Berita Biologi
LIPI
Jurnal Ilmu-ilmu Hayati

10.14203/beritabiologi.v20i1.3991
P-ISSN 0126-1754
E-ISSN 2337-8751

TRANSFORMASI PLASMID REKOMBINAN pRI_101-AN MEMBAWA SISIPAN GEN *cry*III MELALUI *Agrobacterium tumefaciens*

[*Transformation of pRI_101-AN Recombinan Plasmid Carrying cryIII Gene Through Agrobacterium tumefaciens*]

Febriana Dwi Wahyuni[1], Muhamad Amza Sidiq[1], Seprianto[1], Henny Saraswati[2]✉, dan Octaviani Naulita Turnip[2]

[1]Prodi Bioteknologi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul, Jakarta Barat
[2]Laboratorium FIKES Terpadu, Universitas Esa Unggul, Jakarta Barat
email : hennysaraswati@esaunggul.ac.id

ABSTRACT

Sweet potato is a plant that give many benefits because of its high carbohydrate content and is an alternative food source. Behind the benefits of sweet potatoes, there is a threat of pest attack that can cause a decrease in production of up to 19.91%. Sweet potato weevil attack on the leaves, stalks, stems, and tubers. The solution to against this pest attack is by engineering using the *cry*III gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The aim of this study was to transform a recombinant plasmid carrying the insertion of the *cry*III gene into *A. tumefaciens* cells. The results showed that the recombinant plasmid pRI_101-AN carrying the insertion of the *cry*III gene was successfully transformed into *A. tumefaciens* cells by electroporation method by producing 36 recombinant clones on LB media with neomycin and kanamycin antibiotics. Results of colony PCR, DNA bands measuring 1900 bp were successfully amplified using gene-specific primers. Results of the isolation of plasmid DNA bands measuring 12000 bp were obtained from the results of electrophoresis. This size corresponds to the recombinant plasmid pRI_101-AN-*cry*III .

Key words: Sweet potatoes, Transformation, Electroporation, cryIII gene, A. Tumefaciens.

ABSTRAK

Ubi jalar merupakan tanaman yang memberikan banyak manfaat karena kandungan karbohidrat yang tinggi dan menjadi sumber pangan alternatif. Dibalik manfaat ubi jalar, terdapat ancaman serangan hama boleng yang dapat menyebabkan penurunan produksi hingga 19.91%. Hama boleng menyerang pada bagian daun, tangkai, batang, dan umbi. Solusi untuk mengatasi serangan hama boleng yaitu dengan melakukan rekayasa dengan menggunakan gen *cry*III melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan transformasi plasmid rekombinan yang membawa sisipan gen *cry*III ke dalam sel *A. tumefaciens*. Hasil penelitian menunjukkan plasmid rekombinan pRI_101-AN yang membawa sisipan gen *cry*III berhasil tertransformasi ke dalam sel *A. tumefaciens* dengan metode elektroporasi dengan menghasilkan 36 klon rekombinan pada media LB dengan antibiotik neomisin dan kanamisin. Dari hasil PCR koloni, pita DNA berukuran 1900 bp berhasil teramplifikasi dengan menggunakan primer spesifik gen. Sedangkan hasil isolasi plasmid pita DNA berukuran 12000 bp diperoleh dari hasil elektroforesis. Ukuran ini sesuai dengan plasmid rekombinan pRI_101-AN-*cry*III .

Kata kunci: Ubi Jalar, Transformasi, Elektroporasi, gen *cry*III, *A. tumefaciens*.

PENDAHULUAN

Ubi jalar (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) adalah tanaman yang memiliki nilai esensial tinggi di negara-negara berkembang (Nurdjanah dan Yuliana, 2019). Ubi jalar dibudidayakan dan dimanfaatkan sebagai sumber pangan alternatif pengganti beras karena memiliki kandungan karbohidrat. Selain dapat digunakan untuk konsumsi pangan langsung, ubi jalar dapat digunakan sebagai bahan baku dalam industri pangan seperti saus dan makanan tambahan lainnya (Indiati dan Saleh, 2010). Ubi jalar temasuk ke dalam tanaman komoditas unggulan tanaman palawija. Potensi produksi ubi jalar dapat mencapai 25–40 ton/ha dan ubi jalar termasuk umbi-umbian yang memiliki pertumbuhan yang paling produktif.

Berdasarkan data yang dirilis oleh Kementerian Pertanian pada tahun 2020, produksi ubi jalar pada tahun 2017–2018 mengalami penurunan 19.91% sedangkan *yield* yang dihasilkan menurun 15.95%. Pertumbuhan tanaman ubi jalar mengalami penurunan dengan rerata 4.14% (Chafid, 2016). Hal ini disebabkan salah satunya dengan adanya hama boleng (*Cylas formicarius*) yang menurunkan hasil produksi *yield* sampai dengan 80% (Indiati dan Saleh, 2010).

Hama boleng (*Cylas formicarius*) (Fabricus) (Coleoptera: Curculionidae) merupakan hama yang menyerang ubi jalar di seluruh dunia. Hama boleng dapat ditemukan di Amerika Utara, Amerika Tengah, Eropa, Afrika, dan Asia (Bayu dan Prayogo, 2016). Dampak yang ditimbulkan dari hama ini tergantung dari usia serangganya, pada serangga dewasa hama boleng menyebabkan

*Kontributor Utama
*Diterima: 20 November 2021 - Diperbaiki: 21 Maret 2022- Disetujui:

kerusakan yang tidak begitu signifikan, hanya sebagian kecil yang rusak seperti pada permukaan daun, tangkai daun, dan batang terdapat bercak berbentuk oval berukuran kecil. Sedangkan kerusakan yang dominan disebabkan oleh larva boleng yang menyebabkan ubi menimbulkan bercak hitam dengan permukaan yang busuk dan menghasilkan rasa yang pahit. Apabila dikonsumsi oleh manusia, umbi tersebut dapat bersifat toksin yang memengaruhi kerja hati dan paru-paru manusia (Nasahi, 2010).

Saat ini, metode yang digunakan untuk membasmi hama boleng dengan menyemprotkan insektisida berbahan kimia. Penggunaan insektisida berbahan kimia belum menunjukan hasil yang signifikan untuk mengendalikan serangan hama boleng pada ubi jalar. Dampak negatif yang ditimbulkan akibat penggunaan insektisida kimia secara berkepanjangan dapat menjadi toksin yang berdampak langsung pada manusia dan juga lingkungan dan dapat meningkatkan risiko resistensi terhadap serangan hama (Bayu dan Prayogo, 2016). Selain itu, insektisida kimia menyebabkan pengurangan unsur-unsur mikro seperti seng, besi, tembaga, mangan, molibdenium, klor dan boron yang bisa mempengaruhi tanaman, hewan dan kesehatan manusia (Supriatna *et al.,* 2021).

Berdasarkan hal tersebut maka perlu adanya metode alternatif yang dapat dilakukan untuk membasmi hama boleng. Salah satu metode yang dapat digunakan yaitu dengan menggunakan teknik rekayasa genetika dengan menyisipkan gen *cry*III pada tanaman ubi jalar. Gen *cry*III merupakan gen yang mengekspresikan protein kristal (protein Cry) yang bersifat toksik pada serangga golongan Coleoptera yang menyerang ubi jalar (Peng *et al.,* 2015).

Di Indonesia, penelitian ubi jalar untuk meningkatkan ketahanan akan serangan hama boleng telah dilakukan oleh (Ambarwati *et al*., 2002) dengan menggunakan gen *pin*III yang diisolasi dari kentang dan ditransformasi menggunakan *electro gun*. Penelitian dengan menggunakan gen *cry* untuk membuat tanaman transgenik sudah banyak dilakukan di Indonesia, tetapi yang spesifik menggunakan gen *cry*III untuk meningkatkan ketahanan akan hama boleng belum banyak dilakukan. Gen *cry*III digunakan dalam memodifikasi tanaman ubi jalar yang tahan akan serangan hama boleng karena memiliki spesifisitas yang tinggi. Hal ini diakibatkan dari Domain II dari struktur protein Cry yang berperan penting dalam spesifisitas target (Pigott *et al.,* 2020). Hal ini diperkuat dengan hasil analisis dengan menggunan *in silico* yang menyatakan bahwa protein Cry memiliki toksisitas yang spesifik pada salah satu jenis serangga. Hal ini diakibatkan adanya insersi atau delesi pada proses evolusi yang mengakibatkan terjadinya diversitas dari struktur dan fungsi protein Cry (Das *et al.,* 2021). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan transformasi plasmid rekombinan pRI_101-AN membawa sisipan gen *cry*III ke dalam sel *A. tumefaciens* strain LBA4404 dengan metode elektroporasi dan juga mengetahui dan menganalisis proses transformasi plasmid rekombinan dengan metode elektroporasi. Hasil transformasi dianalisis dengan PCR koloni.

BAHAN DAN CARA KERJA

Alat dan Bahan

Penelitian ini dilaksanankan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul. Peralatan yang digunakan yaitu; *Laminar Air Flow* (*CHC Lab Co. LTD*), bunsen, mikropipet (*Thermoscientific*), gelas ukur, botol *duran schott*, labu erlenmeyer, sentrifus (*Eppendorf Centrifuge 5430 R)*, inkubator (*Santn*), neraca analitik (*Kern ALJI*), waterbath (*BT-150)*, mini-spin down (*Tomy Kogyo Co., LTD)*, vortex (*DragonLab MX-S)*, spektrofotometer UV-Vis (*infinite 200 PRO Nanoquant*), elektroforesis horizontal (*Mupid*-exu), UV Geldoc (*UVITEC FireReader*). Autoklaf, elektroporator. Bahan yang digunakan; : *yeast extract*, *triptone*, NaCl, *peptone*, aquades, agar, TAE Buffer 1x, gliserol 50%, $CaCl_2$ 75 mM, cawan petri *disposable*, jarum ose *disposable*, plastik tahan panas, alumunium foil, microtips, microtube 1.5 mL, microtube 0.2 mL, 1Kb DNA Ladder, DNA Loading Dye, *Florosafe* DNA *stain*, Agarose, Primer Cry3 Forward (GTCTCCAAACAACCAAGAACGAATAC) dan Pimer Cry3 Reverse (GGGAGGCTTTTTTGTAGGTAATGC), MyTaq™ HS Red Mix (*Bioline*), Nuclease Free Water (NFW), metanol, antibiotik kanamisin, antibiotik neomisin, antibiotik rifampisin, antibiotik gentamisin, kit Presto™ Mini Plasmid Kit (*Geneaid*), Enzim *Nde*I, *Eco*RI, Buffer Tango.

Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu media Luria Bertani (LB) dengan komposisi 0.75 gr *yeast extract*, 1,5 gr triptone, 0,75 gr NaCl dan dilarutkan ke dalam aquades 150 mL. Pembuatan media agar dilakukan dengan menimbang komposisi yang sama dan ditambahkan Agar sebanyak 1,55 gr. Larutan media kemudian diautoclave pada suhu 121°C, 1 atm, selama 20 menit.

Kultivasi Bakteri *Agrobacterium tumefaciens*

Kultivasi bakteri dilakukan dengan menggunakan media LB cair steril sebanyak 25 mL dan isolat *A. tumefaciens* yang berasal dari stok

gliserol sebanyak 50 µL ke dalam erlenmeyer 250 mL. Proses transfer media dilakukan di dalam *laminar air flow* dengan kondisi aseptik. Kemudian bakteri diinkubasi pada waterbath shaker pada suhu 30 ^{0}C dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama semalam.

Pembuatan Sel Kompeten

Metode pembuatan sel kompeten diadaptasi dari protokol (Chung *et al.,* 1989) dengan adanya modifikasi. Bakteri yang telah dikultivasi semalaman diremajakan dengan mengambil 5 mL kultur dan dicampur dalam 100 mL media LB cair steril dan diinkubasi pada suhu 30 ^{0}C dengan kecepatan agitasi 150 rpm selama 2–3 jam sampai kultur mencapai OD_{600} 0,3–0,4 dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Setelah mencapai OD yang diinginkan maka kultur dapat dibuat sel kompeten dengan menambahkan *Transformation Storage Solution* (TSS). Kemudian sel dipanen dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 detik. Supernatan dibuang dan pelet diresuspensi dengan menambahkan 1 mL TSS dan di inkubasi pada es selama 30 menit. Selanjutnya kultur disentrifugasi kembali dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 detik. Supernatan dibuang dan pelet kembali diresuspensi dengan larutan TSS sebanyak 1 mL. Sel *A. tumefaciens* kompeten dapat langsung digunakan dan dapat disimpan pada *freezer* -80 ^{0}C.

Transformasi Plasmid Rekombinan ke Dalam *A. tumefaciens* dengan Metode Elektroporasi

Proses transformasi plasmid rekombinan dilakukan dengan memodifikasi protokol (Chung *et al.,* 1989). Tahapan transfer sel kompeten bakteri *Agrobaterium tumefaciens* dan plasmid rekombinan PRI_101-AN *cry*III dilakukan dalam *Laminar Air Flow* dengan volume 50 µL sel kompeten dan 2 µL plasmid yang mengandung gen *cry*III yang dicampur dalam microtube 1,5 mL. Sel kompeten dan plasmid dihomogenkan dengan meresuspensi secara perlahan. Selanjutnya kultur dilakukan elektroporasi dengan voltase (V) 240, kapasitansi (uF) 25, dan Resistor 200. Kultur kemudian diresuspensi dengan menambahkan 500 µL media LB di dalam *laminar air flow* dan kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 30°C. Setelah diinkubasi, kultur kemudian disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan dibuang 300 µL dan sisanya diresuspensi dengan peletnya. 50 µL kultur ditanam pada media LB agar yang mengandung antibiotik kanamisin dan neomisin kemudian diinkubasi pada suhu 30 ^{0}C di dalam inkubator. Untuk memastikan keberhasilan proses transformasi, maka dibuat kontrol viabilitas berupa kontrol positif dan negatif. Kontrol positif berupa sel kompeten ditumbuhkan dalam medium dengan antibiotik rifampisin 50 ppm dan streptomisin 30 ppm, sedangkan kontrol negatif berupa sel kompeten yang ditumbuhkan dalam medium dengan antibiotik kanamisin 50 ppm dan neomisin 10 ppm (gen ketahanan yang ada di plasmid). Selanjutnya klon transforman yang tumbuh dapat dihitung efisiensi transformasinya dengan menggunakan rumus:

$$\text{Efisiensi Transformasi} : \frac{\text{Jumlah koloni} \times \text{pengenceran} \times \frac{\text{Volume total kultur}}{\text{Volume kultur yang disebar}}}{\text{Konsentrasi plasmid}}$$

Isolasi Plasmid

Isolasi Plasmid dilakukan dengan menggunakan *Presto™ Mini Plasmid Kit* (*Geneaid*) dengan kultur cair klon transforman mengikuti standar protokol yang telah tersedia.

Colony PCR

Hasil transforman yang tumbuh pada media dengan antibiotik diambil *single colony* dengan menggunakan jarum ose steril dan kemudian ditumbuhkan dalam media LB dengan antibiotik dan diinkubasi *overnight.* Kultur cair tersebut dijadikan *template DNA* untuk proses PCR. Tahapan awal proses PCR yaitu dengan membuat *Master Mix* dengan komposisi primer Cry3 Forward 1 µL, primer Cry3 Reverse 1 µL, MyTaq™ HS Red Mix 12,5 µL, dan NFW 4,5 µL sehingga total *master mix* yang digunakan dalam 1 reaksi berjumlah 19 µL. *master mix* dihomogenkan dengan menggunakan vortex sebelum di*aliquote* ke dalam *microtube PCR.* Dalam *microtube PCR* ditambahkan DNA *template* sebanyak 1 µL. Komponen yang sudah dicampurkan kemudian dihomogenkan kembali sebelum dimasukkan ke dalam mesin *thermal cycler* (*SensoQuest)* dan dilakukan pengaturan suhu pre-denaturasi 95 ^{0}C selama 3 menit, denaturasi 95 ^{0}C selama 1 menit, annealing 57.1 ^{0}C selama 3 menit, elongasi 72 ^{0}C selama 1 menit dan pendinginan 4 ^{0}C. Dalam reaksi ini diberikan kontrol positif yaitu gen sintetik *cry*III dan kontrol negatifnya merupakan *master mix* saja. Proses amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 30 siklus. Hasil amplifikasi DNA dapat langsung dielektroforesis dan divisualisasi dengan menggunakan *gel documentation* atau di simpan dalam *freezer* -20 ^{0}C.

Analisis Restriksi

Fragmen DNA yang digunakan adalah klon transforman yang ditumbuhkan dalam media antibiotik. Komponen yang digunakan untuk analisis restriksi yaitu DNA 10 µL, *Nde*I 1 µL, *Eco*RI 1 µL, Buffer Tango 4 µL, dan NFW 4 µL

sehingga total untuk satu kali reaksi didapatkan 20 µL. Seluruh komponen dihomogenisasi kemudian diinkubasi pada suhu 37 ^{0}C selama overnight. Hasil restriksi dilanjutkan dalam proses elektroforesis dan visualisasi gel.

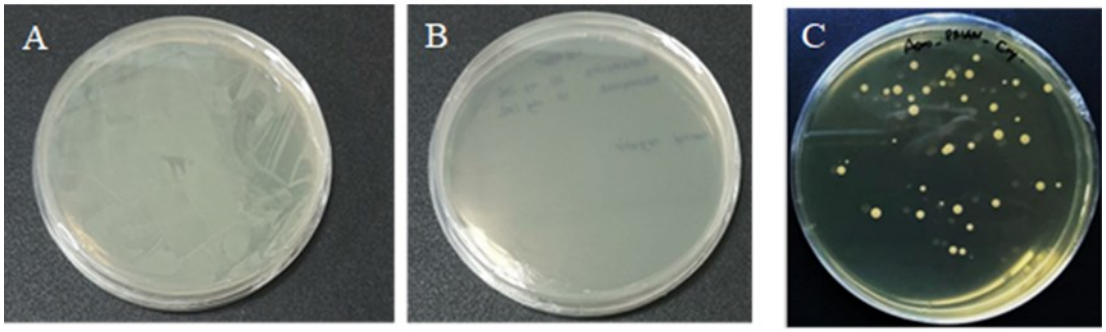
Elektroforesis dan Visualisasi Gel

Elektroforesis dengan mengadaptasi dari protokol (Bernadus dan Kolondam, 2019) dengan adanya modifikasi pada tahap terentu. Tahapan pertama yaitu dengan membuat agarose 1% dengan menimbang agar sebanyak 0,5 gr dan kemudian dilarutkan dengan 50 mL TAE 1x dan dipanaskan menggunakan microwave hingga larut sempurna. Larutan agar didiamkan hingga hangat dan kemudian ditambahkan 20 µL *Florosafe DNA stain* ke dalam agar sambil dihomogenkan dan dituang pada cetakan agar yang sudah disiapkan. Ketika agar sudah memadat sempurna, sisir dilepaskan dari cetakan dan agar diletakan dalam *chamber* elektroforesis horizontal dan TAE 1x digunakan sebagai *buffer*. Marker menggunakan 1 µL *loading dye* dan 3 µL 1 Kb DNA *Ladder*. DNA hasil analisis molekuler diambil 10 µL dan diresuspensi dengan 2 µL *Loading dye*. Proses elektroforesis dilakukan dengan waktu 30 menit sebesar 100 V dan hasil elektroforesis dapat langsung dilakukan pencitraan pada alat Gel Documentation UV Transilluminator (UVITEC FireReader).

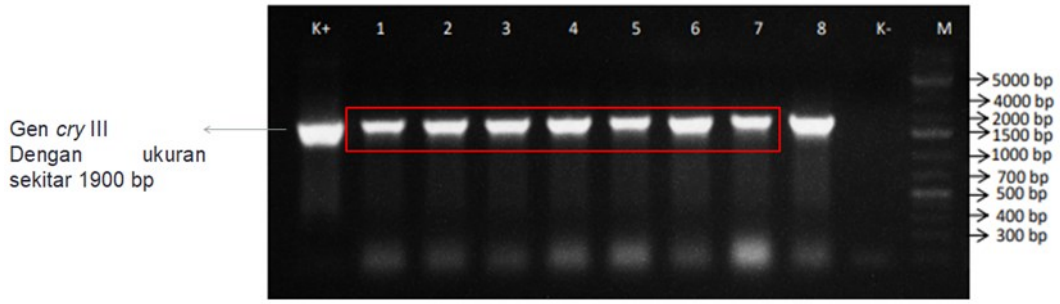
HASIL

Transformasi Plasmid Rekombinan ke Dalam *A. tumefacins*

Proses transformasi plasmid ke dalam sel bakteri dapat dilakukan dengan dua metode yaitu *heat shock* dan elektroforasi. Dalam penelitian ini metode transformasi yang digunakan adalah elektroforasi. *A. tumefaciens* yang berhasil tertransformasi dengan plasmid rekombinan akan menghasilkan *single colony* di dalam media agar yang mengandung antibiotik rifampisin 50 ppm, streptomisin 30 ppm dan antibiotik yang ada diplasmid berupa kanamisin 50 ppm dan neomisin 10 ppm. Hasil transformasi menunjukkan sebanyak 36 klon transforman dapat tumbuh pada media LB dan memiliki nilai efisiensi sebesar 6 x 10^3. Proses transformasi ini berhasil dilakukan karena pada kontrol positif sel *A. tumefaciens* dapat tumbuh dan pada kontrol negatif antibiotik kanamisin dan neomisin bekerja untuk menghambat proses pertumbuhan bakteri (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil Transformasi Plasmid Rekombinan. A Kontrol Positif, B Kontrol Negatif, C Klon Transforman



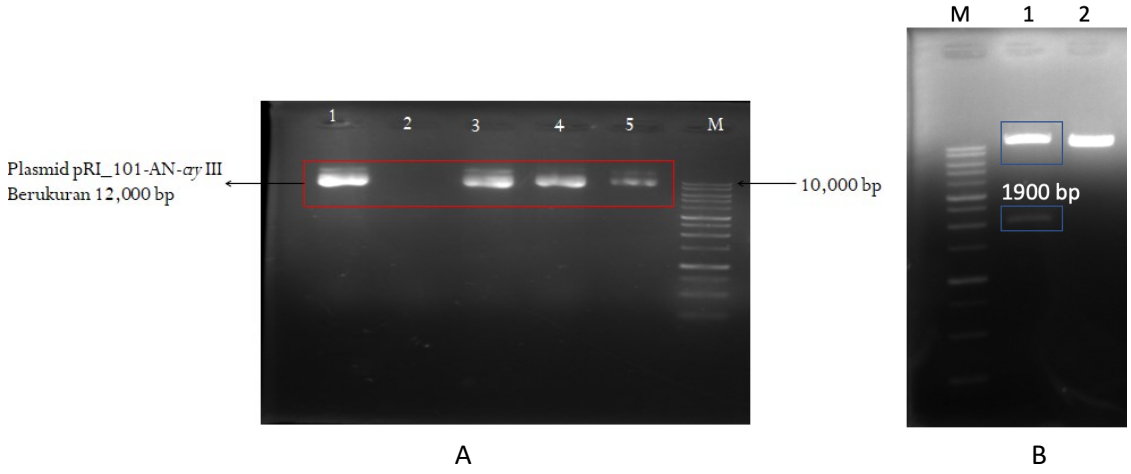
Gambar 2. Hasil Elektroforesis PCR Koloni. K+: Kontrol Positif, 1-8: Klon Transforman, K-: Kontrol Negatif, M: Marker DNA ladder (Thermo Fisher Scientific)

Hasil *colony* PCR

Dari beberapa koloni yang tumbuh pada media LB agar dengan antibiotik, klon transforman dipilih secara acak. Gambar 2 menunjukkan bahwa gen *cry*III dapat diamplifikasi dengan menggunakan primer *cry*III yang spesifik dan menghasilkan pita DNA berukuran 1900 bp. Koloni 1–8 membawa plasmid pRI_101-AN dengan sisipan gen *cry*III karena membentuk pita DNA dari proses amplifikasi primer dengan amplikon berukuran 1900 bp. Hal ini juga diperkuat dengan hasil amplifikasi dari kontrol positif yang digunakan yaitu plasmid pRI_101-AN rekombinan yang membawa sisipan gen *cry*III menunjukkan ukuran pita DNA yang sama yaitu 1900 bp. Sedangkan kontrol negatif tidak menunjukkan adanya pita DNA karena klon tidak membawa plasmid rekombinan. Berdasarkan hasil penelitian ini sel *A. tumefaciens* transforman yang tumbuh sebanyak 36 klon dari total volume kultur yang digunakan sebanyak 100 mL dan volume kultur yang ditanam dalam media LB agar dengan antibiotik kanamisin dan neomisin sebanyak 100 uL. Penghitungan nilai efisiensi transformasi menghasilkan nilai 6 x 10^3. Dari hasil tersebut, menandakan bahwa proses transformasi yang dilakukan berhasil tanpa adanya kontaminasi.

Hasil Isolasi Plasmid dan restriksi

Plasmid yang telah diisolasi dengan menggunakan Presto™ mini plasmid kit (*Geneaid*) lalu dielektroforesis dengan voltase 100 V selama 30 menit dengan agarose 1% dilanjutkan dengan visualisasi gel dengan menggunakan *Gel documentation* (Uvitec FireReader V10). Hasil visualisasi (Gambar 3A) menunjukkan bahwa sel *A.tumefaciens* berhasil memuat plasmid rekombinan pRI_101-AN_*cry*III memiliki ukuran sekitar 12,000 bp. Pada koloni 1, 3, 4, dan 5 terdapat pita DNA yang menunjukkan bahwa klon tersebut memiliki sisipan plasmid pRI_101-An-*cry*III dan pada klon 2 tidak terlihat pita DNA yang menunjukkan bahwa plasmid tidak tertransformasi ke dalam sel *A. tumefaciens*. Pada hasil isolasi plasmid klon 1 kemudian dilakukan pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi *Nde*I dan *Eco*RI. Hasil dari gambar 3B menunjukkan bahwa pada klon 1 adalah klon transforman karena dari hasil restriksi menunjukkan adanya 2 pita dengan ukuran sekitar 1900 bp yang merupakan gen *cry*III dan ukuran sekitar 10000 bp yang merupakan plasmid pRI_101-AN.



Gambar 3. (A) Hasil Elektroforesis Isolasi Plasmid. M: Marker 1Kb DNA Ladder (Geneaid), 1–5: Sampel Isolasi Plasmid; (B) Hasil restriksi. M: Marker 1kb, 1: plasmid rekombinan yang dipotong dengan *NdeI* dan *Eco*RI; 2: Plasmid rekombinan yang tidak dipotong (*uncut*).

PEMBAHASAN

Tahapan awal dalam proses transformasi dengan menggunakan metode elektroporasi adalah dengan mempersiapkan sel agar kompeten. Sel kompeten adalah kemampuan sel untuk memasukan DNA asing (Kroemer, n.d.). Pembuatan sel kompeten merupakan langkah yang krusial dalam proses transformasi (Bernadus dan Kolondam, 2019). Dalam penelitian ini, digunakan *Transformation Storage Solution* (TSS) sebagai tambahan untuk pembuatan sel kompeten. Komposisi TSS terdiri dari PEG, $MgCl_2$, dan $MgSO_2$ (Tsvetkova *et al.,* 2018). Penambahan unsur garam dapat membuat lebih efisien dalam transformasi. Dengan adanya kation bivalen Mg^{2+} yang dapat meningkatkan fusi membran sehingga akan mempercepat interaksi DNA dengan permukaan *A. tumefaciens*. Pemberian PEG akan menginduksi transformasi genetik tanpa merusak dinding sel (Klebe *et al.,* 1983). Setelah didapatkan sel kompeten, plasmid rekombinan dicampur dalam *tube* yang sama lalu dihomogenkan dan kemudian diinkubasi pada es. Hal ini bertujuan untuk plasmid dapat menempel pada membran sel dan untuk menjaga stabilitas dari permeabilitas membran sel sebelum dilakukannya transformasi (Kroemer, n.d.; Rotinsulu *et al.,* 2019).

Sel yang akan dibuat kompeten dilihat pertumbuhannya dengan mengukur *optical density* (OD) atau berdasarkan kekeruhan dari pertumbuhan bakteri. Tanda adanya pertumbuhan bakteri dapat terlihat dari kekeruhan yang semakin meningkat dan menandakan meningkatnya jumlah sel bakteri (Rotinsulu *et al.,* 2019). Pertumbuhan sel bakteri dengan melihat OD menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Panjang gelombang 600 nm digunakan untuk pengukuran pertumbuhan. Panjang gelombang ini menyerap warna kuning-oranye sehingga memudahkan untuk pengukuran OD (Caufield, 2015). Dalam penelitian ini OD_{600} sebesar 0,4 yang dicapai setelah inkubasi *overnight* pada suhu 30 ^{0}C. Pemilihan OD_{600} sebesar 0,4 sebagai sel kompeten karena termasuk dalam fase eksponensial atau disebut juga periode *steady state* (Bernadus dan Kolondam, 2019; Chung *et al.,* 1989).

Dalam proses transformasi, terdapat berbagai macam metode transformasi DNA, diantaranya transformasi kimia, transformasi fisika, elektroporasi, metode kombinasi, dan *ultrasound* (Ren *et al.,* 2019). Dalam penelitian ini menggunakan metode transformasi elektroporasi karena mempermudah proses transformasi dan juga menurunkan risiko terjadinya kontaminasi silang (Gold Biotechnology, 2018). Penghitungan nilai efisiensi transformasi menghasilkan nilai 6 x 10^3. Transformasi yang dilakukan dapat dikatakan memiliki efisiensi yang rendah dimana nilai efisiensi yang dikategorikan optimal berkisar antara 10^6–10^{10} (Thermo Fisher Scientific, n.d.). Nilai efisiensi transformasi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya : fase pertumbuhan bakteri, ukuran bakteri, materi genetik, dan media perantara, Kekuatan kapasitansi, kekuatan voltase, dan temperatur. (Kotnik *et al.,* 2015; Pratheesh dan Vineetha, 2015).

Keberhasilan transformasi dianalisis dengan pengujian resistensi antibiotik yang spesifik dari *selectable marker* dari plasmid. Uji resistensi antibiotik adalah salah satu metode untuk mengetahui sensitivitas bakteri pada antibiotik tertentu (Mardiah, 2017). Ketika plasmid rekombinan pRI_101-AN-*cry*III berhasil terintroduksikan ke dalam sel inang, maka bakteri akan mengalami transformasi dan memiliki resistensi terhadap antibiotik kanamisin dan neomisin. Hal ini terjadi karena plasmid membawa gen NPT III yang apabila terekspresi maka akan mensintesis antibiotik kanamisin dan neomisin, sedangkan *A. tumefaciens* yang digunakan tidak memiliki resistensi terhadap antibiotik kanamisin dan neomisin. Gambar 1 merupakan hasil transformasi yang menunjukkan bahwa setelah plasmid terinsersi ke dalam sel inang maka terbentuk ketahanan pada antibiotik kanamisin dan neomisin. Antibiotik kanamisin dan neomisin ini menghambat pertumbuhan bakteri dengan mengganggu proses sintesis protein yang diakibatkan dari ribosom berikatan dengan subunit 30S ribosom dan menganggu proses translasi (Drugbank, 2021a, 2021b).

PCR koloni merupakan metode deteksi cepat untuk mendeteksi koloni bakteri yang telah tumbuh pada media seleksi guna memverifikasi materi genetik yang dibawa dengan cara mengamplifikasi gen sisipan (Bergkessel dan Guthrie, 2013). Keuntungan menggunakan PCR koloni yaitu teknik yang murah dan cepat, memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi. Tahapan awal proses PCR koloni adalah pembuatan *master* mix sebelum digabungkan dengan *template*. Pembuatan *master mix* idealnya dilakukan pada ruangan terpisah dari ruang sampel untuk menghindari adanya kontaminasi. Selain itu, untuk menghindari kontaminasi terdapat beberapa hal yang dapat diperhatikan diantaranya: mensanitasi area kerja dengan alkohol 70% dan *sodium hypoclorite* 10–15%, menggunakan *tips* yang berbeda-beda untuk mentransfer reagen, menutup *microtube* saat tidak digunakan (Hu, 2016).

Dalam penelitian ini, plasmid rekombinan berhasil tertransformasi ke dalam sel *A. tumefaciens*. Sekuen DNA berhasil teramplifikasi dengan primer *Cry*III yang spesifik. Pemilihan primer menentukan hasil dari produk PCR. Untuk memaksimalkan amplifikasi gen, dilakukan desain

primer terlebih dahulu dengan parameter sebagai berikut: panjang primer tidak lebih dari 18–22 bp, *Temperature melting* (Tm) 52–58 ^{o}C, GC Content berkisar 40–60%, GC clamp minimal 3 dan maksimal 5, Produk PCR idealnya berikisar 100–500 bp, dan perbedaan Tm dari setiap primer tidak lebih dari 5 ^{o}C. Primer dengan panjang basa lebih dari 22 pasang basa akan menyebabkan penempelan primer menjadi tidak spesifik. Karakteristik kedua yang perlu diperhatikan adalah selisih Tm sekitar 5 ^{o}C. Hal ini ditujukan agar tidak terjadi penurunan pada proses amplifikasi. Selain itu, prosentase basa G dan C juga harus diperhatikan karena jumlah basa G dan C dapat mempengaruhi Tm (Saraswati, 2019).

Klon transforman yang tumbuh dipilih secara acak untuk diambil *single colony* dan ditumbuhkan ke dalam media LB cair dengan volume 25 mL dan ditambah antibiotik kanamisin 50 ppm dan neomisin 10 ppm. Kultur cair diambil 20 mL untuk proses isolasi dan sisanya dibuat stok gliserol dan sebagai *template* PCR koloni. Prinsip kerja dari isolasi plasmid yaitu untuk memisahkan materi genetik dan DNA plasmid dari kromosom. Proses isolasi plasmid sesuai dengan protokol *Presto™ Mini Plasmid Kit* (*Geneaid*) dengan adanya modifikasi pada proses *elution* dimana pada proses elusi, *elution* buffer dihangatkan yang bertujuan untuk meningkatkan hasil produk isolasi (OpenWetWare contributors, 2012). Produk isolasi selanjutnya dilakukan elektroforesis untuk melihat pita DNA dari produk hasil isolasi. Hasil isolasi (Gambar 3) menunjukkan bahwa pada klon 2 tidak terbentuk pita DNA, dan pada klon 1, 3, 4, dan 5 terbentuk pita dengan besar 12,000 bp. Terbentuknya klon namun tidak memiliki gen sisipan biasa disebut dengan hasil positif palsu. Faktor-faktor yang menyebabkan hasil positif palsu yaitu: gen target belum terligasi secara sempurna, konsentrasi antibiotik yang tidak sesuai, terlalu banyak sel dalam media agar, waktu inkubasi yang menginisiasi munculnya koloni satelit (Dodda, 2020). Koloni satelit adalah koloni yang tumbuh karena hasil ekskresi dari mikroba lain dan menggunakannya sebagai faktor tumbuh esensial atau yang disebut dengan *cross feeding* (Fatichah, 2011).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa plasmid rekombinan pRI_101-AN yang membawa sisipan gen *cry*III berhasil tertransformasi ke dalam *A. tumefaciens* dengan metode elektroporasi dengan menghasilkan 36 klon rekombinan pada media antibiotik kanamisin dan neomisin. Ukuran plasmid rekombinan pRI_101-AN-*cry*III memiliki ukuran sekitar 12000 bp. Dan hasil amplifikasi sekuens gen *cry*III menghasilkan amplikon berukuran sekitar 1900 bp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemenristekdikti yang telah memberikan dana untuk penelitian ini melalui Hibah Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi dengan perjanjian/kontrak nomor 234/E4.1/ AK.04.PT/2021.

DAFTAR PUSTAKA

Ambarwati, A. D., Sisharmini, A., Santoso, T. J. dan Herman, M., 2002. Transformasi ubi jalar dengan Gen pin II dan Gen CP-SPFMV. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan Dan Bioteknologi Tanaman*, 111–117.

Bayu, M.S.Y.I. dan Prayogo, Y., 2016. Pengendalian hama penggerek ubi jalar cylas formicarius (Fabricus) (Coleoptera: Curculionidae) menggunakan cendawan entomopatogen beauveria bassiana (Balsamo) vuillemen. *Indonesian Journal of Entomology*, *13*(1). https://doi.org/10.5994/jei.13.1.40

Bergkessel, M. dan Guthrie, C., 2013. Colony PCR. *Methods in Enzymology*, *529*, 299–309. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2

Bernadus, Z.G. dan Kolondam, B., 2019. Transformasi plasmid yang mengandung Gen Merb pada bakteri *Escherichia coli* Top-10. *Pharmacon*, *8*(2), 290–297. https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.23478

Caufield, J.H., 2015. *Why is bacterial density measured at OD 600?*

Chafid, M., 2016. Outlook komoditas pertanian tanaman pangan jagung. *Pusat Data Dan Sistem Informasi Pertanian Kementerian Pertanian 2016*, *ISSN : 1907 – 1507*, 102. Leli Nuryati at all

Chung, C.T., Niemela, S.L. and Miller, R.H., 1989. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(7), 2172–2175. https://doi.org/10.1073/pnas.86.7.2172

Das, S.K., Pradhan, S.K., Samal, K.C. and Singh, N.R., 2021. Structural, functional, and evolutionary analysis of Cry toxins of Bacillus thuringiensis: an in silico study. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *31*(1). https://doi.org/10.1186/s41938-021-00394-6

Dodda, S., 2020. *Why there are often false positive bacterial colonies on antibiotic plates after DNA transformation?*

Drugbank, 2021a. *Kanamycin*. https://go.drugbank.com/drugs/DB01172

Drugbank, 2021b. *Neomycin*. https://go.drugbank.com/drugs/DB00994

Fatichah, N.F.Y., 2011. *Potensi Bakteri Endofit Sebagai Penghasil Enzim Kitinase, Protease dan Selulase Secara In Vitro*.

Gold Biotechnology., 2018. Electrotransformation of agrobacterium. In *GOLDBIO*. https://doi.org/10.1385/0-89603-310-4:171

Hu, Y., 2016. Regulatory concern of Polymerase Chain Reaction (PCR) carryover contamination. In *Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications*. InTech. https://doi.org/10.5772/66294

Indiati, S.W. dan Saleh, N., 2010. *HAMA BOLENG PADA TANAMAN UBIJALAR DAN PENGENDALIANNYA*. *37*(19), 27–37.

Kementerian Pertanian, 2020. *LAPORAN TAHUNAN DIREKTORAT JENDERAL TANAMAN PANGAN*.

Klebe, R.J., Harriss, J.V., Sharp, Z.D. and Douglas, M.G., 1983. A general method for polyethylene -glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene*, *25*(2–3), 333–341. https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90238-X

Kotnik, T., Frey, W., Sack, M., Haberl Meglič, S., Peterka, M. and Miklavčič, D., 2015. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, *33*(8), 480–488. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.002

Kroemer, T. (n.d.). *Understanding competent cells for bacterial transformation*. https://www.goldbio.com/articles/article/understanding-competent-cells-for-bacterial-transformation

Mardiah, M., 2017. Uji resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik, amoxillin, tetracyclin dan propolis. *Jurnal Ilmu Alam Dan Lingkungan*, *8*(2), 1–6. https://doi.org/10.20956/jal.v8i16.2978

Nasahi, C., 2010. *Pemupukan Pertanian Onorganik*.

Nurdjanah, S. dan Yuliana, N., 2019. *UBI JALAR TEKNOLOGI PRODUKSI DAN KARAKTERISASI TEPUNG UBI JALAR UNGU TERMODIFIKASI*. Aura.

OpenWetWare contributors., 2012. *Miniprep/ Qiagen kit*. OpenWetWare. https://openwetware.org/mediawiki/index.php?title=Miniprep/Qiagen_kit&oldid=596336

Peng, D.H., Pang, C.Y., Wu, H., Huang, Q., Zheng, J.S. and Sun, M., 2015. The expression and crystallization of Cry65Aa require two C-termini, revealing a novel evolutionary strategy of Bacillus thuringiensis Cry proteins. *Scientific Reports*. https://doi.org/10.1038/srep08291

Pigott, C.R., King, M.S. and Ellar, D.J., 2020. Investigating the properties of *Bacillus thuringiensis* cry proteins with novel loop replacements created using combinatorial molecular biology. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(11), 3497–3511. https://doi.org/10.1128/AEM.02844-07

Pratheesh, P.T. and Vineetha, M., 2015. Genetic engineering of microalgae for production of therapeutic proteins. In *Handbook of Marine Microalgae* (pp. 415–427). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00027-3

Ren, J., Karna, S., Lee, H., Yoo, S.M. and Na, D., 2019. Artificial transformation methodologies for improving the efficiency of plasmid DNA transformation and simplifying its use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(23–24), 9205–9215. https://doi.org/10.1007/s00253-019-10173-x

Rotinsulu, S., Fatimawali, F. dan Tallei, T.E. 2019. Transformasi plasmid yang mengandung gen merB pada bakteri *Escherichia coli* TOP-10. *Pharmacon*, *8*(2), 290. https://doi.org/10.35799/pha.8.2019.29294

Supriatna, S., Siahaan, S. dan Restiaty, I., 2021. Pencemaran tanah oleh pestisida di perkebunan sayur Kelurahan Eka Jaya Kecamatan Jambi Selatan Kota Jambi (Studi keberadaan jamur makroza dan cacing tanah). *Jurnal Ilmiah Universitas Batanghari Jambi*, *21*(1), 460. https://doi.org/10.33087/jiubj.v21i1.1348

Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *Competent cell selection-6 general considerations*. https://www.thermofisher.com/id/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/transformation/competent-cell-considerations.html

Tsvetkova, I., Peykov, S., Kirov, B. and Galabov, V., 2018. *Optimized procedure for competent cell preparation compatible with standard biobrick assembly protocols*. *8*, 82–87.