

# Transfer Gen SOD dengan Teknik Triparental Mating melalui Vektor pRK2013 pada Transformasi Genetik *Agrobacterium tumefaciens*

Nabillatul Ismi Abrar<sup>1</sup>, Imam Safir Alwan Nurza<sup>2\*</sup>, Alif Rahman Hakim<sup>1</sup>, Daniel Jonathan Siregar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universitas Negeri Jakarta, Indonesia

<sup>2</sup>Institut Pertanian Bogor, Indonesia

## ABSTRACT

SOD gene is gene that plays role in producing enzyme superoxide dismutase (SOD). SOD enzyme plays an important role as marker of tolerance abiotic stress, including drought, salinity, heavy metals, and acid. SOD gene can be transferred to *Agrobacterium tumefaciens* as transformation medium for various plants. Many techniques for gene transfer can be used, one of which is triparental mating. Triparental mating uses vector in form of donor strain and helper strain for transformation *A. tumefaciens* bacteria as recipient strain. Donor strain is known to be *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  bacteria which carries target gene and helper strain is pRK2013 vector in *E. coli* DH1. The pRK2013 vector has not been studied and unknown as helper strain for SOD gene transfer to *A. tumefaciens* bacteria. Therefore, this research aimed to insert SOD gene into *A. tumefaciens* bacteria via pRK2013 vector as helper strain in triparental mating and confirm its success. The research method used was triparental mating method with bacteria *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* DH1, and *A. tumefaciens* LBA4404. *E. coli* DH5 $\alpha$  bacteria contain pGWB5-SOD expression vector as donor strain. *E. coli* DH1 bacteria contain pRK2013 vector as helper strain. *A. tumefaciens* LBA4404 bacteria as recipient strain. Results of triparental mating were observed from growing bacterial culture and colony PCR. The results showed that triparental mating was confirmed successful with bands appearing from PCR colonies and bacterial cultures growing in selection medium. This indicates that transfer of SOD gene to *A. tumefaciens* bacteria was successful with help of pRK2013 vector.

## ABSTRAK

Gen SOD adalah gen yang berperan menghasilkan enzim superoksida dismutase (SOD). Enzim SOD berperan penting sebagai penanda toleran cekaman abiotik baik cekaman kekeringan, salinitas, logam berat, maupun asam. Gen SOD dapat ditransfer ke *Agrobacterium tumefaciens* sebagai media transformasi ke berbagai tanaman. Transfer gen ada banyak teknik yang dapat digunakan salah satunya adalah triparental mating. Triparental mating menggunakan vektor berupa strain donor dan strain pembantu untuk transformasi bakteri *A. tumefaciens* sebagai strain penerima. Strain pendonor diketahui dari bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  yang membawa gen target dan strain pembantu berupa vektor pRK2013 dalam *E. coli* DH1. Vektor pRK2013 belum diteliti dan diketahui sebagai strain pembantu untuk transfer gen SOD pada bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Oleh karena itu, tujuan penelitian ini dilakukan untuk memasukkan gen SOD ke dalam bakteri *Agrobacterium tumefaciens* melalui vektor pRK2013 sebagai strain pembantu dalam triparental mating dan konfirmasi keberhasilannya. Metode penelitian yang digunakan adalah metode triparental mating dengan bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Escherichia coli* DH1, dan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  mengandung vektor ekspresi pGWB5-SOD sebagai strain donor. Bakteri *Escherichia coli* DH1 mengandung vektor pRK2013 sebagai strain pembantu. Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 sebagai strain penerima. Hasil triparental mating diamati dari kultur bakteri yang tumbuh dan PCR koloni. Hasil penelitian menunjukkan triparental mating terkonfirmasi berhasil dengan pita muncul dari PCR koloni dan kultur bakteri tumbuh dalam media seleksi. Ini mengindikasikan bahwa transfer gen SOD ke bakteri *A. tumefaciens* berhasil melalui bantuan vektor pRK2013.

## PENDAHULUAN

*Triparental mating* merupakan teknik rekayasa genetika yang digunakan dalam biologi molekuler untuk memasukkan plasmid ke dalam sel bakteri dengan bantuan tiga strain bakteri yang berbeda (Vesel *et al.*, 2023).

## KONTAK

nabillatulismiabrar@gmail.com

## KATA KUNCI

*Agrobacterium tumefaciens*, SOD,  
Triparental Mating, Vektor  
pRK2013

*Triparental mating* diketahui memiliki tiga strain bakteri yang terlibat, yaitu strain pendonor, strain pembantu, dan strain penerima. Strain donor sebagai pembawa plasmid berisi gen yang diinginkan ke dalam sel bakteri target. Strain pembantu sebagai pembantu mobilisasi plasmid untuk mentransfer plasmid donor ke sel bakteri penerima. Strain penerima sebagai penerima dari berbagai plasmid donor yang tertransfer dari strain pembantu (Piotrowska *et al.*, 2020).

Low *et al.* (2022) menjelaskan bahwa proses *triparental mating* melibatkan terjadinya agregasi antar strain bakteri yang dicampur secara bersamaan. Dalam agregasi dapat terjadi konjugasi yang merupakan transfer genetik dari strain donor ke strain penerima melalui kontak antar sel. Tujuan *triparental mating* adalah untuk mentransfer gen tertentu dari strain donor ke strain penerima (Heinze *et al.*, 2018).

*Triparental mating* diketahui memiliki prinsip sebagai pentransfer genetik dari strain donor ke strain penerima. Prinsip ini melibatkan plasmid sebagai vektor karena membawa gen target yang ingin ditransfer ke sel penerima, pemindahan plasmid ke strain penerima melalui strain pembantu, proses konjugasi sebagai kunci dalam *triparental mating*, integrasi DNA asing sebagai materi genetik yang ditransfer ke strain penerima, dan penanda seleksi dengan resistensi antibiotik untuk memastikan bahwa plasmid berhasil masuk ke dalam sel (Heinze *et al.*, 2018; Timmery *et al.*, 2009). Salah satu bakteri yang berperan sebagai strain penerima adalah bakteri *Agrobacterium tumefaciens*.

Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* merupakan bakteri yang terkenal memiliki kemampuan mentransfer DNA (khususnya T-DNA) ke dalam genom tanaman. Transformasi genetik alami ini dieksplorasi dalam bioteknologi untuk menghasilkan tanaman transgenik (Gelvin, 2023). Bakteri ini sebagai media transformasi diketahui memiliki Ti-plasmid yang berukuran besar. Ti-plasmid di dalamnya terdapat TDNA sebagai pentransfer gen ke sel tumbuhan. T-DNA ini mengandung gen sintesis auksin dan sitokinin yang dapat menyebabkan sel membelah tidak terkendali. Sehingga, terbentuk tumor. Bakteri ini juga memiliki gen virulensi (*vir*) yang ada pada Ti-plasmid. Gen virulensi dapat memungkinkan T-DNA dapat masuk ke dalam sel tumbuhan (To, 2020; Gordon dan Christie, 2014; Hwang *et al.*, 2013). Pembentukan struktur virulensi (T-Pilus) dari gen *VirB/VirD4* yang berperan sebagai penyalur untuk transfer T-DNA (Li dan Christie 2018). Integrasi untai DNA ke dalam genom tanaman dari gen *VirD2* yang terikat secara kovalen pada ujung 5' T-DNA (Gelvin, 2017).

Penelitian *Agrobacterium tumefaciens* sebagai media transfer genetik telah dilakukan oleh Raman dan Mysore (2023) dan Shantha *et al.* (2012) dengan teknik *triparental mating* melalui vektor yang berbeda. Raman dan Mysore (2023) menggunakan vektor *pRK2013* sebagai strain pembantu pada transfer gen LN18 dari *Escherichia coli pLN18* ke *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Shantha *et al.* (2012) menggunakan vektor *pGTV* sebagai donor berisi gen WGA yang ditransfer ke *Agrobacterium tumefaciens* melalui vektor *pRK2013* sebagai strain pembantu. Namun, vektor *pRK2013* belum diteliti dan diketahui sebagai strain pembantu untuk transfer gen SOD pada bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Sehingga, penelitian ini bertujuan untuk memasukkan gen SOD ke dalam bakteri *Agrobacterium tumefaciens* melalui vektor *pRK2013* dengan teknik *triparental mating* dan konfirmasi keberhasilannya.

## METODOLOGI

Penelitian ini menggunakan metode *triparental mating* dengan bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , *Escherichia coli* DH1, dan *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  mengandung vektor ekspresi *pGWB5-SOD* sebagai strain donor. Bakteri *Escherichia coli* DH1 mengandung vektor *pRK2013* sebagai strain pembantu. Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 sebagai strain penerima.

Penelitian ini dilakukan dengan menyiapkan kultur bakteri *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 menggunakan media LB (Luria Bertani *Broth*) sebanyak 2 ml. Media LB dimasukkan 4  $\mu$ l streptomisin 50 mg/L. Kemudian, kultur bakteri *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 dibuat stok dengan penambahan 50  $\mu$ l gliserol. Bakteri diinkubasi dalam kondisi gelap dengan suhu ruang 25°C selama 48 jam. Kultur bakteri *Escherichia coli* DH1 (*pRK2013*) dan DH5 $\alpha$  (*pGWB5-SOD*) dilakukan dalam media LB sebanyak 2 ml. Media LB untuk bakteri *Escherichia coli* DH1 (*pRK2013*) ditambahkan 2  $\mu$ l kanamisin 50 mg/L. Kemudian, media LB untuk *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*pGWB5-SOD*) ditambahkan 2  $\mu$ l kanamisin 50 mg/L dan 2  $\mu$ l higromisin 50 mg/L. Kultur bakteri *Escherichia coli* DH1 (*pRK2013*) dan DH5 $\alpha$  (*pGWB5-SOD*) dibuat stok masing-masing dengan penambahan 100  $\mu$ l gliserol. Kedua bakteri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Metode *triparental mating* dilakukan pada media LA (Luria Bertani Agar) yang telah diberi label disiapkan untuk masing-masing bakteri. Kultur bakteri *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, *Escherichia coli* DH1 (*pRK2013*), dan *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*pGWB5-SOD*) masing-masing diambil sebanyak 20  $\mu$ l. Kemudian, ketiga bakteri ditetaskan untuk dicampurkan pada bagian tengah media LA. Resuspensi secara perlahan dan dibiarkan hingga cairan mengering. Inkubasi pada kondisi gelap dengan suhu ruang selama 48 jam.

Seleksi *triparental mating* dilakukan dengan tabung 1,5 ml berisi ddH<sub>2</sub>O sebanyak 500 µl. Hasil *triparental mating* diambil dengan tusuk gigi dan dicelupkan pada ddH<sub>2</sub>O. Cairan diambil sebanyak 100 µl dan diletakkan pada media LA seleksi berisi streptomisin, kanamisin, dan higromisin sebanyak 10 ulangan teknis. Cairan disebar pada media dengan *spatula spreader* hingga merata. Kemudian, media diinkubasi pada ruang gelap dengan suhu ruang 25°C selama 48 jam.

Setelah hasil *triparental mating* tumbuh 48 jam, PCR koloni dilakukan untuk mengkonfirmasi keberhasilan gen SOD masuk ke dalam bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. Koloni diambil dengan tusuk gigi dan digores pada media seleksi *replicate* berisi streptomisin, kanamisin, dan higro. Tusuk gigi dimasukkan pada *tube* berisi 7 µl ddH<sub>2</sub>O. Kemudian, dipanaskan pada suhu 95°C selama 10 menit dan dimasukkan ke dalam es selama 5 menit. Setelah itu, *mix* PCR dimasukkan sebanyak 5,5 µl (*master mix* 5 µl, *primer* 35SF<sub>1</sub> 0,25 µl, dan *primer* SODR<sub>2</sub> 0,25 µl). PCR dilakukan dengan spesifik pasang *primer* 35F<sub>1</sub> (5'-AAA CCT CCT CGG ATT CCA TT-3') dan SODR<sub>2</sub> (5 'CAT CTC CAA CGG TGA CAT TG3') (Hannum, 2012). PCR dijalani 35 siklus dengan pra denaturasi suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit, *annealing* suhu 55°C selama 45 detik, pemanjangan suhu 72°C selama 1 menit, pasca-pemanjangan suhu 72°C selama 5 menit, dan pendinginan suhu 25°C selama 10 menit. Hasil PCR koloni dimasukkan ke dalam gel agarosa 1% dan dijalankan elektroforesis dengan tegangan 100 volt selama 28 menit. Setelah elektroforesis, gel direndam dalam larutan EtBr selama 15 menit dan pita diamati melalui visualisasi UV transiluminator.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pencampuran kultur bakteri pada *triparental mating* semuanya tumbuh. Koloni yang banyak tumbuh teramati pada ulangan ke-1 (K1), 3 (K3), 4 (K4), 6 (K6), 7 (K7), 8 (K8), 9 (K9), dan 10 (K10). Sedangkan ulangan ke-2 (K2) dan ke-5 (K5) sedikit muncul koloninya (Figure 1). Hasil PCR koloni menunjukkan pita muncul pada ulangan ke-4 (K4), 5 (K5), 7 (K7), 8 (K8), dan 10 (K10) berukuran 500 bp (Figure 2). Kemunculan pita dalam visualisasi elektroforesis menunjukkan keberhasilan *triparental mating*.

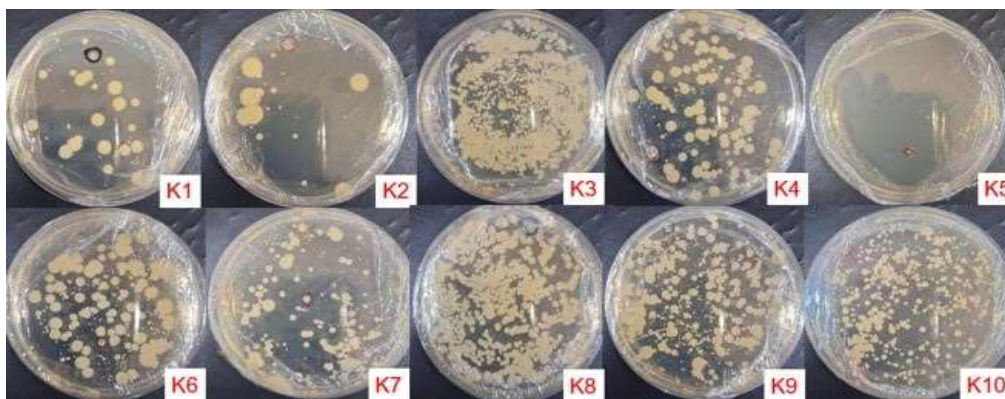


Figure 1. Hasil *triparental mating* pada bakteri *Agrobacterium tumefaciens*. K1-10: ulangan teknis

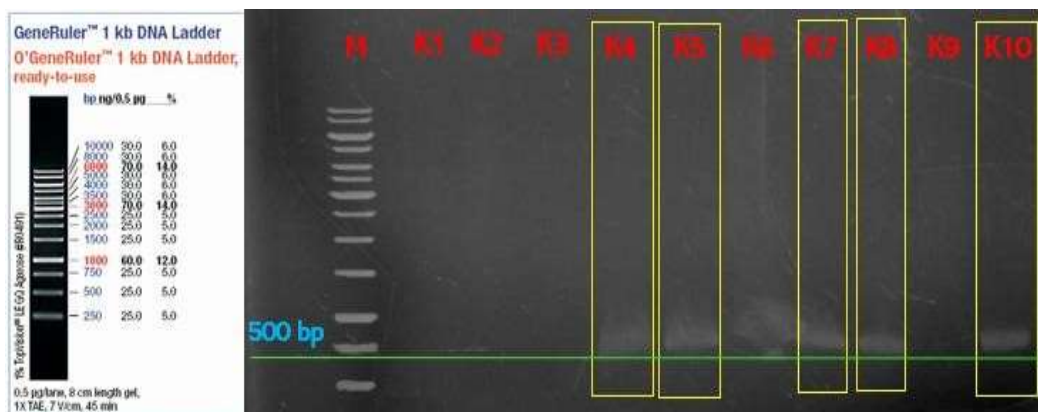


Figure 2. Hasil PCR koloni *triparental mating* pada *Agrobacterium tumefaciens*. M: DNA ladder 1 kb, K1-10: ulangan teknis

Faktor keberhasilan *triparental mating* diketahui memiliki kompatibilitas plasmid yang baik sebagai pendonor ke penerima melalui pembantu. Keberhasilan replikasi dan pemeliharaan materi genetik yang ditransfer (Timmery *et al.*, 2009; Robledo *et al.*, 2022). Kemampuan konjugasi dari pendonor membentuk pilus dan mentransfer materi genetik ke penerima. Efisiensi transfer plasmid menjadi faktor krusial untuk keberhasilan *triparental mating*. Karena terdapat peran mobilitas plasmid maka peran ini juga mempengaruhi efisiensi proses keberhasilan transfer materi genetik (Alderliesten *et al.*, 2020). Viabilitas sel dan kondisi lingkungan tumbuh yang memadai dan sesuai dapat meningkatkan peluang keberhasilan *triparental mating*. Penanda seleksi yang tepat pada plasmid yang digunakan. Selain itu, plasmid yang termodifikasi dengan baik juga dapat membantu koordinasi perpindahan plasmid dari pendonor ke penerima (Yue *et al.*, 2023; Jie *et al.*, 2021). Faktor ketidakberhasilan dalam *triparental mating* juga dapat terjadi ketika plasmid tidak kompatibel, konjugasi yang bermasalah, kondisi tumbuh yang tidak memadai, penanda seleksi yang salah, viabilitas strain bakteri yang rendah, dan ada kontaminan (Kamruzzaman *et al.*, 2017; Philipps *et al.*, 2019).

Bakteri *Escherichia coli* DH1 digunakan dalam *triparental mating* karena memiliki strain pembantu yang dapat mentransfer plasmid berupa *pRK2013* (Heinze *et al.*, 2018). *Escherichia coli* DH1 diketahui merupakan strain pembantu dalam *triparental mating* karena karakteristiknya, yaitu defisiensi gen *RecA*, stabil, dan plasmid yang kompatibel sebagai strain pembantu (Borja *et al.*, 2012). Jain *et al.* (2021) menjelaskan bahwa defisiensi gen *RecA* menyebabkan kekurangan protein *RecA* yang terlibat pada rekombinasi homolog. Sehingga, dapat mengurangi kemungkinan terjadi penataan ulang genetik yang tidak diinginkan. Karena defisiensi gen *RecA* pada *Escherichia coli* DH1 dapat meningkatkan stabilitas sebagai strain pembantu untuk menjaga materi genetik yang masuk ke dalam sel. Selain itu, kompatibilitas plasmid dari strain pembantu dapat berfungsi sebagai pentransfer berupa *pRK2013* (Borja *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2022; Silbert *et al.*, 2021). *pRK2013* diketahui sebagai plasmid pembantu dalam konjugasi antar bakteri (Hall *et al.*, 2023).

Bakteri *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  sebagai strain donor dalam *triparental mating* diketahui memiliki mobilisasi yang baik ke strain penerima sebagai strain donor selama konjugasi dibantu strain pembantu (Silbert *et al.*, 2021). Karena kemampuan mobilisasi ini dapat dipastikan keberhasilan transfer antar bakteri. Kompatibilitas plasmid yang baik sebagai strain donor menjadikannya umum digunakan untuk kloning dan aplikasi biologi molekuler lainnya. Strain bakteri ini juga diketahui tidak memiliki penanda seleksi antibiotik. Sehingga, bisa dimanipulasi dengan penanda seleksi tertentu pada spesifik plasmid yang masuk ke dalam sel bakteri dan terdapat penanda seleksi dari plasmid tersebut (Song *et al.*, 2015).

Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* digunakan dalam *triparental mating* sebagai strain penerima karena memiliki kemampuan konjugasi alami dan mudah menerima DNA asing. Kemampuan konjugasi alami dari *Agrobacterium tumefaciens* dapat mentransfer materi genetik dari satu sel bakteri ke sel tanaman (Martínez-García *et al.*, 2015). Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* menjadi media transfer fragmen DNA yang relatif besar. Ini termasuk T-DNA ke sel tanaman selama infeksi. Karena karakteristik bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dapat memudahkan konstruksi DNA yang relatif lebih besar dalam rekayasa genetika (Gelvin, 2021; Çelik, 2018). Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* memiliki strain yang dimodifikasi dengan kemampuan konjugasi yang telah ditingkatkan sebagai strain penerima dalam *triparental mating*, seperti LBA4404 (Handayani *et al.*, 2014). Selain bakteri *Agrobacterium tumefaciens* diketahui bakteri *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp., dan *Sinorhizobium* spp. dapat sebagai strain penerima dalam *triparental mating* (Ryu *et al.*, 2019; Döhlemann *et al.*, 2017; Acosta-Jurado *et al.*, 2016).

Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang mengandung plasmid rekombinan tertentu dapat diamati dengan penanda seleksi antibiotik streptomisin. Karena antibiotik streptomisin dapat digunakan sebagai penanda dalam rekayasa genetika (Dai *et al.*, 2018; Robinson *et al.*, 2015). Strain bakteri yang membawa plasmid resistensi streptomisin dapat tumbuh dan strain yang rentan akan mati. Howarth *et al.* (2023) menjelaskan bahwa penggunaan penanda seleksi ini penting untuk meminimalkan kontaminasi dengan menekan pertumbuhan bakteri pesaing yang sensitif terhadap antibiotik. Gen resisten streptomisin juga diketahui terdapat dalam plasmid bakteri ini. Karena beberapa strain bakteri *Agrobacterium tumefaciens* plasmidnya sudah dimodifikasi untuk mengekspresikan resistensi terhadap streptomisin, seperti GV3101, EHA105, LBA4404, AGL-1, dan C58C1 (Fu *et al.*, 2015; Intact Genomics, 2024). Sehingga, gen yang diinginkan dapat lebih mudah dimasukkan dan diekspresikan genetiknya.

## KESIMPULAN

*Triparental mating* pada pencampuran bakteri *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, *Escherichia coli* DH1 dan DH5 $\alpha$  terkonfirmasi berhasil. Karena gen SOD masuk ke dalam bakteri *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 yang dapat diamati dari PCR koloni dengan pita muncul.

## REFERENSI

- Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, Pdel, S., Crespo-Rivas, J.C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.Á., Vinardell, J.M. (2016). Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. *PLoS One*. 11(8):e0160499.
- Alderliesten, J.B., Duxbury, S.J.N., Zwart, M.P., de Visser, J.A.G.M., Stegeman, A., Fischer, E.A.J. (2020). Effect of donor-recipient relatedness on the plasmid conjugation frequency: a meta-analysis. *BMC Microbiol*. 20(1):135.
- Borja, G.M., Meza Mora E., Barrón B, Gosset G, Ramírez OT, Lara AR. (2012). Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. *Microb Cell Fact*. 11:132. doi: 10.1186/1475-2859-11-132.
- Brunk E, George KW, Alonso-Gutierrez J, Thompson M, Baidoo E, Wang G, Petzold CJ, McCloskey D, Monk J, Yang L, O'Brien EJ, Batth TS, Martin HG, Feist A, Adams PD, Keasling JD, Palsson BO, Lee TS. (2016). Characterizing strain variation in engineered *E. coli* using a multi-omics-based workflow. *Cell Syst*. 2(5):335-346. doi: 10.1016/j.cels.2016.04.004.
- Çelik Ö. (2018). *New visions in plant science*. London, United Kingdom: IntechOpen.
- Dai K, Wen X, Chang YF, Cao S, Zhao Q, Huang X, Wu R, Huang Y, Yan Q, Han X, Ma X, Wen Y. (2018). A streptomycin resistance marker in *H. parasuis* based on site-directed mutations in *rpsL* gene to perform unmarked in-frame mutations and to verify natural transformation. *PeerJ*. 6:e4253. doi:10.7717/peerj.4253.
- Döhlemann J, Marcel W, Carina H, Martina C, Patrick S, Tobias JE, Martin T, Anke B. (2017). A Family of Single Copy *repABC*-Type Shuttle Vectors Stably Maintained in the Alpha-Proteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *ACS Synthetic Biology*. 6(6):968-984. doi: 10.1021/acssynbio.6b00320.
- Fu Q, Li C, Tang M, Tao YB, Pan BZ, Zhang L, Niu L, He H, Wang X, Xu ZF. (2015). An efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of the biofuel plant *Jatropha curcas* by optimizing kanamycin concentration and duration of delayed selection. *Plant Biotechnol Rep*. 9(6):405-416. doi:10.1007/s11816-015-0377-0.
- Gelvin SB. (2017). Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annu. Rev. Genet*. 51:195– 217. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035320.
- Gelvin SB. (2021). Plant DNA repair and *Agrobacterium* T-DNA integration. *Int J Mol Sci*. 22(16):8458. doi: 10.3390/ijms22168458.
- Gordon JE, Christie PJ. (2014). The *Agrobacterium* Ti plasmids. *Microbiol Spectr*. 2:6. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0010-2013.
- Handayani T, Alimuddin, Widyastuti U, Suryati E, Parenrengi A. (2014). Binary Vector Construction and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of Lysozyme Gene in Seaweed *Kappaphycus alvarezii*. *Biotropia*. 21(2):80-90. doi: 10.11598/btb.2014.21.2.2.
- Hannum, S. (2012). *Isolation, cloning, and expression analysis of gene coding copper/ zinc superoxide dismutase (CuZnSOD) from Melastoma malabathricum L.* [Dissertation]. Bogor: Bogor Agricultural University.
- Heinze S, Kornberger P, Grätz C, Schwarz WH, Zverlov VV, Liebl W. (2018). Transmating: conjugative transfer of a new broad host range expression vector to various *Bacillus* species using a single protocol. *BMC Microbiol*. 18(1):56. doi: 10.1186/s12866-018-1198-4.
- Howarth RE, Pattillo CM, Griffitts JS, Calvopina-Chavez DG. (2023). Three genes controlling streptomycin susceptibility in *Agrobacterium fabrum*. *J Bacteriol*. 205(9):e0016523. doi: 10.1128/jb.0016523.
- Hwang HH, Wu ET, Liu SY, Chang SC, Tzeng KC, Kado CI. (2013). Characterization and host range of five tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* strains and possible application in plant transient transformation assays. *Plant Pathol*. 62: 1384-1397. doi: 10.1111/ppa.12046.
- Intact Genomics. (2024). *Agrobacterium strains for antibiotic sensitivity and resistance*. St. Louis, Missouri, USA: Intact Genomics. <https://intactgenomics.com/support/agrobacterium-antibiotic-resistance/>. Diakses pada tanggal 12 Maret 2024.
- Jain K, Wood EA, Romero ZJ, Cox MM. (2021). RecA-independent recombination: dependence on the *Escherichia coli* RarA protein. *Mol Microbiol*. 115(6):1122-1137. doi: 10.1111/mmi.14655.
- Jie J, Chu X, Li D, Luo Z. (2021). A set of shuttle plasmids for gene expression in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One*. 16(2):e0246918. doi: 10.1371/journal.pone.0246918.
- Kamruzzaman M, Shoma S, Thomas CM, Partridge SR, Iredell JR. (2017). Plasmid interference for curing antibiotic resistance plasmids in vivo. *PLoS One*. 12(2):e0172913. doi: 10.1371/journal.pone.0172913.

- Li YG, Christie PJ. (2018). The *Agrobacterium* VirB/VirD4 T4SS: mechanism and architecture defined through in vivo mutagenesis and chimeric systems. *Curr Top Microbiol Immunol.* 418:233-260. doi: 10.1007/82\_2018\_94.
- Low WW, Joshua LCW, Leticia CB, Chloe S, Sophia D, Hok-Sau K, Tatiana B, Fengbin W, Alejandro P, Tiago RDC, Bach P, Min Ch, Edward HE, Konstantinos B, Gad F. (2022). Mating pair stabilization mediates bacterial conjugation species specificity. *Nat Microbiol.* 7:1016–1027. doi: 10.1038/s41564022-01146-4.
- Magray MS, Kumar A, Rawat AK, Srivastava S. (2011). Identification of *Escherichia coli* through analysis of 16S rRNA and 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region sequences. *Bioinformation.* 6(10):370-371. doi: 10.6026/97320630006370.
- Martínez-García E, Benedetti I, Hueso A, de Lorenzo V. (2015). Mining environmental plasmids for synthetic biology parts and devices. *Microbiol Spectrum.* 3(1):1-16. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS0033-2014.
- Philipps G, Vries S, Jennewein S. (2019). Development of a metabolic pathway transfer and genomic integration system for the syngas-fermenting bacterium *Clostridium ljungdahlia*. *Biotechnol Biofuels.* 12(112):1-14. doi: 10.1186/s13068-019-1448-1.
- Piotrowska M, Dziewit L, Ostrowski R, Chmielowska C, Popowska M. (2020). Molecular characterization and comparative genomics of IncQ-3 plasmids conferring resistance to various antibiotics isolated from a wastewater treatment plant in warsaw (poland). *Antibiotics.* 9(9):613. doi: 10.3390/antibiotics9090613.
- Raman V, Mysore KS. (2023). Engineering *Agrobacterium tumefaciens* with a Type III Secretion System to Express Type III Effectors. *Bio Protoc.* 13(15):e4726. doi: 10.21769/BioProtoc.4726.
- Robinson LJ, Andrew DSC, John S. (2015). Spontaneous and on point: Do spontaneous mutations used for laboratory experiments cause pleiotropic effects that might confound bacterial infection and evolution assays?. *FEMS Microbiology Letters.* 362(21):fzv177. doi: 10.1093/femsle/fzv177.
- Robledo M, Beatriz Á, Ana C, Sheila G, David RG, Luis ÁF, Fernando C. (2022). Targeted bacterial conjugation mediated by synthetic cell-to-cell adhesions. *Nucleic Acids Research.* 50(22):12938–12950. doi: 10.1093/nar/gkac1164.
- Ryu MH, Zhang J, Toth T, Khokhani D, Geddes BA, Mus F, Garcia-Costas A, Peters JW, Poole PS, Ané JM, Voigt CA. (2019). Control of nitrogen fixation in bacteria that associate with cereals. *Nature Microbiology.* 5(2):314-330. doi: 10.1038/s41564-019-0631-2.
- Shantha, S.L., Padma, Bhat, S.G., Sunil, K.C., Ragavendra, R.B. (2012). Genetic Manipulation of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Using WGA Gene Through *Agrobacterium* Mediated Transformation. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology.* 8 (1): 36-43.
- Silbert J, Lorenzo V, Aparicio T. (2021). refactoring the conjugation machinery of promiscuous plasmid RP4 into a device for conversion of gram-negative isolates to Hfr strains. *ACS Synth Biol.* 10(4):690697. doi: 10.1021/acssynbio.0c00611.
- Song Y, Lee BR, Suhung C, Cho YB, Kim SW, Taek JK, Sun CK, Cho BK. (2015). Determination of single nucleotide variants in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  by using short-read sequencing. *FEMS Microbiology Letters.* 362(11):fzv073. doi: 10.1093/femsle/fzv073.
- Timmery S, Modrie P, Minet O, Mahillon J. (2009). Plasmid capture by the *Bacillus thuringiensis* conjugative plasmid pXO16. *J Bacteriol.* 191(7):2197-205. doi: 10.1128/JB.01700-08.
- To KY. 2020. *Genetic transformation in crops.* London, United Kingdom: IntechOpen.
- Vesel N, Iseli C, Guex N, Lemopoulos A, Blokesch M. (2023). DNA modifications impact natural transformation of *Acinetobacter baumannii*. *Nucleic Acids Res.* 51(11):5661-5677. doi: 10.1093/nar/gkad377.
- Wang J, Huang C, Guo K, Ma L, Meng X, Wang N, Huo YX. (2020). Converting *Escherichia coli* MG1655 into a chemical overproducer through inactivating defense system against exogenous DNA. *Synth Syst Biotechnol.* 5(4):333-342. doi: 10.1016/j.synbio.2020.10.005.
- Yang Y, Yu Q, Wang M, Zhao R, Liu H, Xun L, Xia Y. (2022). *Escherichia coli* BW25113 competent cells prepared using a simple chemical method have unmatched transformation and cloning efficiencies. *Front Microbiol.* 13:838698. doi: 10.3389/fmicb.2022.838698.