

SKRIPSI

**PENGARUH LAMA WAKTU INFEKSI TERHADAP FREKUENSI  
TRANSFORMASI GEN *AtRKD4* PADA TANAMAN KACA PIRING (*Gardenia  
jasminoides* J. Ellis) OLEH *Agrobacterium tumefaciens* EHA105**

Sebagai syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) pada Fakultas  
Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta

Disusun Oleh:  
**Sylvana Christin**  
NPM: 160801795



**UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA  
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
YOGYAKARTA  
2020**

## PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama :Sylvana Christin  
NPM :160801795  
Judul Skripsi :Pengaruh Lama Waktu Infeksi Terhadap Frekuensi Transformasi Gen *AtRKD4* pada Tanaman Kaca Piring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) oleh *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105

Menyatakan bahwa skripsi dengan judul tersebut di atas adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri dan saya susun dengan sejujur-jujurnya berdasarkan norma akademik dan bukan merupakan hasil plagiat. Adapun semua kutipan di dalam skripsi ini telah saya sertakan nama penulisnya dan telah saya cantumkan dalam Daftar Pustaka.

Pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya dan apabila di kemudian hari ternyata terbukti melanggar pernyataan tersebut, saya bersedia menerima sanksi akademik yang berlaku (dicabut predikat kelulusan dan gelar kesarjanaan saya).

Yogyakarta, 10 Juli 2020  
Yang menyatakan,



Sylvana Christin  
160801795

## PENGESAHAN

Mengesahkan Skripsi dengan Judul

PENGARUH LAMA WAKTU INFEKSI TERHADAP FREKUENSI  
TRANSFORMASI GEN *AtRKD4* PADA TANAMAN KACA PIRING (*Gardenia  
jasminoides* J. Ellis) OLEH *Agrobacterium tumefaciens* EHA105

yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Sylvana Christin  
NPM: 160801795

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji  
Pada hari Senin, tanggal 15 Juni 2020  
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

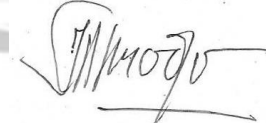
### SUSUNAN TIM PENGUJI

Dosen Pembimbing Utama,

Anggota Tim Penguji



(Dr. Dra. E. Mursyanti, M.Si.)



(Drs. P. Kianto Atmodjo, M.Si.)

Dosen Pembimbing Pendamping,



(Drs. B. Boy R. Sidharta, M.Sc.)

Yogyakarta, 10 Juli 2020  
Universitas Atma Jaya Yogyakarta  
Fakultas Teknobiologi  
Dekan,



Dr. Dra. E. Mursyanti, M.Si.

## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyusun dan menyelesaikan naskah skripsi ini. Kegiatan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Tanaman Obat dan Laboratorium Teknobi-Industri dengan judul Pengaruh Lama Waktu Infeksi Terhadap Frekuensi Transformasi Gen *AtRKD4* pada Tanaman Kaca Piring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) oleh *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105. Penulis hendak mengucapkan terima kasih kepada:

1. Mama dan Papa yang telah memberi dukungan secara finansial dan moral kepada penulis, dengan kepercayaan yang tinggi, tidak menuntut dan memberi kebebasan bagi penulis dalam kegiatan akademis.
2. Ibu Dr. Dra. E. Mursyanti, M.Si. selaku DPU yang selalu ramah dalam memberikan bimbingan, kesempatan dan kepercayaan selama penelitian hingga penyusunan naskah skripsi ini.
3. Bapak Drs. B. Boy Rahardjo Sidharta, M.Sc. selaku DPP yang telah percaya dan memberi semangat terus-menerus hingga saat ini.
4. Bapak Drs. P. Kianto Atmodjo, M.Si. yang ramah dan memberikan bantuan dalam penyelesaian naskah ini.
5. Mba Vita selaku staff Lab. Bioteknologi Tanaman yang membantu jalannya penelitian, dan telah menjadi teman yang baik disaat susah dan senang.

6. Penghuni lab belakang, Kak Pardede, Kak Adam, Lintang, Mega, Ingrid, yang menemani jalannya proses penelitian dan telah menjadi mentor, saudara, dan teman yang baik.
7. Geri, Nina, Ade, Rosa, Dyana, Niko, Yopi, Aril atas keramaian dan hiburannya dalam grup selama masa sulit.
8. Teman-Teman FTB16 yang ramah, tersenyum, menyapa, dan menjadi teman yang menyenangkan selama 4 tahun ini.
9. Andy yang telah menjadi pendengar yang baik dalam setiap kegagalan dan keberhasilan yang penulis alami, yang selalu membangun dan tidak pernah berhenti percaya. Terima kasih.

Penulis menyadari bahwa naskah skripsi ini masih banyak kekurangan. Penulis berharap naskah skripsi ini dapat memberi informasi mengenai penelitian yang penulis lakukan kepada para peneliti, dosen dan teman-teman mahasiswa.

Yogyakarta, 3 Juni 2020

Penulis,

## DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL .....	i
PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME .....	ii
PENGESAHAN .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	x
DAFTAR LAMPIRAN .....	xi
INTISARI .....	xii
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang .....	1
B. Keaslian Penelitian .....	3
C. Rumusan Masalah .....	5
D. Tujuan Penelitian .....	5
E. Manfaat Penelitian .....	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Tanaman Kaca Piring .....	6
B. Pemilihan Eksplan Untuk Induksi Kalus .....	7

C. Induksi Kalus dari Daun Tanaman Kaca Piring sebagai Target Transformasi..	9
D. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) .....	12
E. 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D) .....	14
F. <i>Indole-3-Butyric Acid</i> (IBA) .....	15
G. <i>Thidiazuron</i> (TDZ) .....	16
H. Plasmid pTA7002 dan Gen <i>AtRKD4</i> .....	18
I. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	20
J. Transformasi Genetik dan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	21
K. Lama Waktu Infeksi .....	24
L. Hipotesis .....	25
<b>III. METODE PENELITIAN</b>	
A. Tempat dan Waktu Penelitian .....	26
B. Bahan dan Alat .....	26
C. Rancangan Percobaan.....	27
D. Cara Kerja .....	28
1. Pembuatan Larutan Stok .....	28
2. Sterilisasi Alat dan Ruang Penabur .....	30
3. Pembuatan dan Sterilisasi Medium .....	31
4. Persiapan Eksplan dan Sterilisasi Eksplan .....	33
5. Induksi Kalus Embriogenik dari Daun Kaca Piring.....	34
6. Prekultur Target Transformasi .....	34
7. Deteksi Gen <i>AtRKD4</i> dan <i>hpt</i> pada Plasmid pTA7002.....	35

8. Pembuatan Starter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105 yang Membawa Gen <i>AtRKD4</i> .....	36
9. Infeksi Kalus Tanaman Kaca Piring dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105 yang membawa gen <i>AtRKD4</i> .....	36
10. Kokultivasi Kalus Tanaman Kaca Piring .....	37
11. Eliminasi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105 .....	37
12. Seleksi Kalus Tanaman Kaca Piring Transforman .....	38
E. Analisis Data .....	39
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
A. Induksi Kalus Embriogenik Kaca Piring .....	40
B. Uji Kemurnian <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105.....	50
C. Deteksi Gen <i>AtRKD4</i> dan <i>hpt</i> pada <i>A. tumefaciens</i> EHA 105.....	54
D. Transformasi Genetik Kalus Daun Kaca Piring Melalui <i>A. tumefaciens</i> EHA 105.....	56
E. Pengaruh Lama Waktu Infeksi Terhadap Frekuensi Transformasi Kalus Daun Kaca Piring.....	61
F. Pertumbuhan Kalus Daun Kaca Piring Hasil Transformasi di dalam Medium Selektif .....	64
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN</b>	
A. Simpulan .....	68
B. Saran.....	68
DAFTAR PUSTAKA .....	69
LAMPIRAN.....	77



## DAFTAR TABEL

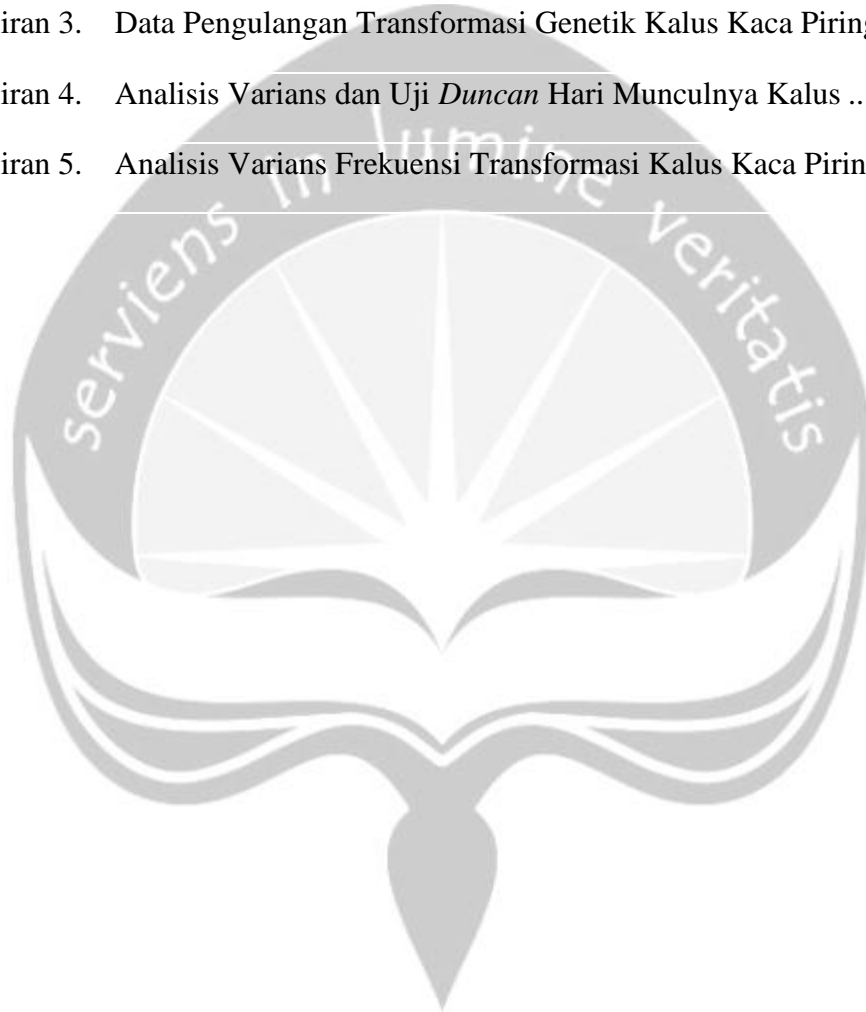
	Halaman
Tabel 1. Rancangan Percobaan Persentase Pembentukan Kalus Embriogenik Tanaman Kaca Piring .....	28
Tabel 2. Rancangan Percobaan Pengaruh Variasi Lama Waktu Infeksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> terhadap Frekuensi Transformasi Kalus Embriogenik Tanaman Kaca Piring .....	28
Tabel 3. Komposisi <i>PCR</i> Mix KOD Fx Neo .....	35
Tabel 4. Tahap <i>PCR</i> Koloni <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	35
Tabel 5. Pengaruh Variasi Hormon 2,4-D, TDZ dan <i>IBA</i> dalam Induksi Kalus Embriogenik Tanaman Kaca Piring .....	42
Tabel 6. Uji Kemurnian <i>A. tumefaciens</i> yang Membawa Plasmid pTA7002.....	53
Tabel 7. Frekuensi Transformasi Kalus Daun Kaca Piring dengan Variasi Lama Waktu Infeksi .....	62
Tabel 8. Jadwal Kegiatan Penelitian.....	77
Tabel 9. Data Induksi Kalus 2,4-D 1 ppm .....	78
Tabel 10. Data Induksi Kalus 2,4-D 2 ppm .....	78
Tabel 11. Data Induksi Kalus 2,4-D 3 ppm.....	78
Tabel 12. Frekuensi Transformasi Genetik Kalus Kaca Piring .....	79
Tabel 13. Analisis Varians Hari Munculnya Kalus .....	80
Tabel 14. Hasil Uji <i>Duncan</i> Hari Munculnya Kalus .....	80
Tabel 15. Analisis Varians Frekuensi Transformasi Genetik Kalus Kaca Piring.....	81

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Morfologi Tanaman Kaca Piring .....	7
Gambar 2. Perbandingan Kalus Embriogenik dan Non-Embriogenik .....	11
Gambar 3. Tahap-Tahap Perkembangan Embrio Somatik .....	11
Gambar 4. Struktur 2,4-Diklorofenoksi Asetat.....	14
Gambar 5. Struktur Kimia <i>Indole-3-Butyric Acid</i> .....	16
Gambar 6. Struktur Kimia <i>Thidiazuron</i> .....	17
Gambar 7. Struktur T-DNA 35S::GAL4::AtRKD4::GR .....	19
Gambar 8. Subkultur Kalus Kaca Piring .....	44
Gambar 9. Morfologi Kalus Daun Kaca Piring .....	45
Gambar 10. Pertumbuhan Kalus pada Medium MS .....	48
Gambar 11. Morfologi Koloni <i>A. tumefaciens</i> .....	51
Gambar 12. Visualisasi <i>PCR</i> Koloni <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105.....	56
Gambar 13. Pertumbuhan Kalus di Medium Selektif.....	65

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Jadwal Kegiatan Penelitian.....	77
Lampiran 2. Data Induksi Kalus Menggunakan Hormon 2,4-D.....	78
Lampiran 3. Data Pengulangan Transformasi Genetik Kalus Kaca Piring.....	79
Lampiran 4. Analisis Varians dan Uji <i>Duncan</i> Hari Munculnya Kalus .....	80
Lampiran 5. Analisis Varians Frekuensi Transformasi Kalus Kaca Piring .....	81



## INTISARI

Transformasi genetik dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* merupakan salah satu metode transformasi yang umum digunakan dengan tingkat keberhasilan yang tinggi. Faktor yang dapat memengaruhi transformasi genetik dengan perantara *A. tumefaciens* adalah target transformasi dan lama waktu infeksi. Target transformasi yang baik adalah eksplan yang tidak bersifat rekalsitran, dapat terinfeksi oleh *A. tumefaciens* serta dapat tumbuh menjadi tanaman dewasa. Waktu infeksi *A. tumefaciens* yang terlalu singkat dapat menyebabkan gen tidak terintegrasi dengan baik pada genom tanaman, sedangkan waktu infeksi yang terlalu lama dapat menyebabkan nekrosis pada sel tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh hormon dalam menginduksi kalus yang diperlukan sebagai target transformasi serta lama waktu infeksi yang terbaik untuk meningkatkan frekuensi transformasi. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi pembuatan larutan stok, sterilisasi alat dan bahan, pembuatan medium, induksi kalus dari daun kaca piring dengan variasi hormon 2,4-D (1, 2, 3 ppm), kombinasi hormon TDZ 1,5 ppm IBA 1,5 ppm dan TDZ 2 ppm IBA 1,5 ppm, prekultur target transformasi, deteksi gen *AtRKD4* dan *hpt* dengan metode *PCR* koloni, pembuatan starter *Agrobacterium tumefaciens* yang mengandung gen *AtRKD4*, infeksi kalus tanaman kaca piring dengan variasi lama waktu infeksi (15, 30, dan 45 menit), kokultivasi kalus, eliminasi *Agrobacterium tumefaciens*, dan seleksi kalus transforman tanaman kaca piring. Hasil deteksi gen dengan *PCR* menunjukkan bahwa koloni *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 membawa gen *AtRKD4* (380 bp) dan *hpt* (500 bp). Hasil induksi kalus dari eksplan daun kaca piring menunjukkan bahwa kombinasi hormon TDZ-IBA tidak dapat menginduksi kalus dari eksplan daun tanaman kaca piring sedangkan hormon 2,4-D dapat menginduksi kalus bersifat meremah berwarna kekuningan dengan persentase pembentukan kalus sebesar 100%. Lama waktu infeksi yang terbaik dalam transformasi genetik kalus kaca piring yaitu 15 menit dengan frekuensi transformasi sebesar 5,08%.

## I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Tanaman kaca piring (*Gardenia jasminoides* J. Ellis) merupakan tanaman obat yang berasal dari China Selatan. Tanaman kaca piring umum digunakan sebagai obat tradisional untuk mengobati inflamasi. Tanaman ini memiliki berbagai senyawa aktif seperti geniposida, genipin, *crocetin*, asam geniposidat, dan *crocin* yang berperan sebagai antikanker, antiinflamatori, antiviral, antioksidan, antibakteri, dan berbagai manfaat lainnya (Phatak, 2015). Perbanyakkan tanaman secara konvensional yaitu stek, memiliki kekurangan berupa laju proliferasi yang rendah. Perbanyakkan tanaman dengan kultur *in vitro* dapat dilakukan, namun dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti hormon yang digunakan, sumber eksplan serta medium tanam (Salim dan Hamza, 2017).

Transformasi gen *AtRKD4* yang berfungsi untuk menginduksi embriogenesis somatik dapat dilakukan untuk mengatasi permasalahan perbanyakkan tanaman (Mursyanti dkk., 2015). Transformasi genetik dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* merupakan salah satu metode transformasi yang umum digunakan dengan tingkat keberhasilan yang tinggi (Alimohammadi dan Najjar, 2009), efisiensi transformasi dengan perantara *A. tumefaciens* dapat mencapai 86% (Sukamto dkk., 2017).

Menurut Khan dkk. (2015), protokol transformasi genetik dengan perantara *A. tumefaciens* pada tanaman obat dan tanaman aromatik jarang

tersedia, sehingga perlu dikembangkan protokol tersebut. Keberhasilan transformasi genetik dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya adalah target transformasi yang digunakan dan waktu infeksi *A. tumefaciens* terhadap eksplan (Qianru dkk., 2017; Khan dkk., 2015).

Target transformasi adalah suatu sel atau jaringan tanaman yang akan disisipi gen target agar dapat terintegrasi pada genom tanaman. Berbagai jenis eksplan seperti kotiledon, daun, hipokotil, akar, embrio zigotik dan kalus dapat digunakan sebagai target transformasi (Jackson dkk., 2003). Target transformasi yang baik dalam transformasi genetik adalah target yang tidak rekalsitran, dapat terinfeksi oleh *A. tumefaciens*, serta dapat tumbuh menjadi tanaman dewasa (Dwiyani dkk., 2016).

Kalus dipilih sebagai target transformasi dalam penelitian ini karena laju pembelahan sel kalus yang tinggi sehingga dapat diperoleh tanaman transgenik dalam jumlah yang banyak (Mendoca dkk., 2013). Eksplan yang digunakan untuk induksi kalus adalah eksplan daun tanaman kaca piring. Eksplan daun dipilih karena proses sterilisasi yang relatif mudah dan daun tersedia dalam jumlah yang banyak (Trigiano dan gray, 2011).

Induksi kalus dari daun kaca piring dapat dilakukan dengan penambahan zat pengatur tumbuh seperti 2,4-D, TDZ dan *IBA*. Menurut Bhojwani dan Razdan (1996), 2,4-D mampu menginduksi kalus yang bersifat embriogenik. Menurut Ahmad dan Faisal (2018), *thidiazuron* mampu menginduksi embriogenesis somatik. Penggunaan TDZ yang dikombinasikan dengan hormon auksin dapat

memberi efek sinergis dan lebih efektif dibanding penggunaan TDZ saja. Penelitian ini menggunakan variasi hormon 2,4-D dengan konsentrasi 1, 2, 3 ppm serta hormon TDZ 1 ppm IBA 1,5 ppm, dan TDZ 2 ppm IBA 1,5 ppm untuk mengetahui hormon yang terbaik dalam menginduksi kalus dari eksplan daun kaca piring.

Waktu infeksi *A. tumefaciens* terhadap target transformasi. Waktu infeksi yang terlalu singkat menyebabkan gen target tak tersisipkan dengan baik, sedangkan waktu infeksi yang terlalu lama dapat menyebabkan pertumbuhan bakteri berlebihan dan dapat menyebabkan nekrosis pada sel tanaman (Qianru dkk., 2017). Penelitian ini menggunakan variasi waktu infeksi 15, 30 dan 45 menit untuk mengetahui waktu infeksi yang terbaik untuk meningkatkan frekuensi transformasi genetik tanaman kaca piring.

## **B. Keaslian Penelitian**

Berdasarkan penelitian Farzinebrahimi dkk. (2014), diketahui bahwa kalus embriogenik tanaman kaca piring tumbuh dari eksplan daun setelah tiga minggu kultur pada medium *Murashige and Skoog* (MS) yang disuplementasi auksin. Penambahan auksin 2,4-D dengan konsentrasi 2 dan 2,5 ppm pada medium MS mampu menginduksi pembentukan kalus hingga 100%. Berdasarkan penelitian Gaber dan Barakat (2019) yang menggunakan eksplan berupa nodus tanaman kaca piring dengan medium MS yang disuplementasi 2,4-D 1 ppm dan 2 ppm menunjukkan persentase pembentukan kalus embriogenik sebesar 100%

dengan morfologi kalus meremah dan berwarna putih dan kuning kehijauan. Berdasarkan penelitian Farzinebrahimi dkk. (2014), penambahan hormon TDZ 1 ppm dan IBA 1,5 ppm pada medium *Woody Plant Medium* (WPM) mampu menginduksi pembentukan kalus dari daun tanaman kaca piring dengan morfologi kalus meremah berwarna kehijauan dan kekuningan.

Penelitian mengenai efek variasi waktu infeksi *Agrobacterium tumefaciens* terhadap frekuensi transformasi genetik pada tanaman kaca piring belum pernah dilakukan sejauh ini. Penelitian yang pernah dilakukan terkait waktu infeksi yaitu penelitian Mendonca dkk. (2013) mengenai transformasi genetik *Eucalyptus camaldulensis* oleh *A. tumefaciens* EHA105, didapatkan waktu infeksi yang terbaik adalah 15 menit. Penelitian yang dilakukan oleh Johan (2018) mengenai waktu infeksi *A. tumefaciens* EHA105 untuk transformasi gen *AtRKD4* pada kalus daun kumis kucing menghasilkan waktu infeksi yang terbaik adalah 30 menit dengan frekuensi transformasi mencapai 5,6%. Penelitian yang dilakukan Budiani dkk. (2000) mengenai transformasi gen kitinase pada daun kopi menunjukkan bahwa waktu infeksi selama 15 menit menghasilkan frekuensi transformasi mencapai 42,5%. Penelitian yang dilakukan oleh Mursyanti dkk. (2015) mengenai transformasi gen *AtRKD4* pada protokorm angrek, waktu infeksi yang digunakan yaitu 60 menit.



### **C. Rumusan Masalah**

1. Bagaimana pengaruh variasi hormon 2,4-D (1, 2, 3 ppm), kombinasi hormon TDZ 1,5 ppm dan *IBA* 1,5 ppm serta kombinasi hormon TDZ 2 ppm dan *IBA* 1,5 ppm dalam menginduksi kalus dari eksplan daun tanaman kaca piring?
2. Berapakah lama waktu infeksi yang terbaik untuk meningkatkan frekuensi transformasi pada tanaman kaca piring?

### **D. Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui pengaruh hormon 2,4-D (1, 2, 3 ppm), kombinasi hormon TDZ 1,5 ppm dan *IBA* 1,5 ppm serta kombinasi hormon TDZ 2 ppm dan *IBA* 1,5 ppm dalam menginduksi kalus dari eksplan daun tanaman kaca piring.
2. Mengetahui lama waktu infeksi yang terbaik untuk meningkatkan frekuensi transformasi pada tanaman kaca piring.

### **E. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini bermanfaat untuk menyediakan data bagi mahasiswa dan peneliti mengenai pengaruh hormon 2,4-D serta kombinasi hormon TDZ dan *IBA* dalam menginduksi kalus dari eksplan daun tanaman kaca piring dan lama waktu infeksi yang terbaik untuk transformasi genetik tanaman kaca piring. Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai protokol dasar transformasi genetik tanaman kaca piring.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### A. Tanaman Kaca Piring

Kaca piring merupakan tanaman obat yang berasal dari China Selatan (Phatak, 2015). Menurut Lim (2014), tanaman kaca piring merupakan tanaman *perennial* berkayu dengan daun tunggal berbentuk *elliptic-ovate*, susunan daun bersilang, dan permukaan daun berwarna hijau mengkilap. Tanaman ini memiliki bunga tunggal yang harum dan berwarna putih kekuningan serta buah menyerupai *berry* berwarna jingga dengan panjang buah 10-20 mm. taksonomi tanaman kaca piring yaitu:

Kerajaan : Plantae  
Kelas : Magnoliopsida  
Bangsa : Rubiales  
Suku : Rubiaceae  
Marga : *Gardenia*  
Jenis : *Gardenia jasminoides*

Tanaman kaca piring dimanfaatkan dalam pengobatan *Traditional Chinese Medicine* (TCM), dan dikenal dengan nama *zhi-zhi*. Bagian tanaman yang digunakan berupa daun dan buah. Tanaman kaca piring telah dikenal sejak Dinasti Song (960-1279), dan diperkenalkan di Inggris pada abad ke-18 serta dibudidayakan secara luas (Jarvis dkk., 2014). Buah tanaman kaca piring juga umum digunakan sebagai pewarna kuning alami (Xiao dkk., 2016).

Pengembangan dan penelitian mengenai kandungan fitokimia tanaman kaca piring gencar dilakukan selama beberapa tahun belakangan ini, dari tahun

2005 hingga 2015 terdapat lebih dari 200 hak paten yang berkaitan dengan tanaman kaca piring. Tanaman ini mengandung berbagai senyawa aktif seperti geniposida, genipin, *crocetin*, asam geniposidat, dan *crocin* yang berperan sebagai antikanker, antiinflamatori, antiviral, antioksidan, antibakteri, hepatoprotektif, gastroprotektif, dan berbagai manfaat lain (Phatak, 2015). Morfologi tanaman kaca piring dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Tanaman Kaca Piring (a) Bunga (b) Daun (c) Buah (d) Tanaman Kaca Piring (Sumber: Talhouk dkk., 2015).

## B. Pemilihan Eksplan Untuk Induksi Kalus

Eksplan adalah bagian dari tanaman, dapat berupa jaringan maupun organ yang ditanam pada kultur *in vitro*. Eksplan yang baik adalah jaringan meristematis yang selnya aktif membelah. Eksplan yang umum digunakan untuk induksi kalus adalah eksplan daun, batang, nodus dan kotiledon. Faktor lain yang perlu diperhatikan berupa letak tumbuh eksplan. Bagian tanaman yang tumbuh di dalam

atau dekat dengan tanah umumnya lebih rentan kontaminasi dibandingkan bagian tanaman yang tumbuh dengan posisi yang jauh dari tanah (Smith, 2013)

Penggunaan daun sebagai eksplan memiliki kelebihan proses sterilisasi yang relatif mudah (Trigiano dan gray, 2011), ketersediaan daun dan permukaan daun yang luas dapat digunakan sebagai eksplan. Pemilihan daun sebagai eksplan perlu memperhatikan beberapa hal diantaranya, dipilih dari daun muda tanaman dewasa yang diketahui asal-usul dan varietasnya, serta tidak terinfeksi penyakit (Mastuti, 2017).

Faktor yang dapat memengaruhi respon eksplan terhadap medium, hormon dan kondisi pertumbuhan adalah faktor genotip. Tanaman memiliki perbedaan genotip antar genus dan antar individu. Terdapat tanaman yang memiliki genotip yang tidak responsif saat dikultur di dalam medium *in vitro*, dan terdapat tanaman yang memiliki genotip yang responsif saat dikultur di dalam medium *in vitro* (Smith, 2013).

Penelitian mengenai pengaruh genotip terhadap kemampuan pembentukan embrio somatik telah dilakukan. Tanaman jagung, diketahui hanya varietas tertentu yang dapat diinduksi membentuk embrio somatik (Trigiano dan gray, 2011). Penelitian pada tanaman *Daucus* sebanyak 12 spesies, menggunakan eksplan tangkai daun dan ditumbuhkan pada kondisi yang sama untuk membentuk embrio somatik, didapatkan hasil bahwa 4 spesies tidak dapat membentuk embrio somatik. Analisis molekuler dilakukan pada spesies *Daucus* yang diteliti tersebut menggunakan metode RAPD dan didapatkan hasil terdapat dua pita yang identik

pada spesies yang membentuk embrio somatik namun tidak ditemukan pada spesies yang tidak dapat membentuk embrio somatik (Neumann dkk., 2009).

### **C. Induksi Kalus dari Daun Tanaman Kaca Piring sebagai Target Transformasi**

Induksi kalus baik embriogenik dan non-embriogenik dapat dilakukan dengan perlakuan hormon. Pembentukan kalus dari eksplan membutuhkan penambahan hormon eksogen berupa auksin dan sitokinin. Sitokinin dan auksin yang dihasilkan secara endogen dalam kultur *invitro*, tidak cukup memenuhi kebutuhan eksplan untuk berkembang untuk menjadi kalus karena konsentrasinya yang kecil, sehingga perlu diketahui konsentrasi hormon optimum yang ditambahkan secara eksogen untuk dapat menginduksi kalus embriogenik (Ahmad dan Faisal, 2018).

Kalus merupakan masa sel yang belum terdiferensiasi dan umumnya tumbuh disekitar irisan eksplan. Kalus muncul sebagai respon tanaman terhadap luka. Berdasarkan morfologi, kalus terbagi atas kalus meremah dan kalus kompak. Berdasarkan sifatnya, kalus terbagi atas kalus embriogenik dan kalus non-embriogenik (Smith, 2013).

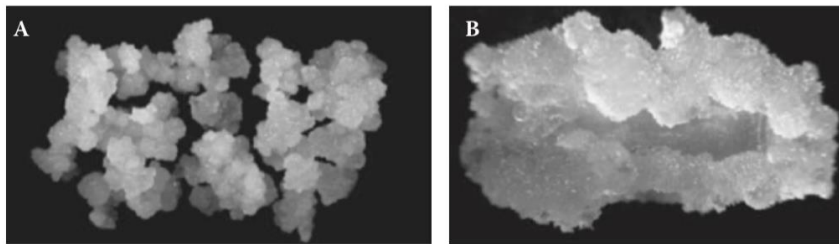
Kalus embriogenik merupakan kalus yang dapat membentuk *Pro-Embryogenic Masses* (PEMs) yang kemudian berkembang menjadi embrio somatik (Trugiono dan Gray, 2011). Embrio somatik merupakan embrio yang berasal dari sel somatik dan memiliki kemampuan untuk tumbuh menjadi planlet (Ahmad dan Faisal, 2018). Sel-sel somatik baik haploid maupun diploid dapat

berkembang menjadi suatu struktur yang menyerupai embrio zigotik tanpa melalui fusi gamet. Proses ini dikenal sebagai embriogenesis somatik (Mastuti, 2017).

Embriogenesis somatik dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu embriogenesis somatik secara langsung dan embriogenesis somatik secara tidak langsung. Embriogenesis somatik secara langsung yaitu proses pembentukan embrio somatik tanpa melalui pembentukan kalus. Embriogenesis somatik secara tidak langsung yaitu proses pembentukan embrio yang didahului oleh pembentukan kalus, kemudian kalus diinduksi menjadi embrio somatik (Trigiano dan Gray, 2011).

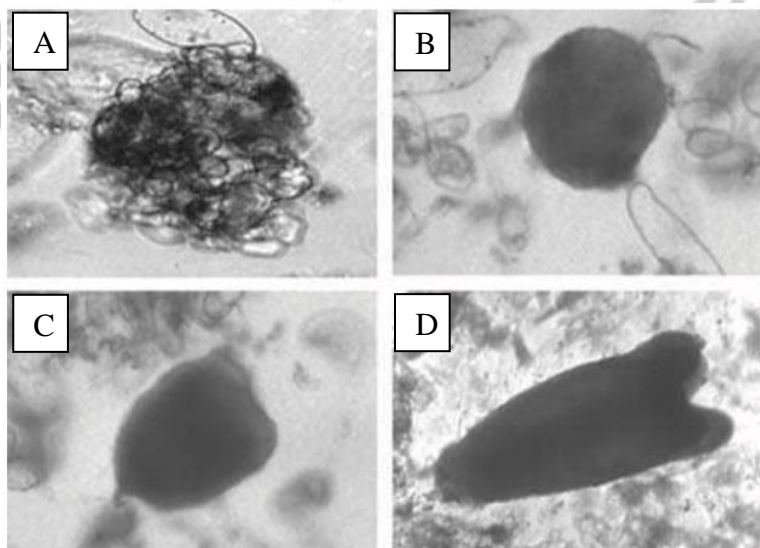
Pada proses embriogenesis somatik secara tidak langsung, kalus embriogenik dan kalus non-embriogenik dapat tumbuh secara bersamaan pada medium kultur. Kalus embriogenik dan kalus non-embriogenik memiliki sifat dan morfologi yang berbeda. Kalus non-embriogenik merupakan kalus yang terus membelah membentuk masa sel yang tidak terdiferensiasi, kalus ini dapat bersifat meremah maupun kompak serta *translucent*. Kalus embriogenik memiliki ukuran yang relatif kecil, permukaan yang halus, bentuknya isodiametris, vakuola yang kecil dan dinding sel lebih tebal (Trigiano dan Gray, 2011).

Berdasarkan penelitian Gaber dan Barakat (2019), kalus embriogenik tanaman kaca piring memiliki morfologi meremah berwarna kehijauan dan kekuningan. Perbandingan kalus embriogenik dan kalus non-embriogenik pada tanaman *Gossypium hirsutum* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Perbandingan Kalus Embriogenik dan Non-Embriogenik (A) Kalus Embriogenik *Gossypium hirsutum*; (B) Kalus Non-Embriogenik *Gossypium hirsutum* (Sumber: Trigiano dan gray, 2011).

Menurut Mastuti (2017), perkembangan embrio somatik pada tanaman dikotil terdiri atas empat tahap, yaitu tahap globular, bentuk hati, bentuk torpedo, dan kotiledon. Perkembangan embrio somatik dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Perkembangan Embrio Somatik Wortel pada Kultur Suspensi sel. (A) PEMs (B) Tahap Globular (C) Tahap Hati (D) Tahap Torpedo (Sumber: Naeumann dkk., 2009)

Embrio somatik dapat dimanfaatkan dalam perbanyakan tanaman dan pembuatan *synthetic seed* (Trigiano dan gray, 2011), selain itu embrio somatik dapat digunakan sebagai target transformasi genetik. Penggunaan embrio somatik sebagai target transformasi memiliki keuntungan berupa kondisi genetik yang seragam, jarang terbentuk *chimera*, dan mudah berproliferasi (Li dkk., 2002). Embrio somatik dapat tumbuh menjadi tanaman utuh sehingga akan diperoleh tanaman transforman (Jackson dkk., 2003)

Kalus non-embriogenik juga dapat dimanfaatkan sebagai target transformasi. Namun, kalus transforman perlu diinduksi menjadi *plantlet* melalui proses organogenesis untuk mendapatkan tanaman transforman (Jackson dkk., 2003). Abdalat dkk. (2011), melakukan transformasi pada kalus yang berasal dari eksplan internodus tanaman *Crataegus aronia* dan didapatkan hasil efisiensi transformasi sebesar 18,8%. Hwang dkk. (2019), melakukan transformasi pada kalus *Mesembryanthemum crystallinum* dan didapatkan frekuensi transformasi 3%

#### **D. Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)**

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) merupakan molekul yang dapat memberikan efek tertentu pada berbagai jenis tanaman pada konsentrasi tertentu. ZPT yang terdapat secara alami dikenal sebagai fitohormon, terdapat pula ZPT sintetis yang dapat digunakan dan menunjukkan efek yang kuat. ZPT terbagi atas lima golongan yaitu auksin, sitokinin, giberelin, asam absisat dan etilen. ZPT yang berperan



penting dan umum digunakan dalam kultur *in vitro* adalah auksin dan sitokinin (Trigiano dan gray, 2011).

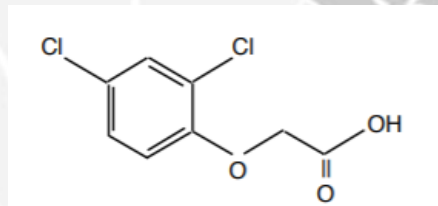
Auksin merupakan fitohormon yang dapat memicu pembelahan dan pemanjangan sel (Song, 2013). Auksin digunakan dalam kultur *in vitro* berfungsi untuk memicu pembentukan kalus dan embrio somatik. Auksin alami yang dapat digunakan dalam kultur *in vitro* yaitu *Indole-3-butyric acid (IBA)* dan *Indole-3-acetic acid (IAA)*, sedangkan auksin sintetik yang dapat digunakan yaitu 2,4-D dan pikloram (Trigiano dan gray, 2011).

Sitokinin merupakan hormon yang mampu merangsang sitokinesis atau pembelahan sel (Campbell dkk., 2003). Sitokinin juga dapat menginisiasi pertumbuhan tunas pada kultur *in vitro*. Sitokinin yang sering ditambahkan dalam medium kultur *invitro* antara lain yaitu kinetin, zeatin, dan benzilaminopurin, *Thidiazuron (TDZ)* dan *Isopentenyl adenine (2iP)*(Trigiano dan gray, 2011).

Medium yang diberi penambahan auksin dan sitokinin secara bersamaan pada konsentrasi tertentu dapat mempengaruhi pertumbuhan eksplan. Konsentrasi auksin yang lebih tinggi dibanding sitokinin dapat menginduksi pembentukan akar, sedangkan konsentrasi auksin yang lebih rendah dibanding sitokinin dapat menginduksi pembentukan tunas. Medium dengan konsentrasi sitokinin dan auksin yang sama besar akan menginduksi pembentukan kalus (Trigiano dan gray, 2011).

### E. 2,4-Diklorofenoksi Asetat (2,4-D)

2,4-diklorofenoksi asetat merupakan herbisida dengan sifat fisik berbentuk kristal, berwarna putih kekuningan dan tidak berbau. Senyawa ini larut dalam air, memiliki sifat yang stabil, dan tahan terhadap proses pemanasan (Kim dkk., 2019) serta tidak mudah terdegradasi oleh enzim yang dihasilkan sel tanaman (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Struktur 2,4-D dapat dilihat pada Gambar 4



Gambar 4. Struktur 2,4-diklorofenoksi asetat (Sumber: Cox, 2005).

Senyawa ini memiliki struktur yang analog dengan auksin natural yaitu IAA serta mampu meniru auksin alami dalam level molekular (Song, 2013). 2,4-D mampu memicu pembelahan sel secara terus menerus bahkan mampu memicu level pembelahan sel yang lebih tinggi dibandingkan sel tanaman yang tidak diberi perlakuan auksin (Campanoni dan Nick, 2005). Penambahan 2,4-D ke dalam medium kultur dapat menginduksi pembentukan kalus dan embriogenesis somatik (Bhojwani dan Razdan, 1996).

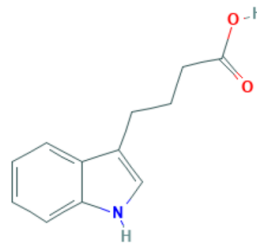
Pengetahuan mengenai mekanisme kerja hormon dalam menginduksi kalus embriogenik masih terbatas. Hal ini dikarenakan keterbatasan dalam mengidentifikasi sel somatik yang akan berubah menjadi embrio. Analisis

transkriptomik pada embrio somatik dilakukan untuk mengetahui kandidat gen yang terlibat dalam proses ini (Hernandez dkk., 2019).

Pembentukan embrio somatik dipengaruhi oleh sinyal endogen dan pemrograman ulang oleh gen tertentu. Auksin diketahui menyebabkan ekspresi gen tertentu yang mengakibatkan sel yang telah terprogram untuk membentuk suatu jaringan yang spesifik mengalami pemrograman ulang atau dediferensiasi, sehingga sel akan terus membelah, membentuk kalus dan dapat bertransisi membentuk embrio somatik. Pada embrio somatik *Arabidopsis*, diketahui terdapat 23 gen ARF (*auxin response factor*) yang diekspresikan, pada embrio somatik kapas terdapat lebih dari 80 gen terkait metabolisme auksin yang diekspresikan (Hernandez dkk., 2019; George dkk., 2008).

#### **F. *Indole-3-Butyric Acid (IBA)***

*Indole-3-Butyric Acid (IBA)* merupakan auksin dengan sifat yang lebih lemah dibandingkan 2,4-D dan mobilitasnya di dalam tanaman rendah (Hendaryono dan Wijayani, 1994). *IBA* memiliki sifat fisik berupa kristal berwarna putih kekuningan dan tidak berbau. *IBA* dapat larut dalam air dan bersifat sangat stabil pada medium dengan pH netral, asam maupun basa (Kim dkk., 2019). Struktur kimia *IBA* dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur Kimia *Indole-3-Butyric Acid* (Sumber: Kim dkk., 2019).

*Indole-3-Butyric Acid* digunakan dalam pembentukan akar pada tanaman. Kemampuan *IBA* lebih baik dibandingkan *IAA* untuk menginduksi perakaran. Tanaman mampu mengkonversi *IBA* menjadi *IAA* melalui mekanisme oksidasi asam lemak di dalam peroksisom (Davies, 2010).

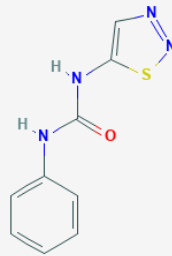
Penggunaan *IBA* yang dikombinasikan dengan auksin atau sitokinin lain akan memberi hasil yang lebih baik dalam menginduksi kalus embriogenik dibandingkan penggunaan *IBA* secara tunggal (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Berdasarkan penelitian Chen dkk. (2002), penggunaan *IBA* sebagai hormon tunggal dapat menginduksi kalus embriogenik, namun penambahan kinetin pada konsentrasi tertentu dapat mendukung efek dari *IBA* sehingga meningkatkan pembentukan kalus embriogenik.

### **G. Thidiazuron (TDZ)**

*Thidiazuron* merupakan turunan senyawa urea yang dapat digunakan sebagai Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) (Lu, 1993). TDZ memiliki sifat fisik berupa kristal tak berwarna dan tak berbau (Kim dkk., 2019). TDZ awalnya digunakan sebagai *defoliant* (penggugur daun) pada tanaman kapas. Namun, TDZ terbukti

mampu memberi efek yang mirip seperti sitokinin pada konsentrasi yang rendah, sekitar 10pM (Trugiana dan Gray, 2011).

*Thidiazuron* merupakan sitokinin yang kuat, penggunaan TDZ dengan konsentrasi 0,05-0,1  $\mu$ M memiliki keaktifan yang lebih tinggi dibandingkan BA (*Benzyladenine*) dengan konsentrasi 4-10  $\mu$ M (Trigiano dan gray, 2011). Menurut Thomas dan Katterman (1986), TDZ mampu menghambat proses degradasi sitokinin dan menginduksi sintesis sitokinin endogen. Struktur TDZ dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur Kimia *Thidiazuron* (Sumber: Kim dkk., 2019)

*Thidiazuron* juga dapat meniru efek yang sama seperti auksin, yaitu dapat menginduksi kalus dan embriogenesis somatik (Trigiano dan gray, 2011). TDZ memodulasi level hormon auksin dan sitokinin endogen dalam embriogenesis somatik (George dkk., 2008). Konsentrasi TDZ yang digunakan untuk menginduksi embriogenesis somatik sangatlah beragam tergantung dari eksplan yang digunakan dan hormon tumbuhan lainnya (Ahmad dan Faisal, 2018).

Penelitian Rughla dan Jones (1998), menunjukkan bahwa penggunaan TDZ 1  $\mu$ M mampu menginduksi embrio somatik dari segmen nodal *Santalum*

*album* dan *Santalum spicatum* dengan frekuensi 100%. Penelitian Chhabra dkk. (2009), menunjukkan bahwa penggunaan TDZ dengan konsentrasi 2,5-15  $\mu\text{M}$  mampu menginduksi embriogenesis somatik pada eksplan *Lens culinaris*.

#### **H. Plasmid pTA7002 dan gen *AtRKD4***

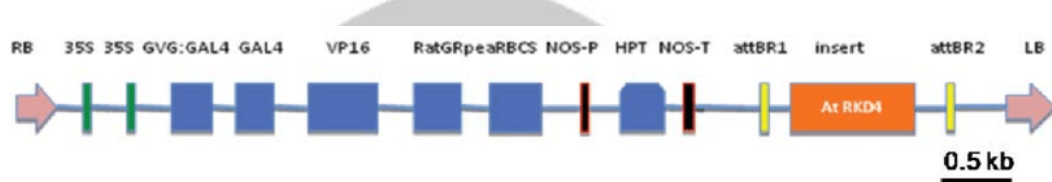
Plasmid merupakan molekul *DNA* sirkular yang berantai ganda dan bereplikasi secara autonomi (Nugroho dan Rahayu, 2018). Kemampuan plasmid untuk bereplikasi secara mandiri dikarenakan plasmid memiliki sekuen *origin of replication* (titik ori) yang mengatur replikasi plasmid pada sel inang. Plasmid memiliki ukuran yang beragam dengan rentang kurang dari 1 kb hingga 500 kb (Glick dkk., 2010).

Plasmid pTA7002 merupakan plasmid biner yang dikembangkan oleh Aoyama dan Chua (Aoyama dan Chua, 1997). Plasmid pTA7002 memiliki daerah *T-DNA* yang membawa gen *hpt*, gen *AtRKD4* dan promotor CaMV 35S. Gen *hpt* merupakan gen yang mengkode protein *hygromisin phosphotransferase* yang berperan dalam sifat resistensi higromisin (Mursyanti dkk., 2015).

*Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) 35S promotor, merupakan promotor kuat yang diisolasi dari virus dan digunakan pada tanaman. Aktivitas dari promotor ini tidak terpengaruh oleh faktor lingkungan, jenis jaringan tanaman, dan spesies tanaman inang (Trigiano dan gray, 2011). Promotor kuat merupakan promotor yang memiliki afinitas yang tinggi terhadap *RNA* polimerase yang dapat meningkatkan transkripsi gen pada region *downstream*. CaMV 35S promotor

dimanfaatkan dalam transformasi genetik untuk meningkatkan ekspresi gen target pada tanaman transgenik (Glick dkk., 2010). Aktivitas promotor ini diinduksi oleh senyawa deksametason (Aoyama dan Chua, 1997).

Struktur T-DNA 35S::GAL4::AtRKD4::GR dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Struktur T-DNA 35S::GAL4::AtRKD4::GR ( Sumber: Mursyanti dkk., 2015).

Gen *AtRKD4* merupakan gen yang diisolasi dari *Arabidopsis thaliana* dan mengkode faktor transkripsi yang melakukan regulasi embriogenesis berupa pola pembelahan sel pada awal embrio zigotik. Gen ini diekspresikan dalam periode waktu yang singkat, mulai dari terbentuknya zigot hingga tahap awal embrio. Gen *RKD4* yang tidak berfungsi dengan baik dapat menyebabkan kecacatan pada embrio seperti elongasi zigot yang terhambat dan pola pembelahan sel yang abnormal (Waki dkk., 2011).

Gen *RKD4* mampu menginduksi embriogenesis sel somatik. Tanaman *Arabidopsis* yang telah disisipi gen *indrKD4ox* dan diberi perlakuan deksametason menunjukkan pertumbuhan struktur yang mirip seperti embrio pada akar *Arabidopsis*, kemudian dilakukan pengecatan yang menunjukkan bahwa sel-sel yang tumbuh bersifat embriogenik. Hasil ini menunjukkan bahwa sel somatik dapat diinduksi menjadi bersifat embriogenik dengan adanya ekspresi gen *RKD4* (Waki dkk., 2011). Mursyanti dkk. (2015), menyisipkan gen *AtRKD4* pada

protokorm *Phalaenopsis* dan berhasil menginduksi embrio somatik dari daun yang ditumbuhkan pada medium NP tanpa penambahan hormon.

### **I. Polymerase Chain Reaction (PCR)**

*Polymerase Chain Reaction* merupakan metode yang digunakan untuk memperbanyak sekuen *DNA* di luar sel. Perbanyak sekuen *DNA* dilakukan melalui tiga tahapan utama yaitu denaturasi, *annealing*, dan elongasi (Yuwono, 2005). Denaturasi merupakan tahap untai *DNA* terdenaturasi dengan suhu yang tinggi, sekitar 95°C. Tahap *annealing* merupakan tahap penempelan primer pada *DNA template*, suhu pada tahap turun menjadi sekitar 55°C. Elongasi merupakan tahap terakhir dalam siklus *PCR*, yaitu tahap pemanjangan rantai *DNA* baru, oleh *DNA* polimerase dan suhu pada tahap ini berkisar pada 75°C (Glick dkk., 2010).

Perbanyak sekuen *DNA* dengan metode *PCR* memerlukan beberapa komponen esensial berupa primer, *DNA template*, *DNA* polimerase, dan deoksiribonukleotida. Primer merupakan sepasang oligonukleotida yang komplementer pada ujung 3' dari kedua rantai *DNA*, primer menyediakan gugus hidroksil bebas pada ujung 3' sehingga *DNA* polimerase dapat menempelkan basa nitrogen. *DNA template* merupakan sekuen *DNA* yang terdapat pada sampel dan berperan sebagai cetakan untuk membuat rantai *DNA* baru. Deoksiribonukleotida terdiri atas basa nitrogen timin, sitosin, adenin, dan guanin. *DNA* polimerase berfungsi untuk menempatkan nukleotida pada posisi yang tepat sehingga menghasilkan untai *DNA* baru yang persis seperti *template* (Glick dkk., 2010).



*DNA* polimerase yang stabil pada suhu tinggi dibutuhkan dalam proses *PCR*. Taq polimerase merupakan *DNA* polimerase yang sering digunakan karena memiliki sifat stabil pada suhu tinggi dan bekerja secara optimal pada suhu 75°C. Taq polimerase diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* (Glick dkk., 2010). Menurut Toyobo (2019), selain Taq polimerase, Kod polimerase juga dapat digunakan dalam proses *PCR*. Kod polimerase diisolasi dari bakteri hipertermofilik *Thermococcus kodakaraensis*. Kod polimerase mampu menekan tingkat kesalahan proses *PCR* hingga 10 kali lebih rendah dibandingkan Taq polimerase.

Aplikasi *PCR* dalam *screening* koloni bakteri yang telah disisipi gen target digunakan secara luas. Bakteri yang tumbuh pada medium seleksi perlu dikonfirmasi keberadaan gen dalam sel bakteri. *PCR* koloni merupakan metode yang dapat digunakan. Berbeda dengan *PCR* pada umumnya yang memerlukan *DNA template* dengan kemurnian yang tinggi, *PCR* koloni tidak memerlukan tahap isolasi dan purifikasi *DNA*. *PCR* koloni dapat dilakukan dengan mengusap koloni tunggal bakteri sehingga diperoleh sel-sel bakteri dan mencampurkan sel-sel tersebut pada *PCR* mix dan dapat langsung di *PCR* (Woodman, 2008).

#### **J. Transformasi Genetik dan *Agrobacterium tumefaciens***

Transformasi genetik tanaman merupakan kegiatan transfer gen asing baik yang diperoleh dari bakteri, hewan, virus, dan tanaman ke dalam sel tanaman. Tujuan dilakukan transformasi yaitu agar gen yang diinsersikan dapat terintegrasi

dalam *DNA* genom dan terekspresi sesuai dengan sifat yang diharapkan. Metode yang dapat digunakan untuk transformasi genetik berupa mikroinjeksi, makroinjeksi, biolistik, dan transformasi dengan perantara *A. tumefaciens* (Nugroho dan Rahayu, 2018).

Menurut Setti dan Bencheikh (2013), *Agrobacterium tumefaciens* merupakan bakteri Gram negatif dan bersifat aerob. Bakteri ini memiliki sel berbentuk batang pendek, motil, dan menunjukkan hasil positif pada uji katalase, dan uji fermentasi karbohidrat (sukrosa, mannitol, sorbitol, inositol, glukosa). Koloni *A. tumefaciens* memiliki bentuk sirkular, *convex* dan memiliki permukaan yang mengkilap dengan diameter koloni 1-1,5 mm pada jam ke-48 setelah inokulasi. *A. tumefaciens* tumbuh secara optimal pada suhu 25-28°C.

*Agrobacterium tumefaciens* merupakan fitopatogen yang dapat menginfeksi sel tanaman dan mengintegrasikan materi genetiknya pada genom tanaman. Sifat ini menyebabkan pembentukan *crown gall tumor* yang dapat mengganggu pertumbuhan tanaman inang (Glick dkk., 2010). Kemampuan ini disebabkan oleh plasmid Ti yang terdapat pada bakteri. Plasmid Ti mengandung bagian yang dapat ditransfer dan terintegrasi pada genom tanaman inang yang disebut T-DNA (Gelvin, 2003).

Mekanisme kerja *A. tumefaciens* dalam transformasi genetik diawali dengan bagian tanaman yang mengalami luka akan mengeluarkan komponen fenolik berupa asetosiringone yang dikenali oleh *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* akan menempel pada bagian sel tanaman yang mengalami luka dan membentuk

jaringan yang terdiri atas fibril selulosa sehingga *A. tumefaciens* dapat melekat erat pada permukaan sel tanaman. Gen virulensi (*vir*) yang terdapat pada plasmid Ti yang dibawa *A. tumefaciens* akan terinduksi dan memproduksi enzim restriksi yang memotong daerah *left* dan *right border* T-DNA. T-DNA yang telah terpotong akan dipindahkan dari sel *A. tumefaciens* menuju sel tanaman dan terintegrasi pada genom tanaman (Glick dkk., 2010).

Transformasi genetik yang diperantarai *A. tumefaciens* dipergunakan secara luas pada berbagai spesies tanaman dan jaringan eksplan. Pengembangan galur terus dilakukan untuk menghasilkan sifat virulensi yang tinggi dan penelitian mengenai optimasi kondisi transformasi terus berlanjut untuk meningkatkan keberhasilan transformasi genetik (Trigiano dan gray, 2011). *A. tumefaciens* EHA105 merupakan salah satu galur yang umum digunakan dalam transformasi genetik. Penelitian Pratheesh dkk. (2012) membandingkan penggunaan *A. tumefaciens* strain EHA101, EHA105, dan LBA4404 untuk transformasi genetik pada alga *Chlamydomonas*. Hasil yang didapat bahwa *A. tumefaciens* galur EHA105 memiliki tingkat efisiensi dan frekuensi transformasi yang paling tinggi dengan jumlah koloni yang tumbuh pada medium selektif sebanyak 14 koloni, sedangkan alga yang ditransformasi menggunakan *A. tumefaciens* EHA101 dan LBA4404 adalah sebanyak 6 dan 7 koloni.

## K. Lama Waktu Infeksi

Infeksi merupakan tahap dalam transformasi genetik yang target transformasinya diinkubasi dalam suspensi *A. tumefaciens* dalam periode waktu tertentu (Gnasekaran dkk., 2014). Waktu infeksi yang optimal untuk setiap eksplan bervariasi tergantung pada eksplan yang digunakan. Hal ini disebabkan karena sensitivitas eksplan terhadap *A. tumefaciens* bervariasi (Duan dkk., 2013). Sensitivitas eksplan terhadap infeksi *A. tumefaciens* dapat dipengaruhi beberapa faktor, diantaranya yaitu dinding sel eksplan dan genotip eksplan yang digunakan (Malinovsky dkk., 2014).

Dinding sel tanaman berperan untuk memberi struktur sel dan berperan dalam mekanisme pertahanan sel tanaman. Dinding sel tanaman umumnya tersusun atas selulosa, hemiselulosa, pektin, dan lignin. Komposisi komponen dapat bervariasi tergantung pada jaringan dan spesies tanaman. Selain itu, eksplan yang berasal dari spesies yang berbeda akan memiliki genotip reseptor yang berbeda juga. Perbedaan komposisi komponen penyusun dinding sel, serta perbedaan genotip reseptor dapat memengaruhi afinitas dan level kerentanan spesies tersebut terhadap infeksi *A. tumefaciens* (Malinovsky dkk., 2014; Trigiano dan Gray, 2011).

Berdasarkan penelitian Ma dkk. (2015), didapatkan hasil bahwa waktu infeksi *A. tumefaciens* terhadap kotiledon tomat adalah selama 20 menit. Penelitian Song dkk. (2019) mengenai transformasi genetik pada tanaman hybrid *Populus alba* x *Populus glandulosa*, didapatkan waktu infeksi oleh *A. tumefaciens* yang

optimal adalah 15 menit. Penelitian Sukamto dkk. (2017) mengenai waktu infeksi *A. tumefaciens* EHA105 pada kalus daun nilam, dan didapatkan waktu infeksi terbaik adalah 10 menit.

Waktu infeksi yang terlalu singkat dapat mengakibatkan frekuensi transformasi yang rendah. Waktu infeksi yang terlalu lama menyebabkan *A. tumefaciens* tumbuh dalam jumlah yang berlebih (Qianru dkk., 2017) dan dapat menyebabkan kondisi hipertonik yang mengakibatkan sel pecah. Waktu infeksi yang terlalu lama juga dapat menyebabkan hiper-aktivasi mekanisme pertahanan yang dapat bersifat letal bagi sel yang memicu nekrosis atau kematian sel (Mannan dkk., 2009). Oleh karena itu perlu dilakukan optimasi waktu infeksi pada target transformasi untuk mengetahui waktu infeksi yang optimal dan frekuensi transformasi yang tinggi (Sukamto dkk., 2017).

#### **L. Hipotesis**

1. Penambahan hormon 2,4-D (1, 2 dan 3 ppm), kombinasi hormon TDZ 1,5 ppm dan *IBA* 1,5 ppm serta kombinasi hormon TDZ 2 ppm dan *IBA* 1,5 ppm dapat menginduksi kalus dari eksplan daun tanaman kaca piring dengan morfologi meremah.
2. Lama waktu infeksi *A. tumefaciens* EHA 105 yang optimal untuk transfer gen *AtRKD4* pada kalus tanaman kaca piring adalah 15 menit.

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### A. Simpulan

Berdasarkan penelitian pengaruh lama waktu infeksi terhadap frekuensi transformasi gen *AtRKD4* pada tanaman kaca piring yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Kombinasi hormon TDZ dan *IBA* tidak dapat menginduksi kalus dari eksplan daun kaca piring. Hormon 2,4-D (1, 2 dan 3 ppm) dapat menginduksi kalus dengan morfologi meremah dan berwarna kekuningan dari eksplan daun kaca piring.
2. Lama waktu infeksi yang paling baik untuk meningkatkan frekuensi transformasi pada tanaman kaca piring adalah 15 menit.

### B. Saran

Saran yang diajukan untuk penelitian lanjutan terkait transformasi gen *AtRKD4* pada tanaman kaca piring, yaitu:

1. Memastikan sifat embriogenik kalus kaca piring dengan pengamatan histologis.
2. Pemilihan berbagai kultivar tanaman kaca piring sebagai eksplan untuk melihat kemampuan setiap kultivar dalam menginduksi kalus embriogenik.
3. Penelitian lanjutan berupa regenerasi kalus transforman menjadi tanaman transgenik, serta melihat ekspresi gen *AtRKD4* pada tanaman transgenik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdalatt, A. M. A., Sawwan, J. S. dan Zoubi, B. A. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of callus cells of *Crataegus aronia*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 104: 31-29.
- Ahmad, N. dan Faisal, M. 2018. *Thidiazuron: From Urea Derivate to Plant Growth Regulator*. Springer Nature Singapore, Singapore. Halaman 22, 104, 221, 284.
- Ahsan, N., Lee, S. H., Lee, D. G., Anisuzzaman, M., Alam, M. F., Yoon, H. S., Choi, M. S., Yang, J. K., dan Lee, B. H. 2007. The effects of wounding type, preculture, infection method and cocultivation temperature on the *Agrobacterium*-mediated gene transfer in tomatoes. *Annals of Applied Biology* 151: 363-372.
- Alimohammadi, M. dan Najjar, M. B. B. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: basic principles and influencing factors. *African Journal of Biotechnology* 8(20): 5142-5148.
- Alves, S. C. Worland, B. Thole, V. Snape, J. W. Bevan, M. W., dan Vain, P. 2009. A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brachypodium distachyon* community standard line Bd21. *Nature protocols* 4(5): 638 - 649.
- Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aesaert, S., dan Lijsebettens, M. V. 2013. Higher plant transformation: principles and molecular tools. *The International Journal of Developmental Biology* 57: 483-494.
- Aoyama, T. dan Chua, N. H. 1997. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal* 11(3): 605-612.
- Bhojwani, S. S. dan Razdan, M. K. 1996. *Plant Tissue Culture : Theory and Practice*. Elsevier, New Delhi. Halaman 10 dan 135.
- Budiani, A., Chaidamsari, T., Priyono., Mawardi, S., dan Siswanto. 2000. Transformation of *Coffe arabica* using chitinase gene and regeneration of plantlets from transformed-zygotic embryos. *Menara Perkebunan* 68(2) : 1-10.
- Campanoni, P. dan Nick, P. 2005. Auxin-dependent cell division and cell elongation 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology* 137(3): 939-948.
- Campbell, N. A., Reece, J. B. dan Mitchell, L. G. 2003. *Biologi*. Erlangga, Jakarta. Halaman 382, 383.

- Cappuccino, J. G. dan Sherman, N. 2014. *Microbiology A laboratory Manual*. Pearson, New York. Halaman 19, 29, 75, 76, 161, 163,
- Chen, H., Guo, A., Lu, Z., Tan, S., Wang, J., Gao, J., Zhang, S., Huang, X., Zheng, J., Xi, J., dan Yi, K. 2019. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of a hevein-like gene into asparagus leads to stem wilt resistance. *Plos one* 14(10): 1-15.
- Chen, M. Y., Zhang, X. L., Nie, Y. C. Wu, J. H. 2002. Study on improvement of plant regeneration technology of upland cotton. *Acta Cotton Sinica* 14: 344-347.
- Chhabra, G., Chaudhary, D., Varma, M., Sainger, M., dan Jaiwal, P. K. 2009. TDZ induced direct shoot organogenesis and somatic embryogenesis on cotyledonary node explants of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Physiology and Molecular Biology Plants* 14(4): 347-353.
- Chin, D.P., Mishiba, K.I. dan Mii, M. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Cymbidium*. *Plant cell reports* 26(6): 735-743.
- Cox, C. 2005. Herbicide factsheet 2,4-D. *Journal of Pesticide Reform* 25(4): 10-15.
- Davies, P. J. 2010. *Plant Hormones Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. Springer, New York. Halaman 34,40.
- Duan, H. Y., Ding, X. S., Song, J. Y., He, Y. L., dan Zhou, Y. Q. 2013. Plant regeration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Achyranthes bidentata* using cotton *EREBP* gene. *Brazilian Archieves of Biology and Technology* 56(3): 349-356.
- Dwiyani, R., Yuswanti, H., Darmawayi, I. A. P., dan Mayadewi, N. N. A. 2016. *Transformasi Genetik pada Tanaman Melalui Agrobacterium tumefaciens*. Swasta Nulus, Denpasar. Halaman 17.
- Farzinebrahimi, R., Taha, R. M., Rashid, K., dan Yaacob, J. S. 2014. The effect of various media and hormones via suspension culture on secondary metabolic activities of (cape jasmine) *Gardenia jasminoides* Ellis. *Scientific World Journal* 2014: 1-7.
- Gaber, M. K. dan Barakat, A. A. 2019. Micropropagation and somatic embryogenesis induction of *Gardenia jasminoides* plants. *Alexandria Science Exchange Journal* 40(1): 190-200.
- Gabr, A. M. M., Arafa, N. M., El-Ashry, A. E., dan Bahr, M. K. E. 2017. Impact of zeatin and thidiazuron on phenols and flavonoids accumulation in callus cultures of *Gardenia* (*Gardenia jasminoides*). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 20(7): 328-335.



- Gelvin, S. B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation : the biology behind the gene-jockeying tool. *Microbiologi Molecular Biology Reviews* 67(1): 16-37.
- George, E. F., Hall, M. A. dan Klerk, G. J. D. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Netherlands. Halaman 49, 50, 186, 343
- Glick, B. R., Pasternak, J. J. dan Patten, C. L. 2010. *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*. ASM Press, Washington. Halaman 47, 67, 109, 726, 727, 731, 744.
- Glowacka, K. dan Jezowski, S. 2009. Genetic and non-genetic factors influencing callus induction in *Mischanthus sinensis* (Anderss.) anther cultures. *Journal of Applied Genetics* 50(4): 341-345.
- Gnasekaran, P., Antony, J. J. J., Uddain, J., dan Subramaniam, S. 2014. *Agrobacterium*-mediated transformation of the recalcitrant *Vanda kasem*'s delight orchid with higher efficiency. *The Scientific World Journal* 2014: 1-10.
- Han, J., Zhang, W., Cao, H., Chen, S., dan Wang, Y. 2007. Genetic diversity and biogeography of the traditional chinese medicine, *Gardenia jasminoides*, based on AFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 35(3): 138-145
- Haruna, M. K., Aguori, C. U., Iheukwumere, C. C., Ogbonna, C. I. C., dan Addy, J. 2019. In vitro callus induction potentials of wheat genotypes using mature embryo as explant source under different levels of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *The Pharmaceutical and Chemical Journal* 6(3): 69-76
- Hendaryono, D. P. S. dan Wijayani, A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta. Halaman 63
- Hernandez, H. A. M., Rodriguez, M. L., Montalvo, R. N. A., Gomez, Y. L. J., Skeete, A., Montalvo, J. A., Pena, C. D. L., dan Vargas, V. M. L. 2019. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science* 10(77): 1-15.
- Hwang, H. H., Wang, C. H., Chen, H. H., Ho, J. F., Chi, S. F., Huang, F. C., dan Yen, H. E. 2019. Effective *Agrobacterium*-mediated transformation protocols for callus and roots of halophyte ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*). *Botanical Studied* 60(1): 1-15.
- Jackson, J. F., Linskens, H. F. dan Inman, R. B. 2003. *Genetic Transformation of Plants*. Springer, New York. Halaman 46.

- Jarvis, C. E., DuVal, A. dan Crane, P. R. 2014. *Gardenia jasminoides* a traditional chinese dye plant becomes a garden ornamental in Europe. *Curtis's Botanical Magazine* 31(1): 80-98.
- Jhinjer, R. K., Bains, N. S. dan Gosal, S. S. 2017. Identification of selective agents concentrations for optimal plant regeneration from transformed calli and immature embryos in wheat. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(7): 2454-2461.
- Johan, R. 2018. Efek Variasi Waktu Infeksi Terhadap Frekuensi Transformasi Gen *AtRKD4* pada Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus*) dengan Perantara *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105. *Skripsi S1*. Fakultas Teknobiologi. Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Yogyakarta.
- Juboory, K. H. A., Skirvin, R. M., Williams, D. J. 1997. Callus induction and adventitious shoot regeneration of gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) leaf explants. *Science Horticulturae* 72(1998): 171-178.
- Khan, S., Fahim, N., Singh, P., dan Rahman, L. U. 2015. *Agrobacterium tumefaciens* mediated genetic transformation of *Ocimum gratissimum*: a medicinally important crop. *Industrial Crops and Products* 71: 138-146.
- Kim, S., Chen, J., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., dan Bolton, E. E. 2019. Pubchem 2019 update: improved acces to chemical data. *Nucleic Acids Research* 47(D1): 1102-1109.
- Kuta, D. D. dan Tripathi, L. 2005. *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *African Journal of Biotechnology* 4(8): 752-757.
- Lee, L. Y. dan Gelvin, S. B. 2008. T-DNA binary vectors and systems. *Plany Physiology* 146(2): 325-332.
- Li, D. D., Shi, W. dan Deng, X. X. 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic calluses of ponkan mandarin and the regeneration of plants containing the chimeric ribonuclease gene. *Plant Cell Reports* 21(2): 153-156.
- Lim, T. K. 2014. *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*. Springer, New York. Halaman 705 dan 707.
- Lu, C.Y. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 29(2): 92-96.
- Ma, J., Liu, T. dan Qiu, D. 2015. Optimatization of *Agrobacterium*-mediated transformation conditions for tomato (*Solanum lycopersium* L.) *Plant Omics Journal* 8(6): 529-536.

- Magdum, S. S. 2013. Effect of *Agrobacterium* induced necrosis, antibiotic induced phytotoxicity and other factors in successful plant transformation. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry* 9(3): 99-112.
- Malinovsky, F. G., Fangel, J. U. dan Willats, W. G. T. 2014. The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science* 5(178): 1-12.
- Mannan, A., Syed, T. N. dan Mirza, B. 2009. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Artemisia absinthium* L. *Pakistan Journal of Botany* 41(6): 3239-3246.
- Masters, A., Kang, M., McCaw, M., Zobrist, J. D., Kamm, W. G., Jones, T., dan Wang, K. 2020. *Agrobacterium*-mediated immature embryo transformation of recalcitrant maize inbred lines using morphogenic genes. *Journal of Visualized Experiments* 156: 1-11.
- Mastuti, R. 2017. *Dasar-Dasar Kultur Jaringan Tumbuhan*. Universitas Brawijaya Press, Malang. Halaman 27 dan 46.
- Mendonca, E. G., Stein, V. C., Balieiro, F. P., Lima, F. C. D., Santos, B. R., dan Paiva, E. L. V. 2013. Genetic transformation of *Eucalyptus camaldulensis* by agrobacterial method. *Revista Arvore* 37(3): 419-429.
- Mursyanti, E., Purwantoro, A., Moeljopawiro, S., dan Semiarti, E. 2015. Induction of somatic embryogenesis through overexpression of *AtRKD4* genes in *Phalaenopsis sogo vivien*. *Journal of Biotechnology* 20(1): 42-53.
- Neumann, K. H., Kumar, A. dan Imani, J. 2009. *Plant Cell and Tissue Culture- A Tool in Biotechnology*. Springer, Heidelberg. Halaman 92
- Nugroho, E. D. dan Rahayu, D. A. 2018. *Pengantar Bioteknologi (Teori dan Aplikasi)*. Deepublish, Yogyakarta. Halaman 49
- Osman, N. I., Sidik, N. J. dan Awal, A. 2016. Effects of variations in culture media and hormonal treatments upon callus induction potential in endosperm explant of *Barringtonia racemosa* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6(2): 143-147.
- Pambudi, A. 2009. Teknik Transformasi Genetik beberapa Tanaman Menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *Skripsi S-1*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Phatak, R. S. 2015. Phytochemistry, pharmacological activities and intellectual property landscape of *Gardenia jasminoides* Ellis a review. *Journal of Pharmacognosy* 7(5): 254-265.
- Pratheesh, P.T., Shonima, G. M., Thomas, J., Abraham, C. I., dan Muraleedhara, K. G. 2012. Study on efficacy of different *Agrobacterium tumefaciens* strains in

- genetic transformation of microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Advances in Applied Science Research* 3(5): 2679-2686.
- Qianru, L. V., Chen, C., Xu, Y., Hu, S., Wang, L., Sun, K., Chen, X., dan Li, X. 2017. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation systems in tea plant (*Camellia sinensis*). *Horticultural Plant Journal* 3(3): 105-109.
- Rana, M. M., Han, Z. H., Song, D. P., Liu, G. F., Li, D. X., Wan, X. C., Karthikeyan, A., dan Wei, S. 2016. Effect of medium supplements on *Agrobacterium rhizogenes* mediated hairy root induction from the callus tissues of *Camellia sinensis* var. *sinensis*. *International Journal of Molecular Sciences* 17(1132): 1-18.
- Rashid, U., Ali, S., Ali, G. M., Ayub, N., dan Masood, M. S. 2009. Establishment of an efficient callus induction and plant regeneration system in Pakistani wheat (*Triticum aestivum*) cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology* 12(3): 1-1
- Reddy, M. Y. dan Saritha, K. V. 2012. Callus induction and somatic embryogenesis of *Gardenia latifolia* Ait. *International Journal of Current Science* 4: 83-89.
- Rugkhla, A. dan Jones, M. G. K. 1998. Somatic embryogenesis and plantlet formation in *Santalum album* dan *S. spicatum*. *Journal of Experimental Botany* 9(320): 563-571.
- Salim, S. A. A. R. dan Hamza, S. Y. 2017. An efficient protocol for micro propagation of *Gardenia jasminoides* Ellis. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 14(2): 757-766.
- Sayd, S. S., Taie, H. A. A. dan Taha, L. S. 2010. Micropropagation, antioxidant activity, total phenolics and flavonoids content of *Gardenia jasminoides* Ellis as affected by growth regulators. *International Journal of Academy Research* 2(3): 184-191.
- Setti, B. dan Bencheikh, M. 2013. Isolation and characterization of *Agrobacterium tumefaciens* from almond nurseries in shlef region in Western Algeria. *European Scientific Journal* 9(30): 192-198.
- Smith, R. H. 2013. *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. Elsevier, London. Halaman 47, 49, 54, 56, 58, 60, 63, 64, 94, 156.
- Song, C., Lu, L., Guo, Y., Xu, H., dan Li, R. 2019. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercial hybrid poplar *Populus alba* x *Populus glandulosa* Uyeki. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 1-9.
- Song, Y. 2013. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as a herbicide. *Journal of the Integrative Plant Biology* 56(2): 106-113.

- Sugimura, Y. dan Salvana, M. J. 1989. Induction and growth of callus derived from rachilla explants of young inflorescences of coconut palm. *Canadian Journal of Botany* 67: 272-274.
- Sugiyarto, L. dan Kuswandi, P. C. 2014. Pengaruh 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan benzyl aminopurine (BAP) terhadap pertumbuhan kalus daun binahong (*Anredera cordifolia* L.) serta analisis kandungan flavonoid total. *Jurnal Penelitian Saintek* 19(1): 23-30.
- Sukamto., Santoso, T. J., Siharmini, A., Apriana, A., Amalia., dan Sirait, N. 2017. Transformasi gen pada nilam untuk ketahanan terhadap penyakit utama menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat* 28(1):37-47.
- Sun, S., Kang, X. P., Xing, X. J., Xu, X. Y., Cheng, J., Zheng, S. W., dan Xing, G. M. 2015. *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Hezuo 908) with improved efficiency. *Agriculture and Environmental Biotechnology* 29(5): 861-868.
- Talhok, S. N., Fabian, M. dan Dagher, R. 2015. *Landscape Plant Database*. <https://landscapeplants.aub.edu.lb/Plants/PlantProfile/%20%20%20%20939db07e-7ba6-46a6-9bdf-525c75a5d89b>. Diakses pada 29 Agustus 2019.
- Thomas, J. C. dan Katterman, F. R. 1986. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiology* 81: 681-683.
- Toyobo. 2019. *Instruction Manual for KOD FX Neo 1103*. Toyobo, Osaka. Halaman 3.
- Trigiano, R. N. dan Gray, D. J. 2011. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton. Halaman 17, 18, 20, 23, 25, 46, 309, 310
- Tuskan, G. A., Mewalai, R., Gunter, L. E., Palla, K. J., Carter, K., Jacobson, D. A., Jones, P. C. Garcia, B. J., Weighill, D. A., Hyatt, P. D., Yang, Y., Zhang, J., Reis, N., Chen, J. G., dan Muchero, W. 2018. Defining the genetic components of callus formation: A GWAS approach. *PLoS One* 13(8): 1-18.
- Waki, T., Hiki, T., Wanatabe, R., Hashimoto, T., dan Nakajima, K. 2011. The *Arabidopsis* RWP-RK protein *RKD4* triggers gene expression and pattern formation in early embryogenesis. *Current Biology* 21(15): 1277-1281.
- Walawage, S. L., Leslie, C. A., Escobar, M. A., dan Dandekar, A. M. 2014. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of Walnut (*Juglans regia*). *Bio-protocol* 4(19): 1-12.
- Wang, K. 2006. *Agrobacterium protocols 2nd Ed*. Humana Press, New Jersey. Halaman 213 - 219.

- Woodman, M. E. 2008. Direct *PCR* of intact bacteria (colony *PCR*). *Current Protocols in Microbiology* 9(1): 1-6.
- Xiao, W., Li, S., Wang, S., dan Ho, C. T. 2016. Chemistry and bioactivity of *Gardenia jasminoides*. *Journal of Food and Drug Analysis* 30: 1-19.
- Yelnitis. 2012. Pembentukan kalus remah dari eksplan daun ramin (*Gonystylus bancanus* (Miq) Kurz.). *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* 6(3): 181-194.
- Yildiz, M. 2012. *Recent Advances in Plant in vitro Culture: The Prerequisite of the Success in Plant Tissue Culture High Frequency Shoot Regeneration*. IndotechOpen, London. Halaman 68
- Yong, D. S., Lin, Z. P., Qiang, W., Ling, F. H., dan Rong, W. X. 2017. Genetic diversity analysis of *Gardenia jasminoides* from different habitats based on EST-SSR markers. *Journal of Chinese Medicinal Materials* 40(10): 2275-2279.
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Erlangga, Yogyakarta. Halaman 93-108.
- Zheng, M. Y. dan Konzak, C. F. 1999. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Cell Reports* 19: 69-73.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Jadwal Kegiatan Penelitian

Tabel 8. Jadwal Kegiatan Penelitian

Kegiatan	Sept	Okt	Nov	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Juni
Pembuatan larutan stok	■								
Sterilisasi alat dan bahan	■	■	■	■	■	■			
Pembuatan medium	■	■	■	■	■	■			
Induksi kalus dari eksplan daun kaca piring	■	■	■	■	■	■			
Uji kemurnian <i>A. tumefaciens</i>					■				
Deteksi gen <i>AtRKD4</i> dan <i>hpt</i>					■				
Prekultur target transformasi					■	■			
Pembuatan Starter <i>A. tumefaciens</i>					■	■			
Infeksi Kalus kaca piring					■	■			
Kokultivasi kalus kaca piring					■	■			
Eliminasi <i>A. tumefaciens</i>					■	■			
<i>Recovery</i> dan seleksi kalus kaca piring					■	■			
Analisis data							■	■	■
Pembuatan naskah skripsi								■	■

Keterangan:

Sept : September

Mar : Maret

Okt : Oktober

Apr : April

Nov : November

Jan : Januari

Feb : Februari

*Lampiran 2. Data Induksi Kalus Menggunakan Hormon 2,4-D*

Tabel 9. Data Induksi Kalus 2,4-D 1 ppm

Nama	Berat Awal (gram)	Berat Akhir (gram)	Berat Basah (gram)	Jumlah eksplan	Hari muncul kalus				
					1	2	3	4	5
1.7.1	104,330	104,208	0,104	4	16	21	21	21	-
1.7.2	113,308	113,143	0,061	4	16	21	21	21	-
1.7.3	104,362	104,192	0,056	4	22	25	25	32	-
1.7.4	112,068	111,908	0,066	4	16	16	21	21	-
1.7.6	114,160	113,989	0,055	4	21	22	25	25	-
1.25.1	116,506	116,427	0,147	5	24	27	27	27	27
1.25.2	112,415	112,325	0,136	5	26	26	26	26	30
<b>Kontrol</b>	<b>110,740</b>	<b>110,514</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
TOTAL			0,625	30					
Rata-Rata			0,0208		23,16667				

Tabel 10. Data Induksi Kalus 2,4-D 2 ppm

Nama	Berat Awal (gram)	Berat Akhir (gram)	Berat Basah (gram)	Jumlah eksplan	Hari muncul kalus				
					1	2	3	4	5
2.7.1	104,852	104,654	0,028	4	16	16	17	21	-
2.7.2	100,396	100,278	0,108	4	18	21	21	21	-
2.7.3	108,339	108,187	0,074	4	18	21	21	22	-
2.7.5	109,054	108,911	0,083	4	16	17	21	21	-
2.7.6	104,090	103,970	0,106	4	21	21	21	21	-
2.23.1	108,574	108,465	0,117	4	23	23	25	25	-
2.25.2	114,366	114,277	0,137	5	23	23	23	23	25
<b>Kontrol</b>	<b>110,740</b>	<b>110,514</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
TOTAL			0,653	29					
Rata-Rata			0,0225		20,86207				

Tabel 11. Data Induksi Kalus 2,4-D 3 ppm

Nama	Berat Awal (gram)	Berat Akhir (gram)	Berat Basah (gram)	Jumlah eksplan	Hari muncul kalus				
					1	2	3	4	5
3.7.1	114,010	113,893	0,109	4	21	21	21	21	-
3.7.2	106,987	106,860	0,099	4	17	18	21	21	-
3.7.3	108,187	108,045	0,084	4	18	21	21	22	-
3.7.4	115,192	115,027	0,061	4	16	18	21	21	-
3.25.1	110,921	110,825	0,130	5	27	27	27	29	29
<b>Kontrol</b>	<b>110,740</b>	<b>110,514</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
TOTAL			0,483	21					
Rata-Rata			0,023		21,81				



*Lampiran 3. Data Pengulangan Transformasi Genetik Kalus Kaca Piring*

Tabel 12. Frekuensi Transformasi Genetik Kalus Kaca Piring

Waktu Infeksi	Ulangan	Jumlah Kalus yang ditransformasi	Jumlah kalus transforman	Frekuensi Transformasi	Rata-Rata Frekuensi Transformasi
15 menit	1	6	0	0	5,08%
	2	7	1	14,2857%	
	3	9	1	11,1111%	
	4	8	0	0	
	5	8	0	0	
30 menit	1	6	0	0	3,3%
	2	7	0	0	
	3	6	1	16,666667	
	4	7	0	0	
	5	7	0	0	
45 menit	1	6	0	0	0%
	2	7	0	0	
	3	7	0	0	
	4	7	0	0	
	5	8	0	0	

*Lampiran 4. Analisis Varians Hari Munculnya Kalus*

Tabel 13. Analisis Varians Hari Munculnya Kalus

	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Rata-Rata Kuadrat	F <sub>hitung</sub>	Signifikansi
Antar Kelompok	79,097	2	39,548	3,143	0,049
Dalam Kelompok	968,853	77	12,583		
Total	1047,950	79			

Tabel 14. Uji *Duncan* Hari Munculnya Kalus

Hormon	N	1	2
2,4-D 2 ppm	29	20,8621	
2,4-D 3 ppm	21	21,8095	21,8095
2,4-D 1 ppm	30		23,1667
Signifikansi		0,339	0,172

*Lampiran 5. Analisis Varians Frekuensi Transformasi Kalus Kaca Piring*

**Tabel 15. Uji ANOVA Transformasi Genetik Kalus Kaca Piring**

	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Rata-Rata Kuadrat	F <sub>hitung</sub>	Signifikansi
Antar Kelompok	66,598	2	32,299	0,950	0,414
Dalam Kelompok	420,836	12	35,070		
Total	487,434	14			

