

I. PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Salah satu proses umum dalam manipulasi gen yang akan ditransfer ke genom sel tanaman adalah kloning gen. Proses ini dilakukan dengan menyisipkan gen target ke dalam vektor kloning dan menggunakan *Escherichia coli* sebagai sel inang untuk memperbanyak jumlah DNA plasmid rekombinan. Tahap selanjutnya adalah memindahkan plasmid yang telah diisolasi dari *Escherichia coli* ke *Agrobacterium* dengan proses transformasi (Widyasari dan Suhandono, 2007). Adapun transformasi gen target ke sel tanaman dengan perantara *Agrobacterium* disebut dengan *Agrobacterium-mediated transformation* (Wang dkk., 2014; Ziemienowicz, 2014; Yang dkk., 2013).

Proses transformasi genetik ke sel bakteri dapat dilakukan dengan beberapa metode seperti elektroporasi, konjugasi, *heat shock* (Acquaah, 2004), dan *freeze thaw* (Holsters dkk., 1978). Metode konjugasi membutuhkan waktu yang lama yaitu sekitar 5 hingga 6 hari untuk transformasi plasmid ke dalam *Agrobacterium* (Ditta dkk., 2001). Metode elektroporasi membutuhkan alat khusus dan mahal, sedangkan metode *heat shock* jarang digunakan untuk transformasi plasmid ke *Agrobacterium*, lebih sering digunakan untuk *Escherichia coli* (Inoue dkk, 1990; Janjua dkk., 2014; Yoo, 2010). Metode transformasi yang sering digunakan pada *Agrobacterium tumefaciens* adalah metode *freeze thaw*, akan tetapi frekuensi transformasinya masih rendah (Holsters dkk., 1978; Merserean dkk., 1990; Hofgen dan Willmitzer, 1988).

Beberapa faktor utama yang memengaruhi tingkat efisiensi transformasi pada *Agrobacterium tumefaciens* yaitu densitas bakteri pada kultur (Jyothishwaran dkk., 2007) dan lama waktu inkubasi dalam nitrogen cair pada metode *freeze thaw* (Wang, 2006). Beberapa penelitian transformasi dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* pada metode *freeze thaw* menggunakan densitas bakteri sekitar 0,4-0,6 pada nilai OD₆₀₀ dan waktu inkubasi nitrogen cair selama 5 menit (Widyasari dan Suhandono, 2007; Movahedi dkk., 2014), akan tetapi efisiensi transformasinya masih rendah (Jyothishwaran dkk., 2007; Hofgen dan Willmitzer, 1988). Oleh karena itu, perlu dilakukan optimasi terhadap densitas bakteri pada OD₆₀₀ dan waktu inkubasi dalam nitrogen cair pada metode *freeze thaw* guna meningkatkan efisiensi transformasi plasmid pada *Agrobacterium tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens EHA105 merupakan salah satu strain yang sering digunakan dalam pembuatan tanaman transgenik menggunakan metode *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation*, seperti pada anggrek (Mursyanti dkk., 2015). Strain ini merupakan salah satu *strain* hipervirulen yang dapat meningkatkan keberhasilan proses transformasi (Trinh dkk., 1998; Pratheesh dkk., 2012). Oleh karena itu penelitian ini menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 sebagai sel inang yang ditransformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4*.

pTA7002 merupakan salah satu plasmid yang dapat digunakan sebagai vektor pembawa gen target dalam proses transformasi pada pembuatan tanaman transgenik. Plasmid ini memiliki penanda selektif *Hygromycin*

phosphotransferase (HPT) sehingga mudah untuk dideteksi keberhasilan transformasinya ke dalam bakteri yang ditumbuhkan pada medium yang mengandung higromisin (Addgene, 2016). Plasmid pTA7002-*AtRKD4* merupakan plasmid yang disisipi gen *AtRKD4* yang diisolasi dari *Arabidopsis thaliana*. Gen ini mempunyai fungsi untuk menginduksi pembentukan embrio somatik pada tahap awal perkembangan tanaman transgenik (Waki dkk., 2011). Penelitian ini akan menggunakan plasmid pTA7002-*AtRKD4* yang ditransformasikan ke dalam bakteri *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

B. Keaslian Penelitian

Penelitian mengenai transformasi DNA rekombinan ke sel inang telah banyak dilakukan. Akan tetapi, penelitian yang bertujuan untuk meningkatkan efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* pada *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 dengan melakukan optimasi nilai OD₆₀₀ kultur dan optimasi waktu inkubasi pada nitrogen cair belum pernah dilakukan.

Widyasari dan Suhandono (2007) berhasil melakukan transformasi pada bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dengan plasmid pCAMBIA1303-CAMV35S yang membawa gen *dip22* ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* dengan tujuan menghasilkan tebu yang tahan terhadap cekaman kekeringan. Transformasi dilakukan dengan menggunakan metode *freeze thaw* dengan waktu inkubasi 5 menit dalam nitrogen cair dan densitas kultur bakteri pada OD₆₀₀ berkisar 0,4-0,5. Meskipun proses transformasi ke *Agrobacterium tumefaciens* berhasil, tetapi tidak dihitung nilai efisiensi transformasinya.

Upaya meningkatkan efisiensi transformasi pada bakteri pernah dilakukan oleh Inoue dkk., (1990). Penelitian ini telah berhasil meningkatkan dan mengukur tingkat keberhasilan transformasi plasmid pBR322 ke dalam 3 strain bakteri *Escherichia coli* (DHS, JMI09 dan HB101). Upaya yang dilakukan antara lain optimasi bufer yang digunakan dalam transformasi, optimasi sel kompeten dengan pendinginan, mengevaluasi ukuran plasmid yang efektif untuk ditransformasikan, optimasi waktu dan suhu transformasi metode *heat shock* dengan waktu 0-90 detik dan suhu 40,42, dan 44 °C. Upaya efisiensi ini berhasil dengan nilai efisiensi transformasi sebesar $1-3 \times 10^9$ cfu/ug pBR322 DNA dan dapat disimpan dalam nitrogen cair selama lebih dari 1 bulan.

Upaya meningkatkan efisiensi transformasi pada bakteri juga pernah dilakukan oleh Calvin dan Hanawalt (1988) dengan menggunakan metode elektroporasi. Penelitian ini telah berhasil meningkatkan efisiensi transformasi plasmid pUC18 ke dalam *Escherichia coli* K-12. Upaya yang dilakukan antara lain mendesain alat elektroporasi yang efisien, optimasi fase pertumbuhan bakteri yang siap untuk ditransformasikan, evaluasi bahwa tegangan tunggal lebih baik digunakan daripada multi tegangan saat proses transformasi, optimasi konsentrasi plasmid yang digunakan, optimasi densitas sel, serta optimasi bufer yang digunakan dalam proses transformasi. Upaya ini menghasilkan nilai efisiensi transformasi sebesar 5×10^9 T/μg DNA plasmid.

Peningkatan efisiensi transformasi pada *Agrobacterium tumefaciens* pernah dilakukan oleh Jyothishwaran dkk., (2007). Penelitian ini mencoba mentransformasikan plasmid pGreen-CaCPK2 ke dalam *A. tumefaciens* strain

LBA4404. Upaya meningkatkan efisiensi transformasi menggunakan metode *freeze thaw* dengan optimasi nilai OD₆₀₀ kultur bakteri 0,3; 0,4; 0,5 dan 0,6. Waktu inkubasi dalam nitrogen cair yang digunakan adalah 5 menit pada suhu 37°C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai efisiensi paling tinggi yang diperoleh adalah sebesar $3,6 \times 10^5$ T/ μ g DNA pada nilai OD₆₀₀ kultur 0,3; sedangkan nilai efisiensi ini semakin menurun terhadap densitas kultur bakteri pada OD₆₀₀ yang semakin meningkat. Nilai efisiensi transformasi terendah diperoleh sebesar $1,2 \times 10^3$ T/ μ g DNA pada nilai OD₆₀₀ kultur 0,6. Disisi lain, banyak penelitian (Widyasari dan Suhandono, 2007; Holsters dkk., 1978; Merserean dkk., 1990; Hofgen dan Willmitzer, 1988) yang menggunakan densitas bakteri dengan nilai OD₆₀₀ kultur sekitar 0,4-0,6 dalam proses transformasi dan menyebabkan diperolehnya efisiensi transformasi yang rendah.

Penelitian yang dilakukan oleh Jyothishwaran dkk., (2007) memberikan konfirmasi bahwa transformasi pada *Agrobacterium tumefaciens* dengan nilai OD₆₀₀ kultur 0,3 menghasilkan nilai efisiensi yang cukup tinggi yaitu $3,6 \times 10^5$ T/ μ g DNA. Penelitian ini belum melakukan optimasi pada waktu inkubasi dengan nitrogen cair. Oleh karena itu perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan efisiensi transformasi pada *Agrobacterium tumefaciens* dengan menggunakan plasmid pTA7002-*AtRKD4* pada *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, yaitu dengan melakukan optimasi nilai OD₆₀₀ kultur *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 dan waktu inkubasi pada nitrogen cair yang optimum untuk proses transformasi.

C. PERUMUSAN MASALAH

1. Berapakah densitas kultur *Agrobacterium tumefaciens EHA105* pada OD₆₀₀ yang optimum untuk meningkatkan efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4*?
2. Berapa waktu inkubasi pada nitrogen cair yang optimum untuk proses transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* ke dalam *Agrobacterium tumefaciens EHA105* dengan metode *freeze thaw*?

D. TUJUAN PENELITIAN

1. Mengetahui densitas kultur *Agrobacterium tumefaciens EHA105* pada OD₆₀₀ yang optimum untuk meningkatkan efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4*.
2. Mengetahui waktu inkubasi pada nitrogen cair yang optimum untuk proses transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* ke dalam *Agrobacterium tumefaciens EHA105* dengan metode *freeze thaw*.

E. MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini dapat menjadi sumber pengetahuan dan bukti ilmiah bagi peneliti khususnya di bidang bioteknologi terkait efisiensi transformasi plasmid pada *Agrobacterium tumefaciens*. Melalui penelitian ini diharapkan proses transformasi plasmid menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* dapat berlangsung lebih efisien.