



**TRANSFORMASI MUTAGENESIS TERARAH GEN  
PENGKODE UGTs *UPSTREAM-SITE* YANG DIMEDIASI  
*Agrobacterium tumefaciens* STRAIN LBA4404 BERBASIS  
CRISPR/*Cas9* PADA TANAMAN PADI**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**Tiffany Achita Dewi**  
**NIM. 221510501039**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN TINGGI, SAINS DAN TEKNOLOGI  
PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
JEMBER  
2026**



**TRANSFORMASI MUTAGENESIS TERARAH GEN  
PENGKODE UGTs *UPSTREAM-SITE* YANG DIMEDIASI  
*Agrobacterium tumefaciens* STRAIN LBA4404 BERBASIS  
CRISPR/*Cas9* PADA TANAMAN PADI**

**SKRIPSI**

*Diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan memperoleh gelar Sarjana  
Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember*

Oleh:

**Tiffany Achita Dewi  
NIM. 221510501039**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN TINGGI, SAINS DAN TEKNOLOGI  
PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI  
FAKULTAS PERTANIAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
JEMBER  
2026**

## PERSEMBAHAN

Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga dapat terselesaikan karya tulis ilmiah ini dengan segenap kerendahan hati, skripsi ini saya persembahkan kepada:

1. Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat LP2M Universitas Jember atas terselenggaranya penelitian ini yang merupakan bagian riset dan didanai oleh Hibah Kerja sama Internasional di Keris Budidaya Tanaman dengan ketua Hibah Bapak Mohammad Ubaidillah, S.Si., M.Agr., Ph.D.;
2. Bapak Mohammad Ubaidillah, S.Si., M.Agr., Ph.D., selaku dosen pembimbing skripsi sekaligus dosen pembimbing akademik yang sudah seperti orang tua saya sendiri dan pemilik rumah yang kami sebut "MU Research Team". Terima kasih banyak atas segala kebaikan, bantuan, kepedulian, arahan, motivasi, kritik, dan saran yang membangun selama masa kuliah, serta tidak pernah mempersulit baik dalam penelitian maupun pengerjaan skripsi hingga saya menyelesaikan skripsi ini.
3. Prof. Ir. Kacung Hariyono, M.S., Ph.D., selaku dosen penguji utama dan Ibu Tri Ratnasari, S.Si., M.Si., selaku dosen penguji anggota yang telah membantu memberikan ilmu dan evaluasi untuk menyempurnakan skripsi ini.
4. Keluarga saya, ibu saya tercinta Ibu Supatemi yang selalu bekerja keras sendiri, mengusahakan agar saya mendapatkan pendidikan yang layak hingga ke perguruan tinggi, tidak pernah membatasi mimpi-mimpi saya, serta tidak pernah menuntut saya menjadi sempurna, dan adik saya Aprilia Nur Azizah yang mana keduanya senantiasa mendoakan, memberikan semangat, motivasi, dukungan mental dan emosional, serta kasih sayang yang tulus.

**MOTTO**

*“Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya.”*

(QS. Al-Baqarah: 286)

*“Setiap kesulitan disertai kemudahan.”*

(QS. Al-Insyirah: 6)



**PERNYATAAN ORISINALITAS**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tiffany Achita Dewi

NIM : 221510501039

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa tesis yang berjudul **“Transformasi Mutagenesis Terarah Gen Pengkode UGTs *Upstream-Site* yang Dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 Berbasis CRISPR/Cas9 Pada Tanaman Padi”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam penutupan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 21 Mei 2026  
Yang menyatakan,

Tiffany Achita Dewi  
NIM. 221510501039

**HALAMAN PERSETUJUAN**

Skripsi berjudul “Transformasi Mutagenesis Terarah Gen Pengkode UGTs *Upstream-Site* yang Dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 Berbasis CRISPR/*Cas9* Pada Tanaman Padi” telah diuji dan disetujui oleh Fakultas Pertanian Universitas Jember pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 21 Mei 2026

Tempat : Fakultas Pertanian, Universitas Jember

Tanda Tangan

Pembimbing

1. Pembimbing Utama

Nama : Mohammad Ubaidillah, S.Si., M.Agr., Ph.D. (.....)

NIP : 198612112019031008

Penguji

1. Penguji Utama

Nama : Prof. Ir. Kacung Hariyono, M.S., Ph.D. (.....)

NIP : 196408141995121001

2. Penguji Anggota 1

Nama : Tri Ratnasari, S.Si., M.Si. (.....)

NIP : 198509182019032011

## RINGKASAN

**Transformasi Mutagenesis Terarah Gen Pengkode UGTs *Upstream-site* yang Dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 Berbasis CRISPR/Cas9 Pada Tanaman Padi**, Tiffany Achita Dewi, 221510501039; 2022; 57 halaman; Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Sakuranetin merupakan senyawa fitoaleksin yang diproduksi sebagai bentuk respon tanaman terhadap serangan patogen dan stres lingkungan. Sakuranetin juga memiliki fungsi lain, seperti antimikroba, antivirus, antioksidan, antidiabetik, dan antikanker. Sakuranetin disintesis melalui glikosilasi naringenin sebagai prekursor utama jalur biosintesis sakuranetin. Naringenin mudah terkonjugasi dengan gugus gula yang diregulasi oleh enzim UDP-*Glucosyltransferase* (UGTs), yang berperan dalam meningkatkan stabilitas, kelarutan, dan aktivitas biologis metabolit sekunder tersebut. Berdasarkan hal tersebut, mutasi pada UGTs penting dilakukan untuk mengubah regulasi transkripsi gen tersebut dan meningkatkan aktivitas enzim yang mengkatalisis glikosilasi naringenin menjadi sakuranetin, sehingga memperkuat mekanisme pertahanan tanaman secara efektif. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efisiensi transformasi mutagenesis berbasis CRISPR/*Cas9* sg-RNA UDP-*Glucosyltransferase* (UGTs), serta menganalisis tingkat regenerasi transforman pada beberapa varietas padi lokal. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember. Hasil penelitian dianalisis secara statistik deskriptif sederhana untuk mendapatkan gambaran tingkat regenerasi transforman dan efisiensi transformasi ke dalam genome tanaman padi. Hasil penelitian ini adalah tanaman padi putatif transforman varietas lokal Pandan Wangi, Ketan Hitam, dan Pendok, tetapi tidak dapat dikonfirmasi positif transforman karena mengalami kematian pada fase aklimatisasi. Efisiensi transformasi sebesar 0,2% pada varietas Pandan Wangi dan 0,1% pada varietas Ketan Hitam dan Pendok.

*Kata kunci* : UDP-*Glucosyltransferase*, CRISPR/*Cas9*, Sakuranetin, Rice Plant

## SUMMARY

**Targeted Mutagenesis Transformation of Upstream-site UGTs Encoding Genes Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 Based on CRISPR/Cas9 in Rice (*Oryza sativa*)**, Tiffany Achita Dewi, 221510501039; 2022; 57 pages; Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, University of Jember.

Sakuranetin is a phytoalexin compound produced as a form of plant response to pathogen attacks and environmental stress. Sakuranetin also has other functions, such as antimicrobial, antiviral, antioxidant, antidiabetic, and anticancer activities. Sakuranetin is synthesized through the glycosylation of naringenin, the main precursor in the sakuranetin biosynthesis pathway. Naringenin is easily conjugated with sugar groups regulated by the enzyme UDP-Glucosyltransferase (UGTs), which plays a role in increasing the stability, solubility, and biological activity of these secondary metabolites. Based on this, mutations in UGTs are important to change the transcriptional regulation of these genes and increase the activity of the enzyme that catalyzes the glycosylation of naringenin to sakuranetin, thereby strengthening the plant's defense mechanism effectively. This study aims to determine the efficiency of CRISPR/Cas9 sg-RNA UDP-Glucosyltransferase (UGTs)-based mutagenesis transformation, as well as to analyze the regeneration rate of transformants in several local rice varieties. This research was conducted at the Agrobiotechnology Laboratory, Faculty of Agriculture, University of Jember. The results were analyzed using simple descriptive statistics to obtain an overview of the regeneration rate of transformants and the efficiency of transformation into the rice genome. The results of this study were putative transformant rice plants of the local varieties Pandan Wangi, Ketan Hitam, and Pendok, but could not be confirmed as positive transformants due to death during the acclimatization phase. Transformation efficiency was 0.2% in the Pandan Wangi variety and 0.1% in the Ketan Hitam and Pendok varieties.

*Keywords: UDP-Glucosyltransferase, CRISPR/Cas9, Sakuranetin, Rice Plant*

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Transformasi Mutagenesis Terarah Gen Pengkode UGTs *Upstream-Site* yang Dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 Pada Tanaman Padi”**. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, Penulis menyampaikan terima kasih atas seluruh dukungan dan bantuan kepada:

1. Mohammad Ubaidillah S.Si., M.Agr., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Skripsi serta Dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan arahan, motivasi, kritik, dan saran yang membangun untuk selama penulis menempuh studi hingga menyelesaikan skripsi ini;
2. Prof. M. Rondhi, S.P., M.P., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember;
3. Drs. Yagus Wijayanto, M.A., Ph.D. selaku Koordinator Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember;
4. Prof. Ir. Kacung Hariyono, M.S., Ph.D., selaku dosen penguji utama dan Ibu Tri Ratnasari, S.Si., M.Si., selaku dosen penguji anggota yang telah membantu memberikan ilmu dan evaluasi untuk menyempurnakan skripsi ini.
5. Orang tua penulis Ibu Supatemi dan adik penulis Aprilia Nur Azizah yang senantiasa mendoakan dan memberi dukungan kepada penulis setiap waktu;
6. Annisa Dwi Aulia, teman penulis yang selalu ada di segala kondisi dan selalu memberikan dukungan baik emosional maupun finansial, terutama selama kegiatan penelitian dan pengerjaan skripsi ini;
7. Teman-teman MU Research Team, Paw, Gagat, Abdul, Aiqe, Mayla, Hilda, Putri, Abel, Nirmala, Rizki, Fisrti, Lisa, Shandy, Billy, Della, Dayu, Niar, Kak Angger, Kak Rosa, Kak Habib, Kak Evita, dan Kak Danny, yang senantiasa menemani, membantu, dan mendukung dalam proses penelitian dan penulisan skripsi ini;
8. Teman-teman penulis, Moniqca, Popy, Else, Ilmi, Erica, Dewi, Risma, Desiana, Aldise, Ritza, Pilar, Ilham, Dimas, Abdullah, Faiz, Arsyah, Erie, dan

Salsata yang senantiasa memberi dukungan hingga penulis menyelesaikan skripsi ini;

9. Teman-teman mahasiswa Agroteknologi angkatan 2022 atas dukungan, pengalaman dan kenangan selama masa perkuliahan.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, Penulis berharap adanya kritik dan saran yang bersifat membangun sehingga menjadikan karya skripsi ini lebih baik. Semoga segala sesuatu yang tertulis di dalam skripsi ini dapat memberikan informasi bagi para pembaca.

Jember, 21 Mei 2026

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>SKRIPSI</b> .....	<b>i</b>
<b>PERSEMBAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	<b>v</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>vii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat.....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Biosintesis Sakuranetin dan Korelasinya dengan Gen Pengkode UGTs..	5
2.2 Genom Editing Berbasis CRISPR/ <i>Cas9</i> .....	6
2.3 Metode Transformasi dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Strain LBA4404 .....	8
2.4 Hipotesis .....	10
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>11</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	11
3.2 Alat dan Bahan .....	11
3.2.1 Alat.....	11
3.2.2 Bahan.....	11
3.3 Prosedur Penelitian.....	11
3.3.1 Persiapan Hasil Konstruksi Plasmid pRGEB32-UGT1.....	11
3.3.2 Transformasi Plasmid pRGEB32-UGT1 ke dalam <i>Agrobacterium</i> ...	13
3.3.3 Perhitungan Luas Kalus pada Aplikasi ImageJ.....	17
3.4 Variabel Pengamatan.....	18
3.4.1 Hasil PCR Konfirmasi <i>Agrobacterium</i> transforman.....	18
3.4.2 Respon Eksplan Induksi Kalus.....	18
3.4.3 Respon Kalus .....	18
3.4.4 Visualisasi Hasil Pewarnaan Sitokimia Sel.....	18
3.4.5 Analisis PCR Tanaman Transforman.....	19
3.5 Analisis Data .....	19
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>20</b>
4.1 Hasil.....	20
4.1.1 Persiapan Eksplan Kalus .....	20
4.1.2 Persiapan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Strain LBA4404 .....	22

4.1.3	Fase Infeksi dan Co-cultivasi .....	23
4.1.4	Fase Regenerasi dan Seleksi .....	24
4.2	Pembahasan .....	26
<b>BAB 5.</b>	<b>PENUTUP</b> .....	<b>30</b>
5.1	Kesimpulan.....	30
5.2	Saran.....	30
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	.....	<b>31</b>
<b>LAMPIRAN</b>	.....	<b>35</b>



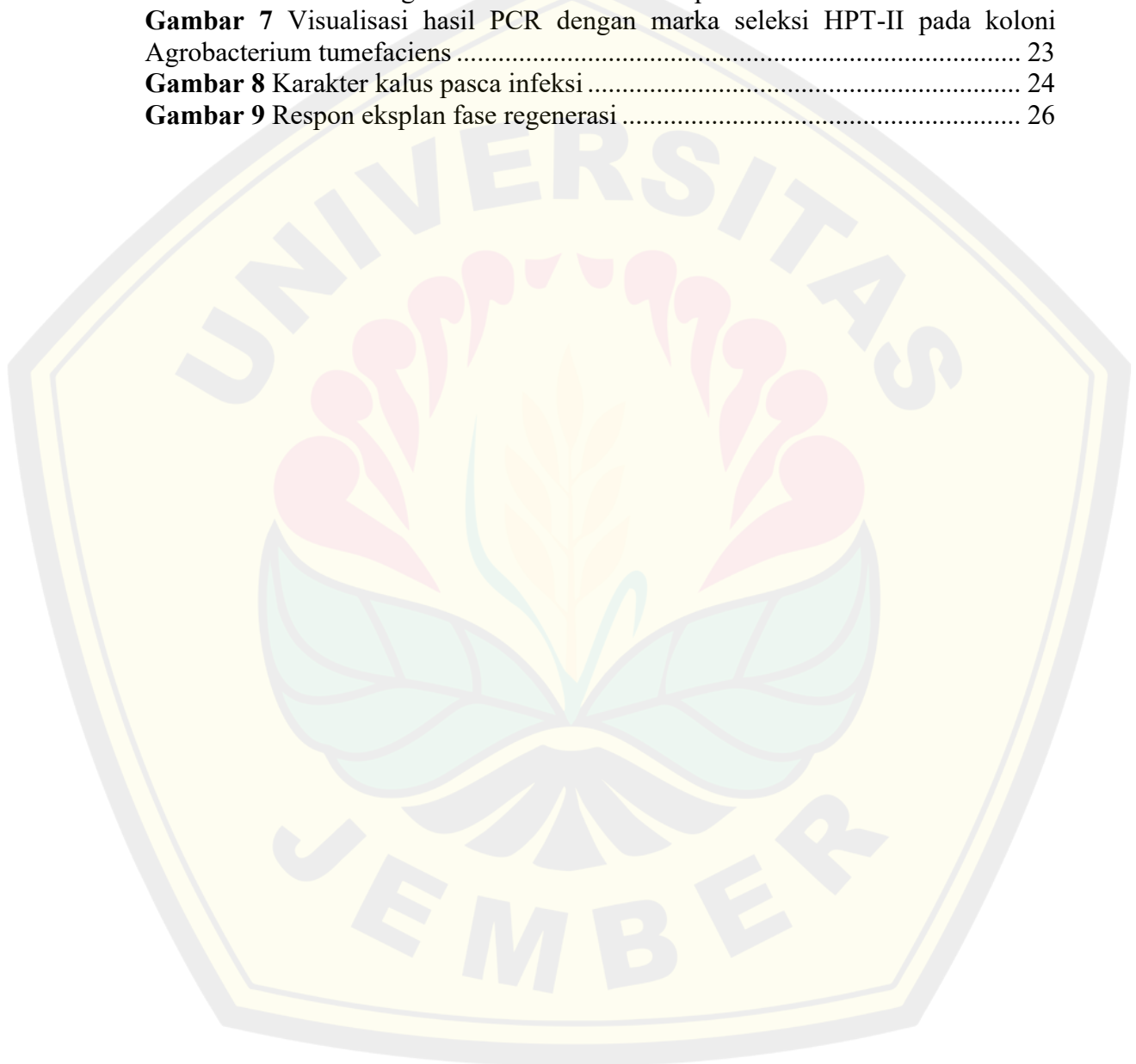
**DAFTAR TABEL**

<b>Tabel 1</b> Primer gen tahapan PCR .....	13
<b>Tabel 2</b> Persiapan eksplan kalus.....	20
<b>Tabel 3</b> Respon eksplan pada fase infeksi dan co-cultivasi.....	23
<b>Tabel 4</b> Respon eksplan pada fase regenerasi dan seleksi.....	25



**DAFTAR GAMBAR**

<b>Gambar 1</b> Jalur Biosintesis Sakuranetin.....	5
<b>Gambar 2</b> Skema Pengeditan CRISPR/Cas9.....	7
<b>Gambar 3</b> Mekanisme Transformasi Genetik oleh Agrobacterium.....	9
<b>Gambar 4</b> Konstruksi Plasmid pRGEB32-UGTs dengan sgRNA1 .....	12
<b>Gambar 5</b> Persiapan kalus varietas padi .....	21
<b>Gambar 6</b> Inokulasi Agrobacterium tumefaciens pada media Luria Bertani .....	22
<b>Gambar 7</b> Visualisasi hasil PCR dengan marka seleksi HPT-II pada koloni Agrobacterium tumefaciens .....	23
<b>Gambar 8</b> Karakter kalus pasca infeksi .....	24
<b>Gambar 9</b> Respon eksplan fase regenerasi .....	26



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tanaman padi (*Oryza sativa* L.) merupakan salah satu tanaman pangan utama yang sangat penting bagi ketahanan pangan global, sehingga keberlanjutan produksi tanaman padi sangat krusial untuk menjamin ketahanan pangan. Produksi tanaman padi dihadapkan dengan tantangan biotik dan abiotik. Pemanasan global menyebabkan peningkatan suhu rata-rata permukaan bumi, perubahan pola curah hujan, peningkatan frekuensi kekeringan, banjir akibat hujan ekstrem, serta peningkatan paparan radiasi UV-B yang berpotensi merusak DNA dan memicu stres oksidatif pada sel tanaman (Karla *et al.*, 2007). Kondisi tersebut dapat mengganggu proses fisiologis tanaman seperti fotosintesis, respirasi, viabilitas polen, dan pengisian bulir sehingga berpotensi menurunkan hasil panen padi secara signifikan (Zhao *et al.*, 2021). Penggunaan pestisida secara intensif dan berulang menyebabkan terjadinya tekanan seleksi pada populasi hama dan patogen sehingga individu yang memiliki kemampuan bertahan terhadap senyawa pestisida akan tetap hidup dan berkembang biak. Hama dan patogen yang resisten tersebut kemudian mewariskan sifat resistensi kepada keturunannya sehingga populasi hama resisten terus meningkat dari generasi ke generasi (Bass *et al.*, 2021). Kondisi tersebut menyebabkan populasi hama resisten menjadi semakin dominan dan efektivitas pengendalian menggunakan pestisida terus menurun.

Tanaman memiliki respon pertahanan alami terhadap cekaman dengan cara memproduksi metabolit sekunder, salah satunya yaitu sakuranetin. Sakuranetin merupakan flavonoid golongan fitoaleksin yang terbentuk melalui metilasi naringenin oleh enzim *Naringenin 7-O-Metiltransferase* (NOMT) (Shimizu *et al.*, 2012). Sakuranetin berfungsi sebagai agen antimikroba yang mampu menghambat perkembangan patogen serta mengganggu hubungan simbiotik hama, seperti dengan mengurangi keberadaan bakteri *endosymbiont* pada wereng coklat. Senyawa sakuranetin juga berperan sebagai antioksidan yang mampu menekan akumulasi radikal bebas (ROS), serta sebagai pelindung terhadap radiasi UV

melalui flavonoid yang ter-metoksilasi, sehingga membantu menjaga stabilitas struktur dan fungsi sistem fotosintesis (Liu *et al.*, 2023; Peng *et al.*, 2017).

Sakuranetin merupakan senyawa fenolik yang biosintesisnya dimulai dari prekursor, yaitu naringenin melalui proses metilasi yang dikatalis oleh enzim *Naringenin 7-O-Metiltransferase* (NOMT) (Shimizu *et al.*, 2012). Sakuranetin diproduksi sebagai bentuk respon tanaman terhadap serangan patogen dan stres lingkungan. Sakuranetin juga memiliki fungsi lain, seperti antimikroba, antivirus, antioksidan, antidiabetik, dan antikanker. Aktivitas antimikroba dan antioksidan pada sakuranetin membantu tanaman dalam mempertahankan diri dari infeksi patogen dan kerusakan oksidatif (Ma *et al.*, 2025). Biosintesis sakuranetin dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk regulasi genetik dan aktivitas enzim yang terlibat dalam jalur flavonoid, serta kondisi lingkungan yang memicu stres (Wang *et al.*, 2018). Sakuranetin disintesis oleh enzim NOMT dari naringenin sebagai prekursor utama jalur biosintesis sakuranetin. Naringenin mudah diubah oleh enzim *UDP-Glucosyltransferase* (UGTs) ke dalam bentuk senyawa lain, sehingga akumulasi naringenin yang dapat diubah ke dalam bentuk senyawa sakuranetin menjadi sangat rendah. Berdasarkan hal tersebut, mutasi terarah pada gen pengkode UGTs penting dilakukan agar akumulasi naringenin yang dapat disintesis menjadi sakuranetin lebih tinggi, sehingga memperkuat mekanisme pertahanan tanaman secara efektif.

Mutasi terarah pada gen pengkode UGTs memiliki peluang untuk mengoptimalkan fungsi gen secara alami melalui pengaturan elemen regulator transkripsi, sehingga tanaman dapat menyesuaikan responnya terhadap stres lingkungan dengan lebih adaptif dan efisien. Dalam hal ini, teknologi *genome editing* CRISPR/*Cas9* merupakan alat yang tepat karena mampu melakukan penyuntingan gen secara presisi pada lokasi target, termasuk pada daerah promoter atau upstream gen, tanpa meninggalkan jejak gen asing (Park *et al.*, 2022). Pemilihan strategi mutasi yang difokuskan pada *upstream-site*, khususnya pada ekson pertama gen target, didasarkan pada pertimbangan efektivitas dalam menghasilkan inaktivasi gen secara menyeluruh. Ekson pertama umumnya mengandung kodon start (ATG) dan bagian awal daerah pengkode yang sangat

penting dalam proses translasi, sehingga mutasi pada wilayah ini memiliki peluang tinggi untuk menghasilkan *frameshift mutation* yang menyebabkan perubahan translasi sejak awal sintesis protein (Bortesi & Fischer, 2015). Mutasi tersebut memicu terbentuknya kodon stop prematur yang mengakibatkan degradasi mRNA, sehingga mencegah terbentuknya protein fungsional (Popp & Maquat, 2013). Pendekatan ini digunakan dalam sistem CRISPR/Cas9 untuk memperoleh mutan *loss-of-function* yang stabil dan konsisten pada tanaman (Zhang et al., 2019; Ma et al., 2014).

Metode transformasi yang digunakan dalam penelitian ini dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, yang merupakan vektor paling umum dan efisien dalam transformasi genetik tanaman padi (Zhang et al., 2021). *Agrobacterium tumefaciens* memiliki mekanisme alami untuk memasukkan DNA T-DNA ke dalam genom tanaman secara stabil melalui proses infeksi yang terkontrol, sehingga memudahkan integrasi gen target dengan tingkat efisiensi yang tinggi (Biswas et al., 2023). Strain LBA4404 dipilih karena kompatibilitasnya yang baik dengan berbagai varietas padi dan kemampuannya dalam mentransfer konstruksi CRISPR/Cas9 secara efektif ke dalam sel tanaman. Kombinasi teknologi transformasi *Agrobacterium* dengan CRISPR/Cas9 diharapkan dapat menghasilkan tanaman padi dengan modifikasi genetik yang presisi, stabil, dan dapat diwariskan secara turun-temurun, sehingga mendukung pengembangan varietas unggul yang adaptif terhadap berbagai kondisi lingkungan yang menantang.

Berdasarkan hal tersebut, untuk meningkatkan sistem pertahanan pada tanaman padi, maka dilakukan penelitian dengan judul “Transformasi Mutagenesis Terarah Gen Pengkode UDP-Glukosyltransferase (UGTs) *Upstream-site* Yang Dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 Berbasis CRISPR/Cas9 Pada Tanaman Padi” varietas lokal Pendok, Pandan Wangi, dan Ketan Hitam. Pemilihan varietas tersebut didasarkan pada karakteristik agronomis, termasuk adaptasi terhadap kondisi lingkungan lokal, produktivitas stabil, serta kandungan senyawa bioaktif yang tinggi (Rahmawati et al., 2023; Hamawi, 2019). Selain berkontribusi pada peningkatan ketahanan tanaman, penelitian ini juga mendukung pengembangan pangan fungsional berbasis beras. Modifikasi dilakukan

menggunakan CRISPR/*Cas9* untuk menonaktifkan gen pengkode UGTs, sehingga naringenin sebagai prekursor senyawa sakuranetin tidak diubah menjadi bentuk senyawa lain. Naringenin dapat diakumulasikan ke dalam bentuk senyawa sakuranetin pada jumlah yang banyak, sehingga terjadi peningkatan sistem pertahanan tanaman padi terhadap cekaman biotik maupun abiotik.

### 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana efisiensi transformasi CRISPR/*Cas9* sg-RNA UDP-*Glucosyltransferase* (UGTs), serta tingkat regenerasi transforman pada beberapa varietas padi lokal?

### 1.3 Tujuan

Mengetahui efisiensi transformasi CRISPR/*Cas9* sg-RNA UDP-*Glucosyltransferase* (UGTs), serta menganalisis tingkat regenerasi transforman pada beberapa varietas padi lokal.

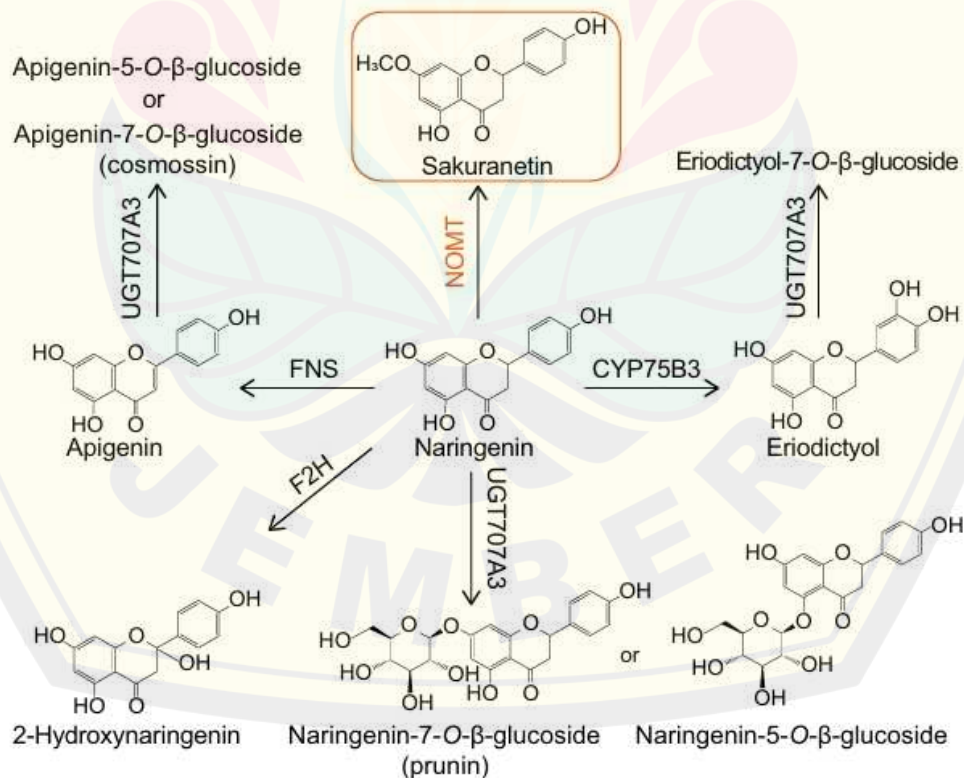
### 1.4 Manfaat

1. Memberikan kontribusi ilmiah dalam pengembangan teknologi rekayasa genetik tanaman padi, khususnya aplikasi CRISPR/*Cas9* untuk mutagenesis.
2. Mendukung pengembangan varietas padi lokal unggul yang memiliki ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik melalui modifikasi gen.
3. Menjadi sumber referensi bagi penelitian selanjutnya dalam pemuliaan tanaman berbasis bioteknologi.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Biosintesis Sakuranetin dan Korelasinya dengan Gen Pengkode UGTs

Sakuranetin pertama kali ditemukan pada bagian korteks tanaman ceri (*Prunus* spp.). Sakuranetin merupakan salah satu flavonoid *phytoalexin* yang terinduksi ketika tanaman mengalami cekaman, sebagai bentuk respons pertahanan tanaman terhadap serangan patogen dan stres lingkungan. Senyawa ini berperan sebagai sistem pertahanan yang melindungi tanaman dari infeksi dan kerusakan oksidatif (Shimizu *et al.*, 2012). Biosintesis sakuranetin dimulai dari asam amino fenilalanin yang diubah menjadi asam cinnamat (CA) oleh enzim *phenylalanin ammonia-lyase* (PAL) yang kemudian mengalami serangkaian reaksi enzimatik menghasilkan naringenin sebagai prekursor utama sakuranetin. Naringenin kemudian dimetilasi oleh enzim *Naringenin 7-O-Methyltransferase* (NOMT) pada gugus hidroksil posisi 7 menggunakan donor metil *S-adenosil metionin* (SAM) membentuk sakuranetin (Shimizu *et al.*, 2012).



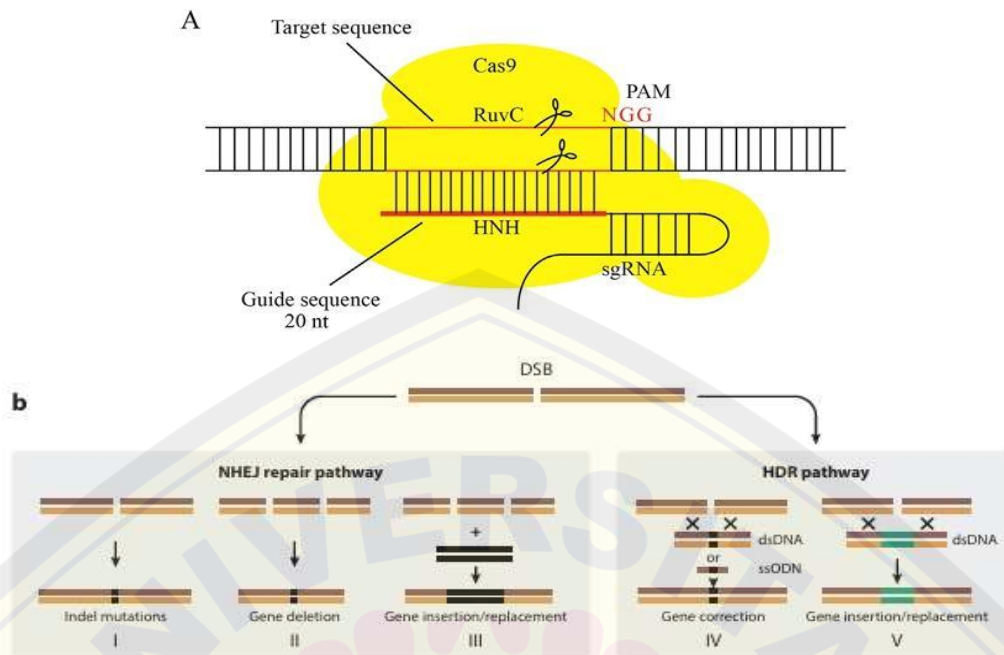
Gambar 1 Jalur Biosintesis Sakuranetin (Liu *et al.*, 2023)

Naringenin sebagai prekursor sakuranetin dapat mengalami modifikasi glikosilasi yang dikatalisis oleh enzim *UDP-Glucosyltransferase* (UGTs), yaitu penambahan gugus glukosil dari donor UDP glukosa ke molekul naringenin atau flavonoid yang terkait (Liu *et al.*, 2025). Modifikasi glikosilasi ini meningkatkan kelarutan air dan stabilitas kimia naringenin, sehingga mempengaruhi akumulasi dan distribusi senyawa pada jaringan tanaman (Peng *et al.*, 2017). Glikosilasi tersebut membuat naringenin tidak dapat diubah menjadi sakuranetin dan menyebabkan kandungan sakuranetin pada tanaman padi menjadi rendah, sehingga berpengaruh terhadap sistem pertahanan tanaman terhadap cekaman.

Penelitian oleh Chen *et al.* (2024) menunjukkan bahwa gen *OsUGT706E2* yang mengkode enzim UGT memiliki peran negatif dalam toleransi padi terhadap patogen dan stres abiotik, yang mengindikasikan bahwa aktivitas tertentu dari UGT dapat menurunkan efektivitas pertahanan tanaman dengan memodifikasi sakuranetin secara berlebihan atau tidak tepat. Oleh karena itu, mutasi terarah gen pengkode UGT sangat diperlukan untuk menghilangkan atau mengurangi aktivitas enzim yang tidak diinginkan, sehingga dapat meningkatkan akumulasi sakuranetin.

## 2.2 Genom Editing Berbasis CRISPR/Cas9

Teknologi CRISPR/*Cas9* merupakan metode pengeditan genom yang berasal dari mekanisme adaptif bakteri dan archaea yang diadaptasi sebagai alat rekayasa genetika yang efisien dan presisi (Ma *et al.*, 2014). Sistem pengeditan genom CRISPR/*Cas9* memungkinkan modifikasi yang presisi pada urutan DNA endogen dengan integrasi sementara materi genetik asing, sehingga tanaman yang dihasilkan diklasifikasikan sebagai non-transgenik. Teknologi ini terdiri dari dua komponen utama, yaitu enzim *Cas9* yang berfungsi sebagai gunting molekuler dan *single guide* RNA (sgRNA) yang mengarahkan enzim *Cas9* untuk memotong target DNA pada lokasi spesifik (Shan *et al.*, 2014). CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) mampu menghasilkan mutasi *knock-out*, *knock-in* maupun pengeditan basa tunggal dengan tingkat efisiensi dan presisi yang tinggi (Wang & Doudna, 2023).



**Gambar 2** Skema Pengeditan CRISPR/Cas9. (A) Komponen CRISPR/Cas9 (Liu *et al.*, 2017). (B) Mekanisme Perbaikan DBS (Chen *et al.*, 2019)

Proses pengeditan dimulai dengan pembentukan kompleks *Ribonucleoprotein* (RNP) antara *Cas9* dan *sgRNA*, yang mana *sgRNA* mengandung urutan pelengkap target DNA yang mengarahkan *Cas9* untuk mengenali dan mengikat sekuens target. Pengikatan sekuens target bergantung pada keberadaan sekuens *protospacer adjacent motif* (PAM), seperti 5'-NGG-3' yang menjadi sinyal pengenalan oleh *Cas9* (Ma *et al.*, 2014; Redman *et al.*, 2016). *Cas9* melakukan pemotongan untai ganda DNA (*double-strand break* / DBS) pada posisi yang ditentukan oleh *sgRNA*, dengan domain nukleas HNH dan RuvC yang memotong untai DNA komplementer dan non komplementer secara spesifik (Liu *et al.*, 2017). Transfer dilakukan melalui vektor biologis berupa *Agrobacterium tumefaciens*, yang mana bakteri mentransfer T-DNA yang mengandung *Cas9* dan *sgRNA* ke nukleus sel tanaman melalui sistem sekresi tipe IV (T4SS) menghasilkan ekspresi transien, karena T-DNA tidak dirancang untuk integrasi stabil ke kromosom tanaman dan cenderung terdegradasi secara alami oleh enzim nuklease seluler atau dilusi selama proses pembelahan sel (Upadhyay *et al.*, 2020). DBS yang dihasilkan memicu mekanisme perbaikan DNA seluler melalui dua jalur utama, yaitu NHEJ (*Non-Homologous End Joining*) dan HDR (*Homologous-Directed*

*Repair*) (Pulecio *et al.*, 2017). NHEJ merupakan alur perbaikan cepat yang tidak menggunakan template dan menghasilkan mutasi penyisipan atau delesi yang menyebabkan terjadinya *knockout* gen target. HDR merupakan alur perbaikan dengan menggunakan template DNA homolog untuk melakukan perbaikan presisi yang memungkinkan penyisipan atau penggantian gen secara spesifik (Sony *et al.*, 2023).

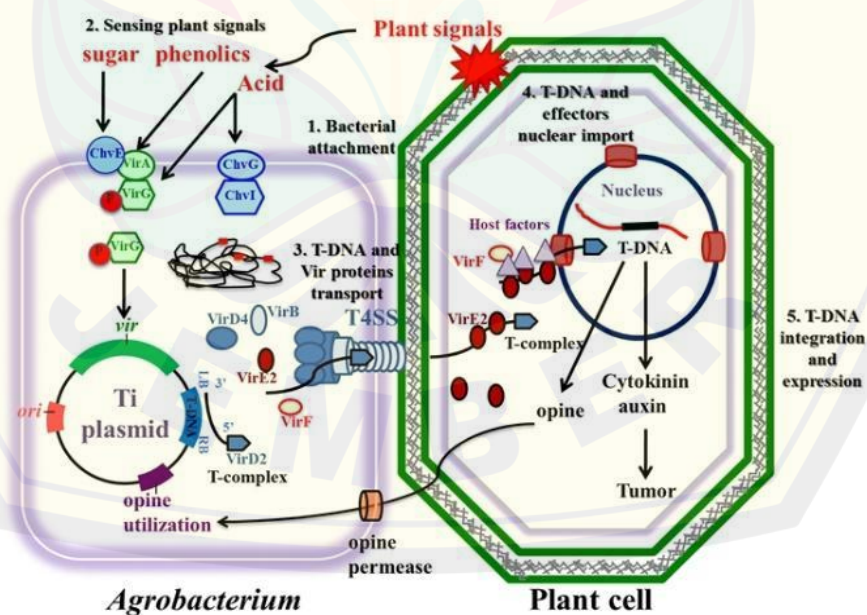
Metode genom editing lain yang biasa digunakan dalam rekayasa genetika tanaman adalah *Zinc Finger Nucleases* (ZFNs) dan *Transcription Activator-like Effector Nucleases* (TALENs). ZFNs dan TALENs bekerja dengan cara mengenali dan memotong DNA target menggunakan protein yang didesain khusus, tetapi proses desain dan konstruksinya relatif kompleks dan memerlukan biaya tinggi (Bortesi & Fischer, 2015). CRISPR/*Cas9* menggunakan RNA pemandu (gRNA) yang lebih mudah disintesis dan dimodifikasi, sehingga lebih cepat dan mudah diadaptasi untuk berbagai target gen. Tingkat keberhasilan genome editing CRISPR/*Cas9* tergantung pada tanaman dan target gen, dengan efisiensi rata-rata mencapai 25% pada tanaman padi (Gelvin *et al.*, 2021), sekitar 8-12% pada tanaman gandum (Zhang *et al.*, 2019), dan 20-30% pada tanaman tomat dan kentang (Brooks *et al.*, 2014; Anderson *et al.*, 2017). Efisiensi dan keberhasilan genom editing dengan CRISPR/*Cas9* dipengaruhi oleh desain sgrRNA yang tepat, metode pengantaran sistem ke dalam sel tanaman yang optimal, dan jenis tanaman yang dimodifikasi (Konstantakos *et al.*, 2022).. Pendekatan ini efektif pada berbagai tanaman, seperti padi, gandum, tomat, dan kentang, dengan potensi peningkatan efisiensi melalui penggunaan promoter spesifik tanaman dan desain gRNA yang lebih baik (Lowder *et al.*, 2015).

### **2.3 Metode Transformasi dengan *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404**

Transformasi genetik pada tanaman dapat dilakukan dengan beberapa metode, seperti biolistik (penembakan partikel), elektroporasi, dan *Agrobacterium tumefaciens*. Metode biolistik dilakukan dengan menggunakan partikel logam yang dilapisi DNA dan ditembakkan ke dalam sel tanaman dengan tekanan tinggi, sedangkan elektroporasi menggunakan listrik untuk membuka pori-pori

(permeabilisasi) membran sel agar DNA dapat masuk (Sharma *et al.*, 2005). Metode biolistik dan elektroporasi cenderung menghasilkan integrasi DNA yang tidak stabil dan jumlah salinan transgen yang tinggi, sehingga dapat menyebabkan efek posisi dan ekspresi gen yang tidak konsisten (Altpeter *et al.*, 2016). Metode transformasi menggunakan *Agrobacterium* merupakan teknik rekayasa genetika yang memanfaatkan kemampuan alami bakteri untuk mentransfer DNA ke dalam genom tanaman (Hiei *et al.*, 1994).

*Agrobacterium tumefaciens* merupakan patogen tanah yang menyebabkan penyakit crown gall pada tanaman dengan mentransfer segmen DNA spesifik yang disebut T-DNA dari plasmid Ti (tumor inducing) ke dalam sel tanaman inang (Păcurar *et al.*, 2011; Tzfira & Citovsky, 2006). Strain LBA4404 merupakan strain yang telah dimodifikasi secara genetik untuk menghilangkan gen-gen virulensi yang menyebabkan penyakit, sehingga aman digunakan sebagai vektor dalam transformasi genetik tanaman (Hiei *et al.*, 1994). Proses transformasi dimulai dengan pengenalan bakteri ke permukaan jaringan tanaman berupa kalus atau embrio somatik yang kemudian diinduksi oleh senyawa fenolik tanaman seperti *acetosyringone* untuk mengaktifkan gen virulensi (vir genes) pada Ti-plasmid (Hwang *et al.*, 2017).



**Gambar 3** Mekanisme Transformasi Genetik oleh *Agrobacterium* (Hwang *et al.*, 2017)

Setelah aktivasi gen virulensi, protein VirD2 dan VirD1 memotong T-DNA pada batas-batasnya menghasilkan molekul T-*strand* tunggal yang dilapisi oleh protein VirE2 untuk melindungi DNA selama proses transfer (Gelvin, 2010). Kompleks T-DNA kemudian ditranspor melalui sistem sekresi tipe IV ke dalam sitoplasma tanaman dan diarahkan ke inti sel dengan bantuan protein VirD2 yang mengandung sinyal lokalisasi inti (NLS) (Tzfira & Citovsky, 2006). T-DNA dilepaskan dari protein pelindung dan diintegrasikan secara acak pada genom tanaman melalui mekanisme perbaikan DNA inang yang melibatkan jalur NHEJ dan protein-protein yang berperan dalam rekombinasi DNA. Integrasi ini menghasilkan tanaman transforman yang stabil secara genetik dengan gen target yang telah disisipkan.

*Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 memiliki efektivitas tinggi karena adanya modifikasi genetik yang menghilangkan gen virulensi tanpa mengurangi kemampuan dalam transfer T-DNA, sehingga lebih efisien dan aman untuk rekayasa genetika (Hiei *et al.*, 1997). Strain LBA4404 menghasilkan tanaman transforman stabil dengan efisiensi 5-10% pada tanaman padi indica melalui co-cultivasi dengan kalus yang diinduksi acetosyringone dan seleksi antibiotik (Pipatpanukul *et al.*, 2004). Selain itu, strain LBA4404 kompatibel dengan sistem CRISPR/*Cas9*, sehingga menjadi vektor yang ideal untuk pengantaran konstruksi genom editing.

#### **2.4 Hipotesis**

Transformasi dan mutagenesis gen pengkode UGTs *upstream-site* dapat menghasilkan tanaman padi putatif transforman varietas lokal dengan sistem pertahanan yang tinggi terhadap cekaman biotik dan abiotik.

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Oktober 2025 hingga Mei 2026 di Laboratorium Agroteknologi, Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

#### 3.2 Alat dan Bahan

##### 3.2.1 Alat

Pada saat penelitian terdapat alat yang digunakan meliputi, bunsen, *Laminar Air Flow*, oven listrik, timbangan analitik, *autoclave*, pH meter, gelas ukur, botol kultur, spatula, kertas saring, erlenmeyer, gelas beaker, pinset, petridish, magnetic stirrer, centrifuge, mesin *thermocycler Polymerase Chain Reaction (PCR)*, elektroforesis, UV *transilluminator*, microwave, mikropipet dan tip, dan falcon tube 15ml dan 50ml.

##### 3.2.2 Bahan

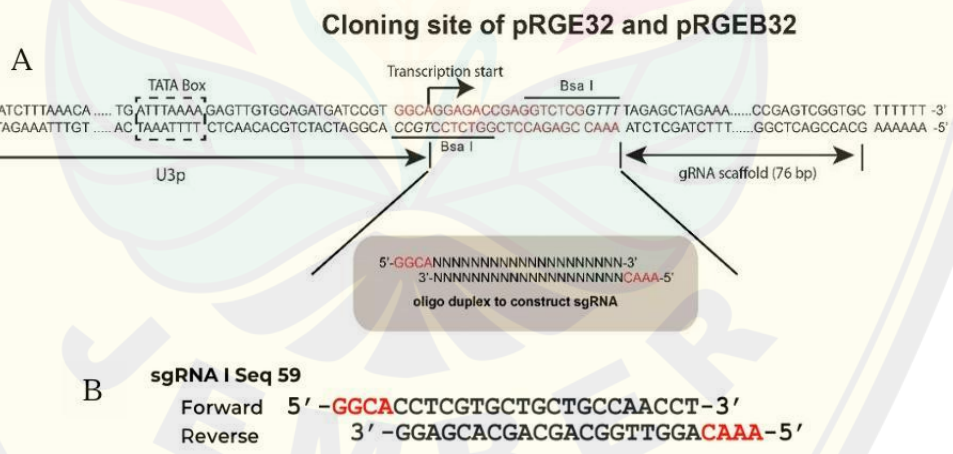
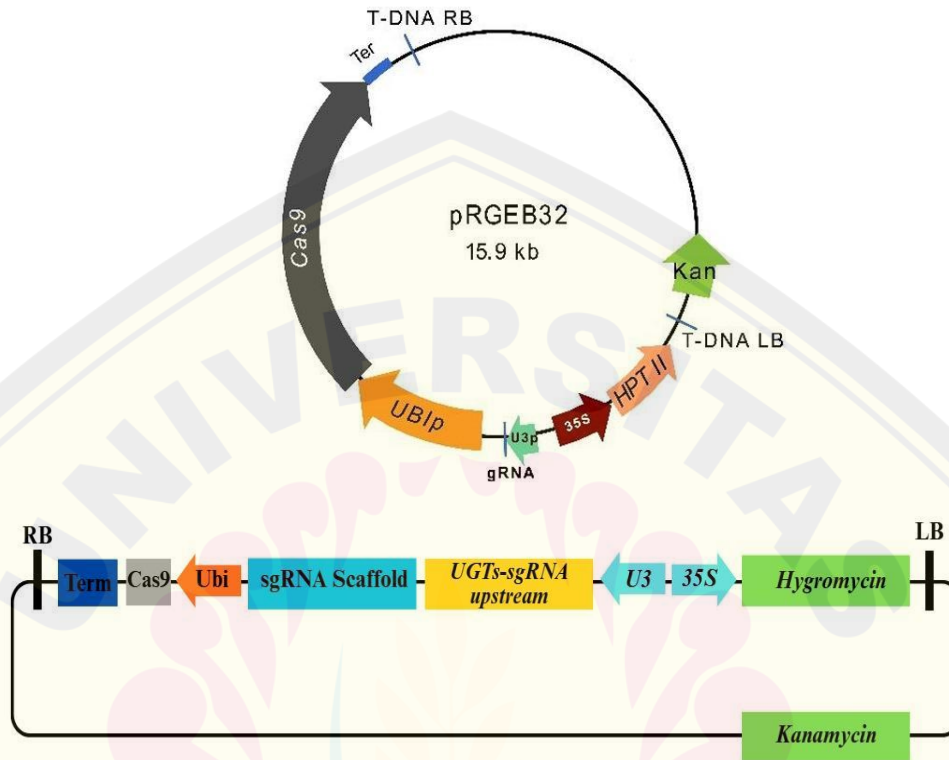
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu benih padi varietas lokal Pandan Wangi, Ketan Hitam, dan Pendok, *Agrobacterium tumefaciens strain LBA4404* yang telah disisipkan sg-RNA UGTs-1, media Murashige & Skoog (MS), media Luria-Bertani (LB), *Casein hydrolysate*, *2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)* 2 mg/ml,  *$\alpha$ -Naphthalene Acetic Acid (NAA)* 1mg/ml, *Kinetin* 2  $\mu$ g/ml, *gelrite* 4 g/L, sukrosa, *Sodium Hypochlorite (NaClO)* 2,25%, *Sodium Hydroxide (NaOH)* 0,1 M, *Hydrochloride acid (HCl)* 0,2 M, *ethanol 70%*, ddH<sub>2</sub>O, *agarose gel*, DNA primer, TAE 1X, *rifampicin* 50mg/ml, *kanamycin* 50mg/ml, *hygromycin* 50mg/ml, *cefotaxime* 500 mg/ml, *acetosyringone* 100 mg/ml. *taq DNA polymerase*, *Ethidium Bromide (EtBr)*, dan *Nuclease-free Water*.

#### 3.3 Prosedur Penelitian

##### 3.3.1 Persiapan Hasil Konstruksi Plasmid pRGEB32-UGTs

Konstruksi telah dilakukan dengan menggunakan plasmid pRGEB32 tertarget sgRNA1-UGTs. Selanjutnya, sgRNA1-UGTs disintesis sehingga menjadi oligonukleotida untai tunggal yaitu gRNA-Exon1, pasangan *forward* dan *reverse* dilakukan *treatment* dengan suhu 90°C denaturasi, 55°C annealing, dan 79°C

ekstensi menjadi duplex oligonukleotida. Kemudian, sgRNA duplex dilakukan reaksi restriksi dan ligasi serta telah dilakukan konfirmasi *sequence* untuk memastikan keberadaan sgRNA1-UGTs pada plasmid pRGE32.



**Gambar 4** Konstruksi Plasmid pRGE32-UGTs dengan sgRNA1. (A) Lokasi gRNA dan pemotongan oleh Bsa1. (B) Urutan gRNA F dan R yang ditambahkan overhang 4 nukleotida (warna merah)

### 3.3.2 Transformasi Plasmid pRGEB32-UGT1 ke dalam *Agrobacterium*

#### 1. Seleksi positif koloni *Agrobacterium tumefaciens* transforman

Hasil kultur bakteri *Agrobacterium tumefaciens* diinokulasi pada media LB pada dengan antibiotic *rifampicin* 50 ppm dan *kanamycin* 50 ppm dengan *spread plate method*. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam pada suhu 28°C pada kondisi gelap.

#### 2. Analisis PCR

Konfirmasi *Agrobacterium tumefaciens* transforman plasmid pRGEB32 dapat dilakukan melalui analisis PCR. Analisis PCR dimulai dengan membuat kolom reaksi sebanyak 30ul larutan yang terdiri dari Taq PCR master mix 2X 15 ul, 1ul dari setiap primer *Forward* (F) dan *Reverse* (R) (Tabel 3.1), 5 ul *Agrobacterium tumefaciens* template, dan 8ul *nuclear free water*. Program PCR yang digunakan yakni 95 °C selama 10 menit dan 30 siklus : 95 °C selama 30 detik untuk denaturasi, 60 °C selama 30 detik untuk *annealing*, 72°C selama 1 menit untuk *extension*, dan siklus terakhir 72°C selama 5 menit. Elektroforesis dapat dilakukan untuk mengetahui hasil amplifikasi PCR. Elektroforesis dilakukan dalam gel agarose 2% yang diwarnai dengan *Ethidium Bromide* (EtBr) kemudian dilakukan visualisasi menggunakan *UV transilluminator*.

**Tabel 1** Primer gen tahapan PCR

Gen	Primer	Amplicon size
HPT II	F : TCGGACGATTGCGTCGCATC	545bp
	R : AGGCTATGGATGCGATCGCTG	

Informasi dari *website* resmi <https://www.addgene.org/>

### 3.3.1 Transformasi pada Kalus Padi

#### 1. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan mencuci alat-alat *glassware* (gelas ukur, petri kaca, gelas *beaker*, botol kultur, dan *erlenmeyer*) dan alat diseksi (pinset) dengan menggunakan sabun cuci dan dilakukan pembilasan dengan air mengalir kemudian dikering-anginkan. Selanjutnya, semua alat-alat *glassware* dan diseksi dibungkus menggunakan *aluminium foil* dan plastik tahan panas kemudian dimasukkan ke dalam alat *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi

selama 90 menit. Alat-alat yang belum digunakan dapat disimpan di dalam oven untuk menjaga kesterilan alat.

## 2. Persiapan Kalus Melalui Fase Induksi

Persiapan kalus dilakukan dengan dengan tahapan sterilisasi eksplan dan penanaman benih pada media induksi kalus (Ms powder 4.41 g/L, Sukrosa 30 g/L, *Casein hydrolysate* 2 g/L, Gelrite 6 g/L, *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2.4-D) 2 mg/L, pH 5.8). Persiapan kalus dimulai dari tahapan sterilisasi eksplan dengan cara mengupas benih padi sehingga terpisah dari sekamnya. Setelah itu, benih dimasukkan ke dalam LAF di dalam *falcon tube* 50ml, kemudian sterilisasi eksplan dilakukan secara kimiawi dengan disterilisasi menggunakan NaOCl 25% selama 10 menit dengan cara *swirling* atau *dishaker* dengan kecepatan 20-30 rpm menggunakan *rotary shaker*. Biji kemudian dibilas menggunakan ddH<sub>2</sub>O steril sebanyak 3 kali. Benih padi yang telah disterilkan kemudian dikering-anginkan di dalam LAF dengan kertas saring yang diletakkan pada petri steril. Setelah benih kering dapat dilakukan penanaman pada media tanam yang sesuai. Selanjutnya, melakukan induksi kalus yang dimulai dengan melakukan pengupasan pada benih padi hingga tersisa bagian endosperm dan embrio. Kemudian dilakukan sterilisasi dan benih dikulturkan pada media MS di suhu 28°C selama 14 hari pada kondisi gelap. Selanjutnya kalus yang sudah tumbuh dan berwarna putih kekuningan akan ditransformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*.

## 3. Kultur dan Infeksi *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium* yang sudah dikonfirmasi memiliki plasmid pRGEB-32 diinokulasi pada media LB padat ditambahkan dengan antibiotik *rifampycin* 50 ppm dan *kanamycin* 50 ppm untuk di suhu 28°C. Masukkan 5ml di atas LB padat pada sel *Agrobacterium tumefaciens* dari cawan dan disuspensikan dengan cara *pipetting*, pindahkan ke dalam *breaker glass* dalam 30 ml cairan MS0. Periksa OD<sub>600</sub> dan encerkan hingga pembacaan OD<sub>600</sub> menjadi 0,5-1. Tambah 100 mM *acetosyringon* ke suspensi bakteri dan inkubasi di suhu 28°C selama 1 jam sebelum infeksi. Pisahkan plumula dan endosperma kemudian ambil kalus padi di umur maksimal 14 hari. Kalus padi dimasukkan ke dalam larutan suspensi *Agrobacterium*

*tumefaciens* kemudian dishaker pelan membentuk angka 8 atau huruf O selama 20 menit.

#### 4. Fase *Co-cultivasi*

Fase *co-cultivasi* merupakan fase dimana *Agrobacterium tumefaciens* mentransfer T-DNA ke dalam genom tanaman. Setelah proses infeksi selama 20 menit, saring kalus menggunakan saringan yang telah disterilisasi, kemudian pindahkan pada kertas saring di atas *petridish*. Kalus yang telah diinfeksi dipindahkan pada media *co-cultivasi* (MS powder 4.41 g/L, Sukrosa 30 g/L, *Casein hydrolysate* 2 g/L, Gelrite 6 g/L, *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2.4-D) 2 mg/L, pH 5.8, *Acetociryngone* 100 mM). Fase *co-cultivasi* ini dilakukan selama 24-28 jam pada suhu 28°C dan kondisi gelap.

#### 5. Fase Eliminasi

Kalus hasil *co-cultivasi* dipindahkan kedalam *beaker glass* steril untuk dibilas. Pindahkan kalus dilakukan hati-hati untuk menghindari stress pada kalus. Kalus dibilas menggunakan ddH<sub>2</sub>O steril sebanyak 3 kali, pada bilas terakhir ditambahkan dengan *cefotaxime* 500 mg/L. Selanjutnya kalus dikeringkan diatas kertas saring didalam *petridish* steril kemudian dipindahkan pada media eliminasi (MS powder 4.41 g/L, Sukrosa 30 g/L, *Casein hydrolysate* 2 g/L, Gelrite 6 g/L, *2,4-dichlorophenoxyacetic acid* (2.4-D) 2 mg/L, pH 5.8, *Cefotaxime* 500 mg/L), serta di inkubasi pada suhu 28°C dan kondisi terang selama 7 hari.

#### 6. Pewarnaan Sitokimia Sel

Pewarnaan dilakukan dengan metode pewarnaan menggunakan larutan *Acetocarmine* 2% dan *Evans blue* 0,5%. Pewarnaan pertama dilakukan menggunakan *Acetocarmine* 2% selama 2 menit, selanjutnya dibilas dengan ddH<sub>2</sub>O dan dikeringkan. Pewarnaan kedua menggunakan *Evans Blue* 0,5% selama 30 detik, kemudian dibilas kembali untuk menghilangkan sisa pewarna dan kalus diamati menggunakan mikroskop.

#### 7. Fase Regenerasi

Kalus dari tahap eliminasi disubkultur pada media regenerasi yaitu media (MS powder 4.41 g/L, Sukrosa 30 g/L, *Casein hydrolysate* 2 g/L, Gelrite 6 g/L, pH 5.8,  $\alpha$ -*Naphtalene Acetic Acid* (NAA) 1 mg/L, Kinetin 2 mg/L, *Cefotaxime* 500

mg/L, *Hygromycin* 50 mg/L) diinkubasi pada cahaya terang secara terus-menerus. Sub kultur pada tahap regenerasi dilakukan setiap 2 minggu sekali pada media regenerasi. Fase regenerasi pertama dan kedua memakai hormon NAA dan Kinetin, sedangkan pada fase regenerasi selanjutnya tidak memakai hormon tersebut.

#### 8. Fase Seleksi

Kalus dari hasil regenerasi yang berkembang dan menunjukkan *greenspot* kemudian dipindahkan ke dalam media seleksi yaitu media MS yang ditambahkan dengan *cefotaxime* 500 mg/L dan *hygromycin* 50 mg/L selama 14 hari. Tanaman yang bertahan dilanjutkan subkultur pada media yang sama hingga dapat diaklimatisasi.

#### 9. Aklimatisasi Tanaman Transforman

Aklimatisasi dilakukan dengan dua tahapan yaitu tahap pertama penyesuaian dari media seleksi ke media tanah yang telah disaring dan disterilisasi menggunakan *autoclave*. Pisahkan agar dan akar planlet dengan dicuci menggunakan air mengalir sampai bersih. Tanam dalam media tanah yang lembab dan disungkup menggunakan plastik selama 24 hari. Setelah umur 3 HST tambahkan nutrisi ABmix. Setelah tanaman berumur 24 hari dipindahkan ke pot dan diletakkan di *greenhouse*

#### 10. Ekstraksi DNA

Analisis PCR tanaman padi transforman dilakukan menyiapkan *cocktail* yaitu 1 ml *CTAB buffer*, 0.04 g *PVP* dan 5  $\mu$ l  $\beta$ -*Mercaptoethanol* dikalikan dengan banyak sampel yang digunakan. Mengambil sampel daun padi dan dipotong menggunakan gunting. Masukkan ke dalam mortar dan tambahkan 1 ml *CTAB* kemudian gerus daun padi. Masukkan sampel kedalam tube *eppendorf* tambahkan cocktail 1 ml persampel dan di *vortex* sampai larut. Inkubasi sampel pada *waterbath* dengan suhu 65°C selama 30 menit, tambahkan *PCI layer* kedua 500  $\mu$ l dan di *vortex*. Sentrifuge sample selama 10 menit 12.000 rpm. Pindahkan supernatant pada layer paling atas tube ke dalam tube baru dan tambahkan 40  $\mu$ l *Ammonium acetate* dan 270  $\mu$ l *isopropanol* dan di *vortex* sampai terlarut. *Sentrifuge* selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Membuang supernatant lalu tambahkan 500  $\mu$ l ethanol 70% dan di *vortex*. *Sentrifuge* selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, buang

*ethanol* dan masukan ke dalam oven selama 1-2 menit. Selanjutnya tambahkan aquades (ddH<sub>2</sub>O) dan menyimpan sampel di dalam kulkas dengan suhu 20°C.

#### 11. Analisis PCR dan Elektroforesis

Analisis PCR dilakukan dengan memasukkan primer HPT II dan *Cas9* masing-masing sebanyak 4 µl, water nuclease 32 µl dan sample 5 µl ke dalam tube PCR kemudian di PCR 35 siklus. Elektroforesis sampel dilakukan dengan menimbang agarose 1.5 gr untuk 100 ml, kemudian mengencerkan 10 ml TAE dengan 490 ml aquades dan homogenkan. Selanjutnya campurkan agarose dan TAE kemudian di oven selama 2 menit sampai berwarna bening. Tambahkan EtBr 1.5 µl dan tuangkan ke cetakan dan pasang sisir tunggu sampai memadat dan tidak ada gelembung. Masukan sampel telah di PCR sebelumnya kemudian ditutup dan nyalakan, tunggu sampai garis ke-4 dan divisualisasikan dengan *UV transilluminator*.

#### 3.3.3 Perhitungan Luas Kalus pada Aplikasi ImageJ

Perhitungan luas kalus dilakukan menggunakan aplikasi ImageJ untuk menentukan luas kalus total, kalus embriogenik, *browning*, *overgrowth*, dan kalus *greenspot*. Foto kalus hasil pengamatan menggunakan mikroskop dimasukkan ke dalam aplikasi untuk dianalisis. Pengaturan area warna dilakukan melalui menu "*Image*", "*Adjust*", dan "*Color Threshold*" untuk menyesuaikan batas warna pada bagian kalus yang akan diukur. Langkah pertama adalah menentukan luas kalus total berdasarkan keseluruhan bentuk kalus. Kemudian, pengukuran dilakukan pada masing-masing variabel, yaitu kalus embriogenik, *browning*, *overgrowth*, dan kalus *greenspot*, dengan menyesuaikan area warna sesuai karakteristik visual setiap bagian. Kemudian, pengukuran luas dilakukan melalui menu "*Analyze*" dan "*Measure*" setelah area yang diinginkan terdeteksi. Hasil pengukuran luas setiap kategori kalus akan ditampilkan pada layar, kemudian digunakan untuk menghitung persentase kalus embriogenik, *browning*, *overgrowth*, dan *greenspot* berdasarkan rumus yang telah ditentukan.

### 3.4 Variabel Pengamatan

#### 3.4.1 Hasil PCR Konfirmasi *Agrobacterium transforman*

Konfirmasi *Agrobacterium tumefaciens* dengan PCR menggunakan primer gen HPT-II.

#### 3.4.2 Respon Eksplan Induksi Kalus

Pengamatan dilakukan yaitu menghitung total kalus yang tumbuh setelah dilakukan induksi kalus dengan menimbang sampel berat kalus, diameter kalus, dan menghitung jumlah total eksplan yang ditanam. Pengamatan dilakukan ketika kalus berumur 14 HST. Persentase adanya kalus yang tumbuh dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase Kalus} = \frac{\text{Jumlah Kalus}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

#### 3.4.3 Respon Kalus

Pengamatan eksplan setelah infeksi meliputi fase cocultivasi, fase eliminasi, fase regenerasi dan fase seleksi dengan parameter persentase hasil perhitungan dari aplikasi ImageJ pada kalus *overgrowth*, *browning*, *greenspot*, dan total planlet menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persentase } \textit{overgrowth} = \frac{\text{Jumlah eksplan } \textit{overgrowth}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

$$\text{Persentase } \textit{browning} = \frac{\text{Jumlah eksplan } \textit{browning}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

$$\text{Persentase } \textit{greenspot} = \frac{\text{Luas area eksplan } \textit{greenspot}}{\text{Luas total eksplan}} \times 100\%$$

Pengamatan dilakukan setelah eksplan saat fase eliminasi yaitu H+7 pasca infeksi, pengamatan fase regenerasi dilakukan saat fase regenerasi 1 sampai fase regenerasi 3 dan pengamatan fase seleksi dilakukan saat fase seleksi.

#### 3.4.4 Visualisasi Hasil Pewarnaan Sitokimia Sel

Pewarnaan sitokimia dilakukan dengan menggunakan *evans blue* 0,5% dan *acetocarmine* 2%. Pengamatan yang diamati adalah warna yang dominan dan perbandingannya pada sel kultur hasil visualisasi. Kalus yang berwarna merah menandakan bahwa kalus tersebut merupakan kalus embriogenik, sedangkan kalus yang berwarna biru menandakan bahwa kalus tersebut tidak embriogenik.

Visualisasi hasil pewarnaan menggunakan mikroskop serta menggunakan *software* ImageJ untuk mengetahui luasan dari hasil pewarnaan.

$$\text{Persentase kalus embriogenik} = \frac{\text{Jumlah kalus embriogenik}}{\text{Jumlah total eksplan}} \times 100\%$$

#### 3.4.5 Analisis PCR Tanaman Transforman

Analisis PCR dilakukan untuk mengkonfirmasi dan memastikan pRGE32 UGT.sgRNA1 terintegrasi ke dalam genom tanaman padi dengan ekstraksi daun padi yang telah diseleksi antibiotik *hygromycin* 50ppm kemudian di analisis PCR dan di elektroforesis serta divisualisasikan dengan UV *transilluminator*.

### 3.5 Analisis Data

Data pengamatan dianalisis secara statistik deskriptif sederhana untuk merepresentasikan efisiensi transformasi dan tingkat regenerasi tanaman padi lokal hasil transformasi sg-RNA UGTs *upstream-site*

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil

Penelitian ini dilakukan dengan melalui 2 tahapan, yaitu konfirmasi keberadaan plasmid pRGEB32 UGTs sgRNA1 pada *Agrobacterium tumefaciens* dan transformasi T-DNA ke dalam genom tanaman padi yang kemudian untuk mengonfirmasi adanya T-DNA yang terintegrasi ke dalam tanaman dilakukan melalui analisis PCR. Terdapat beberapa parameter yang diamati, yaitu persentase induksi kalus, viabilitas kalus, dan respon kalus yang meliputi persentase *browning*, *overgrowth*, *greenspot*, dan jumlah planlet.

#### 4.1.1 Persiapan Eksplan Kalus

Parameter hasil persiapan eksplan kalus dilihat dari jumlah eksplan, waktu muncul kalus (hari), persentase jumlah eksplan berkalus, berat bersih (gram), karakter morfologi kalus berupa tekstur dan warna kalus, serta persentase viabilitas kalus yang dilakukan pada setiap ulangan. Berikut hasil dari persiapan eksplan kalus padi dengan tiga varietas, yaitu Pandan Wangi, Ketan Hitam, dan Pendok (Tabel 2)

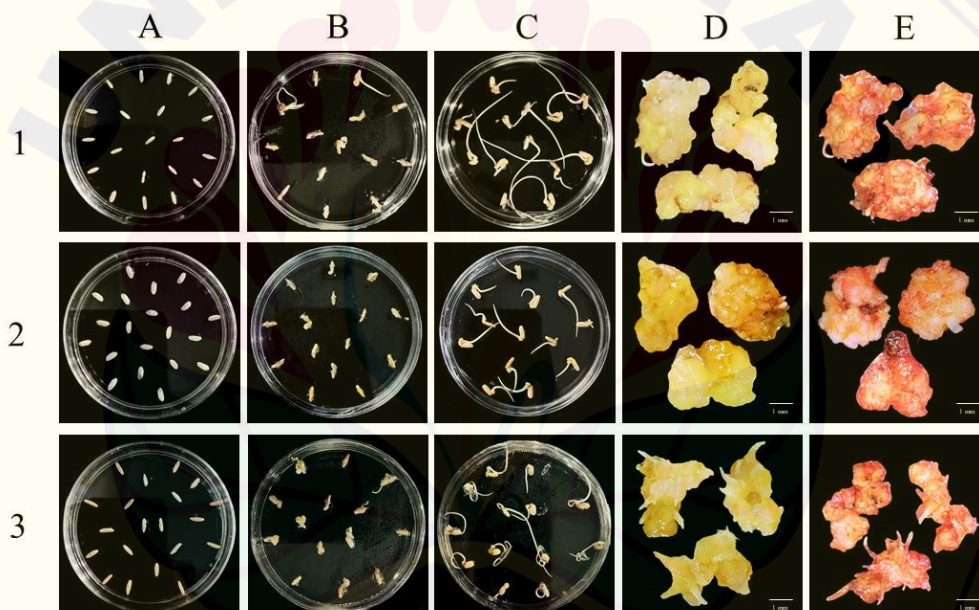
**Tabel 2** Persiapan eksplan kalus varietas Pandan Wangi, Ketan Hitam, dan Pendok

Ulangan	Varietas	Jumlah eksplan	Waktu muncul kalus (hari)	Jumlah eksplan berkalus (%)	Berat basah (g)	Karakteristik kalus	Viabilitas kalus (%)
1	Pandan Wangi	200	14	74	0.0397	<i>white, friable</i>	64,4
	Ketan Hitam	200	14	76	0.0258	<i>yellow-ish, semi-friable</i>	60,42
	Pendok	200	12	81.5	0.0273	<i>yellow-ish, friable</i>	75,28
2	Pandan Wangi	200	14	78.5	0.0399	<i>white, friable</i>	70,81
	Ketan Hitam	200	14	72.5	0.0263	<i>yellow-ish, semi-friable</i>	53,34
	Pendok	200	12	74	0.0295	<i>yellow-ish, friable</i>	73,11
3	Pandan Wangi	200	14	76	0.0394	<i>white, friable</i>	62,32
	Ketan Hitam	200	14	74	0.0226	<i>yellow-ish, semi-friable</i>	46,70
	Pendok	200	12	77.5	0.0325	<i>yellow-ish, friable</i>	63,04
4	Pandan Wangi	200	14	82	0.0413	<i>white, friable</i>	73,29
	Ketan Hitam	200	14	68.5	0.0233	<i>yellow-ish, semi-friable</i>	53,35
	Pendok	200	12	71,5	0.0311	<i>yellow-ish, friable</i>	62,49
5	Pandan Wangi	200	14	78	0.0408	<i>white, friable</i>	65,55
	Ketan Hitam	200	14	77.5	0.0226	<i>yellow-ish, semi-friable</i>	53,57
	Pendok	200	12	68.5	0.0294	<i>yellow-ish, friable</i>	64,08
Rata-rata	Pandan Wangi	200	14	77.7	0.0402	<i>white, friable</i>	67,27
	Ketan Hitam	200	14	73.7	0.0241	<i>yellow-ish, semi-friable</i>	53,48
	Pendok	200	12	74.6	0.0299	<i>yellow-ish, friable</i>	67,6

Keterangan: Pengukuran viabilitas kalus dilakukan melalui pewarnaan sitokimia (*acetocarmine* 2%; *evans blue* 0,5%) untuk melihat persentase embriogenik dan non-embriogenik menggunakan

aplikasi ImageJ; Pengukuran berat basah (g) menggunakan neraca analitik; Jumlah total 1.000 biji dengan setiap ulangan 200 biji.

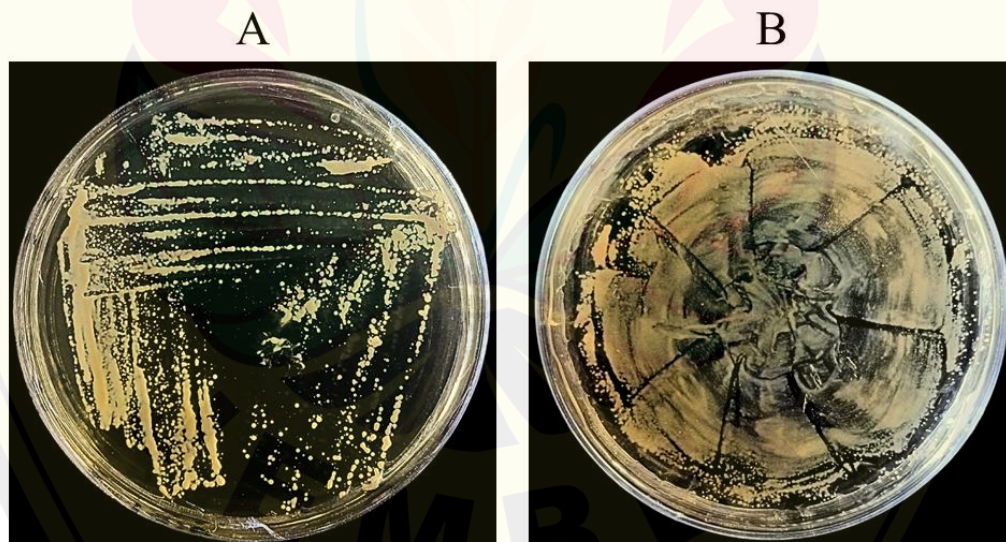
Persiapan eksplan induksi kalus menunjukkan respon yang berbeda pada varietas Pandan Wangi, Ketan Hitam, dan Pendok dengan 5 kali ulangan. Waktu muncul kalus tercepat yaitu pada varietas Pendok dengan rata-rata 12 hari, sedangkan pada varietas Pandan Wangi dan Ketan Hitam rata-rata waktu muncul kalus lebih lama, yaitu 14 hari. Pada parameter persentase eksplan berkalus, rata-rata tertinggi yaitu 77.7% pada varietas Pandan Wangi, kemudian varietas Pendok dengan persentase 74.6%, dan persentase terendah yaitu 73.7% pada varietas Ketan Hitam. Pada variabel viabilitas kalus menunjukkan persentase hasil kalus embriogenik tertinggi, yaitu 67.6% pada varietas Pendok, 67.27% pada varietas Pandan Wangi, dan 53.48% pada varietas Ketan Hitam.



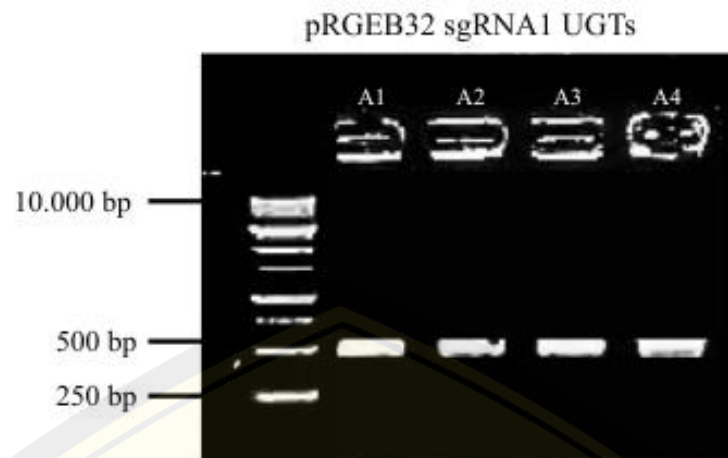
**Gambar 5** Persiapan kalus varietas padi (1) Pandan Wangi, (2) Ketan Hitam, dan (3) Pendok pada media induksi Murashige dan Skoog (MS) 2,4-D 2 ppm, (A) Induksi kalus 0 HST, (B) Induksi kalus 7 HST, (C) Induksi kalus 14 HST, (D) Morfologi kalus, dan (E) Viabilitas kalus dengan pewarnaan sitokimia (acetocarmine 2%; evans blue 0,5%) untuk melihat persentase embriogenik menggunakan aplikasi ImageJ. Scale bar 1 mm.

#### 4.1.2 Persiapan *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404

*Agrobacterium tumefaciens* yang telah terinsersi plasmid pRGEB32::UGT.sgRNA1 ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) padat dengan antibiotik *rifampicin* 50 ppm dan *kanamycin* 50 ppm dengan *streak plate method* (Gambar 6A). Penambahan antibiotik *rifampicin* bertujuan untuk menyeleksi bakteri selain *Agrobacterium tumefaciens*, sedangkan *kanamycin* ditambahkan untuk menyeleksi *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa plasmid pRGEB32::UGT.sgRNA1. Kemudian dilakukan konfirmasi keberadaan plasmid tersebut dalam *Agrobacterium tumefaciens* menggunakan analisis PCR dengan primer gen HPT-II yang merupakan marka ketahanan terhadap antibiotik *hygromycin*. Visualisasi hasil elektroforesis pada semua sampel menunjukkan terbentuknya pita DNA dengan ukuran 545 bp (Gambar 7). Koloni yang terkonfirmasi positif membawa plasmid pRGEB32::UGT.sgRNA1 kemudian diinokulasi pada media Luria Bertani (LB) padat dengan antibiotik *rifampicin* 50 ppm dan *kanamycin* 50 ppm dengan *spread plate method* (Gambar 6B) untuk persiapan infeksi kalus.



**Gambar 6** Inokulasi *Agrobacterium tumefaciens* pada media Luria Bertani dengan tambahan *rifampicin* dan *kanamycin* 50 ppm, (A) kultur *streak plate method* dan (B) kultur *spread plate method*



**Gambar 7** Visualisasi hasil PCR dengan marka seleksi HPT-II pada koloni *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 menggunakan gel agarose 1%.

#### 4.1.3 Fase Infeksi dan Co-cultivasi

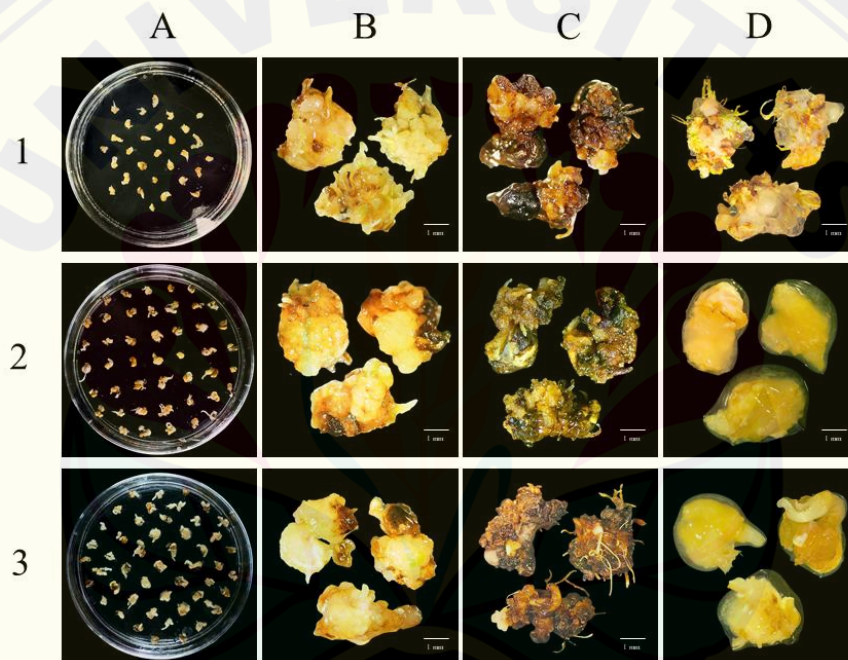
Parameter pengamatan respon eksplan pada fase infeksi dan co-cultivasi meliputi persentase eksplan normal, *overgrowth* dan *browning*. Berikut merupakan data kuantitatif dan kualitatif pada fase infeksi dan co-cultivasi dari respon kalus padi varietas Pandan Wangi, Ketan Hitam, dan Pendok.

**Tabel 3** Respon ekplan pada fase infeksi dan co-cultivasi varietas Pandan Wangi, Ketan Hitam, dan Pendok

Ulangan	Varietas	Jumlah eksplan	Eksplan normal (%)	Eksplan <i>overgrowth</i> (%)	Eksplan <i>browning</i> (%)	Tingkat kematian eksplan (%)
1	Pandanwangi	148	71,62	4,73	23,65	28,38
	Ketan Hitam	152	52,63	5,26	42,11	47,37
	Pendok	163	70,55	3,07	26,38	29,45
2	Pandanwangi	157	65,61	7,64	26,75	34,39
	Ketan Hitam	145	46,90	3,45	49,66	53,10
	Pendok	148	68,92	5,41	25,68	31,08
3	Pandanwangi	152	57,24	11,84	30,92	42,76
	Ketan Hitam	148	47,30	7,43	45,27	52,70
	Pendok	155	68,39	4,52	27,1	31,61
4	Pandanwangi	164	74,39	3,66	21,95	25,61
	Ketan Hitam	137	38,69	6,57	54,74	61,31
	Pendok	143	61,54	4,9	33,57	38,46
5	Pandanwangi	156	82,69	3,21	14,1	17,31
	Ketan Hitam	155	40,65	2,58	56,77	59,35
	Pendok	137	63,50	4,38	32,12	36,50
Rata-rata	Pandanwangi	155	70,31	6,22	23,48	29,69
	Ketan Hitam	147	55,33	5,06	49,71	54,77
	Pendok	149	66,58	4,45	28,97	33,42

Keterangan: Pengukuran persentase *overgrowth* dan *browning* menggunakan aplikasi ImageJ; Jumlah kalus normal dan tingkat kematian dihitung dari persentase eksplan yang normal/mati terhadap total eksplan.

Respon eksplan pada fase infeksi dan co-cultivasi berbeda-beda pada setiap varietas. diperoleh hasil rata-rata persentase *overgrowth Agrobacterium* pada eksplan yang paling tinggi yaitu varietas Pandan Wangi dengan nilai 6.22%, varietas Ketan Hitam 5.06%, dan persentase terendah yaitu varietas Pendok dengan nilai 4.45%. *Agrobacterium* yang *overgrowth* tumbuh di permukaan eksplan, dapat hanya sebagian maupun menutupi seluruh permukaan eksplan. Rata-rata persentase eksplan *browning* tertinggi mencapai 49.71% pada varietas Ketan Hitam, 28.97% pada varietas Pendok, dan persentase *browning* terendah yaitu 23.48% pada varietas Pandan Wangi. Persentase kematian eksplan dihitung dari total eksplan yang mengalami *browning* dan *overgrowth Agrobacterium*.



**Gambar 8** Karakter kalus pasca infeksi pada varietas padi (1) Pandan Wangi, (2) Ketan Hitam, dan (3) Pendok di media co-cultivasi Murashige dan Skoog (MS) 2,4D 2 ppm, (A) Jumlah eksplan kalus, (B) Kalus normal, (C) Kalus mengalami browning, dan (D) Kalus mengalami overgrowth. Pengukuran persentase overgrowth dan browning menggunakan aplikasi ImageJ. Scale bar : 1 mm.

#### 4.1.4 Fase Regenerasi dan Seleksi

Parameter hasil pengamatan respon eksplan pada fase regenerasi dan seleksi meliputi tingkat regenerasi yang dilihat dari persentase kalus *greenspot*, jumlah planlet, jumlah tanaman putatif transforman yang mampu bertahan pada fase

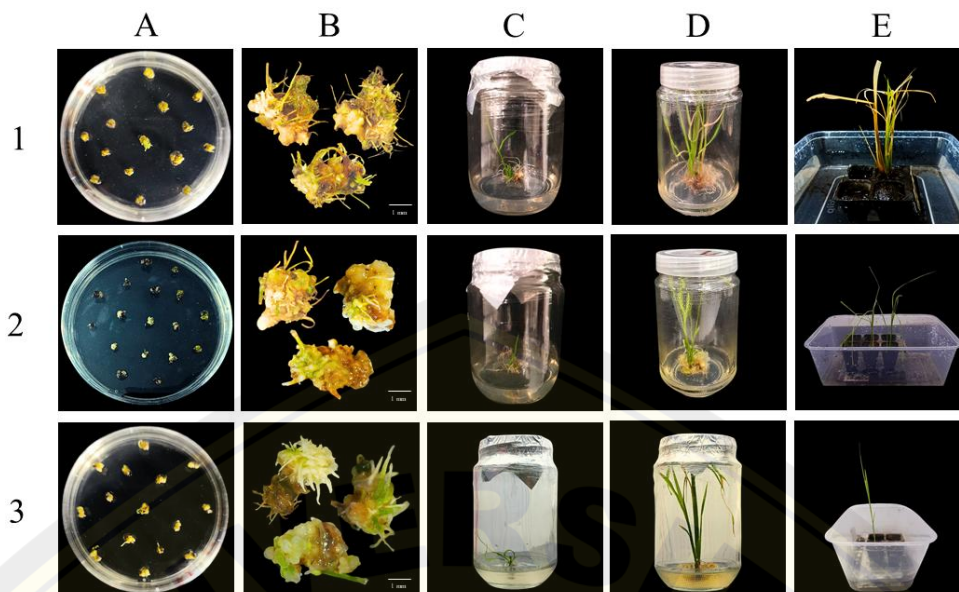
seleksi, dan jumlah tanaman positif transforman yang dikonfirmasi melalui analisis molekuler PCR.

**Tabel 4** Respon eksplan pada fase regenerasi dan seleksi varietas Pandan Wangi, Ketan Hitam, dan Pendok

Ulangan	Varietas	Persentase kematian eksplan (%)	Tingkat regenerasi (%)	Jumlah planlet (fase regenerasi)	Jumlah putatif transforman (fase seleksi)	Jumlah positif transforman (PCR)
1	Pandanwangi	27,36	13,79	0	0	0
	Ketan Hitam	37,50	10,20	0	0	0
	Pendok	20,87	16,85	0	0	0
2	Pandanwangi	22,33	16,92	1	1	0
	Ketan Hitam	61,76	4,92	0	0	0
	Pendok	29,41	24,66	0	0	0
3	Pandanwangi	29,89	25,81	1	1	0
	Ketan Hitam	47,14	14,81	1	0	0
	Pendok	25,47	25,32	0	0	0
4	Pandanwangi	26,23	19,79	0	0	0
	Ketan Hitam	50,94	8,47	0	0	0
	Pendok	28,41	35,29	0	0	0
5	Pandanwangi	17,05	16,88	0	0	0
	Ketan Hitam	39,68	20,41	1	1	0
	Pendok	20,69	25,61	1	1	0
Rata-rata	Pandanwangi	34,51	18,64	2	2	0
	Ketan Hitam	57,59	11,76	2	1	0
	Pendok	32,19	25,55	1	1	0

Keterangan: Pengukuran tingkat regenerasi dengan melihat porsi *greenspot* menggunakan aplikasi ImageJ; Tingkat kematian eksplan dihitung dari persentase eksplan yang mati terhadap total eksplan.

Pengamatan respon eksplan pada fase regenerasi dan seleksi diperoleh hasil rata-rata persentase kalus *greenspot* tertinggi yaitu pada varietas Pendok dengan nilai 25.55%, kemudian varietas Pandan Wangi 18.64%, dan tingkat regenerasi terendah yaitu pada varietas Ketan Hitam 11.76%. Pada fase regenerasi diperoleh planlet 2 planlet varietas Pandan Wangi, 2 planlet varietas Ketan Hitam, dan 1 planlet varietas Pendok. Terdapat 2 tanaman putatif transforman Pandan Wangi dan Ketan Hitam, sedangkan varietas Pendok hanya terdapat 1 tanaman putatif transforman yang resisten terhadap antibiotik *hygromycin* pada fase seleksi. Tanaman putatif transforman tersebut mengalami stres setelah diaklimatisasi, sehingga tidak dapat dilakukan analisis PCR.



**Gambar 9** Respon eksplan fase regenerasi pada varietas padi (1) Pandan Wangi, (2) Ketan Hitam, dan (3) Pendok di media Murashige dan Skoog (MS) Kinetin 2 ppm dan NAA 1 ppm, (A) Tingkat Regenerasi kalus dalam petridish, (B) Kalus mengalami greening spot, (C) Planlet, (D) Tanaman putative transforman, dan (E) Aklimatisasi tanaman putative transforman. Pengukuran tingkat regenerasi dengan melihat porsi greening spot menggunakan aplikasi ImageJ. Scale bar: 1 mm

#### 4.2 Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian, respon eksplan dari tiga varietas padi lokal, yaitu Pandan Wangi, Ketan Hitam, dan Pendok, menunjukkan pola yang berbeda pada setiap tahapan kultur. Perbedaan respon ini dipengaruhi oleh faktor genotipe tanaman yang berkaitan dengan karakteristik varietas padi lokal kelompok javanica (tropical japonica). Padi javanica memiliki keragaman genetik yang tinggi serta adaptasi yang baik terhadap lingkungan tropis, tetapi relatif menunjukkan respon yang variatif dalam kultur jaringan dan transformasi genetik (Rachmawati & Anzai, 2006). Genotipe tanaman berperan dalam menentukan kemampuan dediferensiasi sel, pembentukan kalus embriogenik, respon terhadap infeksi *A. tumefaciens*, serta kemampuan regenerasi setelah transfer T-DNA (Alpeter *et al.*, 2016).

Pada fase induksi kalus (Tabel 2), semua varietas menunjukkan kemampuan membentuk kalus dalam rentang waktu yang relatif sama, yaitu sekitar 12-14 hari, yang mengindikasikan bahwa ketiga varietas tersebut memiliki respon yang cukup baik terhadap media induksi yang digunakan. Padi Pandan Wangi dan Pendok menunjukkan persentase eksplan berkalus yang relatif tinggi dan menghasilkan

kalus dengan karakteristik *white-friable* hingga *yellowish-friable* yang merupakan ciri khas kalus embriogenik dengan potensi regenerasi tinggi. Sedangkan, varietas Ketan Hitam menghasilkan kalus dengan karakteristik *yellowish-semi friable* dengan viabilitas yang lebih rendah. Kalus dengan karakter *friable* dan bersifat embriogenik umumnya lebih mudah diinfeksi oleh *Agrobacterium* karena memiliki aktivitas pembelahan sel yang tinggi dan lebih mendukung transfer T-DNA dibandingkan kalus non-embriogenik (Toki, 1997). Perbedaan ini menunjukkan bahwa masing-masing varietas memiliki kapasitas dediferensiasi sel dan poliferasi yang berbeda. Respons induksi kalus pada padi sangat dipengaruhi oleh genotipe, di mana beberapa varietas *tropical japonica* memiliki kemampuan yang lebih baik dalam menghasilkan kalus embriogenik dibandingkan varietas lainnya (George *et al.*, 2008). Selain itu, padi lokal memiliki kandungan metabolit sekunder dan tingkat aktivitas hormon endogen juga berkontribusi terhadap kualitas kalus yang terbentuk, sehingga mempengaruhi keberhasilan tahap selanjutnya.

Pada tahap *co-cultivasi* dan eliminasi (Tabel 3), respon eksplan berkaitan dengan karakteristik varietas *javanica*. Varietas Pandan Wangi menunjukkan tingkat eksplan normal yang lebih tinggi serta tingkat kematian yang lebih rendah dibandingkan Ketan Hitam dan Pendok, yang menunjukkan bahwa varietas ini memiliki toleransi yang lebih baik terhadap stres yang ditimbulkan selama interaksi dengan *A. tumefaciens*. Sedangkan, varietas Ketan Hitam menunjukkan tingkat *browning* dan kematian eksplan yang tinggi, yang mengindikasikan adanya sensitivitas yang lebih besar terhadap kondisi stres *in vitro*. Rata-rata *browning* mencapai 49,71% dengan tingkat kematian eksplan sebesar 54,77%. *Browning* ini umumnya disebabkan oleh oksidasi senyawa fenolik sebagai respon pertahanan terhadap infeksi *Agrobacterium*, yang kemudian membentuk senyawa quinon yang bersifat toksik dan menghambat pertumbuhan sel, serta menurunkan viabilitas eksplan (Hiei & Komari., 2008). Akumulasi senyawa fenolik teroksidasi dapat bersifat toksik bagi sel dan menghambat regenerasi maupun integrasi T-DNA (Xu & Huang, 2014). Sedangkan, varietas Pandan Wangi memiliki tingkat *browning* dan kematian eksplan paling rendah, masing-masing sebesar 23,48% dan 29,69%, sehingga kondisi fisiologis eksplan lebih mendukung keberhasilan transformasi.

Pada varietas *javanica*, perbedaan tingkat *browning* ini berkaitan dengan kandungan metabolit sekunder antar varietas yang berbeda, di mana beberapa varietas lokal diketahui memiliki kandungan fenolik yang lebih tinggi sehingga lebih rentan mengalami *browning* selama kultur *in vitro*. Selain itu, *overgrowth A. tumefaciens* yang terjadi pada semua varietas juga menunjukkan bahwa interaksi antara bakteri dan jaringan tanaman belum sepenuhnya optimal. Meskipun tingkat *overgrowth* relatif rendah, kondisi ini tetap berpotensi menghambat pertumbuhan eksplan akibat kompetisi nutrisi dan produksi senyawa toksik oleh bakteri. Berkaitan dengan hal ini, varietas Pandan Wangi yang menunjukkan tingkat viabilitas lebih tinggi memiliki kemampuan fisiologis yang lebih baik dalam mempertahankan integritas sel selama proses *co-cultivasi*. Keberhasilan transformasi berbasis *Agrobacterium* tidak hanya ditentukan oleh kemampuan bakteri dalam mentransfer T-DNA, tetapi juga oleh respons jaringan tanaman terhadap infeksi dan stres lingkungan (Gelvin, 2003).

Pada tahap regenerasi dan seleksi (Tabel 4), varietas Pendok menunjukkan tingkat regenerasi tertinggi, diikuti oleh Pandan Wangi, sedangkan Ketan Hitam menunjukkan tingkat regenerasi terendah serta tingkat kematian eksplan tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun Pandan Wangi unggul pada tahap awal kultur, varietas Pendok memiliki kemampuan rediferensiasi yang lebih baik pada tahap regenerasi. Kemampuan ini berkaitan dengan kualitas kalus yang dihasilkan pada tahap induksi, di mana kalus dengan tekstur friable dan viabilitas tinggi lebih mampu berkembang menjadi planlet. Menurut Ikeuchi *et al.* (2013), keberhasilan regenerasi sangat bergantung pada kemampuan sel kalus untuk mengalami transisi dari fase dediferensiasi menuju rediferensiasi, yang sangat dipengaruhi oleh kondisi fisiologis sel dan faktor genetik tanaman. Varietas Pandan Wangi menghasilkan rata-rata dua planlet pada fase regenerasi dan dua transforman putatif. Ketan Hitam dua planlet pada fase regenerasi dan 2 tanaman transforman putatif. Sedangkan, Pendok memiliki tingkat regenerasi tertinggi sebesar 25,55%, hanya menghasilkan 1 tanaman putatif transforman.

Efisiensi transformasi yang dihitung dari jumlah tanaman putatif transforman adalah sebesar 0,2% pada Pandan Wangi serta 0,1% pada Ketan Hitam dan Pendok.

Nilai tersebut tergolong rendah, tetapi masih umum pada transformasi padi menggunakan metode *Agrobacterium-mediated*, terutama pada varietas lokal yang memiliki respons kultur jaringan berbeda-beda (Sahoo et al., 2011). Pada varietas Pendok, kemampuan regenerasi yang tinggi menunjukkan kemampuan morfogenesis jaringan dibandingkan keberhasilan transfer gen asing. Sedangkan, Pandan Wangi dan Ketan Hitam meskipun memiliki regenerasi lebih rendah dibandingkan Pendok mampu menghasilkan transforman putatif karena kondisi fisiologis kalus lebih mendukung proses infeksi dan integrasi T-DNA. Efisiensi transformasi yang rendah menunjukkan bahwa efisiensi transformasi dipengaruhi oleh kombinasi beberapa faktor, seperti kompatibilitas genotipe tanaman dengan strain *Agrobacterium*, aktivitas gen *vir*, kondisi sel target, kemampuan regenerasi, dan respon pertahanan tanaman terhadap infeksi bakteri (Toki, 1997; Norkunas et al., 2018).

## BAB 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa transformasi *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 yang terinsersi plasmid pRGEB32::UGTs.sgRNA1 berhasil dilakukan pada ketiga varietas padi lokal yang ditunjukkan dengan adanya tanaman putatif transforman. Efisiensi transformasi berdasarkan jumlah putatif transforman tergolong rendah, yaitu 0,2% pada Pandan Wangi, serta 0,1% pada Ketan Hitam dan Pendok.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, diperlukan adanya analisis PCR dan *sequencing* untuk mengetahui tingkat keberhasilan *knock-out* gen pengkode UGTs dan tingkat *off target*, serta diperlukan analisis karakteristik pada tanaman putatif transforman yang diperoleh.

## DAFTAR PUSTAKA

- Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., Conrad, L. J., Gelvin, S. B., Jackson, D. P., Kausch, A. P., Lemaux, P. G., Medford, J. I., Orozco-Cárdenas, M. L., Tricoli, D. M., Van Eck, J., Voytas, D. F., Walbot, V., Wang, K., Zhang, Z. J., & Stewart, C. N., Jr. (2016). Advancing Crop Transformation in the Era of Genome Editing. *The Plant Cell*, 28(7), 1510–1520.
- Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A. S., Samuelsson, M., & Hofvander, P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports*, 36(1), 117–128.
- Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide biochemistry and physiology*, 121, 78-87.
- Berim, A., & Gang, D. R. (2016). The roles of specialized metabolites in plant defense. *Plant Physiology*, 172(3), 1426–1435.
- Biswas, S., Ibarra, O., Shaphek, M., Molina-Risco, M., Faion-Molina, M., Bellinatti-Della Gracia, M., Thomson, M.J., & Septiningsih, E.M. (2023). Increasing the level of resistant starch in 'Presidio' rice through multiplex CRISPR-Cas9 gene editing of starch branching enzyme genes. *Plant Genome*, 16(2), 1-14.
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41–52.
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z. B., & Van Eck, J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiology*, 166(3), 1292–1297.
- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H., & Gao, C. (2019). CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual Review of Plant Biology*, 70(1), 667–697.
- Chen, P., Jiang, L., Zhang, L., Sun, B., Lv, S., Zhang, J., Yu, H., Mao, X., Fan, Z., Li, C., Chen, W., & Liu, Q. (2024). The UDP-glycosyltransferase gene OsUGT706E2 negatively regulates rice tolerance to blast disease and abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 226(1), 1-11.
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium-mediated plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying” tool*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67(1), 16–37.

- Gelvin, S. B. (2010). Plant Proteins Involved in *Agrobacterium*-Mediated Genetic Transformation. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 45-68.
- Gelvin, S. B., Kim, S. I., & Piatkowski, M. (2021). Optimizing *Agrobacterium*-mediated transformation and CRISPR-Cas9 gene editing in the tropical japonica rice variety Presidio. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 1-16.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). Plant propagation by tissue culture. *The Netherland, The Back Ground Springer*, 1 (1), 65-75.
- Hamawi, M. (2019). Karakter Morfologis Kultivar Padi Ketan Lokal Ponorogo. *Karakter Morfologis Kultivar Padi Ketan Lokal Ponorogo*, 47(03), 224-231.
- Hiei, Y., Komari, T., & Kubo, T. (1997). Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 35(1), 205–218.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6(2), 271-282.
- Hwang, H. H., Yu, M., & Lai, E. M. (2017). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15, 1-31.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). *Plant callus: Mechanisms of induction and repression*. *The Plant Cell*, 25(9), 3159–3173.
- Kalra, N., Chander, S., Pathak, H., Aggarwal, P. K., Gupta, N. C., Sehgal, M., & Chakraborty, D. (2007). Impacts of climate change on agriculture. *Outlook on AGRICULTURE*, 36(2), 109-118.
- Konstantakos, V., Nentidis, A., Krithara, A., & Paliouras, G. (2022). Prediksi efisiensi gRNA CRISPR-Cas9: ikhtisar alat prediktif dan peran pembelajaran mendalam. *Penelitian Asam Nukleat*, 50(7), 3616-3637.
- Liu, M., Hong, G., Li, H., Bing, X., Chen, Y., Jing, X., Gershenzon, J., Lou, Y., Baldwin, I. T., & Li, R. (2023). Sakuranetin protects rice from brown planthopper attack by depleting its beneficial endosymbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(23), 1-10.
- Liu, X., Wu, S., Xu, J., Sui, C., & Wei, J. (2017). Application of CRISPR/Cas9 in plant biology. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(3), 292-302.
- Liu, Z., Xie, L., & Chen, W. (2025). Advancement of uridine diphosphate-dependent glycosyltransferases (UGTs) in the glycosylation modification of natural products and their protein engineering. *Food Quality and Safety*, 9(1), 1-18.
- Lowder, L. G., Zhang, D., Baltes, N. J., Paul, J. W., Tang, X., Zheng, X., Voytas, D. F., Zhong, Y., Gao, Y., Ren, Q., van Eck, J., Kirk, J. A., & Qi, Y. (2015).

- A CRISPR/*Cas9* toolbox for multiplexed plant genome editing and transcriptional regulation. *Plant Physiology*, 169(2), 971–985.
- Ma, J., Wei, L., Huang, K., Wang, D., Gao, J., Chen, X., ... & Wang, Y. (2025). Biosynthesis of sakuranetin regulated by OsMPK6–OsWRKY67–OsNOMT cascade enhances resistance to false smut disease. *New Phytologist*, 245(3), 1216-1231.
- Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/*Cas9*. *The FEBS Journal*, 281(23), 5186-5193.
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., & Dugdale, B. (2018). *Improving Agrobacterium-mediated transient and stable transformation in plants*. Methods in Molecular Biology, 1676, 273–288.
- Păcurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C., & Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 76-81.
- Park, J. R., Kim, E. G., Jang, Y. H., Jan, R., Farooq, M., Ubaidillah, M., & Kim, K. M. (2022). Applications of CRISPR/*Cas9* as new strategies for short breeding to drought gene in rice. *Frontiers in Plant Science*, 13 (1), 1-15.
- Peng, M., *et al.* (2017). Differentially evolved glucosyltransferases determine natural variation of rice flavone accumulation and UV-tolerance. *Nature Communications*, 8 (1975), 1-12.
- Pipatpanukul, T., Bunnag, S., Theerakulpisut, P., & Kosittrakul, M. (2004). Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. RD6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transformation*, 26 (1), 1-13.
- Pulecio, J., Verma, N., Mejía-Ramírez, E., Huangfu, D., & Raya, A. (2017). CRISPR/*Cas9*-based engineering of the epigenome. *Cell Stem Cell*, 21(4), 431-447.
- Rahmawati, D., Santika, P., Fauzi, D. R. R., & Rosyadi Adnan, D. M. (2023, April). Characterization of five local varieties of rice (*Oryza sativa* L.) in east java, Indonesia. *Earth and Environmental Science*, 1168 (1), 1-8.
- Rachmawati, D., & Anzai, H. (2006). Studies on callus induction, plant regeneration and transformation of Javanica rice cultivars. *Plant Biotechnology*, 23(5), 521–524.
- Redman, M., King, A., Watson, C., & King, D. (2016). What is CRISPR/*Cas9*?. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*, 101(4), 213-215.
- Sahoo, K. K., Tripathi, A. K., Pareek, A., Sopory, S. K., & Singla-Pareek, S. L. (2011). An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. *Plant Methods*, 7(49), 1–14.

- Shan, Q., Wang, Y., Li, J., & Gao, C. (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols*, 9(10), 2337–2351.
- Sharma, K. K., Bhatnagar-Mathur, P., & Thorpe, T. A. (2005). Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(2), 102-112.
- Shimizu, T., Lin, F., Hasegawa, M., Nojiri, H., Yamane, H., & Okada, K. (2012b). The potential bioproduction of the pharmaceutical agent sakuranetin, a flavonoid phytoalexin in rice. *Bioengineered*, 3(6), 352–357.
- Shimizu, T., Lin, F., Hasegawa, M., Okada, K., Nojiri, H., & Yamane, H. (2012a). Purification and Identification of Naringenin 7-O-Methyltransferase, a Key Enzyme in Biosynthesis of Flavonoid Phytoalexin Sakuranetin in Rice. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(23), 19315–19325.
- Sony, S. K., Kaul, T., Motelb, K. F. A., Thangaraj, A., Bharti, J., Kaul, R., ... & Nehra, M. (2023). CRISPR/Cas9-mediated homology donor repair base editing confers glyphosate resistance to rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 14(1), 1-20.
- Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 147-154.
- Upadhyay, S. K., Kumar, J., Alok, A., & Tuli, R. (2020). CRISPR/Cas9 mutagenesis by translocation of Cas9 protein into plant cells using *Agrobacterium* type IV secretion system. *Frontiers in Genome Editing*, 2(6), 1-11.
- Wang, J. Y., & Doudna, J. A. (2023). CRISPR technology: A decade of Genome Editing is only the beginning. *Science*, 379(6629), 1-13.
- Xu, J., & Huang, B. (2014). *Responses of plant tissues to oxidative stress during tissue culture*. *Plant Cell Reports*, 33(2), 179–190. Berim, A., & Gang, D. R. (2016). Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis. *In Phytochemistry Reviews*, 15(3), 363–390
- Zhao, C., Liu, B., Piao, S., Wang, X., Lobell, D. B., Huang, Y., ... & Asseng, S. (2017). Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proceedings of the National Academy of sciences*, 114(35), 9326-9331.
- Zhang, S., Shen, J., Li, D., & Cheng, Y. (2021). Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics*, 11(2), 614-634.
- Zhang, Y., Bai, Y., Wang, N., Zhu, T., Guo, T., Yao, W., Zhu, J. K., Zhang, Y., & Wang, Z. (2019). Development of an *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for targeted mutagenesis in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 17(7), 1233–1245.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Kegiatan Penelitian



Persiapan benih padi



Pembuatan media



Sterilisasi menggunakan autoclave



Penuangan media pada botol kultur



Persiapan induksi kalus



Penimbangan berat basah kalus



Persiapan infeksi / transformasi kalus



Kalus pasca infeksi



Subkultur fase regenerasi



Planlet fase regenerasi



Planlet fase seleksi



Planlet fase aklimatisasi