* yang positif memiliki plasmid pBI 121 dicuplik dengan menggunakan tusuk gigi steril dan dimasukkan dalam 10-20 ml YEP cair dengan penambahan 50 mg/L antibiotik yang sesuai, kemudian diinkubasikan pada *shaker* dengan kecepatan 200 rpm pada suhu ruang dalam kondisi gelap selama dua hari. 10% kultur ditambahkan pada kultur besar YEP yang mengandung 50 mg/L antibiotik yang sesuai. Pada saat mencapai kerapatan optis tertentu OD₆₀₀, kultur dipanen dengan cara disentrifugasi dengan kecepatan 2700 rpm selama 30 menit. Medium pertumbuhan kemudian diganti dengan medium ko-kultivasi dengan volume sama. Pada medium kokultivasi ditambahkan silwett L-77 0,02%, dan *acetosyringone* kemudian digunakan untuk mentransformasi tunas daun cocor bebek. Optimasi secara berurut dilakukan mencakup: galur *A. tumefaciens* (LBA4404, GV3101, AGL1), kerapatan optis OD₆₀₀ dari *A. Tumefaciens* (0,5 0,7 0,9), konsentrasi *acetosyringone* (0, 20, 50, 100, 200) µM, teknik introduksi *A. tumefaciens* (perendaman dan infiltrasi vakum), pH medium ko-kultivasi (5,5 dan 7,0) dan komposisi medium ko-kultivasi (½MSO dan M9).

Konfirmasi tunas tertransformasi secara transien dengan *GUS Assay*.

Tunas yang telah selesai melewati periode ko-kultivasi selama dua hari, satu helai daun per tunasnya diambil dari dan dimasukan ke dalam larutan GUS. Komposisi larutan GUS untuk uji gen β-Glucoronidase adalah sebagai berikut: substrat berupa 5-Bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl β-D-

glucopyranosiduronic (*X-Gluc*[®]) 1 mM dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO), 0,5 mM K₃Fe(CN)₆, 0,5 mM K₄Fe(CN)₆, 0,3%, *Triton-X 100*, 50 mM buffer fosfat pH 7. Kemudian daun diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 1-2 hari (Sambrook *et al.* 1989).

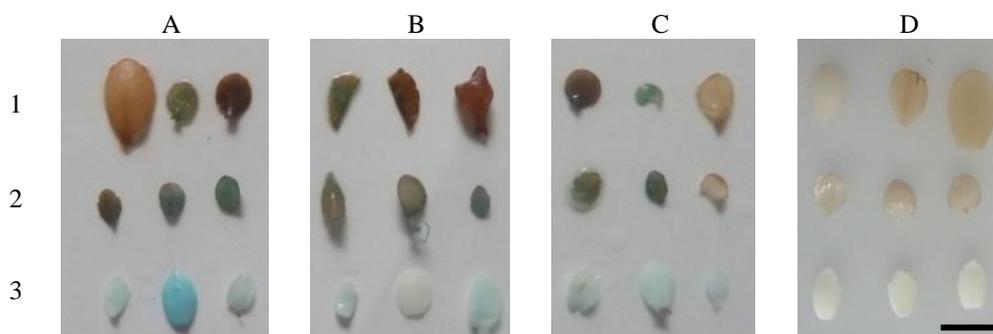
HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi Transformasi Tunas Daun Tanaman Cocor Bebek

Optimasi transformasi transien pada tanaman cocor bebek dilakukan dengan menguji jumlah dan kondisi yang sesuai untuk berlangsungnya proses transformasi yang meliputi, galur *A. tumefaciens*, kerapatan optis, konsentrasi 3,5-Dimethoxy-4-Hydroxyacetopenone (*acetosyringone*), teknik introduksi *A. tumefaciens* (infiltrasi vakum, perendaman), pH media ko-kultivasi (5,5 dan 7), dan jenis media ko-kultivasi.

Optimasi yang pertama dilakukan adalah memilih galur *A. tumefaciens* yang memiliki tingkat infeksi tertinggi terhadap tanaman cocor bebek. Tingkat infeksi tertinggi ditunjukkan dengan hasil ekspresi transien dari gen *GUS* melalui *GUS Assay*. Hasil penelitian pada tanaman cocor bebek dengan menggunakan tiga macam galur *Agrobacterium* (LBA4404, GV3101, AGL1) tidak menunjukkan keseragaman hasil transformasi dalam satu galur. Aida & Shibata (1996) juga mendapatkan hal yang sama pada saat mengamati hasil transformasi *A. tumefaciens* galur LBA4404 pada tanaman cocor bebek *K. blossfeldiana*. Pengamatan yang dilakukan Aida & Shibata (1996) mendapatkan tiga kelas aktifitas gen reporter *GUS* yaitu aktifitas tinggi, aktifitas rendah dan hampir tanpa aktifitas.

Pengamatan hasil *GUS Assay* yang ditunjukkan Gambar 2 memperlihatkan warna biru muda yang menunjukkan tingkat ekspresi gen reporter belum baik, karena warna *GUS assay* yang semestinya adalah warna biru indigo. Variasi virulensi yang menjadi kunci level ekspresi gen reporter *GUS* salah satunya disebabkan adanya perbedaan kemampuan sel bakteri untuk menempel pada sel tanaman atau



Gambar 2. Uji transformasi transien pada tunas dengan perlakuan galur bakteri. Galur LBA4404 menghasilkan tingkat warna biru yang lebih baik pada *K. daigremontiana* 2 A : LBA4404 , B : GV3101 , C : AGL1, D : Kontrol. Baris 1: *Kalanchoe mortagei*, Baris 2: *Kalanchoe daigremontiana* 1, Baris 3: *Kalanchoe daigremontiana* 2, bar : 1 cm.

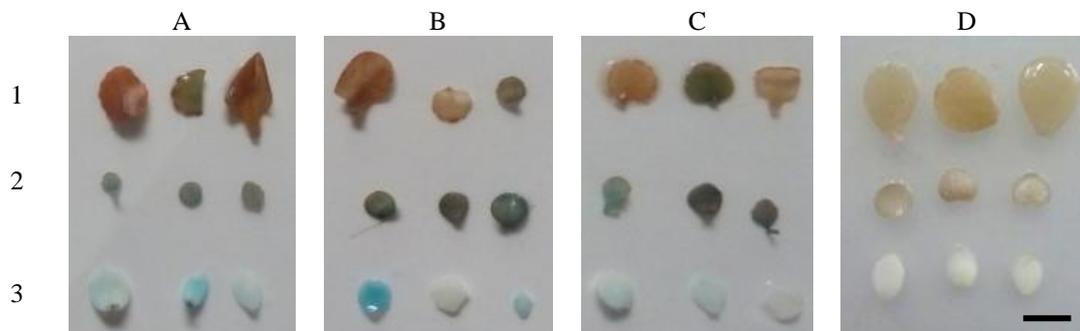
perbedaan kemampuan sel bakteri dan sel tanaman untuk mengkode protein yang berkaitan dengan mekanisme perpindahan T-DNA (Nam *et al.* 1997).

Gambar 2 juga memperlihatkan bahwa warna yang dihasilkan oleh hasil transformasi masing-masing galur berbeda. Karakter masing-masing galur berbeda didasarkan pada latar belakang kromosom yang menyusun mereka. Galur *Agrobacterium* yang ada dikembangkan dari dua isolat liar: C58 (Hamilton & Fall 1971) dan Ach5 (Hoekema *et al.* 1983). Galur AGL1, dan GV3101 dikembangkan dari kromosom C58, sedangkan galur LBA4404 dikembangkan dari kromosom Ach5. Latar belakang kromosom yang berbeda ini menyebabkan galur *Agrobacterium* tertentu memiliki tingkat virulensi yang lebih tinggi dibandingkan dengan lainnya tergantung pada jenis inangnya, misalnya galur C58C1 lebih cocok dalam aplikasi ekspresi transien pada *lettuce*, tomat dan *arabidopsis* (Wroblewski *et al.* 2005). Hal ini menjelaskan mengapa pada Gambar 2 warna biru yang dihasilkan oleh galur LBA4404 memiliki tingkat kebiruan yang lebih baik, meskipun tidak seragam, sedangkan tingkat ekspresi gen reporter GUS pada galur GV3101 dan AGL1 relatif sama. LBA4404 menghasilkan jumlah pucuk hidup terbanyak pada transformasi menggunakan daun tembakau (Salas *et al.* 2001). Kim *et al.* (2009) melaporkan bahwa tingkat ekspresi transien pada *Arabidopsis* menggunakan LBA4404 (octopine) 1,6 kali lebih tinggi dibandingkan menggunakan tipe nopaline dan 3,5 kali lebih tinggi dibandingkan dengan tipe succinamopine. Berdasarkan hasil yang didapatkan dan beberapa studi literatur maka *A. tumefaciens* galur LBA4404 digunakan untuk tahap optimasi selanjutnya.

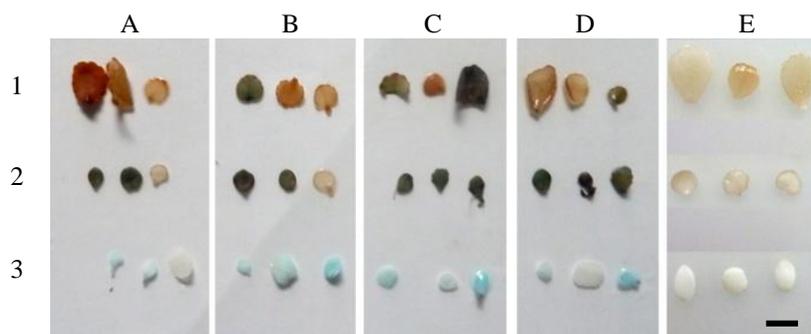
Optimasi yang kedua dilakukan untuk menguji pengaruh kerapatan optis yang optimal untuk proses transformasi. Optimasi dilakukan dengan menggunakan nilai kerapatan optis yang berbeda, yaitu 0,5; 0,7 dan 0,9. Hasil yang didapatkan pada optimasi kerapatan optis tidak jauh berbeda dengan hasil yang didapatkan pada optimasi galur *A. tumefaciens*. Hasil yang didapatkan tidak seragam

dalam satu perlakuan. Kerapatan optis menunjukkan kepadatan bakteri dalam medium. Semakin tinggi nilai kerapatan optis semakin tinggi pula jumlah *A. tumefaciens* yang terkandung dalam medium. Gambar 3 memperlihatkan bahwa jumlah bakteri tidak berbanding lurus dengan hasil ekspresi gen reporter artinya semakin banyak bakteri tidak berbanding lurus dengan tingkat infeksi atau tingkat transformasi transien. Hal ini ditunjukkan pada gambar bahwa perlakuan dengan kerapatan optis OD₆₀₀ 0,9 memiliki tingkat ekspresi gen reporter yang lebih rendah ditunjukkan pada warna hasil *GUS Assay* pada *K. daigremontiana* 1 dan 2 jika dibandingkan dengan kerapatan optis OD₆₀₀ 0,7. Perlakuan dengan kerapatan optis OD₆₀₀ 0,5 juga menunjukkan tingkat kebiruan yang lebih rendah pada *K. daigremontiana* 1 dan 2 dibandingkan dengan kerapatan optis OD₆₀₀ 0,7. Menurut Wroblewski *et al.* (2005) kepadatan suspensi sel sangat berpengaruh terhadap ekspresi transien pada *Arabidopsis*. Kepadatan sel bakteri dibawah OD₆₀₀ 0,1 seringkali menghasilkan ekspresi transien yang rendah sedangkan kepadatan diatas OD₆₀₀ 1,0 menyebabkan jaringan menjadi rapuh dan kuning. Berdasarkan hasil ini galur LBA4404 dan OD₆₀₀ 0,7 digunakan untuk proses optimasi transformasi selanjutnya.

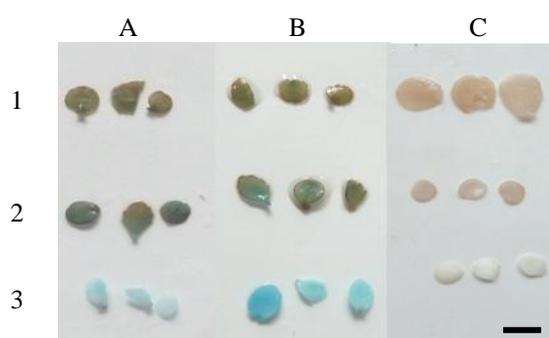
Optimasi ketiga berkaitan dengan konsentrasi *acetosyringone* yang digunakan. Pada penelitian ini pemberian *acetosyringone* dilakukan pada medium ko-kultivasi dengan berbagai konsentrasi yaitu, 0, 20, 50, 100, dan 200 μ M. *Acetosyringone* adalah suatu senyawa fenolik yang berperan dalam menstimulasi protein virA. VirA adalah *sensor kinase* histidin yang terikat membran. Sinyal senyawa fenolik (mis. *acetosyringone*) ditangkap oleh *Agrobacterium* melalui virA. VirA yang terautofosforilasi kemudian memindahkan gugus fosforilnya pada virG. Aktifnya virG ini kemudian menstimulasi transkripsi protein vir yang lain. VirG menstimulasi transkripsi dengan cara menempel pada sekuen 12 pasang basa lestarti yang kaya akan basa AT pada bagian promoter (Pazour & Das 1990).



Gambar 3. Uji transformasi transien pada tunas dengan perlakuan optical density. Perlakuan 0,7 menghasilkan warna biru yang lebih baik pada *K. daigremontiana*. A : 0,5 , B : 0,7 , C : 0,9 , D : Kontrol. Baris 1 : *Kalanchoe mortagei*, Baris 2 : *Kalanchoe daigremontiana* 1, Baris 3 : *Kalanchoe daigremontiana* 2, bar : 1 cm.



Gambar 4. Uji transformasi transien pada tunas dengan perlakuan konsentrasi *acetosyringone*, tidak menunjukkan tingkat warna biru yang berbeda. A : 0 μ M, B : 50 μ M, C : 100 μ M, D : 200 μ M, E: Kontrol. Baris 1 : *Kalanchoe mortagei*, Baris 2 : *Kalanchoe daigremontiana* 1, Baris 3 : *Kalanchoe daigremontiana* 2, bar : 1 cm.



Gambar 5. Uji transformasi transien pada tunas dengan perlakuan teknik introduksi *A. tumefaciens*. Perlakuan infiltrasi vakum menghasilkan tingkat warna biru lebih baik pada *K. daigremontiana* 2. A: perendaman B: infiltrasi vakum, C: kontrol. Baris 1: *Kalanchoe Mortagei*, Baris 2: *Kalanchoe daigremontiana* 1, Baris 3: *Kalanchoe daigremontiana* 2, bar: 1 cm.

Hasil percobaan dengan menggunakan daun tunas adventif tidak menghasilkan perbedaan warna biru yang baik (Gambar 4). Warna biru yang tampak jika dibandingkan dengan perlakuan sebelumnya mengalami penurunan intensitas seperti yang teramati pada *K. daigremontiana* 2, sedangkan pada *K. daigremontiana* 1 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4, sepuluh dari dua belas daun yang ditunjukkan mengalami *browning* yang lebih parah dibandingkan perlakuan galur dan kerapatan optis. Hal ini menandakan ekspresi gen *vir* tidak meningkat secara signifikan. Hasil yang sama pernah dilaporkan oleh Dixon *et al.* (2002) yang mendapatkan hasil bahwa penambahan *acetosyringone* tidak menunjukkan perbedaan tingkat virulensi yang berarti pada *Agrobacterium* dengan kromosom Ach5 (LBA4404) menggunakan *B. campestris* dan *G. max*.

Penelitian ini juga mendapatkan bahwa *Agrobacterium* dengan kromosom Ach5 (LBA4404) tidak menunjukkan perbedaan tingkat virulensi yang berarti pada cocor bebek ketika diberi perlakuan dengan konsentrasi *acetosyringone* yang berbeda. Hal ini mengindikasikan bahwa ada variabel lain yang berperan atau berperan bersama dengan *acetosyringone* dalam proses interaksi *Agrobacterium* dan inang. Fenol mutlak dibutuhkan

dalam aktivasi gen *vir*, meskipun fenol secara alami terdapat pada tumbuhan tingkat tinggi, penambahan yang spesifik berguna untuk beberapa spesies dan genus (Dixon *et al.* 2002). Hasil biru yang relatif tidak berbeda pada pengamatan langsung untuk masing-masing perlakuan pada percobaan ini bukan berarti *acetosyringone* tidak berperan dalam transformasi, tetapi lebih disebabkan oleh kondisi lain yang menyebabkan *Agrobacterium* tidak dapat secara optimal menginfeksi sel tumbuhan. Batas atas konsentrasi *acetosyringone* sebesar 200 μ M diambil berdasarkan penelitian Stachel *et al.* (1985) yang menemukan bahwa konsentrasi *acetosyringone* 200 μ M tidak beracun secara signifikan pada sel *Agrobacterium*. Optimasi selanjutnya menggunakan konsentrasi 100 μ M didasarkan pada data sekunder dari penelitian Jung *et al.* (2009) yang mendapatkan hasil bahwa pada konsentrasi *acetosyringone* 200 μ M mampu mentransformasi *K. pinnata* secara stabil untuk produksi ScFv.

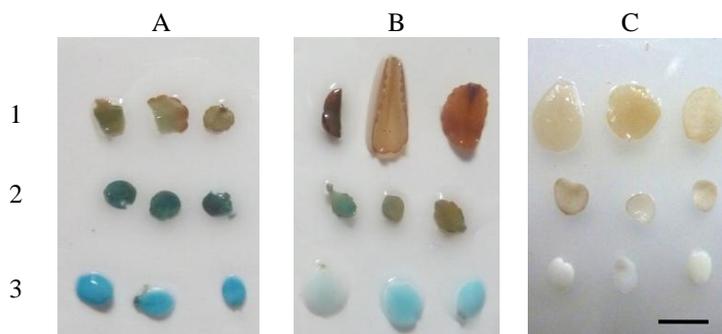
Optimasi keempat adalah menguji teknik introduksi *A. tumefaciens*. Dua cara yang digunakan dalam penelitian ini dalam mengintroduksi *A. tumefaciens*. Pertama adalah dengan perendaman dalam medium cair yang mengandung *A. tumefaciens* LBA4404, OD₆₀₀ 0,7 dan *acetosyringone* 100 μ M.

Kedua adalah dengan infiltrasi vakum dalam medium cair yang mengandung *A. tumefaciens* LBA4404, OD₆₀₀ 0,7 dan *acetosyringone* 100 µM.

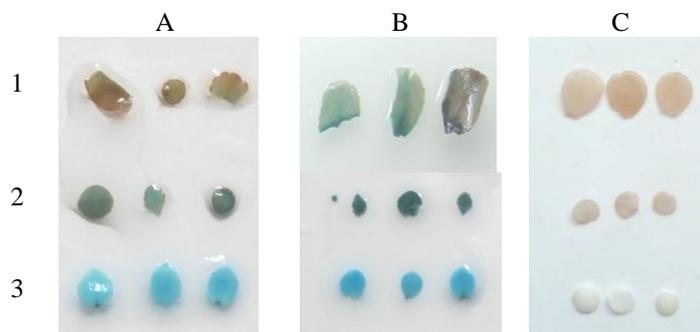
Gambar 5 menunjukkan hasil yang kurang optimal dalam uji GUS ditandai dengan tingkat kebiruan dari ekspresi glukoronidase pada perlakuan perendaman yang dapat dilihat jelas pada *K. Daigremontiana* 2. Hal ini diduga berkaitan dengan interaksi bakteri dengan sel tumbuhan yang kurang optimal. Hasil perlakuan introduksi menggunakan infiltrasi vakum menunjukkan hasil yang lebih baik jika dilihat dari ekspresi gen reporter pada *K. Daigremntiana* 2. Proses infiltrasi vakum memaksa bakteri untuk dapat masuk kedalam jaringan pengangkut pada tumbuhan, sehingga interaksi antara *Agrobacterium* dengan sel tanaman berlangsung lebih baik. Hasil interaksi yang baik ini menyebabkan tingkat infeksi yang lebih tinggi yang ditunjukkan dengan ekspresi GUS yang lebih tinggi pada *K. Daigremntiana*. Optimasi infiltrasi vakum yang sesuai dengan kemampuan tunas cocor bebek adalah 300 mmHg selama 15 menit pada *K. daigremontiana* dan 5 menit pada *K. mortagei*. Ukuran waktu tersebut dilihat dari tingkat kerusakan yang dialami daun selama proses vakum yang mengakibatkan tunas mati. Daun *K. mortagei* secara morfologi memiliki

lapisan kutikula yang lebih tipis sehingga kurang lebih tiga kali lebih sensitif terhadap proses vakum dibandingkan dengan *K. daigremontiana*. Berdasarkan dengan hasil ini maka infiltrasi vakum dalam medium cair yang mengandung *A. tumefaciens* LBA4404, OD₆₀₀ 0,7 dan *acetosyringone* 100 µM digunakan untuk proses optimasi berikutnya.

Optimasi kelima berkaitan dengan derajat keasaman media tumbuh bakteri yaitu YEP dan media ko-kultivasi yaitu 1/2MS0. Ekspresi transien pada daun tunas menunjukkan warna biru yang lebih baik pada tanaman yang diinfeksi dengan menggunakan *A. tumefaciens* yang ditumbuhkan pada medium asam (Gambar 6). Perbedaan warna kebiruan ini disebabkan karena perbedaan level ekspresi pada virG dari *A. tumefaciens*. Hasil yang serupa didapatkan oleh Yuan *et al.* (2007) yang mendapatkan bahwa level ekspresi virG dari *A. tumefaciens* yang ditumbuhkan pada medium asam naik sebanyak dua kali lipat lebih, sedangkan aktivitas β-Glucuronidase meningkat dari 198 unit miller pada kondisi netral ke 723 unit miler pada kondisi asam. Hal lain yang terinduksi oleh keberadaan kondisi asam ini adalah ekspresi dari virE0, -E1, -H1, -H2 yang berperan dalam proses transformasi.



Gambar 6. Uji transformasi transien pada tunas dengan perlakuan pH, A : pH 5,5, B : pH 7, C: kontrol. Baris 1 : *Kalanchoe Mortagei*, Baris 2 : *Kalanchoe daigremontiana* 1, Baris 3 : *Kalanchoe daigremontiana* 2, bar : 1 cm.



Gambar 7. Uji transformasi transien pada tunas dengan perlakuan medium ko-kultivasi, A: 1/2 MS0, B: M9, C: Kontrol. Baris 1: *Kalanchoe Mortagei*, Baris 2: *Kalanchoe daigremontiana* 1, Baris 3: *Kalanchoe daigremontiana* 2, bar: 1 cm.

Warna biru yang cukup mencolok pada *K. daigremontiana* 1 dan 2 pada tahap ini salah satunya disebabkan oleh melimpahnya aktivasi ekspresi protein vir pada kromosom *A. tumefaciens*. Hal ini terjadi karena induksi transkripsi gen vir hanya akan terjadi pada kondisi yang asam, pada pH sekitar 5,5, yang merupakan pH umum pada rizosfer (Fierer & Jackson 2006). Selain itu keberadaan senyawa fenolik (*acetosyringone*) yang terdapat dalam media diduga mengaktifasi promotor virG bagian distal, sedangkan kondisi asam secara tersendiri menginduksi promotor virG bagian proximal, yang berefek pada meningkatnya level ekspresi virG (Mantis & Winan 1992). Aktivasi virG ini melibatkan aktivasi sistem yang lain yaitu *chvG-chvI* yang terdapat pada kromosom *Agrobacterium*. Sistem *chvG-chvI* ini kemudian diketahui berperan penting dalam pembentukan tumor dan pertumbuhan bakteri pada kondisi asam.

Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa *Agrobacterium* yang diperlakukan dengan pH rendah menghasilkan tingkat warna kebiruan yang lebih tinggi pada *GUS assay* dibandingkan pada pH netral. Mantis & Winan (1993) mendapatkan data bahwa 152 gen pada *A. tumefaciens* terekspresi dua kali lipat atau lebih pada pH 5,5.

Kondisi fisiologis *A. tumefaciens* dipengaruhi besarnya pH lingkungan. Saat terjadi perubahan pH *A. tumefaciens* akan memberikan respon yang kompleks untuk mempertahankan pH dalam selnya tetap netral atau mendekati netral, kondisi ini dinamakan homeostasis pH. pH 5,5 memang mempunyai beberapa kelebihan seperti melimpahnya ekspresi protein virulensi *A. tumefaciens* yang menyebabkan tingginya level ekspresi dari gen reporter. Tetapi disisi lain suasana pH 5,5 mempengaruhi kondisi fisiologis *A. tumefaciens* yang menyebabkan turunnya kecepatan pertumbuhannya. *A. tumefaciens* yang tumbuh pada medium netral memiliki laju pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan *A. tumefaciens* yang tumbuh pada medium asam. *A. tumefaciens* yang tumbuh pada medium netral mencapai OD₆₀₀ 0,7 kurang lebih selama 8-12 jam sedangkan pada medium asam *A. tumefaciens* mencapai kepadatan yang sama kurang lebih selama 12-24 jam. Menurut Yuan *et al.* (2007) lambatnya laju pertumbuhan ini disebabkan *A. tumefaciens* yang tumbuh pada kondisi asam akan menekan aktivasi gen-gen yang berkaitan dengan metabolisme sel, respirasi, transfer elektron dan sintesis makromolekul. Meskipun memiliki konsekuensi dengan laju pertumbuhan *A. tumefaciens* yang lebih lambat pH 5,5 digunakan untuk proses optimasi selanjutnya bersana dengan kondisi galur *A. tumefaciens* LBA4404, OD₆₀₀ 0,7 dan *acetosyringone* 100 µM

Optimasi yang terakhir adalah mengoptimasi medium ko-kultivasi. Medium ko-kultivasi adalah medium yang digunakan untuk menumbuhkan bersama-sama *A. tumefaciens* dan tanaman sehingga

medium ini harus dapat mendukung kebutuhan hidup antara dua organisme yang berbeda. Kondisi yang optimal yang diciptakan medium ko-kultivasi akan memacu proses interaksi antara naiknya tingkat virulensi dari *A. tumefaciens* dan melemahnya pertahanan tanaman sehingga lebih mudah untuk diinfeksi oleh *A. tumefaciens*. Medium ko-kultivasi yang digunakan adalah medium ½MS0 dan M9. Medium ½MS0 adalah medium yang umum digunakan dalam kultur jaringan tumbuhan sedangkan medium M9 adalah medium pertumbuhan bakteri.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada medium ko-kultivasi M9 didapatkan warna biru yang lebih baik dibandingkan dengan medium ko-kultivasi ½MS0 (Gambar 7). Bahkan pada *K. Mortagei* yang dari awal proses optimasi tidak pernah menunjukkan hasil yang positif, pada optimasi ini menunjukkan warna biru yang cukup baik. Warna biru dari ekspresi gen reporter lebih terlihat jelas pada *K. Daigremontiana* 1 dan 2. Hal ini kemungkinan disebabkan karena pada medium M9 memiliki sumber karbon yang berbeda dengan medium ½MS0. Medium M9 menggunakan glukosa sebagai sumber karbonnya sedangkan pada medium MS menggunakan sukrosa sebagai sumber karbonnya. Kandungan glukosa ini menyebabkan adanya gerak kemotaksis bakteri menuju sel tanaman (Loake *et al.* 1988)

Analisis sekuen dari *chvE A. tumefaciens* menunjukkan bahwa *chvE* homolog terhadap protein pengikat gula pada *E. coli* (Huang *et al.* 1990). Cangelosi *et al.* (1990) melaporkan bahwa *chvE* adalah protein pengikat gula yang memediasi proses kemotaksis dan induksi gen vir terhadap keberadaan glukosa, galaktosa dan gula yang lain. Ekspresi virB, -C, -D, -E, dan -F terinduksi pada level transkripsi oleh struktur yang berhubungan dengan senyawa fenol seperti *acetosyringone* dan diduga memiliki potensi terinduksi oleh monosakarida eksogen dan kondisi lingkungan seperti pH dan suhu (Cangelosi *et al.* 1990). Protein *chvE* memiliki tingkat homologi yang tinggi terhadap protein pengikat gula (*galactose-glucose-binding protein (GBP)*) pada *Escherichia coli* (Huang *et al.* 1990), akan tetapi memiliki perbedaan spektrum monosakarida yang terikat pada masing-masing protein. Keberadaan *A. tumefaciens* pada daerah luka menyebabkan kemotaksis yang dimediasi oleh *chvE* menuju monomer dinding, kemudian bakteri dapat menempel pada sel tanaman dan ekspresi gen vir menjadi terinduksi dengan adanya senyawa fenolik dan gula yang dikeluarkan oleh sel tanaman (Hahn *et al.* 1989). Transkripsi dari gen vir dapat diinduksi dengan berbagai macam senyawa fenolik salah satu contohnya adalah *acetosyringone* (Stachel *et al.* 1985), dan beberapa macam gula yang bekerja secara sinergis dengan senyawa fenolik (Cangelosi *et al.* 1990). pH asam dibutuhkan untuk ekspresi optimal dari gen vir (Stachel *et al.* 1986). Fakta-fakta yang

disebutkan diatas menunjukkan bahwa terdapat korelasi yang tinggi antara senyawa fenol, gula dan pH.

Tiga variabel optimasi yang menentukan terbentuknya warna biru yang lebih baik pada ekstresi transien pada penelitian ini adalah infiltrasi vakum, pH media tumbuh asam dan sumber karbon bakteri berupa glukosa. Infiltrasi vakum memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan perendaman karena interaksi bakteri dengan sel tanaman yang lebih besar. pH asam berperan bersama dengan glukosa untuk memperkuat sinyal yang dihasilkan karena keberadaan *acetosyringone*, dengan cara berinteraksi dengan protein virA periplasmik dan membuat daerah kinase sensor virA sitoplasma menjadi oversensitif terhadap *acetosyringone*.

Tanpa keberadaan *acetosyringone* pengaruh pH asam dan glukosa menjadi tidak bermakna (McCullen & Binns. 2006). Warna biru yang lebih baik pada *K. daigremontiana* 2 diduga berkaitan dengan produksi senyawa fenolik yang rendah dibandingkan dengan *K. mortagei* dan *K. daigremontiana* 1, hal ini dapat diamati dari timbulnya warna kecoklatan dan tekstur daun yang lebih keras pasca transformasi. Kondisi pada *K. daigremontiana* 2 didukung laporan Tkalec *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa produksi fenolase tidak meningkat secara signifikan pada saat terjadi infeksi *Agrobacterium* pada *K. daigremontiana*. Tetapi belum ada penjelasan fenomena perbedaan produksi senyawa fenolik antara *K. daigremontiana* 1 dan *K. daigremontiana* 2 meskipun satu spesies, kemungkinan karena *K. daigremontiana* 1 telah memiliki warna yang lebih gelap dari *K. daigremontiana* 2 tetapi hal ini perlu kajian lebih lanjut.

KESIMPULAN

Profil transformasi terbaik berdasarkan uji ekspresi transien menggunakan gen GUS adalah menggunakan *K. daigremontiana* 2, galur *A. tumefaciens* LBA 4404 yang ditumbuhkan pada pH 5,5 dengan metode infiltrasi vakum dengan kepadatan bakteri yang diukur pada panjang gelombang 600 nm sebesar 0,7 yang mengandung konsentrasi *acetosyringone* 100 µM, dengan medium ko-kultivasi M9.

DAFTAR PUSTAKA

Aida, R. & Shibata, R. (1996). Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and transgene silencing. *Plant Science*. 121(2): 175–185

Cangelosi, G.A., Ankenbauer, R.G. & Nester E.W. (1990). Sugars induce the *Agrobacterium* virulence genes through a periplasmic binding protein & a transmembrane signal protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 87: 6708–6712

Dagert, M. & Ehrlich, S. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*. 6 (1): 23–28

Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.J., Reddy, M.S.R. & Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway & plant defense a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*. 3: 371–390

Fierer, N. & R. B. Jackson. (2006). The diversity & biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 103: 626–631

Hahn, M.G., Bucheli, F., Cervone, F., Doares, S.H., O'Neill, R.A., Darvill, A. & Albershelm, P. (1989). Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. In *Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Perspectives*, Vol. 3. T. Kosuge & E.W. Nester (eds). New York: McGraw-Hill. pp. 131-181.

Hamilton, R.H. & Fall, M.Z. (1971). The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 27(2): 229-230.

Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J. & Schilperoort, R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- & T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*. 303: 179-80

Horn, M.E, Woodard, S.L, & Howard, J.A. (2004). Plant molecular farming: systems & products. *Plant Cell Rep*, 22, 711–20

Huang, M.L., Cangelosi, G.A., Halperin, W. & Nester, E.W. (1990). A chromosomal *Agrobacterium tumefaciens* gene required for effective plant signal transduction. *Journal of Bacteriology*. 172(4): 1814-1822.

Jung, Y., Rhee, Y., Auh, C.K., Shim, H.K., Choi, J.J., Kwon, S.T., Yang, J.S., Kim, D., Kwon, M.H., Kim, Y.S. & Lee, S. (2009). Production of recombinant single chain antibodies (scFv) in vegetatively reproductive *Kalanchoe pinnata* by in planta transformation. *Plant Cell Reports*. 28(10): 1593-1602.

Kim, M.J., Baek, K. & Park, C.M. (2009). Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*. 28(8): 1159-1167

Loake, G.J., Ashby, A.M. & Shaw, C.H. (1988) Attraction of *Agrobacterium tumefaciens* C58 towards Sugars Involve A Highly Sensitive Chemotaxis System. *Journal of General Microbiology*. 134: 1427-1432.

Mantis, N. J., & S. C. Winans. (1992). The *Agrobacterium tumefaciens* vir gene transcriptional activator virG is transcriptionally induced by acid pH & other stress stimuli. *Journal of Bacteriology*. 174(4): 1189-1196.

- McCullen, C.A. & Binns, A.N. (2006). *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22: 101-127.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3): 473-497
- Nam, J., Matthyse, A.G. & Gelvin, S.B. (1997). Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell*. 9: 317-333
- Pazour, G.J., & Das, A. (1990). Characterization of the *virG* binding site of *Agrobacterium tumefaciens*. *Nucleic Acid Research*. 18: 6909-6913
- Sambrook, J., Fritsch E. F., & Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Salas, M.G., Park, S.H., Srivatanakul, M. & Smith, R.H. (2001). Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. *Plant Cell Reports*. 20(8): 701-705.
- Stachel, S.E., Messens, E., Van Montagu, M. & Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*. 318: 624-29
- Stachel, S.E., Nester, E.W. & Zambryski, P.C. (1986). A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* *vir* gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 83: 379-83
- Tkalec, M., Car, D., Gospočić, J., Križaić, I., Duž, K. and Vidaković-Cifrek, Ž. (2012). Response of *Kalanchoe daigremontiana* to wounding and infection with *Agrobacterium tumefaciens*. *Periodicum Biologorum*. 114(1): 83-90.
- Wroblewski, T., Tomczak, A. & Michelmore, R., (2005). Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal*. 3(2): 259-273.
- Yuan, Z.C., Liu, P., Saenkham, P., Kerr, K. & Nester, E.W. (2008). Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. *Journal of Bacteriology*. 190(2): 494-507.