

# **Transformasi T-DNA *Agrobacterium* sebagai Model Integrasi Gen pada Tanaman**

**Lili Sugiyarto**

**Juridik Biologi FMIPA UNY**

**[lili\\_sugiyarto@uny.ac.id](mailto:lili_sugiyarto@uny.ac.id)**

## **Abstrak**

Transformasi merupakan teknik manipulasi genetik yang telah banyak dilakukan pada tanaman termasuk tanaman pertanian melalui media *Agrobacterium*. Selama ini transfer gen dengan *Agrobacterium* dikembangkan untuk menghasilkan tanaman transgenik dengan sistem ketahanan tertentu (ketahanan terhadap hama penyakit, kekeringan, herbisida) maupun untuk meningkatkan produksi tanaman.

*Agrobacterium* merupakan agen yang menyebabkan penyakit *crown-gall* atau pembengkakan seperti tumor pada tanaman. Pembengkakan ini terjadi karena adanya segmen transfer T-DNA (*Transferred DNA*) dari *Ti* plasmid (*Tumor inducing*) bakteri ke dalam sel tanaman dan kemudian berintegrasi ke dalam genom sel inang dan diekspresikan oleh gen yang mengkode. Proses transformasi genetik ke dalam sel tanaman meliputi lima tahapan yaitu kolonisasi bakteri, induksi sistem virulen bakteri, pembentukan kompleks T-DNA, transfer T-DNA, dan integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman.

Kata kunci : *Agrobacterium*, transformasi T-DNA, integrasi gen

## **A.PENDAHULUAN**

*Agrobacterium* dikenal secara alami mempunyai kemampuan transfer DNA antar kingdom. Pada tanaman, *Agrobacterium* biasanya digunakan sebagai agen rekayasa genetik untuk menghasilkan tanaman transgenik. Selain itu *Agrobacterium* juga dapat digunakan untuk transformasi gen antar sel hidup, misalnya dari sel prokariot ke dalam sel fungi atau sel manusia. Kemampuan *Agrobacterium* melakukan transformasi genetik ke dalam sel inang telah dipelajari selama beberapa dekade (Tzfira, 2004).

*Agrobacterium* di alam menyebabkan penyakit Crown-gall yaitu pembengkakan yang terjadi karena poliferasi seperti tumor yang terjadi pada tanaman kebanyakan

dikotil. Pembengkakan ini terjadi karena adanya segmen transfer T-DNA (*Transferred DNA*) dari *Ti* plasmid (*Tumor inducing*) bakteri ke dalam sel inang dan kemudian berintegrasi ke dalam genom sel inang dan diekspresikan oleh gen yang mengkode. *Ti* Plasmid terdiri dari dua komponen yang diperlukan untuk transformasi genetik yaitu daerah *Vir* dan T-DNA. Daerah *Vir* dikode oleh protein bakteri yang diperlukan untuk proses transport T-DNA, sedangkan T-DNA membawa signal target nonspesifik dan mengkode beberapa transport ataupun fungsi integrasi (Tzfira, 2004).

Secara garis besar ada dua teknik transfer gen yang telah berhasil dilakukan yaitu transfer gen secara langsung (misalnya dengan senyawa kimia polyethylene glycol (PEG), elektroporator atau penembak DNA) dan secara tidak langsung yaitu menggunakan bakteri tanah *Agrobacterium tumefaciens*. Masing-masing teknik memiliki keunggulan dan kelemahan. Teknik transfer DNA secara langsung ada kecenderungan menyisipkan DNA dengan jumlah salinan yang banyak, sehingga teknik transformasi *Agrobacterium* menjadi alternatif pilihan. Semakin banyak jumlah salinan gen yang disisipkan dapat menyebabkan ekspresi gen kurang stabil. Hal ini akibat adanya pembungkaman gen dan proses penyusunan kembali (*rearrangement*) yang semakin tinggi. Penerapan teknologi transformasi gen memungkinkan penyisipan gen-gen penting saja, sehingga diharapkan tidak merubah sifat yang lain. Transformasi gen pada tanaman merupakan upaya untuk memperbaiki sifat genetik tanaman. (Rahmawati, 2006).

Transformasi genetik biasanya digunakan untuk rekayasa genetik dan telah dilakukan pada beberapa tanaman termasuk tanaman pertanian. Prosedur transformasi genetik yang efisien dapat digunakan untuk mempermudah studi biologi molekuler dan menghasilkan tanaman varietas unggul, misalnya pada tanaman jagung. Transformasi genetik jagung telah berhasil dilakukan dengan tiga metode yaitu menggunakan penembak biolistik, elektroporasi dan *Agrobacterium*. Transformasi menggunakan *Agrobacterium* ternyata lebih disenangi dibandingkan dengan penembak biolistik dan elektroporasi karena menghasilkan transgen terekspresi yang lebih besar dengan jumlah lokus yang lebih rendah. Efisiensi transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium* dipengaruhi oleh strain *Agrobacterium* yang digunakan. Perbedaan antar strain *Agrobacterium* ditentukan oleh adanya tipe kromosom dan tipe *Ti*-plasmid. Tipe kromosom dalam sel bakteri *Agrobacterium* terdiri dari *octopine*, *nopaline*, dan

*chrysoptine*; sedangkan tipe Ti-plasmid terdiri dari *octopine*, *nopaline*, *chrysoptine*, dan *succinamopine* (Utomo, 2004) .

Keunggulan teknik transformasi menggunakan *Agrobacterium* antara lain adalah 1). Efisiensi transformasi dengan salinan gen tunggal lebih tinggi, 2). Dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium yang sederhana. Gen dengan salinan tunggal lebih mudah dianalisa dan biasanya bersegregasi mengikuti pola pewarisan Mendel.

## **B. PEMBAHASAN**

Transformasi genetik pada tanaman pertanian merupakan prosedur yang rutin dilakukan untuk mendapatkan varietas tanaman unggul. Ada dua bakteri tanah yang biasanya digunakan dalam transformasi pada tanaman yaitu *Agrobacterium tumefaciens* dan *Agrobacterium rhizogenes* yang mengakibatkan tumor dan *hairy root* pada tanaman dikotil. Walaupun penyakit yang disebabkan oleh kedua bakteri di atas berbeda, tetapi proses atau mekanisme infeksiya sama. *Agrobacterium* mempunyai kemampuan untuk mentransfer T-DNA dari plasmid yang dikenal dengan Ri plasmid (*root inducing plasmid*) ke dalam sel tanaman melalui pelukaan (Walden, 1991).

### **Proses transfer genetik dari *Agrobacterium* pada sel tanaman**

Proses transfer genetik dari *Agrobacterium* pada sel tanaman melalui beberapa tahap (gambar 1) yaitu :

#### **1). Kolonisasi bakteri**

Merupakan tahapan awal yang penting untuk menginduksi terbentuknya tumor. Tahap ini berperan pada saat *Agrobacterium* menempel pada permukaan sel tanaman. Polisakarida yang terdapat pada permukaan sel *Agrobacterium* berperan penting dalam proses kolonisasi.

#### **2). Induksi sistem virulen bakteri**

Transfer T-DNA ditunjukkan dengan produk yang dikode oleh 30-40 kb daerah Vir pada Ti plasmid. Daerah ini sedikitnya terdiri dari enam operon esensial ( Vir A, Vir B, Vir C, Vir D, Vir E dan Vir G) dan operon non esensial (Vir F dan Vir H). Jumlah gen masing-masing operon berbeda, Vir A, Vir G dan Vir F hanya terdiri dari satu gen; Vir C, Vir E dan Vir H terdiri dari dua gen; sedangkan Vir D dan Vir B mempunyai masing-masing empat dan tujuh gen. Vir A-Vir G merupakan dua komponen sistem yang mengaktifkan transkripsi pada gen Vir yang lain. Vir A yang teraktivasi mempunyai kapasitas untuk mentransfer fosfat menjadi residu aspartat yang sesuai

dengan DNA sitoplasmik *binding* protein Vir G. Fungsi Vir G adalah sebagai faktor transkripsi yang mengatur regulasi ekspresi gen Vir pada saat terfosforilasi oleh Vir A. Daerah C-terminal bertanggung jawab dalam mengikat DNA, sedangkan N-terminal merupakan domain fosforilasi yang menunjukkan homologi dengan domain sensor Vir A. Aktivasi sistem Vir juga tergantung pada faktor eksternal seperti temperatur dan pH. Pada temperatur lebih dari 32°C, gen Vir tidak akan terekspresi karena mengubah konformasi folding Vir A yang menginduksi terjadinya inaktivasi. Pengaruh temperatur pada Vir A ditekan dalam bentuk mutan Vir G (Vir G<sup>0</sup>), yang mengaktifkan ekspresi gen Vir.

### **3). Pembentukan generasi kompleks T-DNA**

Aktivasi gen Vir menghasilkan generasi molekul *single strand* (ss) yang menghadirkan copy strand T-DNA. DNA yang terletak diantara batas T-DNA akan ditransfer ke dalam sel tanaman sebagai ssDNA, dan kemudian berintegrasi ke dalam genom tanaman. Protein Vir D1 dan Vir D2 merupakan protein yang berperan penting pada tahap ini, dengan mengenali sekuen batas T-DNA dan nicking (aktivitas endonuklease) pada strand bawah di setiap batas. Pada daerah nick diasumsikan sebagai tempat inisiasi dan terminasi untuk pemulihan strand T. Setelah terjadi pemotongan endonukleotida, Vir D2 secara kovalen akan menempel pada ujung 5' pada ss strand T. Asosiasi ini mencegah eksonukleolitik pada ujung 5' pada ss strand T dan membedakan ujung 5' sebagai pemeran penting dalam kompleks transfer T-DNA.

### **4). Transfer T-DNA meliputi dua model untuk translokasi kompleks T-DNA**

Sarana transfer ke dalam nukleus tanaman adalah kompleks protein ssT-DNA. Ini harus ditranslokasi ke dalam nukleus tanaman melalui tiga membran, dinding sel tanaman dan ruang seluler. Berdasarkan model yang paling banyak diterima adalah kompleks ss T-DNA Vir D2 yang dilindungi 69 kDa protein Vir E2, ssDNA *binding* protein. Asosiasi ini mencegah nuklease dan penambahan perpanjangan strand ss T-DNA sehingga mengurangi diameter kompleks sekitar 2 nm. Hal ini mengakibatkan translokasi melalui membran menjadi lebih mudah. Walaupun demikian, asosiasi tersebut tidak dapat menstabilkan kompleks T-DNA dalam *Agrobacterium*. Vir E2 terdiri dari dua signal tanaman yaitu NLS (*nuclear location signal*) dan Vir D2 terdiri dari satu NLS. Fakta ini menunjukkan bahwa kedua protein rupanya berperan penting dalam sel tanaman sebagai perantara transfer kompleks T-DNA ke dalam nukleus. Vir

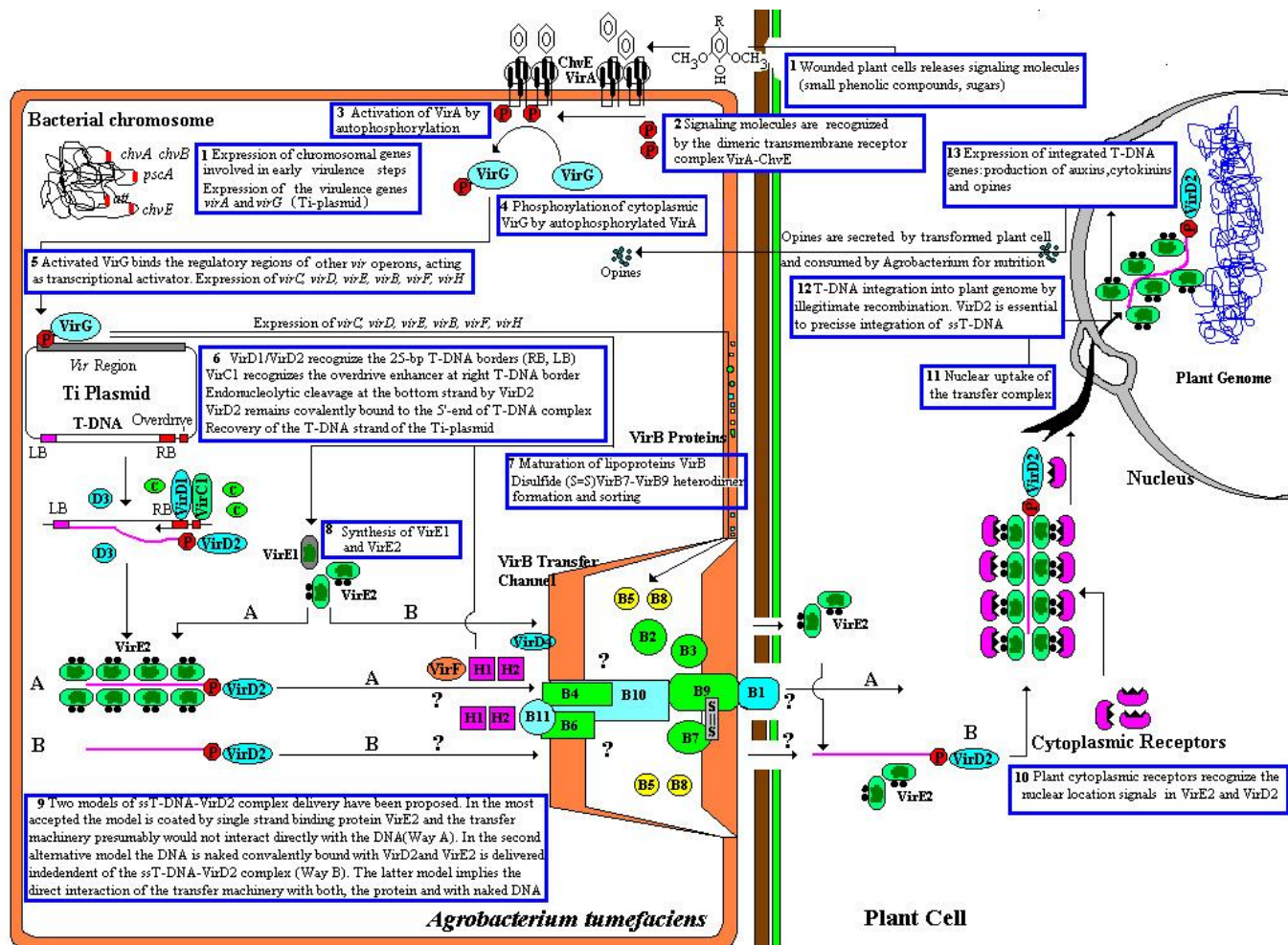
E1 diperlukan untuk ekspor Vir E2 ke dalam sel tanaman, walaupun fungsi spesifik yang lain belum diketahui. Model alternatif lain yaitu bahwa kompleks transfer berupa ssDNA secara kovalen terikat pada ujung 5' dengan Vir D2, tetapi tanpa dilingkupi oleh protein Vir E2. Ekspor independen Vir E2 ke dalam sel tanaman merupakan proses alami, dan sekali kompleks ssT-DNA VirD2 tersebut masuk dalam sel tanaman, akan dilingkupi oleh protein Vir E2. Hal ini juga memungkinkan proses tersebut dapat terjadi sebagai alternatif pada saat kondisi terinfeksi.

#### **5). Integrasi T-DNA dalam genom tanaman**

Pada sel tanaman, kompleks ssT-DNA merupakan target nukleus untuk melewati membran nukleus. Dua protein Vir telah diketahui penting dalam tahap ini, yaitu Vir D2 dan Vir E2 adalah yang paling penting, dan kemungkinan Vir F memberikan sedikit peran pada proses ini. Signal NLS dari Vir D2 dan Vir E2 berperan penting sebagai target nukleus dalam mengantarkan kompleks ssT-DNA sebagai gambaran awal. Vir D2 mempunyai satu NLS fungsional. Kompleks ss T-DNA merupakan kompleks nukleoprotein berukuran besar sekitar diatas 20 kb yang hanya terdiri dari satu ujung 5' secara kovalen menempel pada protein Vir D2 per kompleks. Setiap kompleks dilingkupi molekul Vir E2 dengan ukuran besar yaitu sekitar 600 per 20 kb T-DNA, dan masing-masing terdiri dari 2 NLS. Dua NLS dari Vir E2 ini telah dipertimbangkan sebagai sesuatu yang penting untuk kelanjutan impor nukleus kompleks ss-TDNA, kemungkinan dengan menjaga kedua sisi pori nukleus yang terbuka secara simultan. Impor nukleus ini kemungkinan diperantarai oleh NLS spesifik *binding* protein, yang terdapat dalam sitoplasma tanaman.

Tahapan akhir dari transfer T-DNA adalah integrasi T-DNA ke dalam genome tanaman. Berdasarkan model di atas, pasangan sedikit basa yang dikenal sebagai mikro-homologi diperlukan untuk tahap pre-annealing antara pasangan strand T-DNA dengan Vir D2 dan DNA tanaman. Homologi ini sangat kecil dan mempunyai sedikit spesifitas dalam proses rekombinasi dengan memosisikan Vir D2 untuk ligasi. Pada ujung 3' atau sekuen yang berdekatan pada T-DNA terdapat beberapa homologi sedikit dengan DNA tanaman yang menghasilkan kontak awal (sinapsis) antara stran T dan DNA tanaman dan membentuk gap pada strand 3'-5' DNA tanaman. Pemandahan DNA tanaman akan memotong pada ujung 3' pada gap oleh endonuklease, dan nukleotida pertama pada 5' menempel pada pasangan Vir D2 dengan nukleotida pada ujung (5'-3')

strand DNA tanaman. Pada 3' *overhang*, T-DNA bersama dengan pemindahan DNA tanaman merupakan peristiwa digesti baik oleh endonuklease atau 3'-5' eksonuklease. Kemudian, 5' menempel pada akhiran Vir D2 dan ujung 3' lain pada stand T (berpasangan dengan DNA tanaman selama sejak tahap awal pada proses integrasi) tepat di bawah strand DNA tanaman. Inilah pengenalan strand T pada strand 3'-5' DNA tanaman terjadi sempurna, pilinan yang diikuti dengan nick pada lawan strand DNA tanaman dihasilkan. Situasi ini mengaktifkan mekanisme repair pada sel tanaman dan strand komplementer yang disintesis melalui sisipan awal strand T-DNA sebagai cetakan (Gustafo, dkk., 1998).



Gambar 1. Proses transfer T-DNA *Agrobacterium* pada sel tanaman

Respon tanaman terhadap infeksi *Agrobacterium* mengakibatkan beberapa pengaruh pada jaringan tanaman seperti nekrosis pada tanaman anggur, respon apoptosis pada jagung. Respon berupa jaringan yang nekrosis dan pemotongan DNA

nukleus menjadi fragmen oligonukleosoma oleh enzim *endogenous* nuklease merupakan karakteristik reaksi caspase-protease (Gelvin, 2003).

Secara alami *Agrobacterium tumefaciens* hanya mampu menginfeksi tanaman kelompok dikotil. Sejalan dengan keberhasilan penelitian yang telah dilakukan, transformasi *Agrobacterium* juga dapat dilakukan pada tanaman monokotil. Padi (kelompok monokotil) merupakan salah satu tanaman pertanian yang selama ini banyak dilakukan untuk mendapatkan padi varietas unggul. Beberapa gen yang telah berhasil disisipkan pada tanaman padi, dan sedang dievaluasi ekspresi dan fungsinya yaitu gen untuk ketahanan terhadap hama penggerek batang kuning, penyakit yang disebabkan oleh jamur, dan toleran terhadap kekeringan (Rahmawati, 2006). Tanaman monokotil lain yaitu tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) juga telah berhasil ditransformasi melalui *Agrobacterium*, walaupun mengalami kendala selama beberapa tahun. Tanaman tebu merupakan bahan mentah untuk produksi gula, sehingga produksinya sangat tinggi dibutuhkan khususnya di daerah tropis dan subtropis. Penggunaan metode transformasi genetik dengan mengenalkan gen-gen rekalsitran ke dalam genom tanaman mengakibatkan dampak yang besar terhadap produksi tebu dan tanaman pertanian lainnya. Transformasi *Agrobacterium* yang mengenalkan sejumlah kopi DNA luar merupakan prosedur yang penting dan dibutuhkan untuk meningkatkan produksi terhadap tanaman-tanaman yang termasuk kategori rekalsitran. Tanaman-tanaman seperti cereal, legume dan yang berkayu ini sangat sulit untuk ditransformasi. Adanya rekayasa genetik dengan *Agrobacterium* sangat membantu perkembangan dan kemajuan teknologi untuk produksi tanaman pertanian seperti padi yang merupakan bahan pangan utama di Indonesia.

## **C. PENUTUP**

### **1). Kesimpulan**

Transformasi gen dengan *Agrobacterium* merupakan metode yang efisien untuk mendapatkan tanaman transgenik. Keunggulan teknik transformasi menggunakan *Agrobacterium* antara lain adalah 1). Efisiensi transformasi dengan salinan gen tunggal lebih tinggi, 2). Dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium yang sederhana.

Metode transformasi melalui *Agrobacterium* berbeda untuk setiap jenis tanaman. Hal ini dapat dilakukan melalui optimasi metode yang digunakan dengan

mempertimbangkan dua hal yaitu pertama, optimasi interaksi *Agrobacterium* dan tanaman pada sel kompeten dari jaringan yang berbeda. Kedua, melalui pengembangan metode yang tepat untuk regenerasi sel yang berperan dalam transformasi. Adanya transformasi *Agrobacterium* akan terus membuka peluang untuk meningkatkan produksi tanaman pertanian baik dari segi ketahanannya terhadap hama penyakit, kekeringan, herbisida, maupun untuk meningkatkan kandungan antioksidan.

## 2). Saran

Metode transformasi *Agrobacterium* perlu terus dikembangkan baik pada tanaman dikotil dan monokotil, yang mempunyai nilai ekonomi tinggi dengan melakukan optimasi pada setiap jenis tanaman. Optimasi penting dilakukan agar proses transformasi pada suatu tanaman berhasil.

## DAFTAR PUSTAKA

- A.de la Riva, G., Joel, G.C., Roberto, V.P., Camilo, A.P. 1998. *Agrobacterium tumefaciens: a natural tool for plant transformation*. *Journal of Biotechnology*. Vol 1. No.3.
- Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool*. *Rev.Microbiol and Mol Biol*. Vol 67.1:16-37.
- Rahmawati, S. 2006. *Status Perkembangan Perbaikan Sifat Genetik Padi*. *Jurnal AgroBiogen*.vol 2.No1.
- Tzfira T., Jianxiong L., Benoit L., and Vitaly C. 2004. *Agrobacterium T-DNA Integration: molecules and models*. *Rev. Trends in Genetic*. Vol. 20 : No.8.
- Utomo, S. D. 2004. *Pengaruh Strain Agrobacterium Terhadap Efisiensi Transformasi Genetik Jagung Genotipe Hibrida HiII*. *Jurnal Ilmu Pertanian*. Vol 11 No. 2:1-10.
- Walden, R., and Jeff, S. 1991. *Tissue Culture and The Use of Transgenic Plants to Study Plant Development*. *In Vitro Cell. Def. Biol*. 27:1-10.