



# LOG-BOOK



Title of activity : I-COLIN (In Silico Design of Insulin) Production from Transgenic Aloe vera with Agrobacterium tumefaciens as a Vector

Member(s) 1 : Aisyah Rifa Fadhillah

Member(s) 2 : Muhamad Nabil Alhanif

Institution : SMA Kharisma Bangsa

## Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia – LIPI Indonesian Institute of Sciences

Date and time	13 september 2020
---------------	-------------------

### Aloe Vera

#### 1. Fisiologi Aloe vera

##### 1.1 Metabolisme

Dari segi fisiologi, Aloe vera termasuk dalam kelompok CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Tanaman CAM hanya membuka stomata pada malam hari untuk menyerap CO<sub>2</sub> dan air, berbeda dengan tumbuhan yang membuka stomatanya di siang dan malam hari. Hal ini memberikan keuntungan bagi tumbuhan CAM, karena ia dapat menutup rapat stomatanya pada siang hari dan mengurangi penguapan air. Oleh karena itu, tumbuhan CAM dapat hidup di daerah yang kering. Contoh tumbuhan CAM selain Aloe vera adalah kaktus dan nanas.

##### 1.2 Transformasi dan Rekayasa genetik

Semenjak akhir abad 20, Aloe vera mulai mendapat perhatian untuk rekayasa genetika. Hal ini disebabkan oleh berbagai macam keuntungan yang ditawarkan Aloe vera. Komponen Aloe vera dilaporkan memiliki sifat antijamur, antiseptik, antivirus, antibakteri, anti-inflamasi, antioksidan, dan penyembuhan luka[7].

##### Manfaat Aloe vera

Produk kesehatan  
Kandungan nutrisi yang banyak  
Produk kosmetik

Budidaya Aloe vera

Aloe vera sudah mulai dibudidayakan di Indonesia semenjak 1980, terutama di daerah Siantan Hulu, Pontianak. Jenis lidah buaya yang dibudidayakan adalah Aloe chinensis Baker atau lebih dikenal dengan sebutan Lidah Buaya Pontianak.

##### 2.5.5 Kesimpulan

Aloe vera dapat bertahan hidup dalam kekeringan, hal ini disebabkan oleh metabolisme CAM nya yang membantu mengurangi penguapan air. Oleh karena itu, Aloe vera tidak membutuhkan perawatan sebanyak tanaman lain yang



membutuhkan banyak air. Walaupun tentunya untuk mendapatkan hasil panen yang memuaskan, lebih disarankan untuk menanam Aloe vera di kondisi lingkungan ideal seperti yang tertera di bagian 2.5.4. Selain itu, Aloe vera juga memiliki berbagai macam manfaat dan khasiat, serta tidak menimbulkan kerusakan lingkungan. Kultivasi Aloe vera juga berkesempatan membuka lapangan kerja baru bagi warga Indonesia (Bank Indonesia - PPUK budidaya lidah buaya).

Di sisi lain, kesulitan transformasi Aloe vera merupakan salah satu penghambat utama. Walau begitu, beberapa uji lapangan dengan menggunakan antioksidan dan beberapa bahan lainnya menunjukkan hasil yang signifikan dalam kultivasi Aloe vera transgenik.

## 2. *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* merupakan anggota dari kingdom monera, dan berasal dari keluarga rhizobiaceae. Rhizobiaceae merupakan keluarga yang dihuni oleh berbagai macam bakteri pemfiksasi nitrogen yang bersimbiosis mutualisme dengan kacang-kacangan. Berbeda dengan anggota keluarga rhizobiaceae lainnya (wikipedia). *A. tumefaciens* merupakan jenis bakteri phytopathogen yang dapat menyebabkan crown gall disease. Crown gall disease disebabkan TI-plasmid bakteri yang membawa T-DNA menuju tanaman melalui bacterial type IV secretion system (T4SS).

Dalam beberapa dekade terakhir, ilmuwan berhasil mengidentifikasi gen pada tanaman dan bakteri yang berperan dalam pembentukan tumor. Dengan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai interaksi *A. tumefaciens* dengan sel inang, ilmuwan berhasil merubah *A. tumefaciens* menjadi perantara transformasi tanaman[8].

### 2.1 Komponen dan Mekanisme *A. tumefaciens*

*A. tumefaciens* memiliki berbagai macam komponen yang memungkinkannya memindahkan sebagian DNA nya ke dalam sel tumbuhan.

TI-Plasmid

TI-Plasmid (Tumor Inducing Plasmid) terdiri

T-DNA

Konjugasi TI Plasmid

vir Genes



## 2.6 *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* merupakan anggota dari kingdom monera, dan berasal dari keluarga rhizobiaceae. Rhizobiaceae merupakan keluarga yang dihuni oleh berbagai macam bakteri pemfiksasi nitrogen yang bersimbiosis mutualisme dengan kacang-kacangan. Berbeda dengan anggota keluarga rhizobiaceae lainnya (wikipedia). *A. tumefaciens* merupakan jenis bakteri fitopatogen yang dapat menyebabkan *crown gall disease*. *Crown gall disease* disebabkan TI-plasmid bakteri yang membawa T-DNA menuju tanaman melalui bacterial type IV secretion system (T4SS).

Dalam beberapa dekade terakhir, berbagai macam gen pada tanaman dan bakteri yang berperan dalam pembentukan tumor berhasil diidentifikasi. Penemuan ini, digabung dengan pemahaman yang lebih komprehensif mengenai interaksi *A. tumefaciens* memungkinkan manusia untuk memanfaatkan *A. tumefaciens* sebagai perantara transformasi tanaman<sup>[8]</sup>.

### 2.6.2 Komponen dan Mekanisme *A. tumefaciens*

*A. tumefaciens* memiliki berbagai macam komponen dan mekanisme yang memungkinkannya mentransfer sebagian DNA nya ke dalam sel tumbuhan.

#### TI-Plasmid

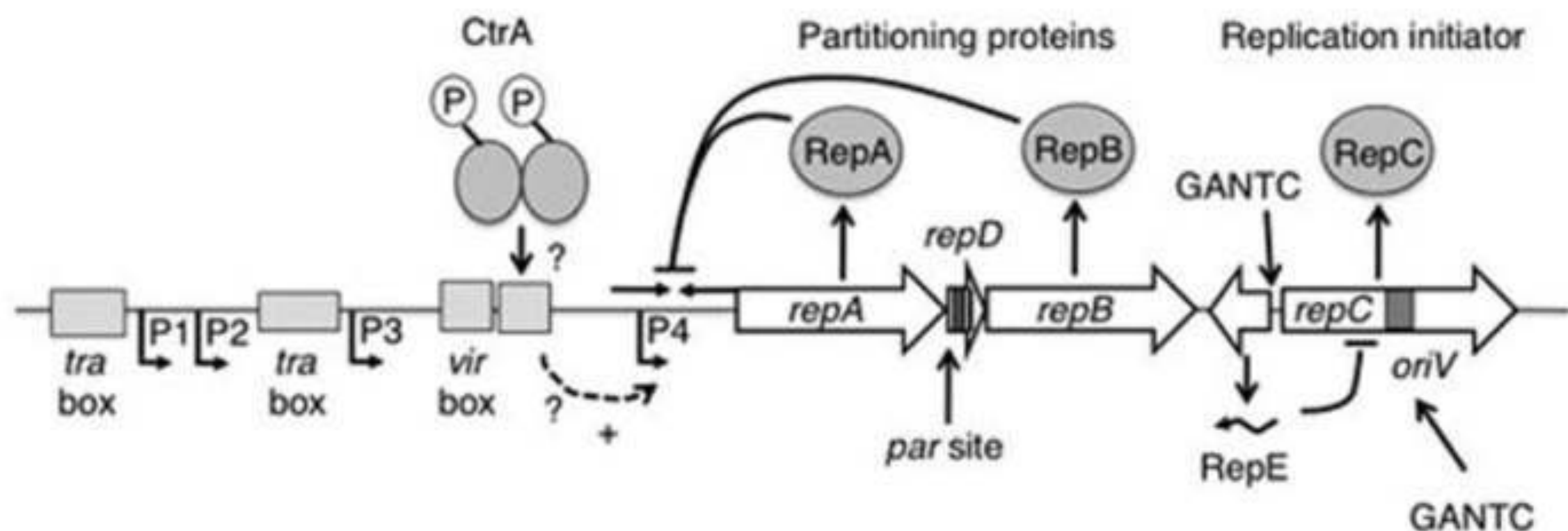
Plasmid merupakan molekul kecil DNA ekstrakromosomal yang terpisah dari DNA kromosomal dan dapat bereplikasi sendiri. Plasmid biasanya berupa molekul DNA sirkuler rantai ganda yang ditemukan pada bakteri dan membawa gen yang menguntungkan bagi sang bakteri. Tumor Inducing (TI) Plasmid merupakan jenis plasmid yang ditemukan di spesies *Agrobacterium* dan dapat menyebabkan pembentukan tumor di tanaman yang diinfeksi<sup>[64]</sup>.

Ti plasmid berasal dari keluarga replikon yang bernama *repABC* yang dimiliki oleh berbagai spesies Alphaproteobacteria<sup>[74]</sup>. Keluarga replicon ini terdiri dari plasmid ekstrakromosomal dan beberapa kromosom sekunder. *repABC cassette* merupakan bagian esensial dalam replikasi dan partisi *octopine-type* Ti plasmid<sup>[75]</sup>. *Cassette* ini terdiri dari tiga gen (*repA*, *repB*, *repC*), situs partisi *cis* (*parS*), dan *Origin of Replication* (*oriV*).

*repA* dan *repB* mengkode sistem partisi, sedangkan *repC* mengkode protein inisiasi replikasi<sup>[74, 77]</sup>. *repA* dan *repB* memiliki banyak kesamaan dengan *parA/parB* yang dimiliki oleh berbagai macam plasmid, phages, dan kromosom



*parA/parB* yang dimiliki oleh berbagai macam plasmid, phages, dan kromosom spesies bakteri yang beragam<sup>[76]</sup>. Protein protein ini bekerja dengan *parS* dalam rangka memastikan proses partisi plasmid berjalan lancar. Protein RepC berikatan dengan *oriV* dan gen *repC* mendukung replikasi replikon secara otonom<sup>[78,79]</sup>. Penemuan secara in vivo mengindikasikan RepC berfungsi sebagai protein inisiator dan *oriV* berada di dalam gen *repC*<sup>[76]</sup>.



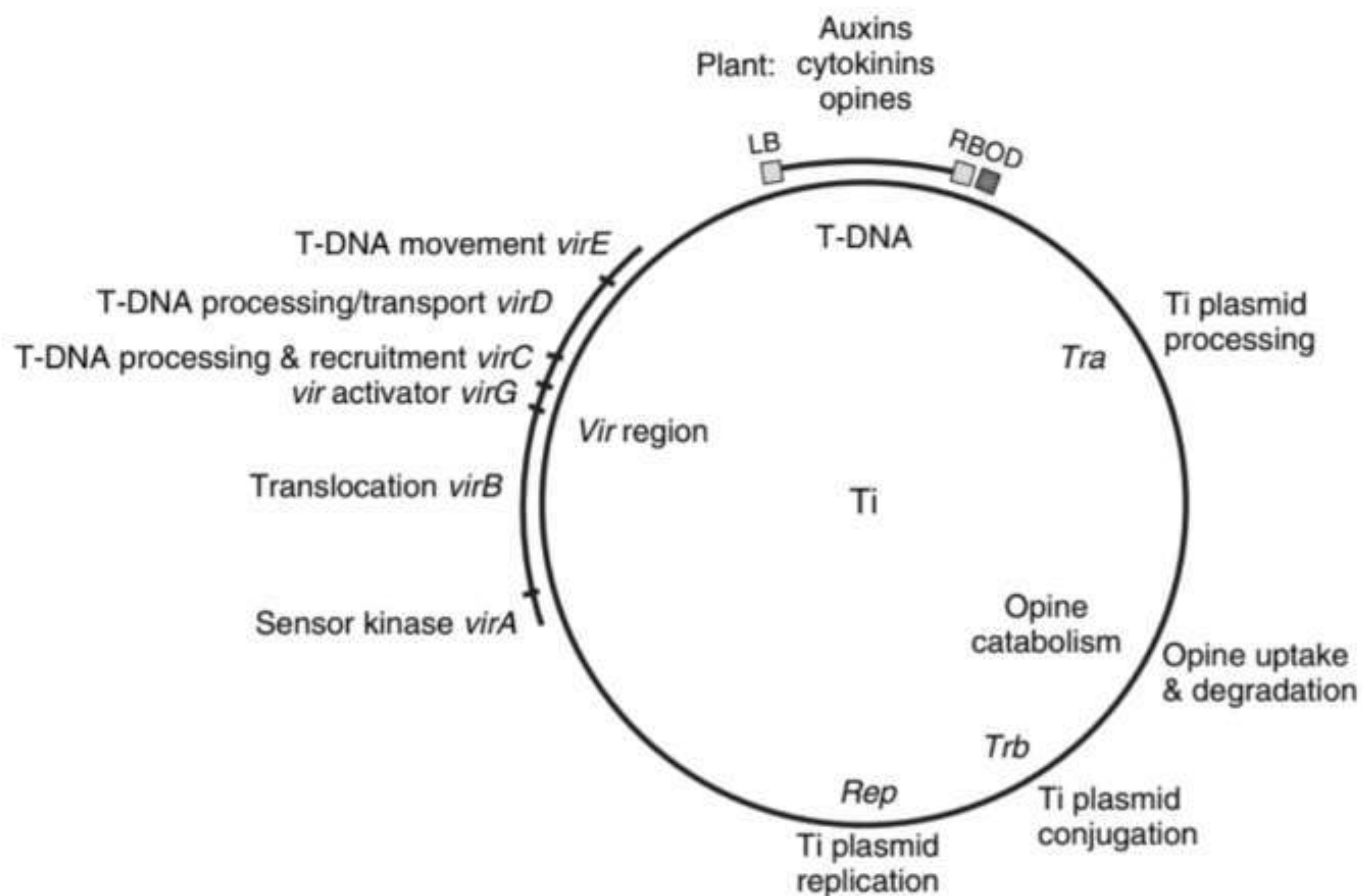
(Gambar 2.6.1. Regulasi operon *repABC* dari *octopine-type* Ti plasmid. Transkripsi operon *repABC* diinhibisi oleh *autorepression* yang dimediasi kompleks RepA-RepB di daerah operator di hilir P4 dan di situs partisi (*parS*) yang terletak di antara *repA* dan *repB*. Ekspresi *repC* diinhibisi secara transkripsional dan post-transkripsional oleh RNA RepE. Ti plasmid dipertahankan sebagai salinan singular dalam ketiadaan sinyal eksternal. Regulasi tambahan replikasi Ti plasmid dalam siklus sel disediakan CtrA terfosforilasi dan metilasi CcrM pada motif GANTC dalam *repA* dan hulu *repE*. Persepsi sensoris dari dua sinyal eksogenus berujung pada ditingkatkannya transkripsi *repABC cassette* dan peningkatan jumlah salinan plasmid. Komponen fenolik yang dihasilkan tanaman dideteksi oleh sistem dua-komponen VirA-VirG; Fosfo-VirG berikatan dengan *vir* untuk mengaktivasi transkripsi dari promoter P4. Kompleks lakton TraR-3-okso-oktanoil homoserin berikatan dengan *tra*, dan mengaktivasi operon *repABC* melalui promoter P1, P2, P3, dan P4<sup>[74]</sup>.)

Ukuran Ti plasmid berkisar antara 180 sampai 800 kilobase. Terdapat dua bagian dari Ti plasmid yang berperan dalam infeksi, kedua bagian tersebut adalah T-DNA dan vir region. T DNA bertugas untuk membawa gen yang diekspresikan di dalam sel tumbuhan, dan vir region bertanggung jawab membawa gen yang bertugas mengenali sinyal tanaman<sup>[64]</sup>.

Terdapat dua daerah Ti plasmid lainnya yang tidak begitu esensial dalam proses transfer T DNA namun tetap memiliki andil dalam proses infeksi secara keseluruhan. Bagian yang pertama berperan dalam katabolisme asam amino yang disebut opine. Sedangkan bagian yang kedua berperan dalam proses



transfer T DNA serta sifat virulensi sesama *A. tumefaciens* melalui proses yang disebut sebagai konjugasi<sup>[64]</sup>.



(Gambar 2.6.2 Skema Ti plasmid yang berpengaruh pada infeksi (*vir* region, dan T DNA), keselamatan bakteri di dalam tumor (Opine catabolism), dan konjugasi Ti plasmid ke sesama *Agrobacterium* (*tra*, dan *trb*). T DNA, dibatasi oleh *border sequence* 25-bp (kotak biru; LB, Left Border, RB, Right Border), dan OD, *overdrive* sequence (kotak merah) yang menstimulasi proses transfer<sup>[64]</sup>.)

## Type IV Secretion System

Type IV secretion system (T4SS) merupakan kompleks protein besar yang melintasi selubung sel dan digunakan untuk transpor makromolekul seperti protein dan DNA melintasi selubung sel. T4SS memediasi transpor monomer protein kecil hingga protein multi-subunit dan kompleks nukleoprotein, oleh karena itu T4SS merupakan sistem sekresi yang paling serbaguna diantara sistem sekresi lainnya. T4SS dimiliki oleh berbagai spesies bakteri gram negatif dan gram positif, serta beberapa jenis archaea<sup>[80]</sup>.

Terdapat tiga tipe fungsional T4SS. Tipe yang pertama digunakan untuk transfer DNA antar sel melalui teknik yang disebut konjugasi.

## T-DNA

Transfer DNA (T DNA) merupakan DNA yang membawa gen yang akan diekspresikan di sel target. T DNA terdiri dari sekitar 24.000 pasang basa dan kedua ujungnya dibatasi oleh perulangan 25 pasang basa yang disebut border sequence<sup>[65,66]</sup>. Di sebelah batas kanan T DNA, ditandai kotak merah pada gambar 2.6.2, terdapat sequence yang disebut *overdrive*, dan berfungsi untuk menstimulasi proses transfer T DNA. Transfer dimulai dari batas kanan dan



berakhir di batas kiri serta membutuhkan gen *vir* dari Ti plasmid.

Berdasarkan fungsi, gen yang dibawa oleh T DNA dibagi menjadi dua grup, onkogen, dan gen biosintesis opine. Onkogen merupakan gen yang bertanggung jawab atas pembentukan tumor. Sedangkan gen biosintesis opine mengkode sintesis opine di dalam sel tumbuhan. Onkogen dapat diganti dengan *gene of interest*, karena onkogen tidak terlibat dalam proses transfer, melainkan hanya mengkode protein yang akan diekspresikan di dalam sel tumbuhan<sup>[64]</sup>.

Setelah masuk ke dalam sel target, onkogen bertugas untuk mensintesis dua hormon yang mengatur pertumbuhan tanaman. Kedua gen ini adalah auksin dan sitokinin. Sintesis kedua hormon ini menstimulasi pembelahan sel dan hilangnya kontrol pertumbuhan sel<sup>[67]</sup>, yang akan berujung pada terbentuknya crown gall tumors.

### **Katabolisme Opine**

Opine merupakan produk dari reaksi antara asam amino dengan asam keto atau gula<sup>[69]</sup>. Opine pertama kali diisolasi dari sel otot gurita pada 1927, dan dinamai octopine<sup>[68]</sup>. Opine berfungsi sebagai sumber nitrogen, karbon, dan energi utama bagi *Agrobacterium*.

Bukti pertama keberadaan opine didalam tumor didapatkan pada 1950 melalui investigasi metabolisme arginin di tumor yang diinduksi *A. tumefaciens*. Terdapat tiga observasi utama yang menjadi kunci penting dalam memahami peran *opine* dan pembentukan tumor. Ketiga observasi itu adalah<sup>[70]</sup>:

1. *Agrobacterium* dapat memetabolisme opine;
2. *Agrobacterium* hanya memetabolisme opine yang disintesis didalam tumor dan diinduksi oleh strain tertentu.
3. Jenis opine yang disintesis dipengaruhi oleh jenis strain bakteri, bukan jenis tanaman yang diinfeksi.

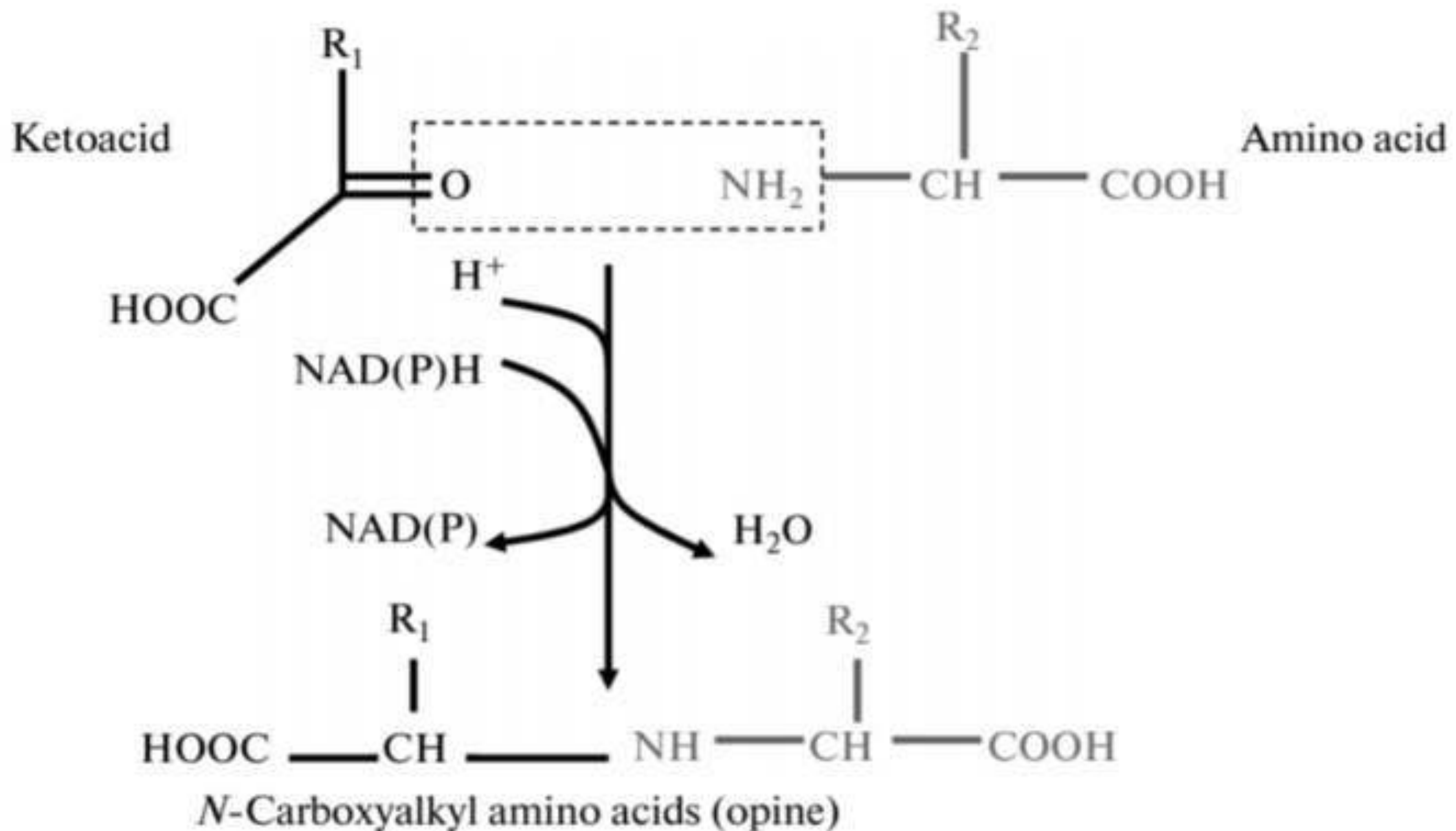
Observasi kedua dan ketiga, serta kemampuan tumor untuk terus bertumbuh setelah dimusnahkannya *Agrobacterium* oleh antibiotik, menjadi dasar dari asumsi transfer gen horizontal antara *Agrobacterium* dan tumbuhan<sup>[71]</sup>. Asumsi ini dibuktikan pada tahun 1979<sup>[72]</sup>.

Selain itu, pada 1979, seluruh fakta fakta yang telah diketahui mengenai transformasi yang dimediasi *Agrobacterium* digabungkan dalam satu konsep yang disebut konsep opine. Konsep ini mengemukakan bahwa sintesis opine



sebagai nutrisi *Agrobacterium* memiliki efek signifikan pada transpor dan transformasi DNA serta pembentukan tumor<sup>[73]</sup>.

Terdapat beberapa fungsi penting terkait katabolisme opine yang dikode oleh Ti plasmid. Fungsi yang pertama adalah regulasi ekspresi gen transpor dan katabolisme opine. Beberapa gen lain yang ditranskripsi dari promoter tunggal mengkode fungsi spesifik untuk transpor dan katabolisme opine. Di ujung proksimal operon terdapat gen transpor yang memediasi pengikatan dan penyerapan spesifik-opine<sup>[64]</sup>.



(Gambar 2.6.3 Biosintesis opine<sup>[69]</sup>)

### Konjugasi TI-Plasmid

Konjugasi adalah transfer materi genetik antara dua sel yang mengandalkan kontak langsung antara kedua sel tersebut<sup>[81]</sup>. Konjugasi biasanya dilakukan melalui pili sebagai jembatan antar sel, walaupun ada beberapa pengecualian<sup>[82]</sup>. Konjugasi merupakan satu dari tiga teknik transfer gen horizontal, dan merupakan satu satunya yang bergantung pada kontak antar sel<sup>[83]</sup>.

Fungsi transfer Ti plasmid (tra dan trb) mengatur transfer konjugatif Ti plasmid menuju bakteri penerima. Secara sequence dan fungsi, sistem transfer Ti plasmid berhubungan erat dengan sistem transfer plasmid dan translokasi protein lainnya. Sistem sistem ini diklasifikasikan sebagai type IV secretion system (T4SS)<sup>[64]</sup>.

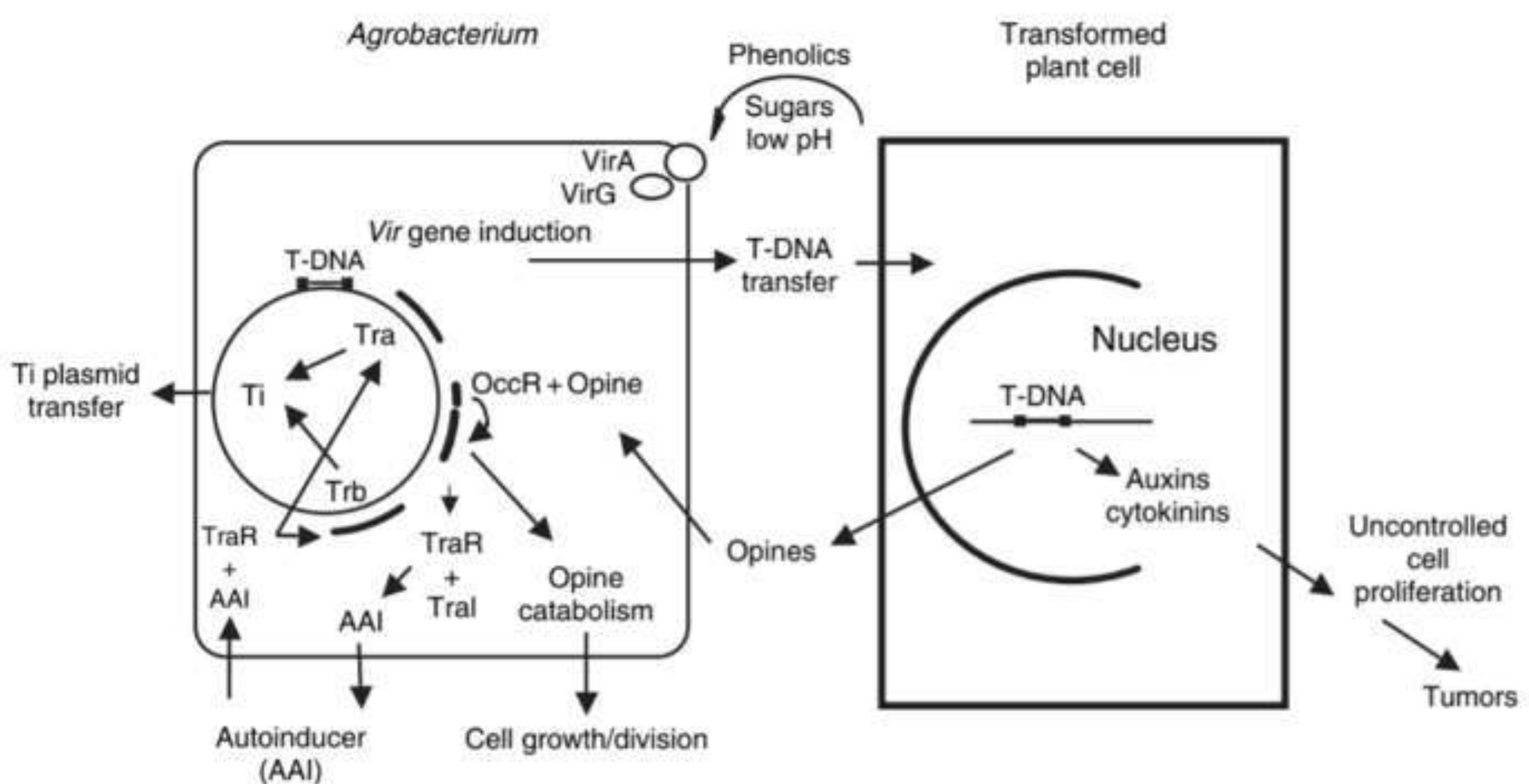
Sebuah sistem regulasi kimiawi (gambar 2.6.4) mengaktivasi transfer Ti



Sebuah sistem regulasi kimiawi (gambar 2.6.4) mengaktivasi transfer Ti plasmid dalam lingkungan dengan kepadatan sel yang tinggi. Pada plasmid pTiA6, OccR bereaksi dengan opine untuk mengaktivasi transkripsi operon *acc* yang transpor dan katabolisme opine serta gen aktivator transkripsional bernama TraR. TraR berkaitan dengan LuxR, sebuah aktivator yang meregulasi sintesis sejenis *acyl homoserine lactone* (AML) yang disebut *autoinducer*<sup>[64]</sup>.

*Autoinducer* yang diproduksi disekresikan ke lingkungan. Sehingga, lingkungan dengan kepadatan sel rendah akan mengandung sedikit *autoinducer*. Sedangkan lingkungan dengan kepadatan sel tinggi mengandung banyak *autoinducer* yang akan berdifusi kembali ke dalam sel. Pada *Agrobacterium*, *autoinducer* yang dimiliki adalah N-3-(oxo-octanoyl)-L-homoserine lactone yang disebut *Agrobacterium autoinducer* (AAI)<sup>[64]</sup>.

AAI akan bersinergi dengan TraR untuk mengaktivasi transkripsi gen *tra* dan *Tral* yang memediasi sintesis AAI. Oleh sebab itu, sintesis TraR dalam lingkungan dengan kepadatan sel tinggi memberikan *positive-feedback loop* dimana kompleks TraR-AAI menginduksi transkripsi *Tral* yang meningkatkan sintesis AAI. Sistem regulasi ini memiliki efek meningkatkan transfer Ti plasmid di dalam tumor tanaman, dan dipercaya bahwa sistem regulasi ini berkembang untuk memaksimalkan jumlah bakteri pembawa Ti plasmid di dalam tumor tanaman<sup>[64]</sup>.



(Gambar 2.6.4 Skema pensinyalan kimiawi antara *Agrobacterium* dan tanaman target<sup>[64]</sup>)

## vir Genes