



**TRANSFORMASI MUTAGENESIS TERARAH GEN PENGKODE
UGTS *MIDSTREAM SITE* DENGAN MEDIASI *Agrobacterium
tumefaciens* STRAIN LBA4404 MENGGUNAKAN
CRISPR/Cas9 PADA TANAMAN PADI**

SKRIPSI

Oleh

**Annisa Dwi Aulia
221510501038**

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



**TRANSFORMASI MUTAGENESIS TERARAH GEN PENGKODE
UGTS *MIDSTREAM SITE* DENGAN MEDIASI *Agrobacterium
tumefaciens* STRAIN LBA4404 MENGGUNAKAN
CRISPR/Cas9 PADA TANAMAN PADI**

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

SKRIPSI

Oleh

**Annisa Dwi Aulia
221510501038**

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

PERSEMBAHAN

Dengan Puji Syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya yang telah memberikan kesehatan, kekuatan, kesabaran serta ketekunan bagi penulis sehingga dapat terselesaikan karya tulis ilmiah ini dengan segenap kerendahan hati Penulis persembahkan karya Skripsi ini sebagai bentuk rasa terima kasih 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. dan anggota Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, MS. dan Prof. Ir. Sholeh Avivi, M.Si.
2. Bapak Mohammad Ubaidillah, S.Si., M.Agr., Ph.D selaku dosen pembimbing skripsi yang selalu memberikan arahan, motivasi, kritik, dan saran yang membangun untuk menyelesaikan skripsi ini.
3. Bapak Ir. Didik Pudji Restanto, M.S., selaku dosen penguji utamas dan Bapak Prof. Ir. Kacung Hariyono, M.S., Ph.D. selaku dosen penguji anggota yang telah memberikan evaluasi demi penyempurnaan skripsi ini.
4. Bapak Mohammad Ubaidillah, S.Si., M.Agr., Ph.D selaku dosen pembimbing akademik yang senantiasa memberikan semangat, nasihat, dan arahan selama kegiatan perkuliahan hingga proses mencapai gelar Sarjana Pertanian.
5. Keluarga penulis, kedua orang tua saya Bapak Umar dan Ibu Emi Endrawati, serta kakak penulis Moh Salafudin Rifai dan Rahayu Nining Anggraini yang selalu menjadi motivasi, semangat, dukungan mental, dan kasih mereka yang mampu membawa saya sampai pada penyelesaian penulisan skripsi.

MOTTO

“Sesungguhnya Beserta Kesulitan Ada Kemudahan”

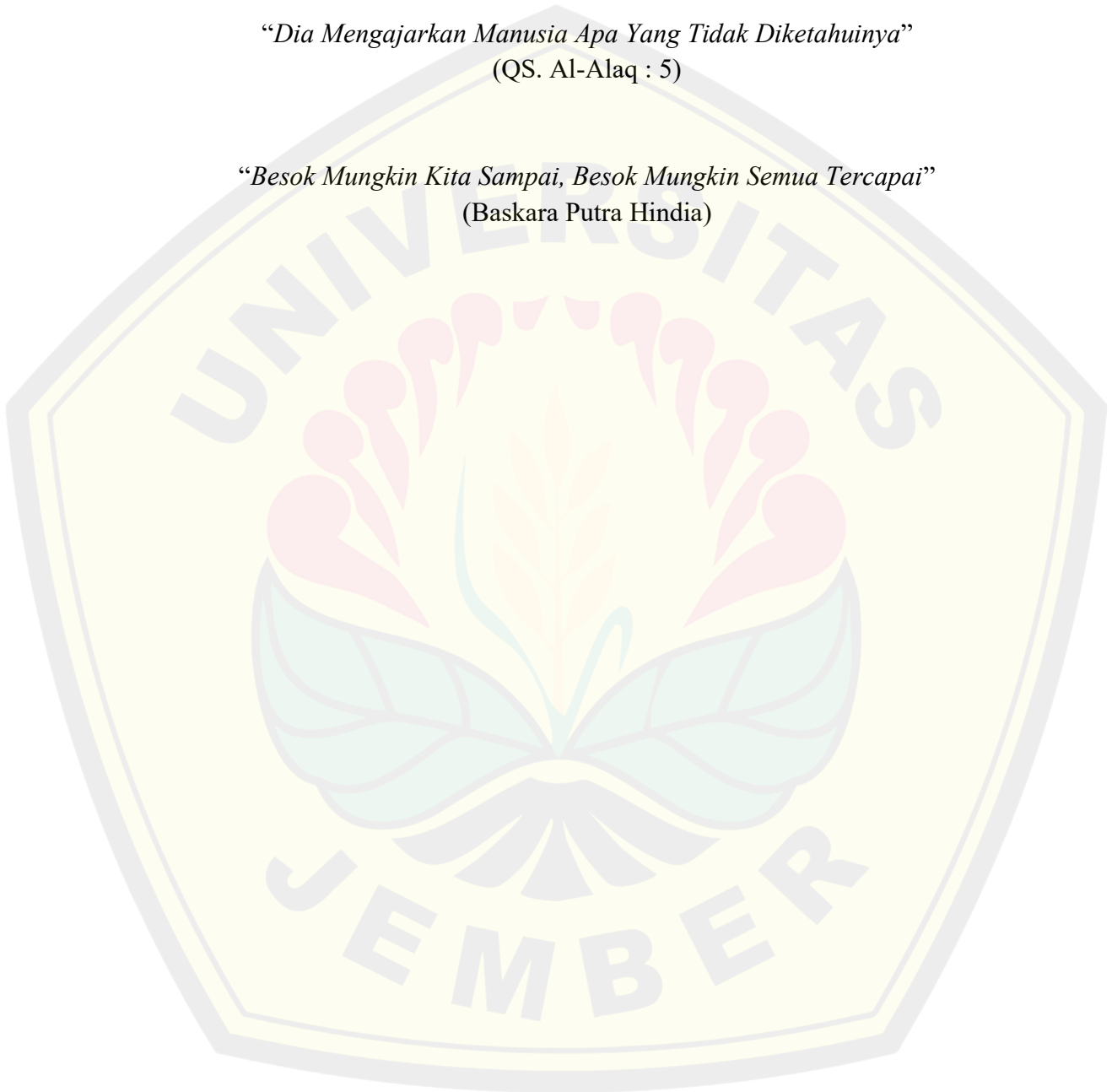
(QS. Al-Insyirah: 6)

“Dia Mengajarkan Manusia Apa Yang Tidak Diketahuinya”

(QS. Al-Alaq : 5)

“Besok Mungkin Kita Sampai, Besok Mungkin Semua Tercapai”

(Baskara Putra Hindia)



PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Annisa Dwi Aulia

NIM : 221510501038

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa tesis yang berjudul **”Transformasi Mutagenesis Terarah Gen Pengkode UGTs *Midstream Site* Dengan Mediasi *Agrobacterium tumefaciens* STRAIN LBA4404 Menggunakan 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, 09 Juni 2026
Yang menyatakan,

Annisa Dwi Aulia
NIM. 221510501038

HALAMAN PERSETUJUAN

Skripsi berjudul “Transformasi Mutagenesis Terarah Gen Pengkode UGTs *Midstream Site* Dengan Mediasi *Agrobacterium tumefaciens* STRAIN LBA4404 Menggunakan CRISPR/Cas9 pada Tanaman Padi” telah diuji dan disetujui oleh Fakultas Pertanian Universitas Jember pada:

Hari : Selasa
Tanggal : 09 Juni 2026
Tempat : Fakultas Pertanian, Universitas Jember

Pembimbing

1. Pembimbing Utama Tanda Tangan
Nama : Mohammad Ubaidillah, S.Si., M.Agr., Ph.D.
NIP : 198612112019031008 (.....)

Penguji

1. Penguji Utama
Nama : Ir. Didik Pudji Restanto, M.S.,
NIP : 196504261994031001 (.....)

2. Penguji Anggota 1
Nama : Prof. Ir. Kacung Hariyono, M.S., Ph.D.
NIP : 196408141995121001 (.....)

RINGKASAN

Transformasi Mutagenesis Terarah Gen Pengkode UGTs *Midstream Site* dengan Mediasi *Agrobacterium tumefaciens* STRAIN LBA4404 Menggunakan CRISPR/Cas9 Pada Tanaman Padi; Annisa Dwi Aulia; 221510501038; 2022; 67 halaman; Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Sakuranetin merupakan senyawa fitoaleksin yang disintesis tanaman sebagai respons terhadap serangan patogen dan cekaman lingkungan. Senyawa ini dibentuk melalui jalur metabolisme flavonoid, dimana naringenin berperan sebagai prekursor utama. Dalam kondisi fisiologis, naringenin sering kali terkonjugasi menjadi bentuk glikosilasi yang dikatalisis oleh enzim *UDP-Glucosyltransferase* (UGTs), yang cenderung menurunkan bioaktivitasnya sebagai fitoaleksin. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk melakukan mutasi terarah pada gen *UGTs* menggunakan teknologi CRISPR/Cas9 guna menghambat glikosilasi naringenin, sehingga akumulasi sakuranetin meningkat dan ketahanan tanaman terhadap cekaman biotik lebih optimal. Metode transformasi yang digunakan adalah melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa konstruksi vektor CRISPR/Cas9-sgRNA. Hasil penelitian menunjukkan Pada fase regenerasi diperoleh planlet varietas Pandan Wangi sejumlah 2 planlet Ketan Hitam 1 planlet dan 2 planlet pada varietas. Dengan pada varietas pandawangi terdapat 2 tanaman putatif transforman yang berhasil bertahan atau resisten terhadap antibiotik *hygromycin* pada fase seleksi. Efisiensi transformasi pada varietas Pandan Wangi mencapai 0,2%, sedangkan varietas Ketan Hitam 0,1% dan Pendok sebesar 0,2%. Perbedaan efisiensi transformasi antarvarietas dipengaruhi oleh respon genotip terhadap proses infeksi dan transfer T-DNA oleh *A. tumefaciens*. Keberhasilan integrasi plasmid pRGEB32::UGTs.sgRNA1 ke dalam genom tanaman padi dikonfirmasi melalui analisis PCR menggunakan marka HPTII dengan amplifikasi 545 bp dan Cas9 dengan amplifikasi 495 bp sehingga tanaman tersebut dapat dinyatakan sebagai transforman positif yang membawa konstruksi CRISPR/Cas9-UGTs.

Kata kunci : UDP-Glycosyltransferases (UGTs), CRISPR/Cas9, Genome Editing, Sakuranetin, Rice

SUMMARY

Targeted Mutagenesis Transformation of Midstream-site UGTs Encoding Genes Mediated by *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 Based on CRISPR/Cas9 in Rice (*Oryza sativa*); Annisa Dwi Aulia; 221510501038; 2022; 68 pages; Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, University of Jember.

*Sakuranetin is a phytoalexin compound synthesized by plants in response to pathogen attacks and environmental stress. This compound is produced via the flavonoid metabolic pathway, where naringenin acts as the primary precursor. Under physiological conditions, naringenin is often conjugated into a glycosylated form catalyzed by the enzyme UDP-glucosyltransferase (UGTs), a process that tends to reduce its bioactivity as a phytoalexin. Therefore, this study aimed to perform targeted mutations on the UGTs gene using CRISPR/Cas9 technology to inhibit naringenin glycosylation, thereby increasing sakuranetin accumulation and optimizing plant resistance to biotic stress. The transformation was conducted via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using a CRISPR/Cas9-sgRNA vector construct. During the regeneration phase, plantlets were obtained from the Pandan Wangi (2), Ketan Hitam (1), and Pendok (2) varieties. Notably, two putative transformants of the Pandan Wangi variety successfully survived and exhibited resistance to hygromycin during the selection phase. The transformation efficiency was recorded at 0.2% for Pandan Wangi, 0.1% for Ketan Hitam, and 0.2% for Pendok. The differences in transformation efficiency among the varieties were influenced by their genotypic responses to the infection process and T-DNA transfer by *A. tumefaciens*. The successful integration of the pRGEB32::UGTs.sgRNA1 plasmid into the rice genome was confirmed through PCR analysis using HPTII markers with 545 bp amplification and Cas9 markers with 495 bp amplification, identifying the plants as positive transformants carrying the CRISPR/Cas9-UGTs construct.*

Keywords: *UDP-Glycosyltransferases* (UGTs), CRISPR/Cas9, Genome Editing, Sakuranetin, Rice

PRAKATA

Alhamdulillah, dengan mengucapkan 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 *Midstream Site* Dengan Mediasi *Agrobacterium tumefaciens* STRAIN LBA4404 Menggunakan CRISPR/Cas9 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. Bapak Mohammad Ubaidillah S.Si., M.Agr., Ph.D. selaku Dosen Pendamping Akademik sekaligus sebagai Dosen Pembimbing Skripsi yang senantiasa memberikan arahan, motivasi, kritik, dan saran yang membangun untuk 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. Bapak Ir. Didik Pudji Restanto, M.S., selaku dosen penguji utamas dan Bapak Prof. Ir. Kacung Hariyono, M.S., Ph.D. selaku dosen penguji anggota yang telah memberikan evaluasi demi penyempurnaan skripsi ini;
5. Bapak/Ibu Dosen dan Staff di lingkungan Fakultas Pertanian yang telah membantu Penulis dalam menggali ilmu selama perkuliahan;
6. Kedua orang tua Penulis, Bapak Umar dan Ibu Emi Endrawati, dua orang hebat yang selalu menjadi motivasi, doa, dan dukungan baik secara moral maupun materi kepada Penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini;
7. Kedua kakak Penulis, Moch Salafudin Rifai dan Rahayu Nining Anggraini yang selalu mendukung dan memberikan semangat kepada penulis;
8. Tiffany Achita Dewi selaku *labmate* sekaligus sahabat yang telah menemani baik suka maupun duka Penulis dan memberikan dukungan secara penuh selama proses penelitian hingga menyelesaikan skripsi;

9. Anggota “MU Ressearch Team” Tiffany, Abdul, Gagat, Mayla, Aiqe, Hilda, Putri, Nirmala, Abel, Rizki, Firsty, Lissa, Sandy, Billy, Della, Dayu, Kak Angger, Kak Rossa, Kak Evita dan Om danny yang senantiasa membantu dan memberi motivasi dalam proses penelitian dan penulisan skripsi.
10. Teman-teman dekat penulis Tiffany, Herfiza, Vita, Nurisasy, Ayu, Bitu, Asma, Della Intan, Anggerda, Siska, Ihsan, Dara, Hana, Yuka dan Niar Terima kasih atas beberapa hal yang dapat menjadi sumber motivasi penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
11. Penulis dan pengarang lagu, Baskara Putra Hindia dan Nadin Amizah yang telah menciptakan banyak lagu indah dan memotivasi Penulis selama proses penelitian dan penulisan skripsi.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisan skripsi dan penulis telah berusaha menyelesaikan tanggung jawabnya dalam penulisan skripsi ini dengan sebaik-baiknya. Oleh karena itu, penulis berharap adanya kritik dan saran yang bersifat membangun sehingga menjadikan skripsi ini lebih baik. Semoga segala sesuatu yang tertulis dalam skripsi ini dapat memberikan informasi bagi para pembaca.

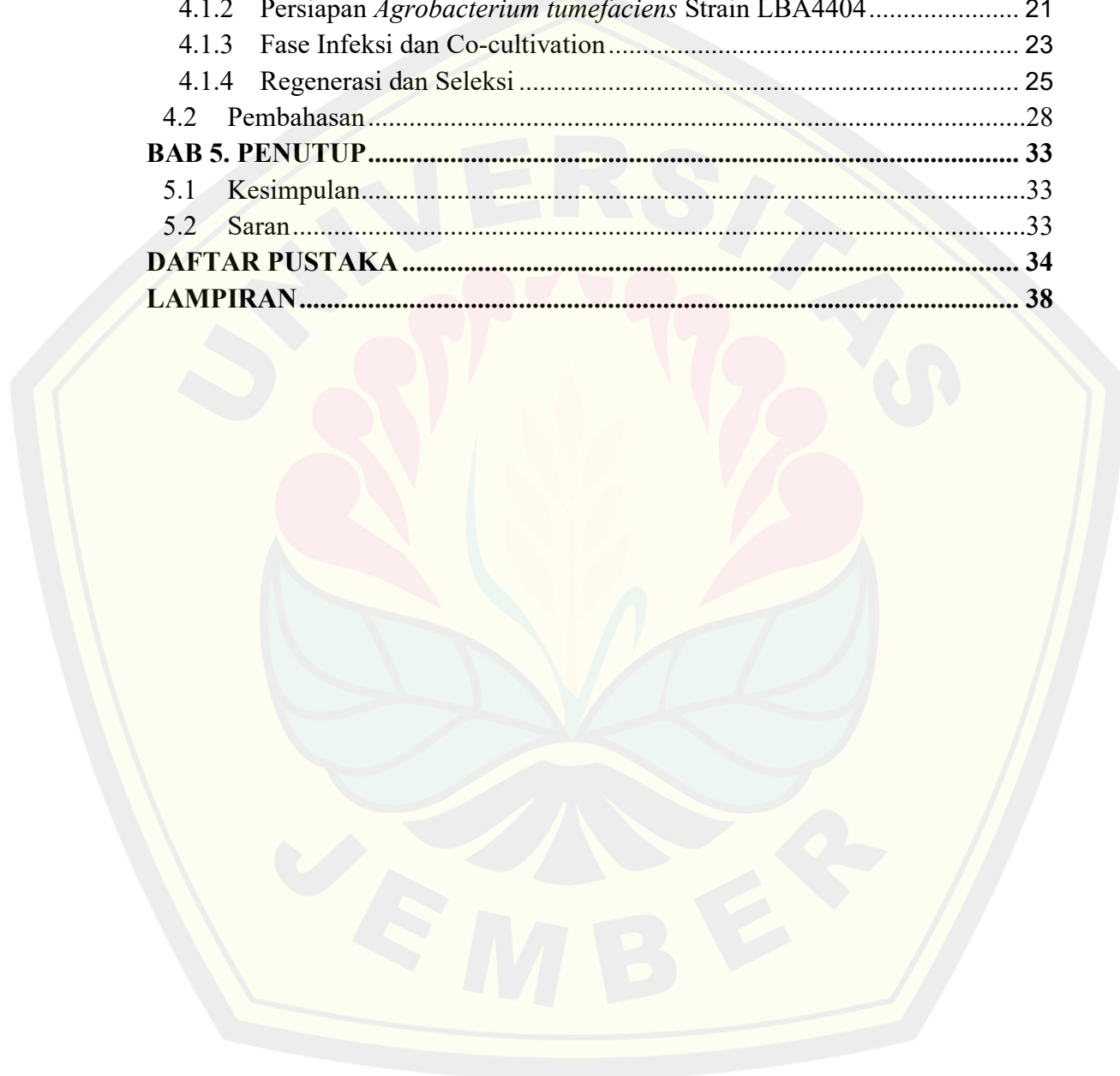
Jember, 09 Juni 2026

Penulis

DAFTAR ISI

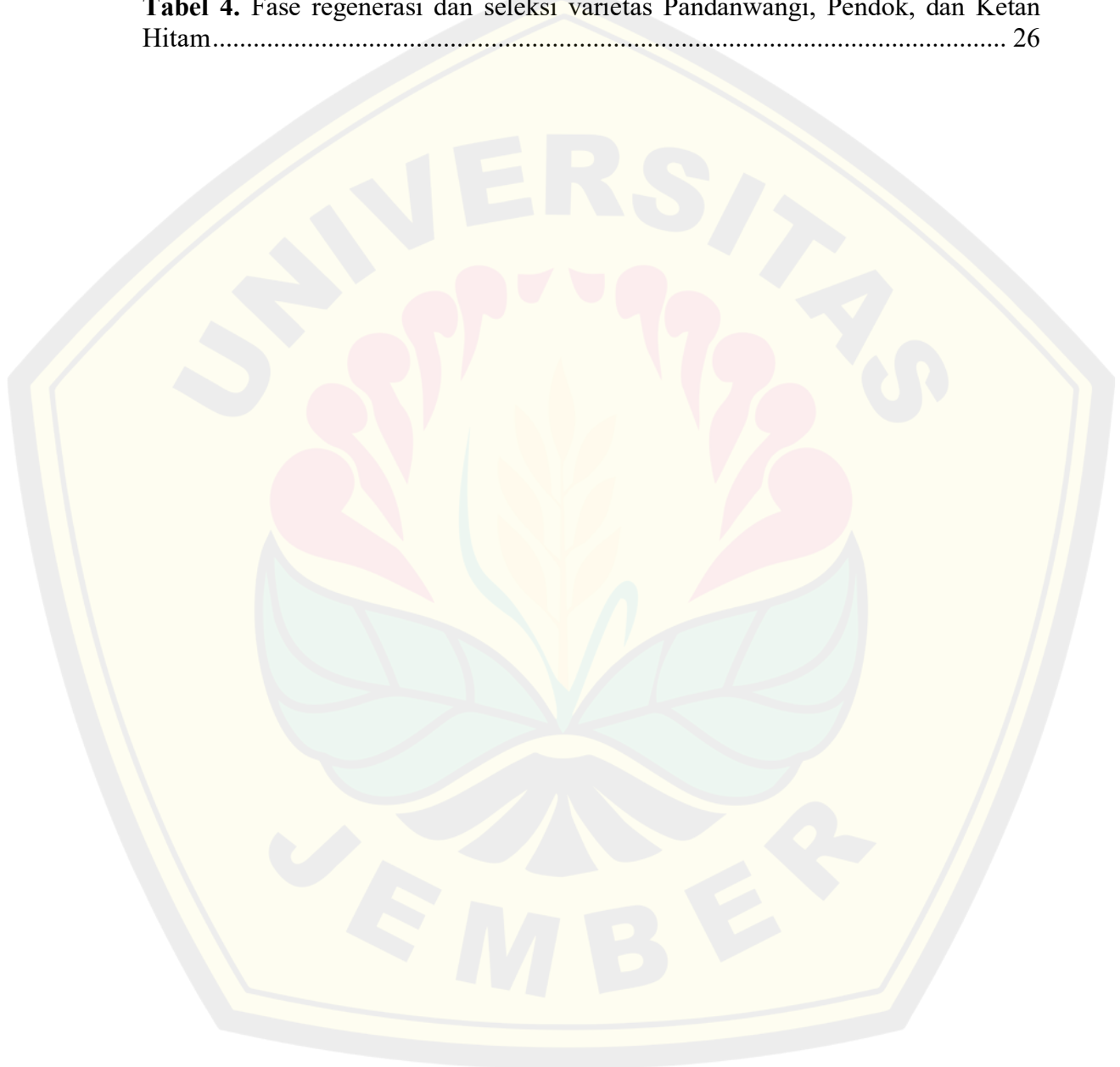
SKRIPSI	i
PERSEMBAHAN	ii
MOTTO	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
HALAMAN PERSETUJUAN	v
RINGKASAN	vi
SUMMARY	vii
PRAKATA	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Korelasi Biosintesis Sakuranetin Terhadap UDP- <i>glucuronosyltransferases</i>	4
2.2 Transformasi Genetik	5
2.3 Transformasi Genetik dengan Metode CRISPR/Cas9 dan <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	7
2.4 Transformasi dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Strain LBA4404	8
2.5 Mutasi Terarah Dengan CRISPR/Cas9 dan <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
2.6 Hipotesis.....	10
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
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.....	12
3.3.1 Persiapan Plasmid pRGEB32	12
3.3.2 Transformasi Plasmid pRGEB-UGT's 2 ke dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
3.3.3 Transformasi pada Kalus Padi.....	13
3.3.4 Pengukuran Luas Kalus pada Aplikasi ImageJ	17
3.4 Variabel Pengamatan.....	17
3.4.1 Hasil PCR Konfirmasi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transforman	17
3.4.2 Respon Eksplan induksi Kalus	17

3.4.3	Respon Kalus Setelah Infeksi	18
3.4.4	Visualisasi Hasil Pewarnaan Sitokimia Sel	18
3.4.5	Analisis PCR Tanaman Transforman	19
3.5	Analisis Data	19
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN		20
4.1	Hasil.....	20
4.1.1	Persiapan Eksplan Kalus	20
4.1.2	Persiapan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Strain LBA4404.....	21
4.1.3	Fase Infeksi dan Co-cultivation.....	23
4.1.4	Regenerasi dan Seleksi	25
4.2	Pembahasan.....	28
BAB 5. PENUTUP		33
5.1	Kesimpulan.....	33
5.2	Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA		34
LAMPIRAN.....		38



DAFTAR TABEL

Tabel 1. Primer gen tahapan PCR	13
Tabel 2. Persiapan Eksplan Kalus Varietas Pandanwangi, Pendok dan Ketan Hitam	20
Tabel 3. Fase infeksi (co-cultivasi) varietas Pandanwangi, Pendok, dan Ketan Hitam.....	24
Tabel 4. Fase regenerasi dan seleksi varietas Pandanwangi, Pendok, dan Ketan Hitam.....	26



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Jalur biosintesis sakuranetin di tanaman padi (Zhao <i>et al.</i> , 2024).....	4
Gambar 2. Transformasi genetik dengan metode RNA Silencing (Majumdar, et al 2017)	6
Gambar 3. Transformasi genetik dengan metode TALENs (Chen & Gao., 2013)	6
Gambar 4. Mekanisme CRISPR/Cas9 (Wang et al., 2019).....	8
Gambar 5. Ilustrasi konstruk plasmid pRGEB32 dengan sgRNA UGT's 2	12
Gambar 6. Persiapan kalus varietas padi (1) Pandanwangi, (2) Pendok, dan (3) Ketan Hitam pada media induksi <i>Murashige</i> dan <i>Skoog</i> (MS) 2,4D 2 ppm, (A1-A3) Induksi kalus 0 HST, (B1-B3) Induksi kalus 7 HST, (C1-C3) Induksi kalus 14 HST, (D1-D3) Hasil morfologi kalus, dan (E1-E3) Viabilitas kalus. <i>Scale bar</i> :1 mm..	21
Gambar 7. Inokulasi <i>Agrobacterium</i> pRGEB32::UGTs pada media LB padat dengan tambahan antibiotik <i>rifampycin</i> 50 ppm dan <i>kanamycin</i> 50 ppm, (A) Peremajaan menggunakan <i>streak plate method</i> , (B) Persiapan infeksi menggunakan <i>spread plate method</i>	22
Gambar 8. Visualisasi hasil PCR dengan marka seleksi HPTII pada koloni <i>A tumafaciens</i> Strain LBA 4404 menggunakan gel <i>agarose</i> 1%.....	23
Gambar 9. Karakter kalus pasca infeksi pada varietas padi (1) Pandanwangi, (2) Pendok, dan (3) Ketan Hitam di media <i>co-cultivasi</i> <i>Murashige</i> dan <i>Skoog</i> (MS) 2,4D 2 ppm, (A1-A3) Jumlah eksplan kalus, (B1-B3) Kalus normal, (C1-C3) Kalus mengalami <i>overgrowth</i> , dan (D1-D3) Kalus mengalami <i>browning</i> . <i>Scale bar</i> : 1 mm.	25
Gambar 10. Respon eksplan fase regenerasi pada varietas padi (1) Pandanwangi, (2) Pendok, dan (3) Ketan Hitam di media <i>Murashige</i> dan <i>Skoog</i> (MS) Kinetin 2 ppm dan NAA 1 ppm, (A1-A3) Tingkat Regenerasi kalus dalam <i>petridish</i> , (B1-B3) Kalus mengalami <i>greenspot</i> , (C1-C3) Planlet, (D1-D3) Tanaman putative transforman, (E1-E3) Aklimatisasi tanaman putative transforman. <i>Scale bar</i> : 1 mm.	27
Gambar 11. Hasil tanaman padi transforman knockout UGTs pada varietas Pandanwangi (21HST).....	27
Gambar 12. Hasil analisis tanaman padi positif transforman menggunakan primer Cas9 (A), dan <i>hptII</i> (B), Kontrol (kode 1) dan Varietas Pandanwangi (Kode P1 dan P2).....	28

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman padi (*Oryza sativa*) merupakan komoditas utama di Indonesia yang mengambil pangsa pasar sekitar 9% dari total produksi padi di dunia. Seiring dengan meningkatnya populasi manusia maka kebutuhan beras sebagai makanan pokok juga semakin meningkat sehingga perlunya pengembangan tanaman padi (Gouda et al., 2020). Tantangan masa kini dari budidaya padi adalah perubahan cuaca yang ekstrim yang meningkatkan suhu lingkungan hingga 0.5-3°C. Suhu yang meningkat berpotensi meningkatkan kekeringan ketika musim kemarau dan meningkatkan curah hujan ketika musim penghujan, curah hujan yang tinggi serta lembab berpotensi menyebabkan luka dan merangsang terjadinya serangan penyakit (Mousumi et al., 2022). Iklim dan suhu berperan langsung dalam memacu siklus hidup serta laju perkembangan patogen, sekaligus menekan kemampuan sistem pertahanan tanaman. Gejala ini teramati dari meningkatnya serangan penyakit blas (*Magnaporthe oryzae*) dan hawar daun (*Xanthomonas oryzae*). Salah satu mekanisme pertahanan padi terhadap serangan bakteri dan jamur akan memproduksi metabolit sekunder sakuranetin (Zhao et al., 2024).

Sakuranetin sebagai salah satu flavonoid dihasilkan tanaman secara alami yang menjadi sistem pertahanan tanaman dari cekaman biotik dan abiotik, disaat bersamaan sakuranetin memiliki fungsi antioksidan, antidiabetic, antikanker, antibakteri dan antimikroba (Stompor, 2020). Selain itu sakuranetin dilaporkan juga senyawa bioaktif sebagai agen pertahanan terhadap stres abiotik antara lain menggunakan penyinaran UV (*ultraviolet*) dan CuCl₂ (Rakwal et al., 1996). Sakuranetin merupakan hasil biosintesis naringenin yang dikode oleh NOMT (*naringenin 7-O-methyltransferase*) (Sun et al., 2022). Naringenin berfungsi sebagai prekursor atau flavonoid pertama yang diubah dari senyawa naringenin chalcone oleh *chalcone isomerase*, naringenin juga dapat menjadi senyawa perantara bagi biosintesis isoflavon serta berbagai flavon lainnya. Proses glikosilasi oleh UGTs (*UDP-glycosyltransferase*) terhadap naringenin menghambat konversi senyawa naringenin menjadi sakuranetin melalui dimetilasi oleh enzim NOMT,

sehingga produksi sakuranetin yang berperan dalam sistem pertahanan tanaman terhadap cekaman biotik dan abiotik menjadi terbatas (Berim & Gang, 2016). UGTs mengubah naringenin menjadi apigenin, keterlibatan ekspresi gen UGTs dalam sintesis flavonoid sehingga naringenin tidak dapat diubah menjadi sakuranetin. Berdasarkan hal tersebut, diperlukan adanya *knock out* gen UGTs pada jalur biosintesis naringenin agar akumulasi sakuranetin lebih tinggi, sehingga memperkuat sistem pertahanan tanaman.

Mutasi pada gen pengkode UGTs dilakukan untuk mengoptimalkan fungsinya melalui pengaturan elemen regulator transkripsi, sehingga kemampuan adaptasi tanaman terhadap stres lingkungan dapat meningkat secara efektif (Nadeem et al., 2019). Pemilihan strategi mutasi yang difokuskan pada *midstream site*, khususnya pada ekson pertama gen target, didasarkan pada pertimbangan efektivitas dalam menghasilkan inaktivasi gen secara menyeluruh. Ekson kedua 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 kehilangan fungsi yang stabil dan konsisten pada tanaman (Zhang et al., 2019; Ma et al., 2014). Pada penelitian ini difokuskan untuk *knock out* gen UGTs yang diharapkan mampu meningkatkan gen NOMT yang akan dilakukan menggunakan teknik transformasi mutagenesis pada gen UGTs via CRISPR pRGE32 pada tanaman padi. Penelitian ini diharapkan memberikan informasi fundamental baru terhadap jalur biosintesis sakuranetin dan diharapkan mampu meningkatkan senyawa sakuranetin pada tanaman padi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang rumusan masalah yang dikaji yaitu bagaimana efisiensi transformasi dan mutagenesis gen pengkode UGTs untuk meningkatkan sakuranetin pada tanaman padi lokal yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404?

1.3 Tujuan

Mengetahui efisiensi transformasi dan mutagenesis gen pengkode UGTs untuk meningkatkan sakuranetin pada padi tanaman lokal yang dimediasi *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

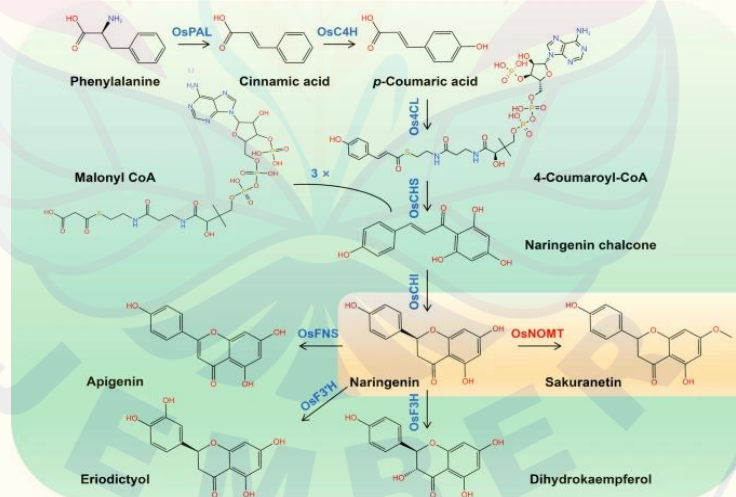
1.4 Manfaat

Mendapatkan tanaman padi lokal transforman hasil pembungkaman gen UGTs yang tinggi sakuranetin.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Korelasi Biosintesis Sakuranetin Terhadap UDP-Glucosyltransferase

Tanaman padi yang mengalami cekaman biotik dan abiotik memberikan respon dengan memproduksi metabolit sekunder berupa senyawa toksik seperti terpenoid dan flavonoid (Saddique et al., 2018). Sebagai mekanisme pertahanan terhadap paparan sinar UV, tanaman mengaktifkan ekspresi gen *OsNOMT* yang memicu peningkatan aktivitas enzim NOMT. Enzim tersebut kemudian mengkatalisis reaksi metilasi naringenin dengan memanfaatkan AdoMet (*S-adenosyl-L-methionine*) sebagai kofaktor, sehingga menghasilkan sakuranetin sebagai senyawa fitoaleksin yang penting bagi sistem pertahanan tanaman (Zhao et al., 2024). *OsNOMT* menjadi kunci utama pada jalur biosintesis naringenin menjadi sakuranetin (Zhao et al., 2024). Kandungan naringenin dapat dirubah menjadi bentuk senyawa lain oleh gen UGTs yaitu apigenin sehingga naringenin tidak dapat dirubah menjadi sakuranetin dan menyebabkan kandungan sakuranetin pada tanaman padi menjadi rendah yang akan berpengaruh terhadap resistensi tanaman terhadap patogen penyebab penyakit pada tanaman (An et al., 2023).



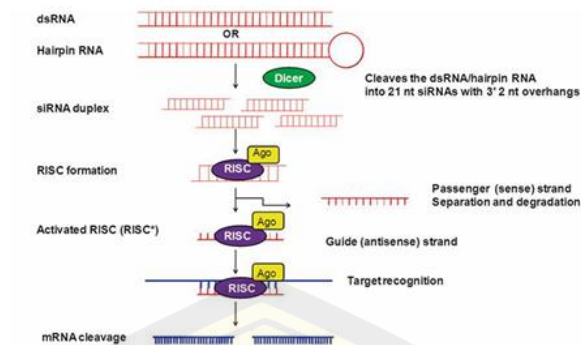
Gambar 1. Jalur biosintesis sakuranetin di tanaman padi (Zhao et al., 2024)

UGTs (*UDP-glycosyltransferase*) adalah glikosiltransferase terbesar yang banyak ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi. UGTs dapat memodifikasi metabolit sekunder, hormon dan xenobiotik serta berperan penting dalam

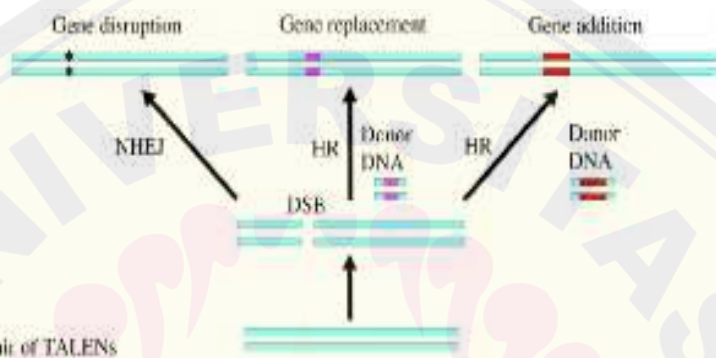
keanekaragaman metabolit sekunder tumbuhan pada suatu spesies tanaman (Nishimura et al., 2010). Ekspresi gen UGTs dalam sintesis flavonoid naringenin menghasilkan apigenin yang lebih tinggi sehingga naringenin yang diubah ke bentuk lain seperti sakuranetin kandungannya akan rendah (Ali et al., 2017). Enzim UGTs merupakan enzim fase II yang berperan dalam detoksifikasi melalui konjugasi glukoronil, yaitu dengan mengkatalisis pengikatan gugus glukoronil dari *uridine 5'-diphosphate glucuronic acid* (UDPGA) ke berbagai substrat, termasuk naringenin. Proses glukuronidasi ini mengubah naringenin menjadi naringenin glukuronida, yang secara biologis bersifat tidak aktif. Oleh karena itu, strategi *knock-out* pada gen pengkode UGTs dilakukan untuk menghambat konjugasi tersebut, sehingga akumulasi naringenin sebagai prekursor tetap terjaga. Melalui hambatan ini, naringenin dapat dialihkan untuk memproduksi sakuranetin secara optimal guna meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cekaman biotik dan abiotik

2.2 Transformasi Genetik

Transformasi genetik merupakan teknik transfer materi genetik dari organisme sumber ke dalam genom target untuk menghasilkan tanaman transgenik. Seiring perkembangannya, berbagai metode telah dikembangkan, mulai dari *RNA silencing* hingga *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALENs). *RNA silencing* atau *RNA interference* (RNAi) merupakan metode yang memanipulasi mekanisme pertahanan alami sel untuk menekan ekspresi gen target melalui degradasi mRNA (Matelot et al., 2017; Rajam, 2020). Meskipun efektif untuk studi *knock-down* gen, metode ini memiliki keterbatasan berupa sifat penonaktifan yang tidak permanen serta risiko efek samping pada gen yang tidak ditargetkan (*off-target*) (Dass et al., 2021). Selain itu, terdapat pula metode TALENs yang bekerja dengan memotong DNA secara spesifik melalui domain pengikat TALE dan domain nuklease FokI (Chen & Gao, 2013). Namun, aplikasi TALENs sering kali terkendala oleh prosedur perakitan protein yang rumit, biaya tinggi, serta kebutuhan akan sepasang protein spesifik untuk setiap lokasi target (Gaj et al., 2013).



Gambar 2. Transformasi genetik dengan metode RNA Silencing (Majumdar, et al 2017)



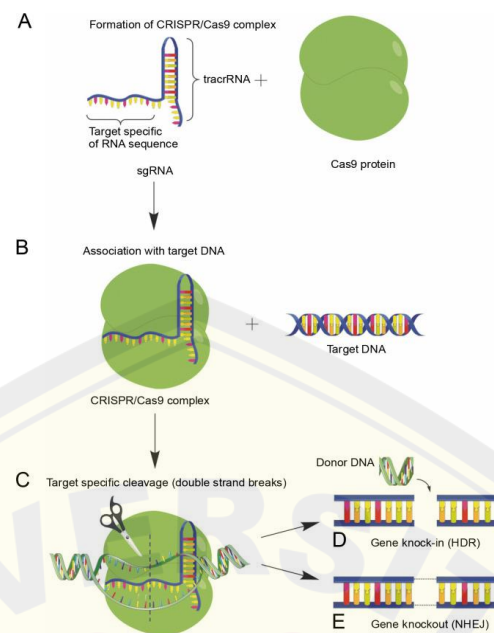
Gambar 3. Transformasi genetik dengan metode TALENs (Chen & Gao., 2013)

Berbeda dengan TALENs yang memerlukan perakitan protein baru yang spesifik dan kompleks untuk setiap lokasi target DNA sebuah proses yang memakan waktu dan biaya tinggi, CRISPR/Cas9 bersifat terprogram melalui sgRNA. Untuk menargetkan gen yang berbeda, metode CRISPR/Cas9 hanya perlu mendesain ulang sekuens *spacer* pada *single guide RNA* (sgRNA) berukuran sekitar 20 nukleotida. Penggantian sekuens RNA jauh lebih sederhana, cepat, dan ekonomis dibandingkan dengan rekayasa ulang domain protein pada TALENs atau *Zinc Finger Nucleases* (ZFNs). Sistem CRISPR/Cas9 membentuk kompleks ribonukleoprotein yang sangat stabil di dalam inti sel. Keberhasilan pengikatan *Cas9* pada DNA target sangat ditentukan oleh keberadaan *Protospacer Adjacent Motif* (PAM) yang terletak tepat di sebelah sekuens target. Kombinasi antara pengenalan sekuens DNA oleh sgRNA dan lokalisasi oleh PAM memastikan bahwa pemotongan untai ganda DNA (*Double-Strand Break/DSB*) terjadi dengan akurasi tinggi pada lokasi yang diinginkan. Presisi ini meminimalkan variabel yang tidak terprediksi selama proses mutasi terarah menjadikannya metode yang paling efektif

dan efisien untuk menghasilkan tanaman transforman dibandingkan teknik penyuntingan genom sebelumnya (Gaj et al., 2013).

2.3 Transformasi Genetik dengan Metode CRISPR/Cas9 dan *Agrobacterium tumefaciens*

CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) merupakan teknologi penyuntingan genom yang diadaptasi dari sistem pertahanan bakteri yang pertama kali diidentifikasi pada *Escherichia coli* (Ishino et al., 1987). Dalam aplikasi transformasi tanaman padi, sistem ini diintegrasikan ke dalam vektor T-DNA biner berbasis *Gateway* yang memuat gen *Cas9* serta *single guide RNA* (sgRNA) dalam satu unit ekspresi. Proses desainnya dimulai dengan mengkloning sekuens *spacer* spesifik gen target ke dalam vektor entri, yang selanjutnya dipindahkan ke vektor ekspresi untuk disatukan dengan gen *Cas9*. Di dalam sel tanaman, efisiensi penyuntingan ditentukan oleh mekanisme lokalisasi protein *Cas9* yang dilengkapi dengan *nuclear localization signal* (NLS) untuk membentuk kompleks ribonukleoprotein di dalam inti. Untuk mendukung fungsionalitasnya, ekspresi sgRNA dikendalikan oleh promotor pol III (U3 snRNA), sementara gen *Cas9* yang telah dioptimasi kodonnya dijalankan di bawah kendali promotor *ubiquitin*. Guna meningkatkan afinitas pengikatan *Cas9* serta menstabilkan pembentukan *R-loop* pada DNA target, desain sgRNA dioptimalkan dengan struktur sekunder yang mencakup *spacer* menggantung, daerah *hairpin* yang diperpanjang, serta ekor 3' yang termodifikasi.



Gambar 4. Mekanisme CRISPR/Cas9 (Wang et al., 2019).

Pada Cas9 terdapat enzim atau protein dari *Streptococcus pyogenes* dapat mudah mengenali substrat dsDNA dan membelah setiap untai dengan domain nuklease yang berbeda (HNH atau RuvC). Kedua nya memiliki fungsi yang berbeda HNH berfungsi dalam memotong satu untai DNA dengan cara mengikat dan memotong untai DNA yang tidak berpasangan pada area dekat PAM sedangkan RuvC berperan dalam pemotongan kedua untai DNA secara simultan yang telah diberi sinyal oleh PAM membentuk double strand break (DSB) (Hidayah, N., 2016). PAM (*Protospacer Adjacent Motive*) merupakan suatu motif DNA yang berperan sebagai sinyal guna mengidentifikasi target genetik yang akan diinterferensikan oleh sistem CRISPR/Cas9. Proses yang berlangsung dalam perubahan urutan DNA sehingga dua komponen sistem Cas9 yang disederhanakan ini dapat diprogram untuk menargetkan hampir semua urutan DNA yang diinginkan dalam genom dan selanjutnya menghasilkan pemutusan untai ganda atau DSB (*double - strand breaks*) berujung tumpul spesifik lokasi (Jinek M, et al., 2012).

2.4 Transformasi dengan *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404

Agrobacterium tumefaciens adalah bakteri gram negatif yang umum digunakan untuk agen rekayasa genetik dengan mekanisme melibatkan serangkaian

proses yang kompleks dimulai dari pendeteksian sinyal terhadap gen target, pengaktifan gen virulensi, kemudian T-DNA akan dipindah melalui sistem transfer yang mirip dengan sistem konjugasi (Khatimah *et al.*, 2025). Transformasi genetik menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 telah menjadi metode standar dalam rekayasa genetika tanaman, terutama karena efisiensinya yang tinggi dan kemudahan manipulasi genetiknya. Strain tersebut, yang merupakan salah satu vektor kloning yang paling sering digunakan, memiliki kemampuan alami untuk mentransfer segmen T-DNA dari plasmid Ti (*tumor-inducing*) ke genom sel tanaman inang. Keberhasilan metode ini dalam menghasilkan tanaman transgenik yang stabil telah dipublikasikan secara luas dalam berbagai penelitian, seperti yang diteliti oleh Hoekema *et al.* (1983), Bevan (1984), dan Horsch *et al.* (1985) yang menjadi landasan utama penggunaan *A. tumefaciens*. Selain itu, penelitian terbaru seperti yang dilakukan oleh Komari *et al.* (2006) dan Frame *et al.* (2002) juga menunjukkan keberhasilan strain ini dalam mentransformasi berbagai spesies tanaman, termasuk monokotil yang sebelumnya dianggap sulit, dengan modifikasi protokol yang optimal. Transformasi melalui *A. tumefaciens* LBA4404 tetap menjadi pilihan utama untuk pengembangan varietas tanaman dengan sifat-sifat unggul, seperti ketahanan terhadap hama, penyakit, dan toleransi terhadap cekaman lingkungan.

2.5 Mutasi Terarah Dengan CRISPR/Cas9 dan *Agrobacterium tumefaciens*

CRISPR/Cas9 untuk mutasi terarah pada tanaman padi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 merupakan pendekatan yang efektif (Xu *et al.*, 2014). Metode ini memanfaatkan kemampuan *A. tumefaciens* untuk mentransfer DNA ke dalam sel tanaman, sistem ini digunakan untuk mengirim komponen-komponen CRISPR/Cas9 yang akan melakukan pemotongan DNA secara spesifik di lokasi yang diinginkan. Penggunaan CRISPR/Cas9 dengan *A. tumefaciens strain* LBA4404 memungkinkan mutasi terarah yang sangat spesifik dan efisien. Sebaliknya, komponennya (gen untuk protein Cas9 dan RNA pemandu atau *guide RNA* (sgRNA) dimasukkan ke dalam plasmid vektor biner. Vektor ini dirancang untuk dapat bereplikasi di dalam *E. coli* (untuk kloning) dan ditransfer

ke dalam *A. tumefaciens* (untuk transformasi tanaman). Gen Cas9 dan sgRNA akan ditempatkan di dalam area T-DNA dari vektor biner tersebut (Char et al., 2019). *A. tumefaciens* yang sudah mengandung vektor CRISPR/Cas9 kemudian di ko-kultivikasi dengan jaringan tanaman, seperti kalus embriogenik atau kotiledon. Bakteri ini akan mengenali sinyal kimia dari sel tanaman dan mengaktifkan gen *vir* untuk memproses dan mentransfer T-DNA yang mengandung gen Cas9 dan sgRNA ke dalam inti sel tanaman. Setelah T-DNA masuk ke dalam sel tanaman, gen Cas9 akan diekspresikan menjadi protein dan sgRNA akan memandu protein Cas9 ke lokasi spesifik pada genom tanaman yang cocok dengan urutan targetnya. Cas9 kemudian akan membuat pemotongan ganda (DSB) yang memicu mekanisme perbaikan DNA sel tanaman. Perbaikan ini sering kali tidak sempurna dan dapat menyebabkan penghilangan atau penyisipan basa acak (*indel*), yang akhirnya menciptakan mutasi atau merusak gen target.

2.6 Hipotesis

Memungkinkan dilakukan transformasi tanaman padi menggunakan teknik genome editing CRISPR/Cas9 untuk pembungkaman gen UGTs *midstream site* pada tanaman padi dan dapat diperoleh tanaman transforman yang membawa T-DNA tersistem CRISPR/Cas9-UGTs..

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian “Transformasi Mutagenesis Terarah Gen Pengkode UGTs *Midstream Site* Dengan Mediasi *Agrobacterium tumefaciens* STRAIN LBA4404 Menggunakan CRISPR/Cas9 pada Tanaman Padi” dilaksanakan mulai bulan September 2025 – April 2026 di Laboratorium Agrobioteknologi, 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.

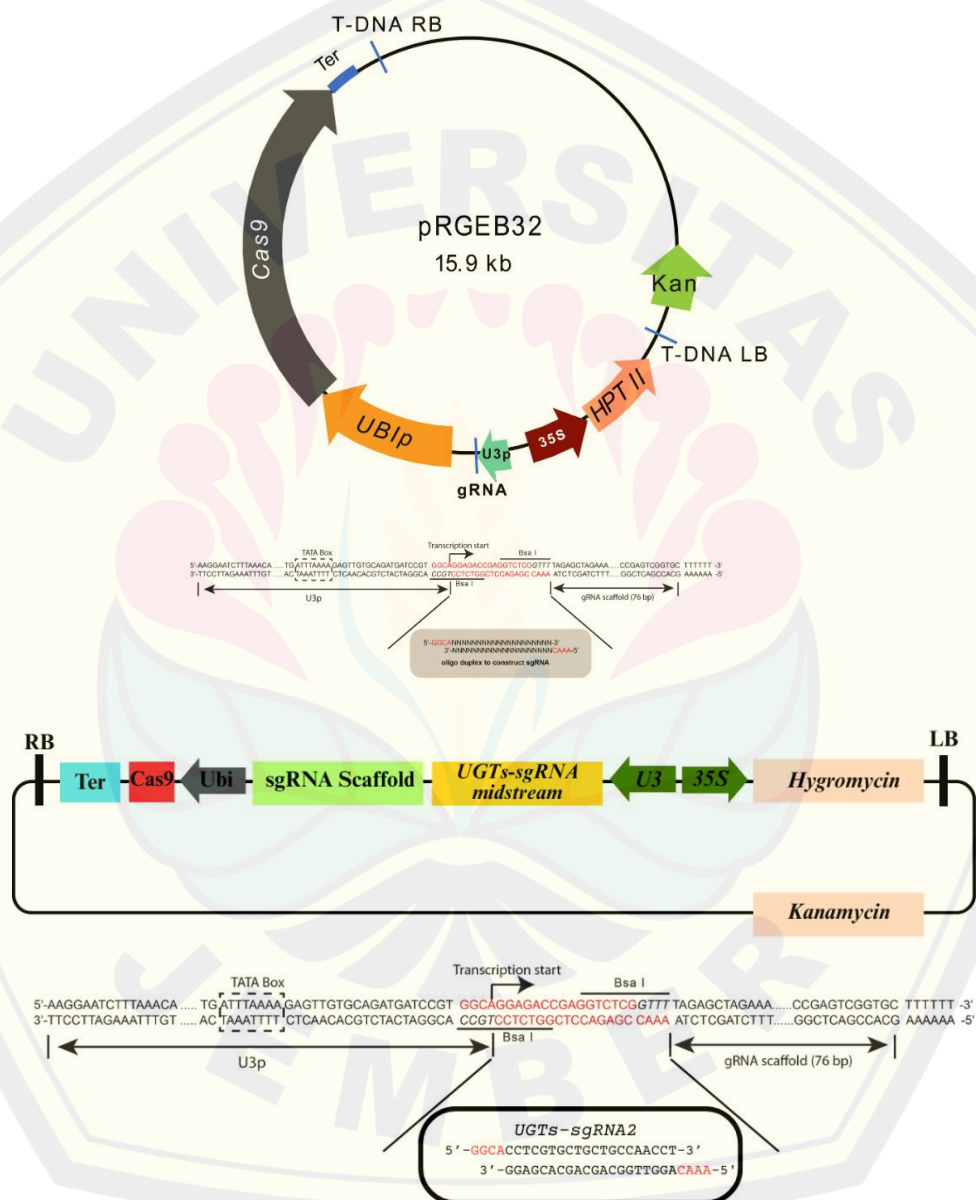
3.2.2 Bahan

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-RNA2-UGTs, media *Murashige & Skoog* (MS), media Luria-Bertani (LB), Casein hydrolysate, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2 mg/ml, α -Naphthalene Acetic Acid (NAA) 1mg/ml, Kinetin 2 μ 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%, ddH₂O, 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 Plasmid pRGEB32

Plasmid *A tumefaciens* yang digunakan dalam penelitian ini adalah plasmid pRGEB32 dengan sgRNA2- UGT's. Plasmid sgRNA tersebut telah dikonstruksi ke dalam sgRNA-Ekson 2 dan telah dilakukan konfirmasi urutan DNA.



Gambar 5. Ilustrasi konstruk plasmid pRGEB32 dengan sgRNA UGT's 2

3.3.2 Transformasi Plasmid pRGEB32-UGT's2 ke dalam *Agrobacterium*

1. Seleksi positif koloni *Agrobacterium tumefaciens* transforman

Hasil kultur bakteri *Agrobacterium tumefaciens* di inokulasi pada media LB pada dengan antibiotic *rifampicin* 50 ppm dan *kanamycin* 50 ppm dengan *streak 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 R:AGGCTATGGATGCGATCGCTG	545bp

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

3.3.3 Transformasi pada Kalus Padi

1. Sterilisasi Alat

Peralatan gelas (*glassware*) dan alat diseksi dicuci dengan deterjen, dibilas di bawah air mengalir, lalu dikeringkan. Selanjutnya, seluruh alat dibungkus dengan aluminium foil dan plastik tahan panas untuk disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15psi selama 90 menit. Alat yang telah steril dapat disimpan di dalam oven guna menjaga kesterilannya sebelum digunakan.

2. Persiapan Kalus

Bahan tanam yakni benih padi dikupas hingga tersisa bagian endosperm dan embrio. Sterilisasi bahan tanam dilakukan dengan menggunakan (NaClO) *Sodium Hypochlorite* 25% dengan pelarutnya dH₂O steril menggunakan tabung falcon 50 ml. Pembilasan bahan tanam selanjutnya menggunakan dH₂O steril sebanyak 3 kali untuk menghilangkan NaClO. Benih dapat dikering anginkan menggunakan kertas saring steril. Kultur benih dilakukan pada media Murashige and Skoog dengan hormon 2,4-D. Hasil kultur kemudian diinkubasi dalam kondisi gelap dengan suhu 32°C selama 14 hari. Kalus yang akan digunakan untuk transformasi yakni kalus yang memiliki warna putih kekuningan, berdiameter 1-2mm dan remah.

3. Kultur dan Infeksi *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium yang sudah dikonfirmasi memiliki plasmid pRGEB-32 diinokulasi pada media LB padat ditambahkan dengan antibiotik rifampicin 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 OD₆₀₀ dan encerkan hingga pembacaan OD₆₀₀ 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 tahapan integrasi T-DNA dari *Agrobacterium tumefaciens* galur LBA4404 ke dalam genom tanaman. Setelah proses inokulasi, kalus disaring menggunakan saringan steril dan dikering-anginkan di atas kertas saring dalam cawan petri. Eksplan yang telah diinfeksi selanjutnya ditanam pada media *co-cultivasi* yang mengandung komposisi: *MS powder* 4,41 g/L, sukrosa 30 g/L, *casein hydrolysate* 2 g/L, gelrite 6 g/L, serta zat pengatur tumbuh 2,4-D 2 mg/L. Media diatur pada pH 5,8 dan diperkaya dengan *acetosyringone* 100 mM

untuk menginduksi virulensi bakteri. Inkubasi fase *co-cultivasi* dilakukan selama 24 jam pada suhu 28°C dalam kondisi gelap total.

5. Fase Eliminasi

Kalus yang sudah diinkubasi pada media *co* *cultivasi* selama 48-72 jam selanjutnya dapat dilakukan washing menggunakan dH₂O steril sebanyak 3 kali selama 3 menit. Pembilasan terakhir dapat ditambahkan cefotaxime (500 ppm: pelarutan 1g/10ml untuk penggunaan 5ml/Liter) dan digojok selama 5 menit. Kalus padi yang sudah selesai di washing dan eliminasi *agrobacterium* dapat dikeringkan menggunakan kertas saring steril.

6. Pewarnaan Sitokimia

Pewarnaan dilakukan pada kalus dengan usia kultur yaitu 35 HST atau pada fase regenerasi dengan metode pewarnaan menggunakan larutan *Acetocarmine* 2% dan *Evans blue* 0,5%. Pewarnaan pertama dilakukan menggunakan *Acetocarmine* 2% selama 2 menit, selanjutnya dibilas dengan aquades steril sebanyak 3 kali. 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 yang sudah melalui proses washing dan eliminasi, dapat dipindahkan pada media regenerasi (MS 4,41g/L + Sukrosa 30g/L + Casein hydrolysate 0,3g/L + Gelrite 6g/L) yang ditambahkan dengan 20uL NAA (stok NAA 1000ppm) + 1ml/L Kinetin (stok 2000ppm), PH 5,8 dan cefotaxime 5ml/L (stok 1g/10ml) untuk 2 minggu pertama. Subkultur kalus setelah 2 minggu pertama dapat menggunakan media yang sama, namun tanpa ada penambahan hormon NAA dan kinetin. Sub kultur dilakukan sebanyak 3x yang dilakukan setiap 2 minggu sekali pada media regenerasi tanpa hormone hingga didapatkan planlet.

8. Fase Seleksi

Tahapan seleksi dilakukan ketika sudah selesai dilakukan sub-kultur media regenerasi tanpa hormone sebanyak 3 kali. Planlet dapat dipindahkan pada media seleksi (MS pythotech 4,41g/L + Sukrosa 30g/L + Casein hydrolysate 0,3g/L + Gelrite 6g/L, pH 5,8 + cefotaxime 5ml/L + Hygromicyn 50ppm) selama 2 minggu.

Sub Kultur selanjutnya menggunakan media MS tanpa adanya penambahan hygromycin. Planlet yang survive di kultur dan di subkultur pada media yang sama hingga dapat diaklimatisasi.

9. Aklimatisasi Tanaman Transforman

Aklimatisasi dilakukan dengan penyesuaian dari media seleksi ke media tanah yang telah disaring dan disterilisasikan 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 AB mix. Setelah tanaman berumur 24 hari dipindahkan ke pot dan diletakkan di greenhouse.

10. Ekstraksi DNA

Prosedur analisis PCR tanaman padi dilakukan dengan menyiapkan *cocktail* yang terdiri dari 1 ml CTAB buffer, 0,04 g PVP, dan 5 μ l β -Mercaptoethanol, dikalikan dengan jumlah sampel yang digunakan. Sampel daun padi diambil dan dipotong menggunakan gunting, kemudian dimasukkan ke dalam mortar, ditambahkan 1 ml CTAB, dan digerus. Sampel dimasukkan ke dalam *tube eppendorf*, ditambahkan 1 ml *cocktail* per sampel, dan divorteks sampai larut. Setelah itu, sampel diinkubasi pada *waterbath* dengan suhu 65°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan 500 μ l PCI sebagai *layer* kedua dan divorteks. Sampel disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan pada *layer* paling atas dipindahkan ke dalam *tube* baru, ditambahkan 40 μ l ammonium acetate dan 270 μ l isopropanol, lalu divorteks sampai terlarut. Selanjutnya, sampel disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan dibuang, kemudian ditambahkan 500 μ l etanol 70% dan divorteks. Sampel disentrifugasi kembali selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, etanol dibuang, dan *tube* dimasukkan ke dalam oven selama 1-2 menit. Akhirnya, aquades (ddH₂O) ditambahkan ke dalam sampel, dan sampel disimpan di dalam kulkas dengan suhu -20°C.

11. Analisis PCR dan Elektroforesis

Analisis PCR dilakukan dengan memasukkan primer hptII 4 μ l, water nuclease 32 μ l dan sample 5 μ l kedalam tube pcr kemudian di PCR 35 siklus.

Elektroforesis sampel dilakukan dengan menimbang agarose 1.5 g untuk 100 ml, kemudian mengencerkan 10 ml TAE dengan 490 aquades dan homogenkan. Selanjutnya campurkan agarose dan TAE kemudian di oven selama 2 menit sampai berwarna bening. Tambahkan EtBR 1.5 μ l dan tuangkan ke cetakan dan pasang sisir tunggu sampai memadat dan tidak ada gelembung. Masukkan sampel telah di PCR sebelumnya kemudian ditutup dan dinyalakan, tunggu sampai garis ke-4 dan divisualisasikan dengan UV transilluminator.

3.3.4 Pengukuran 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. Foto kalus akan diukur dengan mengatur luas blocking warna dari kalus secara keseluruhan. Tahapan pengukuran kalus dimulai dengan mengatur blocking menggunakan color threshold, kemudian mengatur blocking yang disesuaikan dengan warna kalus yang akan diukur. Untuk mengetahui hasil luas, pilih menu “analyze” lalu pilih “measure” dan dilayar akan terlihat hasil perhitungan luas kalus

3.4 Variabel Pengamatan

Adapun Variabel pengamatan yang dapat diamati dan diambil dari Penelitian sebagai berikut:

3.4.1 Hasil PCR Konfirmasi *Agrobacterium* transforman

Konfirmasi *A. tumefaciens* dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) gen menggunakan primer *HPTIII*.

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. Persentase adanya kalus yang tumbuh dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase Kalus} = \frac{\text{Jumlah Total kalus}}{\text{Jumlah Total Eksplan}} \times 100\%$$

Pengamatan dilakukan H+14 setelah waktu tanam. Eksplan yang mengalami pertumbuhan kalus akan dilakukan tahap infeksi *A. tumefaciens*.

3.4.3 Respon Kalus Setelah Infeksi

Pada saat pasca infeksi yaitu fase co kultivasi, fase eliminasi, fase regenerasi, dan fase seleksi dengan parameter persentase hasil perhitungan dari aplikasi ImageJ pada kalus overgrowth, browning, greenspot, dan total planlet hingga terdapat beberapa variabel yang diamati sebagai berikut:

a. Persentase Overgrowth

Pengamatan yang dilakukan yaitu perhitungan terhadap jumlah kalus yang mengalami *overgrowth* dengan jumlah eksplan yang ditanam. Persentase adanya *overgrowth* dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase overgrowth} = \frac{\text{Jumlah Kalus Overgrowth}}{\text{Jumlah Total Kalus}} \times 100\%$$

Pengamatan dilakukan setelah eksplan melalui fase eliminasi pada H+7 eksplan yang survive dipindahkan ke media regenerasi.

b. Persentase Browning

Pengamatan yang dilakukan yaitu perhitungan terhadap jumlah eksplan yang browning dari total eksplan yang sudah terinfeksi. Persentase tingkat *browning* per eksplan dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan browning} = \frac{\text{Jumlah Kalus Browning}}{\text{Jumlah Total Kalus}} \times 100\%$$

Pengamatan dilakukan dari fase setelah eliminasi hingga fase regenerasi ke tiga kali dengan cara mendokumentasikan eksplan yang browning menggunakan mikroskop.

c. Persentase Greenspot

Pengamatan yang dilakukan yaitu perhitungan terhadap jumlah eksplan yang greenspot dari total eksplan yang sudah terinfeksi. Persentase tingkat *greenspot* per eksplan dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase eksplan greenspot} = \frac{\text{Jumlah Kalus Greennspot}}{\text{Jumlah Total Kalus}} \times 100\%$$

3.4.4 Visualisasi Hasil Pewarnaan Sitokimia Sel

Pewarnaan sitokimia dilakukan dengan menggunakan *evans blue* dan *acetocarmine*. Pengamatan yang diamati adalah warna yang dominan dan

perbandingannya pada sel kultur hasil visualisasi. Visualisasi hasil pewarnaan menggunakan mikroskop serta menggunakan ImageJ untuk mengetahui luasan dari pewarnaan dengan rumus berikut:

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

3.4.5 Analisis PCR Tanaman Transforman

Analisis PCR dilakukan untuk mengkonfirmasi dan memastikan pRGEB32 UGTs.sgRNA2 terintegrasi ke dalam genom tanaman padi dengan ekstraksi daun padi yang telah diseleksi antibiotik hygromicin 50ppm kemudian di analisis PCR dan di elektroforesis serta divisualisasikan dengan UV transilluminator.

3.5 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik deskriptif sederhana untuk merepresentasikan efisiensi transformasi dan mutagenesis tanaman padi lokal hasil infeksi *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 yang mengandung gen pengkode UDP- Glucosyltransferase (UGTs).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

Penelitian ini dilakukan melalui 2 tahapan yaitu konfirmasi keberadaan plasmid pRGEB32:: sgRNA2 UGTs ke dalam *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 melalui analisis PCR, transformasi T-DNA ke dalam genome tanaman, dan konfirmasi adanya T-DNA yang terintegrasi ke dalam tanaman melalui analisis PCR.

4.1.1 Persiapan Eksplan Kalus

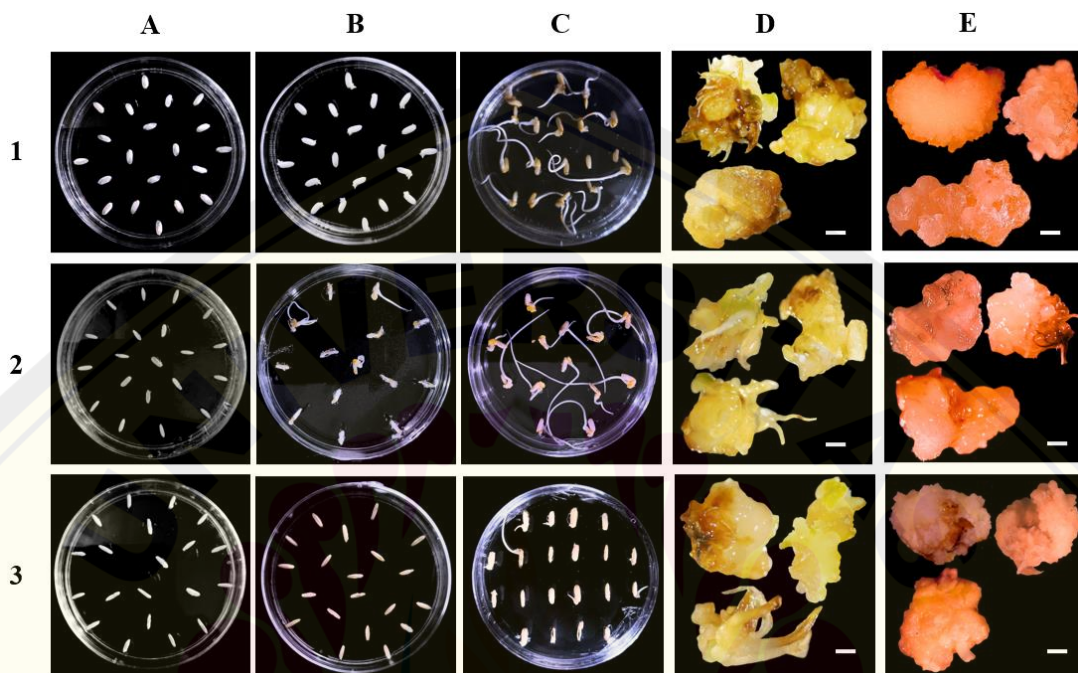
Parameter hasil persiapan kalus dilihat dari jumlah eksplan, waktu keluarnya kalus (hari), persentase jumlah eksplan yang berkalus, berat basah (gram), morfologi berupa tekstur dan warna kalus, serta persentase viabilitas kalus yang dilakukan pada setiap ulangan. Berikut hasil dari persiapan eksplan kalus tanaman padi dengan tiga varietas yaitu Pandanwangi, Pendok dan Ketan Hitam. Hasil induksi kalus dapat dilihat di tabel 2.

Tabel 2. Persiapan Eksplan Kalus Varietas Pandanwangi, Pendok dan Ketan Hitam

Ulangan	Varietas	Jumlah Eksplan	Waktu Muncul Kalus (Hari)	Jumlah Eksplan Berkalus (%)	Berat Basah (g)	Karakteristik Kalus	Viabilitas Kalus (%)
1	Pandanwangi	200	14	78.15	0.3469	White yellow-ish, friable	50.76
	Pendok	200	14	85.71	0.0351	White, semi-friable	53.13
	Ketan Hitam	200	14	49.31	0.0477	White yellow-ish, friable	51.79
2	Pandanwangi	200	14	81.50	0.0480	White yellow-ish, friable	61.39
	Pendok	200	14	78.50	0.0495	White, semi-friable	64.28
	Ketan Hitam	200	14	58.50	0.0621	White yellow-ish, friable	60.71
3	Pandanwangi	200	14	80.00	0.0525	White yellow-ish, friable	57.29
	Pendok	200	14	86.74	0.0454	White, semi-friable	58.91
	Ketan Hitam	200	14	54.51	0.0595	White yellow-ish, friable	50.78
4	Pandanwangi	200	14	83.50	0.0401	White yellow-ish, friable	51.87
	Pendok	200	14	86.13	0.0461	White, semi-friable	54.23
	Ketan Hitam	200	14	50.91	0.0505	White yellow-ish, friable	53.21
5	Pandanwangi	200	14	65.11	0.0553	White yellow-ish, friable	50.67
	Pendok	200	14	87.31	0.0471	White, semi-friable	47.53
	Ketan Hitam	200	14	77.51	0.0381	White yellow-ish, friable	41.29
Rerata	Pandanwangi	200	14	85.63±7.33	0.0461±0,008	White yellow-ish, friable	55.40±4,76
	Pendok	200	14	77.15±2,62	0.0515±0,005	White, semi-friable	54.62±6,31
	Ketan Hitam	200	14	58.97±4.82	0.0447±0,009	White yellow-ish, friable	51.56±6,94

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 biji 1.000 biji dengan setiap ulangan 200 biji.

Persiapan eksplan menunjukkan respon eksplan diperoleh rata-rata persentase hasil induksi kalus tertinggi yaitu 85.15% pada varietas Pandawangi, 77.63% pada varietas Pendok, dan persentase terendah yaitu 58.97% pada varietas Ketan Hitam dari total masing masing varietas sebanyak 1000 biji.



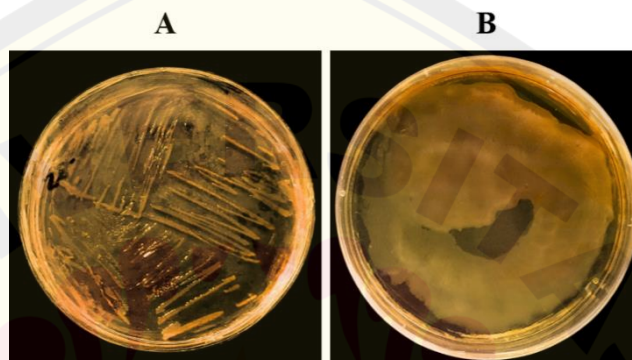
Gambar 6. Persiapan kalus varietas padi (1) Pandanwangi, (2) Pendok, dan (3) Ketan Hitam pada media induksi *Murashige* dan *Skoog* (MS) 2,4D 2 ppm, (A1-A3) Induksi kalus 0 HST, (B1-B3) Induksi kalus 7 HST, (C1-C3) Induksi kalus 14 HST, (D1-D3) Hasil morfologi kalus, dan (E1-E3) Viabilitas kalus. *Scale bar*: 1 mm.

Karakter morfologi kalus berbeda pada setiap varietas, kalus Pandan Wangi berwarna putih dengan tekstur remah, kalus Ketan Hitam berwarna putih kekuningan dengan tekstur kompak, sedangkan kalus Pendok berwarna putih kekuningan dengan tekstur remah. Pengamatan viabilitas kalus dengan pewarnaan sitokimia, pewarnaan sitokimia dengan *acetocarmine* dilakukan untuk melihat sel kalus masih hidup dan aktif membelah diperoleh hasil rata-rata persentase kalus embriogenik tertinggi, yaitu 55.62% pada varietas Pendok, 54.40% pada varietas Pandan Wangi, dan 51.56% pada varietas Ketan Hitam.

4.1.2 Persiapan *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404

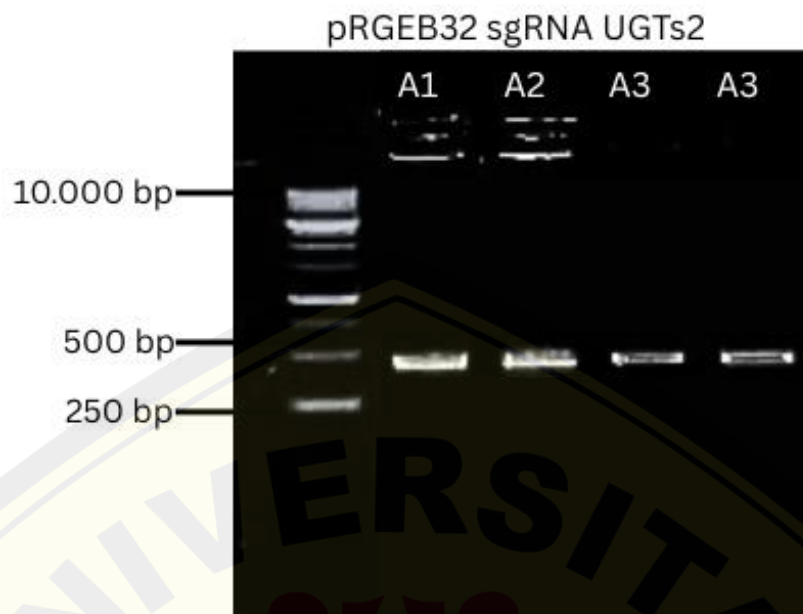
Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang sudah terinsersi plasmid pRGE32::UGTs.sgRNA2 ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) padat dengan menambahkan antibiotik *rifampycin* 50 ppm dan *kanamycin* 50 ppm. Fungsi

dari antibiotik *rifampycin* yaitu menyeleksi bakteri lain selain *Agrobacterium tumefaciens*, sedangkan fungsi dari antibiotik *kanamycin* yaitu untuk menyeleksi *Agrobacterium* yang terinsersi dalam membawa plasmid pRGEB32::UGTs.sgRNA2. Kemudian dilakukan konfirmasi keberadaan plasmid tersebut dengan menggunakan analisis PCR gen HPTII yang merupakan marka ketahanan antibiotik. Hasil yang diperoleh menunjukkan adanya pita DNA pada visualisasi hasil PCR dengan amplifikasi 545 bp.



Gambar 7. Inokulasi *Agrobacterium* pRGEB32::UGTs pada media LB padat dengan tambahan antibiotik *rifampycin* 50 ppm dan *kanamycin* 50 ppm, (A) Peremajaan menggunakan *streak plate method*, (B) Persiapan infeksi menggunakan *spread plate method*.

Ciri koloni *Agrobacterium* yang tumbuh yaitu terdapat bintik berwarna putih kekuningan (Gambar 7) yang selanjutnya akan dilakukan PCR untuk mengkonfirmasi bahwa *Agrobacterium* telah diperbanyak mengandung plasmid yang dapat dilihat pada hasil pita amplikon yang muncul pada primer yang digunakan.



Gambar 8. Visualisasi hasil PCR dengan marka seleksi HPTII pada koloni *A tumefaciens* Strain LBA 4404 menggunakan gel *agarose* 1%.

Hasil amplifikasi PCR koloni *Agrobacterium tumefaciens* dengan kode A1-A4 menunjukkan keseluruhan koloni menggunakan primer *hptII* pada semua sampel menunjukkan terbentuknya pita ampikon dengan ukuran 545 bp. Koloni *Agrobacterium tumefaciens* yang terkonfirmasi memiliki plasmid pRGEB32 kemudian diinokulasi pada media LB padat dengan streak plate method untuk peremajaan dan spread plate method untuk selanjutnya digunakan dalam proses transformasi ke kalus padi.

4.1.3 Fase Infeksi dan Co-cultivation

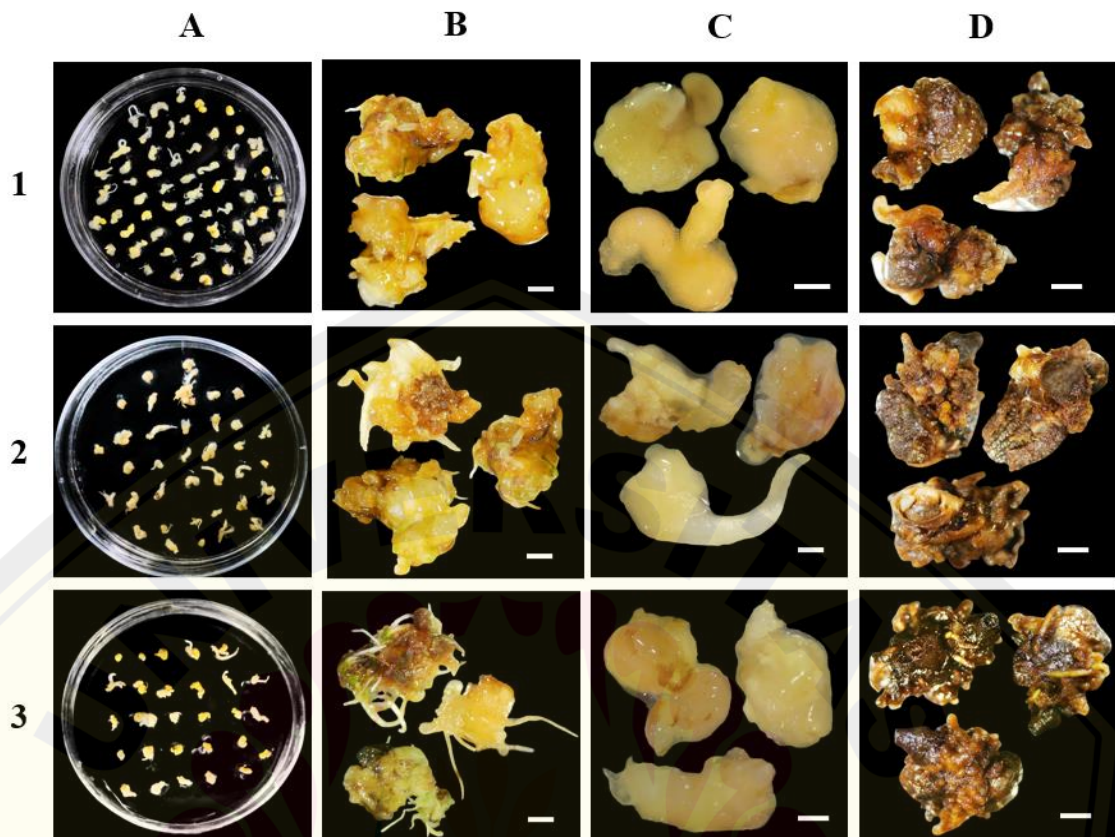
Parameter hasil infeksi dan *co-cultivasi* meliputi dari respon jumlah eksplan kalus, jumlah *overgrowth*, tingkat kematian kalus, serta jumlah *browning* yang terjadi pada eksplan. Berikut hasil data kuantitatif dari infeksi dan *co-cultivasi* pada eksplan kalus padi varietas Pandanwangi, Pendok, Ketan Hitam dalam lima kali ulangan.

Tabel 3. Fase infeksi (co-cultivasi) varietas Pandanwangi, Pendok, dan Ketan Hitam

Ulangan	Varietas	Jumlah	Jumlah	Jumlah	Tingkat	Jumlah
		Eksplan Kalus	Kalus Normal (%)	<i>Overgrowth</i> Eksplan (%)	Kematian Eksplan (%)	<i>Browning</i> Eksplan (%)
1	Pandanwangi	156	83.97	1.28	16.02	14.74
	Pendok	170	90.58	1.74	7.64	7.64
	Ketan Hitam	98	55.10	4.08	44.90	40.81
2	Pandanwangi	163	79.75	1.84	18.40	18.40
	Pendok	157	88.53	1.91	11.64	9.55
	Ketan Hitam	117	66.67	1.70	31.62	31.62
3	Pandanwangi	160	75.91	3.12	25.41	21.87
	Pendok	172	85.88	2.90	12.20	12.20
	Ketan Hitam	109	66.97	6.42	33.02	26.60
4	Pandanwangi	167	83.23	0.59	16.76	16.17
	Pendok	168	76.78	4.16	19.04	19.04
	Ketan Hitam	101	53.46	1.98	46.53	44.55
5	Pandanwangi	130	84.61	1.53	15.38	13.84
	Pendok	184	83.69	1.08	15.21	15.21
	Ketan Hitam	156	76.12	3.22	23.87	20.64
Rerata	Pandanwangi	155	81.31 ± 3,99	1,67 ± 0,93	18.31 ± 3,90	12.74 ± 3,21
	Pendok	116	63,66 ± 9,38	3,48 ± 1,90	13.11 ± 4,27	17.75±4,53
	Ketan Hitam	115	84,89 ± 5,31	2,36 ± 1,19	35.97± 9,55	32.84± 9,87

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.

Pengamatan respon eksplan pada fase *co-cultivasi* dan eliminasi diperoleh hasil rata-rata persentase *overgrowth A tumefaciens* pada eksplan yang paling tinggi yaitu varietas Ketan Hitam dengan persentase 3,48%, varietas Pendok 2.36%, dan persentase terendah yaitu varietas Pandanwangi dengan nilai 1.67%. *A tumefaciens* yang *overgrowth* tumbuh di permukaan eksplan, dapat hanya sebagian maupun menutupi seluruh permukaan eksplan. Rata-rata persentase eksplan *browning* tertinggi mencapai 32.84% pada varietas Ketan Hitam, 17.74% pada varietas Pendok, dan persentase *browning* terendah yaitu 12.75% pada varietas Pandanwangi. Persentase kematian eksplan dihitung dari total eksplan yang mengalami *browning* dan *overgrowth*.



Gambar 9. Karakter kalus pasca infeksi pada varietas padi (1) Pandanwangi, (2) Pendok, dan (3) Ketan Hitam di media *co-cultivasi* Murashige dan Skoog (MS) 2,4D 2 ppm, (A1-A3) Jumlah eksplan kalus, (B1-B3) Kalus normal, (C1-C3) Kalus mengalami *overgrowth*, dan (D1-D3) Kalus mengalami *browning*. Scale bar: 1 mm.

Kalus yang mengalami *overgrowth* saat fase *cocultivasi*-eliminasi terjadi pada setiap varietas (gambar 4.4C) hal tersebut ditandai dengan adanya lendir berwarna putih pada area kalus. Sedangkan kalus yang mengalami *browning* pada gambar 9 D pada setiap varietas yang ditandai dengan perubahan warna kehitaman serta terdapat lendir pada area kalus.

4.1.4 Regenerasi dan Seleksi

Hasil regenerasi hingga seleksi dilihat dari beberapa parameter yaitu persentase tingkat kematian eksplan, tingkat regenerasi, jumlah planlet, jumlah putative transforman, jumlah positif transforman, serta konfirmasi keberadaan T-DNA pada tanaman transforman dengan gen target berupa UGTs *midstream* melalui analisis PCR menggunakan marka HPTII dan Cas9. Berikut hasil data

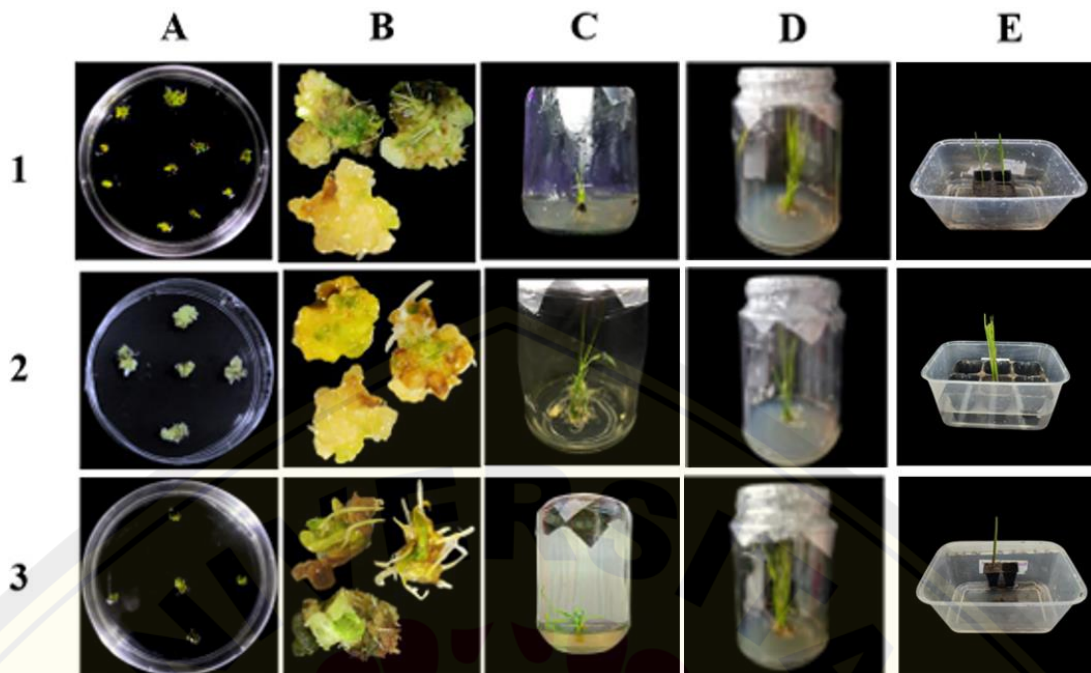
kuantitatif dari fase regenerasi dan seleksi dari eksplan kalus padi varietas Pandanwangi, Pendok dan Ketan Hitam fase regenerasi dan seleksi varietas Pandanwangi, Pendok dan Ketan Hitam

Tabel 4. Fase regenerasi dan seleksi varietas Pandanwangi, Pendok, dan Ketan Hitam

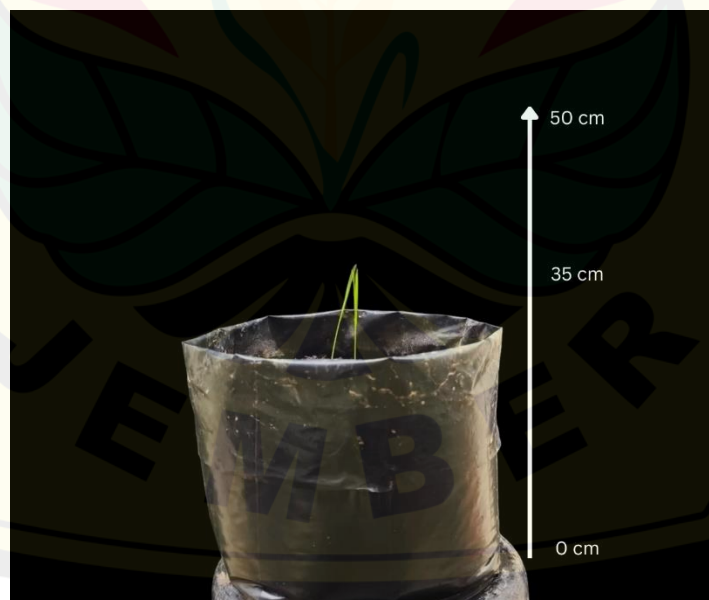
Ulangan	Varietas	Jumlah Eksplan	Tingkat Kematian Eksplan (%)	Tingkat Regenerasi (%)	Jumlah Planlet	Jumlah Putative Transforman	Jumlah Positif Transforman	Efisiensi Tanaman Transformasi
1	Pandanwangi	131	47.12	53.43	-	-	-	0,0
	Pendok	154	47.40	52.59	-	-	-	0,0
	Ketan Hitam	54	57.43	42.59	1	1	-	0,01
2	Pandanwangi	130	47.84	53.07	-	-	-	0,0
	Pendok	139	48.92	51.09	-	-	-	0,0
	Ketan Hitam	78	62.11	38.46	-	-	-	0,0
3	Pandanwangi	120	46.33	54.16	-	-	-	0,0
	Pendok	146	43.15	50.68	1	-	-	0,006
	Ketan Hitam	73	49.23	49.21	-	-	-	0,0
4	Pandanwangi	139	47.82	52.51	-	-	-	0,0
	Pendok	129	43.15	45.73	1	-	-	0,07
	Ketan Hitam	54	61.28	38.88	-	-	-	0,0
5	Pandanwangi	110	45.78	54.54	2	2	2	0,01
	Pendok	154	44.81	55.19	-	-	-	0,0
	Ketan Hitam	118	56.32	44.06	-	-	-	0,0
Rerata	Pandanwangi	126	46.82± 0.81	53.4± 0.88	2	2	2	0,2
	Pendok	144	47.71± 4.29	52.2± 4,29	2	2	-	0,2
	Ketan Hitam	75	57.10± 4.94	42.9±4,93	1	1	-	0,1

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

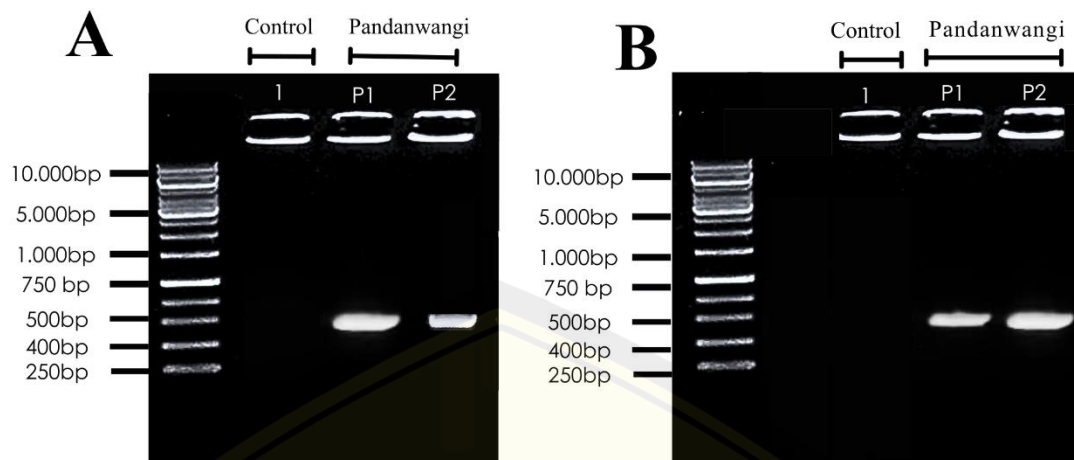
Pengamatan respon eksplan pada fase regenerasi dan seleksi diperoleh hasil rata-rata persentase kalus regenerasi tertinggi yaitu pada varietas Pandanwangi dengan nilai 53.4%, kemudian varietas Pendok 52.2%, dan tingkat regenerasi terendah yaitu pada varietas Ketan Hitam 42.9%. Pada fase regenerasi diperoleh planlet varietas Pandan Wangi sejumlah 2 planlet Ketan Hitam 1 planlet dan 2 planlet pada varietas. Dengan pada varietas pandawangi terdapat 2 tanaman putatif transforman yang berhasil bertahan atau resisten terhadap antibiotik *hygromycin* pada fase seleksi. Dengan efisiensi transformasi pada Pandanwangi 0,2%, Pendok 0,2% dan 0,1% pada Ketan Hiاتم.



Gambar 10. Respon eksplan fase regenerasi pada varietas padi (1) Pandanwangi, (2) Pendok, dan (3) Ketan Hitam di media *Murashige* dan *Skoog* (MS) Kinetin 2 ppm dan NAA 1 ppm, (A1-A3) Tingkat Regenerasi kalus dalam *petridish*, (B1-B3) Kalus mengalami *greenspot*, (C1-C3) Planlet, (D1-D3) Tanaman putative transforman, (E1-E3) Aklimatisasi tanaman putative transforman. *Scale bar*: 1 mm.



Gambar 11. Hasil tanaman padi transforman knockout UGTs pada varietas Pandanwangi (15HST)



Gambar 12. Hasil analisis tanaman padi positif transforman menggunakan primer Cas9 (A), dan *hptII* (B), Kontrol (kode 1) dan Varietas Pandanwangi (Kode P1 dan P2).

Hasil analisis PCR menggunakan primer *hptII* dan Cas9 dengan marker DNA pada sisi kiri sebagai acuan ukuran fragmen menunjukkan adanya pita DNA pada ukuran sekitar 495bp pada hasil primer Cas9 dan 545bp pada hasil primer *hptII* yang sesuai dengan ukuran gen target. Pada kontrol (kode 1 dan 2) tidak terdeteksi pita DNA pada posisi target, yang menunjukkan bahwa tidak terjadi integrasi gen UGTs pada sgRNA.2.

4.2 Pembahasan

Penelitian bertujuan untuk melakukan knockout fungsi gen UDP Glucosyltransferase (UGTs) tersistem CRISPR/Cas9. Pada fase induksi kalus (Tabel 2), semua varietas menunjukkan kemampuan membentuk kalus dalam rentang waktu yang relatif sama, yaitu sekitar 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.

Selanjutnya, pada Gambar 7 merupakan fase preparasi kultur *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 yang dikultivasi pada media agar spesifik *Luria Bertani* (LB) padat. Media LB tersebut telah diinkubasi dengan media dengan tambahan antibiotik rifampisin dan kanamycin sebagai agen selektif. Pertumbuhan koloni *A. tumefaciens* pada media ini mengonfirmasi spesifisitas strain tersebut terhadap rifampisin, yang sekaligus berfungsi menekan kontaminasi mikroorganisme non-target. Resistensi bakteri terhadap kanamycin menjadi indikator awal keberhasilan introduksi konstruk plasmid pRGEB32::UGTs .sgRNA2,. Tahap verifikasi dilakukan melalui analisis molekuler menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk mengonfirmasi terinsersi gen *Hygromycin Phosphotransferase* (HPTII) yang terletak pada wilayah T-DNA. Berdasarkan hasil elektroforesis pada Gambar 8, terdeteksi pita DNA (amplikon) yang konsisten pada ukuran 545 bp. Secara fungsional, gen HPTII berperan sebagai *selectable marker* utama pada konstruk pRGEB32 yang memberikan ketahanan terhadap antibiotik hygromycin saat proses inokulasi pada kalus padi dilakukan. Mekanisme ini memastikan bahwa hanya jaringan tanaman yang telah terintegrasi dengan T-DNA secara stabil yang mampu mempertahankan viabilitasnya pada media seleksi seleksi hygromycin, sementara sel yang tidak bertransformasi akan mengalami nekrosis.

Tahapan setelah persiapan *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 adalah fase co-cultivasi yang dilakukan melalui proses transformasi pada kalus padi. Hasil dari fase co-cultivasi menunjukkan beberapa respon kalus, yaitu kalus normal, kalus

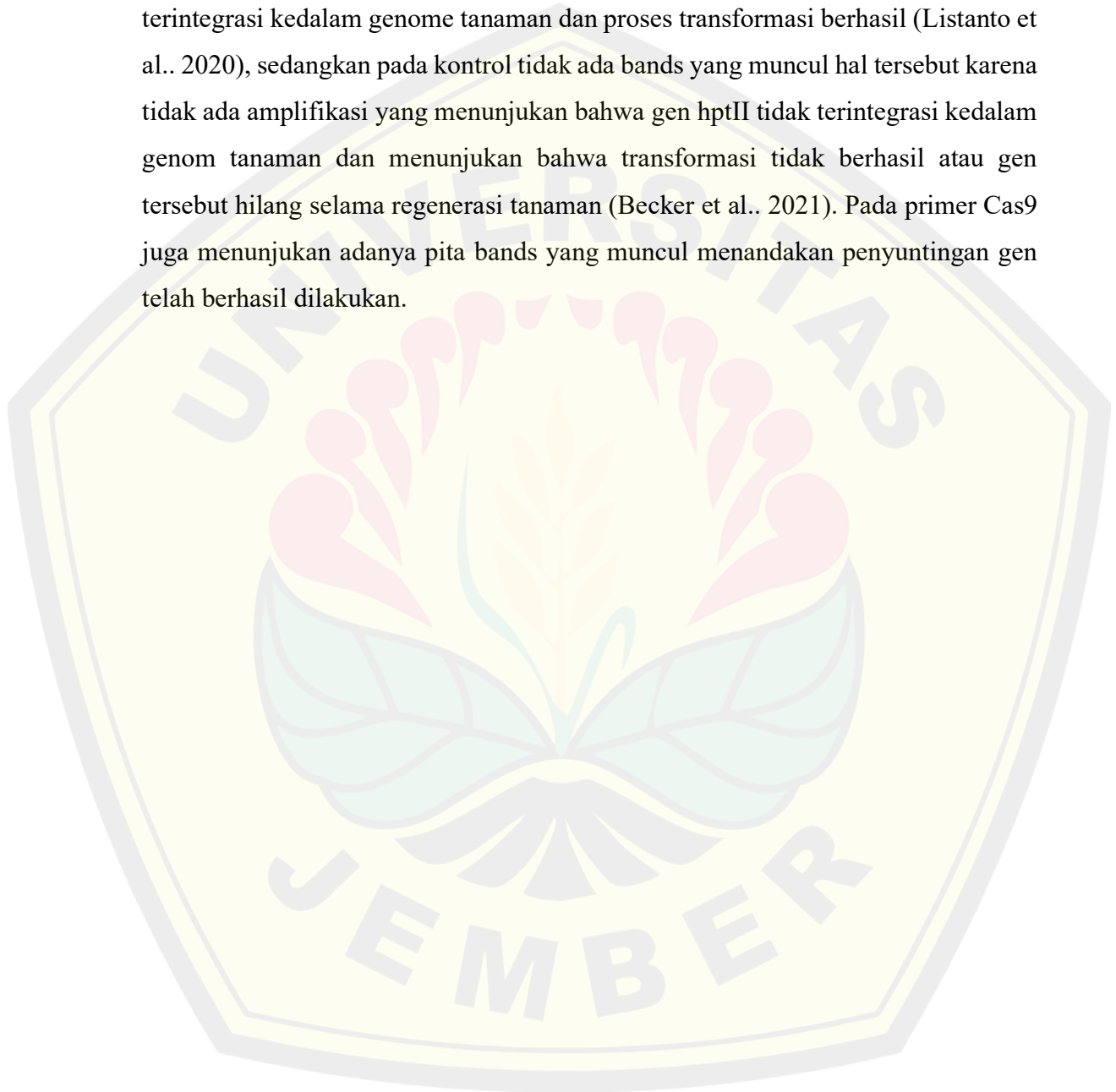
mati, kalus browning, dan overgrowth bakteri seperti pada gambar 9. Pertumbuhan berlebih (*overgrowth*) oleh *Agrobacterium tumefaciens* pada eksplan merupakan salah satu kendala utama dalam transformasi genetik yang terjadi akibat laju proliferasi bakteri yang melampaui kapasitas inhibisi agen bakterisida dalam media kultur. Kondisi ini dipicu oleh ketersediaan nutrisi makro dan sumber karbon, seperti sukrosa, dalam media regenerasi yang secara signifikan lebih mendukung pertumbuhan eksponensial bakteri dibandingkan dengan pembelahan sel tanaman (Pollock *et al.*, 1983). *Agrobacterium* dapat menempati ruang antarsel dan membentuk lapisan pelindung berupa biofilm di dalam jaringan eksplan. Kondisi ini menyebabkan koloni bakteri sulit dijangkau oleh antibiotik yang hanya bekerja pada permukaan media (Gurel & Gurel, 2002). Selain faktor genotipe, ketidakefektifan kontrol bakteri juga sangat dipengaruhi oleh stabilitas zat antibakteri yang digunakan. Penggunaan antibiotik golongan sefalosporin, seperti cefotaksim, seringkali menghadapi hambatan berupa sifat fotolabilitas senyawa tersebut, di mana paparan cahaya selama masa inkubasi dapat menurunkan efektifitas antibiotik secara drastis hingga di bawah ambang batas letal bagi bakteri (Niu *et al.*, 2000).

Fase regenerasi pada kalus ditunjukkan dengan munculnya *greenspot* pada kalus merupakan indikator awal terjadinya primordial organogenesis yang menandakan dediferensiasi sel parenkim menjadi jaringan meristemik aktif. Keberhasilan tahap ini sangat bergantung pada kompetensi genetik varietas, di mana kelompok *Tropical Japonica* memiliki tingkat totipotensi yang lebih tinggi untuk menginisiasi pembentukan kloroplas dan tunas dibandingkan kelompok varietas lainnya (Hiei *et al.*, 1994). Kemampuan regenerasi varietas padi berkaitan dengan keseimbangan hormon endogen dan kemampuan sel dalam merespon sinyal diferensiasi. Perbedaan kemampuan regenerasi antar varietas mendukung pernyataan bahwa latar belakang genetik berperan penting dalam menentukan keberhasilan kultur jaringan dan transformasi genetik tanaman (Wu *et al.*, 2022). Variasi genetik dapat mempengaruhi respon jaringan terhadap cekaman, efisiensi pembelahan sel, serta kemampuan diferensiasi jaringan, yang pada akhirnya menentukan keberhasilan pembentukan planlet (Birch, 1997). Varietas

Pandanwangi menunjukkan kecepatan regenerasi tertinggi dengan menghasilkan dua planlet, diikuti oleh varietas Pendok dan Ketan Hitam yang masing-masing menghasilkan satu planlet (Tabel 4). Efisiensi transformasi pada penelitian ini tercatat sebesar 0,2% untuk varietas Pandan Wangi dan Pendok, serta 0,1% untuk varietas Ketan Hitam. Efisiensi transformasi merupakan indikator keberhasilan transfer materi genetik ke dalam kalus embriogenik hingga mampu beregenerasi menjadi tanaman. Persentase eksplan yang berhasil tumbuh menjadi tanaman transforman mencerminkan tingkat keberhasilan metode ini. Endahnya efisiensi transformasi pada varietas padi lokal dalam penelitian ini sejalan dengan temuan Shao et al. (2017), yang menyatakan bahwa efisiensi transformasi padi lokal sering kali berada di bawah 1% karena sifat genotipnya yang kurang responsif terhadap kalus embriogenik dibandingkan varietas model seperti *Nipponbare*. Perbedaan efisiensi ini dipengaruhi oleh faktor genotipe yang tidak dapat menoleransi. Varietas lokal cenderung memiliki profil senyawa pertahanan endogen yang dapat menghambat infeksi *Agrobacterium*, serta kapasitas embriogenesis yang sangat bergantung pada latar belakang genetik masing-masing. Selain itu, sensitivitas yang tinggi terhadap agen seleksi dan ketidakseimbangan hormon endogen membuat varietas lokal lebih rentan mengalami stres selama fase *in vitro*. Faktor-faktor tersebut menjelaskan mengapa varietas lokal tidak mampu menunjukkan tingkat regenerasi yang seoptimal varietas model yang telah teradaptasi secara laboratorium.

Konfirmasi molekuler menggunakan primer Cas9 dan *hptII* merupakan tahapan akhir untuk menjamin insersi plasmid ekspresi T-DNA serta memvalidasi stabilitas genetik tanaman transforman. Mekanisme transfer DNA yang dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens* berlangsung berhasil dapat dilihat dari batas kanan (*Right Border*) ke batas kiri (*Left Border*), penggunaan dua set primer yang menargetkan posisi berbeda pada T-DNA diperlukan untuk mendeteksi peristiwa integrasi yang terfragmentasi (*truncated T-DNA*) (Hiei & Komari, 2008). Primer *Cas9* berfungsi mengonfirmasi keberadaan perangkat nuklease fungsional untuk penyuntingan gen target, sedangkan primer *hptII* memvalidasi integrasi penanda seleksi yang memberikan resistensi terhadap antibiotik higromisin (Miao et al.,

2013). Konfirmasi melalui PCR untuk memvalidasi transforman dan memastikan bahwa transformasi telah tersisip secara utuh ke dalam genom tanaman guna mendukung efisiensi penyuntingan gen (Yin *et al.*, 2017). Hasil analisis PCR tanaman padi varietas Pandawangi positif transforman hal tersebut terlihat bands yang muncul, yang menunjukkan bahwa gen *hptII* bersama T-DNA berhasil terintegrasi kedalam genome tanaman dan proses transformasi berhasil (Listanto *et al.*, 2020), sedangkan pada kontrol tidak ada bands yang muncul hal tersebut karena tidak ada amplifikasi yang menunjukkan bahwa gen *hptII* tidak terintegrasi kedalam genom tanaman dan menunjukkan bahwa transformasi tidak berhasil atau gen tersebut hilang selama regenerasi tanaman (Becker *et al.*, 2021). Pada primer Cas9 juga menunjukkan adanya pita bands yang muncul menandakan penyuntingan gen telah berhasil dilakukan.



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa transformasi *Agrobacterium tumefaciens* Strain LBA4404 yang terinsersi plasmid pRGE32::UGTs.sgRNA2 berhasil dilakukan pada ketiga varietas padi lokal yang ditunjukkan dengan adanya tanaman putatif transforman. Efisiensi transformasi berdasarkan jumlah putatif transforman yaitu 0,2% pada Pandan Wangi, serta 0,15% pada Pendok dan 0,1 % pada Ketan Hitam yang juga telah terkonfirmasi melalui analisis PCR dengan marka *HPTII* dan marka *Cas9* sebagai tanaman positif transforman.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperlukan adanya analisis lebih lanjut melalui analisis *sequencing* untuk mengetahui tingkat off target dan diperlukan uji karakteristik pada tanaman hasil transformasi yang diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

- Aliu, E., Ji, Q., Wlazlo, A., Grosic, S., Azanu, M. K., Wang, K., and Lee, K. (2024). Enhancing *Agrobacterium*-mediated plant transformation efficiency through improved ternary vector systems and auxotrophic strains. *Frontiers in Plant Science*, 15: 1429353.
- Berim, A., and Gang, D. R. (2016). Methoxylated flavones: occurrence, importance, biosynthesis. *Phytochemistry Reviews*, 15, 363-390.
- Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12(22), 8711–8721.
- Birch, R. G. (1997). Plant Transformation: Problems and Strategies for Genetic Improvement. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), 297-326.
- Char, S. N., Li, R., & Yang, B. (2019). CRISPR/Cas9 for mutagenesis in rice: Methods and protocols. In B. Yang (Ed.), *Plant genome editing with CRISPR systems* (pp. 279–293). Springer.
- Chen, K., and Gao, C. (2013). TALENs: Customizable molecular DNA scissors for genome engineering of plants. *Journal of Genetics and Genomics*, 40, 271-279.
- Cheng, M., Fry, J. E., Pang, S. Z., Zhou, H. P., Hironaka, C. M., Duncan, D. R., ... & Wan, Y. (1998). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of highland barley and wheat. *Plant Cell Reports*, 17(8), 646-651.
- Das, P., Longkumer, L., Adhikari, D. N., and Sen, P. (2021). RNAi and CRISPR: Promising tool for gene silencing. *Journal of Scientific & Technical Research*, 40(3).
- Frame, B. R., Shou, H., Chikwamba, R. K., Zhang, Z., Xiang, C., Fonger, T. M., Pegg, S. E. K., Li, B., Nettleton, D. S., Pei, D., & Wang, K. (2002). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiology*, 129(1), 13–22.
- Gaj, T., Gersbach, C. A., and Barbas, C. F. (2013). ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*, 31(7): 397-405.
- Ge, X., Chu, Z., Lin, Y., & Wang, S. (2006). Factors affecting gene transfer and expression in rice. *Biologia Plantarum*, 50(1), 17-24.

- Gurel, S., & Gurel, E. (2002). Factors affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Turkey Journal of Botany*, 26(4), 211-217.
- Haoyu, Q. (2025). Sakuranetin: a multifaceted study from plant resistance to pharmacological activity. *Academic Journal of Agriculture & Life Science*, 6(1): 110-116.
- Hidayah, N. (2016). Cluster Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat Association 9 (CRISPR/Cas9) Teknologi Terbaru Editing Gen Human Pluripotent Stem Cells (Hpsc) Sebagai Terapi Penyakit Diabetes Mellitus Tipe 1. *Khazanah: Jurnal Mahasiswa*, 8(1), 11-11.
- Hiei, Y., & Komari, T. (2008). *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli derived from mature seed. *Nature Protocols*, 3(5), 824-834.
- 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.
- Hoekema, A., Roelvink, P. W., Hooykaas, P. J., & Schilperoort, R. A. (1983). Delivery of T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome into plant cells. *The EMBO Journal*, 3(11), 2485-2490.
- Hoque, M. E., & Mansfield, J. W. (2005). Effect of genotype and explant age on *Agrobacterium*-mediated transformation of Australian rice cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(1), 17-24.
- Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G., & Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227(4691), 1229-1231.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429-5433.
- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 48. 2012. Endonuklease DNA yang dipandu RNA ganda yang dapat diprogram dalam kekebalan bakteri adaptif. *Science* 337 : 6096 816- 21.
- Khatimah, K., Muthmainnah, T. A., and Hala, Y. (2025). *Agrobacterium tumefaciens* sebagai agen rekayasa genetika: mekanisme, keunggulan, dan tantangan dalam transformasi genetik tanaman. *Jurnal Pendidikan dan Sains Biologi*, 8(1): 19-29.

- Komari, T., Kaneko, T., & Abe, T. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocols*, 1(6), 3274–3284.
- Ma, L., and Liang, Z. (2021). CRISPR technology for abiotic stress resistant crop breeding. *Plant Growth Regulation*, 94, 115-129.
- Majumdar, R., Rajasekaran, K., & Cary, J. W. (2017). RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: Concepts and considerations. *Frontiers in Plant Science*, 8, 200.
- Matelot, E. E., Alba, A. E. M. D., and Vaucheret, H. (2017). Diversity of RNA silencing pathways in plants. In *Plant gene silencing: mechanisms and applications*, Wallingford UK: CABI, 1-31.
- Meech, R., Hu, D. G., McKinnon, R. A., Mubarakah, S. N., Haines, A. Z., Nair, P. C., Rowland, A., and Mackenzie, P. I. (2019). The UDP-Glycosyl transferase (UGT) superfamily: new members, new functions, and novel paradigms. *Physiol Rev*, 99: 1153-1222.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., ... & Qu, L. J. (2013). Targeted mutagenesis in rice using RNA-guided Cas9 nuclease. *Molecular Plant*, 6(6), 1965-1967.
- Niu, X., Lin, K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., & Weller, S. C. (2000). Factors relevant to *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Pelargonium x hortorum* Bailey. *Plant Cell Reports*, 19(3), 304-310.
- Pazuki, A., & Sohani, M. M. (2013). Phenotypic evaluation of scutellum-derived calluses in 'Indica' rice cultivars. *Acta Agriculturae Slovenica*, 101(2), 239-247.
- Pollock, K., Barfield, D. G., & Shields, R. (1983). The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Reports*, 2(5), 252-255.
- Rajam, M. V. (2020). RNA silencing technology: a boon for crop improvement. *J Biosci*, 45: 118.
- Rakwal, R., Agrawal, G. K., Yonekura, M., and Kodama, O. (2000). Naringenin 7-O-methyltransferase involved in the biosynthesis of the flavanone phytoalexin sakuranetin from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 155, 213-221.
- Schmitz, D. J., Ali, Z., Wang, C., Aljedaani, F., Hooykaas, P. J. J., Mahfouz, M., and Pater, S. (2020). CRISPR/CAS9 Mutagenesis by translocation of Cas9

protein into plant cells via the *Agrobacterium* type IV secretion system. *Frontiers in Genome Editing*, 2(6): 1-11.

Shimizu, T., Lin, F., Hasegawa, M., Nojiri, H., Yamane, H., and Okada, K. (2012). The potential bioproduction of the pharmaceutical agent sakuranetin, a flavonoid phytoalexin in rice. *Bioengineered*, 3:6, 352-357.

Stompor, M. (2020). A Review on sources and pharmacological aspects of sakuranetin. *Nutrients*, 12(2), 513.

Tie, W., Zhou, F., Wang, L., Xie, W., Chen, H., Li, X., & Lin, Y. (2012). Increasing the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of recalcitrant rice cultivars by optimizing several factors. *Plant Cell Reports*, 31(4), 751-764.

Wang, G., Zhang, K., Geng, L., & Li, G. (2019). CRISPR/Cas9 in plant biotechnology. *Biotechnologia*, 100(4), 383-404.

Xu, R., Li, H., Qi, W., Yang, H., & Liu, X. (2014). Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR-Cas system in rice. *Rice*, 7(1), 5.

Yin, K., Han, T., Liu, G., Chen, T., Wang, Y., Yu, A. Y., & Wang, K. (2017). Cas9 expression levels and open chromatin regions determine the efficiency of Cas9-mediated gene editing in rice. *Molecular Plant*, 10(6), 886-892.

Yoda, H., Hiroki, M., & Hirochika, H. (2014). The effect of multi-copy T-DNA integration on *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 33(1), 1-12.

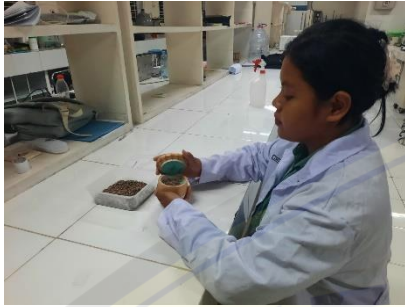
Yulina, N., Ezward, C., dan Haitami, A. (2021). Karakter Tinggi Tanaman, Umur Panen, Jumlah Anakan dan Bobot Panen pada 14 Genotipe Padi Lokal. *Jurnal Agrosains dan Teknologi*, 6(1): 15-24.

Zhang, H. J., Wang, X., & Zhang, G. H. (2014). Genetic analysis and fine mapping of a quantitative trait locus, qRE-10, for regeneration efficiency in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*, 33(1), 245-253.

Zhao, Y., Hu, J., Zhou, Z., Li, L., Zhang, X., He, Y., Zhang, C., Wang, J., and Hong, G. (2024). Biofortified rice provides rich sakuranetin in endosperm. *Rice*, 17,19.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Kegiatan Penelitian



Melakukan Persiapan Benih



Melakukan pembuatan media



Melakukan strelisasi alat



Melakukan penuangan media



Melakukan persiapan kalus dengan fase induksi



Melakukan persiapan infeksi kalus



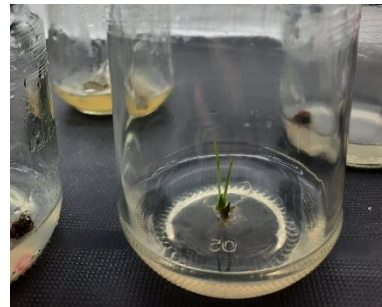
Melakukan kultur dan proses transformasi kalus (infeksi)



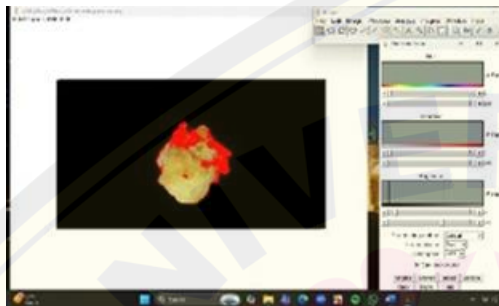
Melakukan subkultur pada fase regenerasi



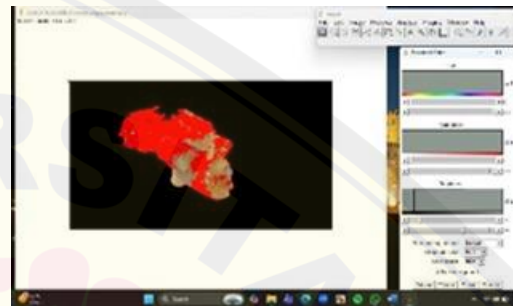
Melakukan penimbangan berat kalus



Hasil planlet varietas Siam Epang



Melakukan pengukuran luas hasil kalus embriogenik pada aplikasi ImageJ



Melakukan pengukuran luas hasil kalus overgrowth pada aplikasi ImageJ

Lampiran 2. Data Percobaan dan Perhitungan Statistik Sederhana

a. Persentase Eksplan yang Berkalus

Ulangan	Varietas	Jumlah eksplan yang ditanam	Jumlah kalus yang terbentuk	Persentase
1	Pandawangi	200	156	78
	Pendok	200	170	85
	Ketan Hitam	200	98	49
2	Pandawangi	200	163	82
	Pendok	200	157	78
	Ketan Hitam	200	117	59
3	Pandawangi	200	160	80
	Pendok	200	172	86
	Ketan Hitam	200	109	55
4	Pandawangi	200	167	84
	Pendok	200	168	84
	Ketan Hitam	200	101	51
5	Pandawangi	200	130	65
	Pendok	200	184	90
	Ketan Hitam	200	155	77

b. Berat Basah

Ulangan	Pandanwangi	Pendok	Ketan Hitam
1	0,0437	0,0437	0,0330
	0,0521	0,0380	0,0653
	0,0427	0,0099	0,0241
	0,0345	0,0547	0,0453
	0,0236	0,0170	0,0380
	0,0127	0,0107	0,0342
	0,0348	0,0841	0,0608
	0,0432	0,0198	0,0543
	0,0329	0,0330	0,0573
	0,0267	0,0398	0,0642
Rata-rata	0,03469	0,0351	0,0477
2	0,0281	0,0457	0,0881
	0,0771	0,0203	0,0590
	0,0521	0,0530	0,0768
	0,0018	0,0112	0,0254
	0,0443	0,0716	0,0583
	0,0320	0,0542	0,0401
	0,0955	0,0961	0,0222
	0,0162	0,0379	0,083
	0,0850	0,0129	0,0946
	0,0477	0,0919	0,0731
Rata-rata	0,0480	0,0495	0,0621
3	0,0068	0,0115	0,0564
	0,0841	0,0623	0,0812

	0,0996	0,0904	0,0683
	0,0489	0,0752	0,0376
	0,0232	0,0608	0,0735
	0,0099	0,0127	0,0460
	0,0435	0,0382	0,0248
	0,0743	0,0431	0,0939
	0,0857	0,0572	0,0789
	0,0492	0,0025	0,0341
Rata-rata	0,0525	0,0454	0,0595
	0,0720	0,0139	0,0942
	0,0312	0,0974	0,0056
	0,0425	0,0082	0,0337
	0,0691	0,0805	0,0865
4	0,0047	0,035	0,0217
	0,017	0,0873	0,0546
	0,0794	0,0647	0,0073
	0,0511	0,0021	0,0704
	0,0275	0,0418	0,0397
	0,006	0,0328	0,0913
Rata-rata	0,0401	0,0464	0,0505
	0,0837	0,0294	0,0309
	0,0498	0,0636	0,0145
	0,0229	0,0159	0,0410
	0,0194	0,0367	0,0551
5	0,0982	0,0928	0,0091
	0,0893	0,0669	0,0674
	0,0519	0,0315	0,0826
	0,0615	0,0188	0,0034
	0,0106	0,0602	0,0263
	0,0658	0,0554	0,0502
Rata-rata	0,0553	0,0471	0,0381

c. Viabilitas Kalus

Ulangan	Indikator	Varietas		
		Pandanwangi	Pendok	Ketan Hitam
1	Luas Kalus (px2)	65745	45778	47406
	Luas Acetocarmine (px2)	46309	32890	36913
	Luas Evans blue (px2)	19436	12888	10493
	Acetocarmine (%)	70,43	71,84	77,86
	Evans blue (%)	29,57	28,16	22,14
2	Luas Kalus (px2)	58972	47854	52857
	Luas Acetocarmine (px2)	32879	30765	39074
	Luas Evans blue (px2)	26093	17089	13783
	Acetocarmine (%)	55,75	64,28	73,39
	Evans blue (%)	44,25	35,72	26,61

	Luas Kalus (px2)	60263	58256	62009
	Luas Acetocarmine (px2)	41987	38703	43056
3	Luas Evans blue (px2)	18276	19553	18953
	Acetocarmine (%)	69,67	66,44	69,44
	Evans blue (%)	30,33	33,56	30,56
	Luas Kalus (px2)	53789	59078	58294
	Luas Acetocarmine (px2)	35923	40590	39938
4	Luas Evans blue (px2)	17866	18488	18356
	Acetocarmine (%)	66,79	68,71	68,51
	Evans blue (%)	33,21	31,29	31,49
	Luas Kalus (px2)	60873	56988	48592
	Luas Acetocarmine (px2)	44450	40990	32910
5	Luas Evans blue (px2)	16423	15888	15682
	Acetocarmine (%)	73,03	72,13	67,73
	Evans blue (%)	26,97	27,87	32,27

d. Overgrowth fase cocultivikasi

Ulangan	Pandanwangi		
	Luas Kalus (px2)	Luas Overgrowth (px2)	Overgrowth (%)
1	45230	16840	37,2
	68750	27490	40,0
	154820	61230	39,5
	238940	86740	36,3
	126780	48920	38,6
	193450	71580	37,0
	84560	32640	38,6
	217890	90230	41,4
	176540	68320	38,7
	102340	38470	37,6
	Rerata		38,5
2	53890	20150	37,4
	72940	28670	39,3
	168430	70120	41,6
	251760	94580	37,6
	134650	52340	38,9
	201280	76450	38,0
	91730	34980	38,1
	226540	95860	42,3
	184920	75810	41,0
	113470	44790	39,5
	Rerata		39,4
3	47680	18240	38,3
	65320	24870	38,1
	149870	63820	42,6
	243650	89370	36,7
	121540	45720	37,6
	187690	79340	42,3

	88420	34150	38,6
	209340	84590	40,4
	171230	67940	39,7
	108760	39820	36,6
	Rerata		39,1
	56480	21970	38,9
	78340	30450	38,9
	166890	68940	41,3
	259340	98750	38,1
4	138920	54860	39,5
	207650	81230	39,1
	93870	37210	39,6
	228430	95480	41,8
	189760	74290	39,1
	115340	44670	38,7
	Rerata		39,5
	59230	23340	39,4
	81470	32780	40,2
	173650	73640	42,4
	267890	101230	37,8
5	142780	60320	42,2
	214560	85670	39,9
	96340	38590	40,1
	231450	97860	42,3
	196780	80340	40,8
	117920	47260	40,1
	Rerata		40,5
Ulangan	Pendok		
	Luas Kalus (px2)	Luas Overgrowth (px2)	Overgrowth (%)
	28450	11320	39,8
	96780	38240	39,5
	145670	52480	36,0
	312450	136890	43,8
1	58720	20140	34,3
	223890	87320	39,0
	174560	64120	36,7
	84230	30490	36,2
	261780	106450	40,7
	118940	48930	41,1
	Rerata		38,7
	43680	17850	40,9
2	75210	29840	39,7
	189430	83470	44,1
	274560	115920	42,2

	103780	35690	34,4
	216340	92650	42,8
	168920	74280	44,0
	69450	28410	40,9
	247680	104380	42,1
	132560	55170	41,6
	Rerata		41,3
	35890	14570	40,6
	88940	39180	44,1
	157230	60320	38,4
	298760	127430	42,7
3	62450	24380	39,0
	231560	98540	42,6
	182340	76890	42,2
	91760	32940	35,9
	256890	111760	43,5
	126780	41950	33,1
	Rerata		40,2
	51240	22490	43,9
	103670	44780	43,2
	172450	72130	41,8
	286340	102560	35,8
4	78430	32670	41,7
	208760	84720	40,6
	163890	60380	36,8
	56980	18740	32,9
	239450	101890	42,6
	148670	64510	43,4
	Rerata		40,3
	39210	17180	43,8
	81450	27360	33,6
	194780	76820	39,4
	305670	134560	44,0
5	69230	25940	37,5
	225430	94560	41,9
	178560	69780	39,1
	98740	41920	42,5
	268340	118740	44,2
	121450	50670	41,7
	Rerata		40,8
Ulangan	Ketan Hitam		
	Luas Kalus (px2)	Luas Overgrowth (px2)	Overgrowth (%)
1	26340	9450	35,88
	184920	72180	39,03

	57860	24120	41,69
	301780	104650	34,68
	94730	39680	41,89
	142560	45120	31,65
	228940	96850	42,30
	71640	22890	31,95
	119870	52340	43,66
	274650	118920	43,30
	Rerata		38,6
	43890	16240	37,0
	257630	90180	35,0
	68320	29170	42,7
	168450	73480	43,6
2	325780	143560	44,1
	82470	27380	33,2
	193760	68840	35,5
	105430	37490	35,6
	246580	105870	42,9
	53760	21740	40,4
	Rerata		39
	97240	41580	42,8
	154890	63720	41,1
	34780	11890	34,2
	286540	122430	42,7
3	128670	49320	38,3
	219430	76180	34,7
	76120	30470	40,0
	174560	54980	31,5
	234780	99840	42,5
	61230	24650	40,3
	Rerata		38,8
	252890	113760	45,0
	80760	34250	42,4
	171230	58290	34,0
	44580	17340	38,9
4	312670	106980	34,2
	98760	39840	40,3
	148230	61270	41,3
	224560	87940	39,2
	65940	24830	37,7
	191870	72460	37,8
	Rerata		39,1
	109340	37920	34,7
5	278450	124680	44,8
	52370	18640	35,6

	163780	70320	42,9
	88340	31890	36,1
	236470	102840	43,5
	134890	54430	40,4
	72860	30170	41,4
	205760	89140	43,3
	41790	15120	36,2
	Rerata		39,9

e. Tingkat Kematian eksplan pada fase

Ulangan	Varietas	Jumlah eksplan yang tersisa	Jumlah kalus yang mati	Persentase
1	Pandanwangi	156	88	16
	Pendok	170	90	9
	Ketan Hitam	98	55	44
2	Pandanwangi	163	79	20
	Pendok	157	88	11
	Ketan Hitam	117	66	33
3	Pandanwangi	160	75	25
	Pendok	172	84	15
	Ketan Hitam	109	67	33
4	Pandanwangi	167	83	16
	Pendok	168	76	23
	Ketan Hitam	101	68	46
5	Pandanwangi	130	84	15
	Pendok	184	83	16
	Ketan Hitam	155	76	23

f. Browning fase cocultivikasi

Ulangan	Pandanwangi		
	Luas Kalus (px2)	Luas Browning (px2)	Browning (%)
1	41820	15340	36,7
	183470	52410	28,6
	269850	39620	14,7
	141230	34890	24,7
	225780	56340	25,0
	73450	21970	29,9
	281340	35970	12,8
	205670	51840	25,2
	248910	30580	12,3
	126390	36140	28,6
	Rerata		23,8
2	45870	17650	38,5
	68430	29480	43,1
	172560	48690	28,2
	281340	35970	12,8
	136780	40230	29,4

	205670	51840	25,2
	232450	44190	19,0
	259780	32760	12,6
	81640	20850	25,5
	126390	36140	28,6
	Rerata		26,3
	39480	14270	36,1
	57320	25380	44,3
	191450	54720	28,6
	274680	38840	14,1
3	148920	33670	22,6
	212340	47290	22,3
	238760	52940	22,2
	246570	31480	12,8
	79230	22760	28,7
	114850	29540	25,7
	Rerata		25,7
	47360	18920	39,9
	62940	27650	43,9
	168230	45980	27,3
	287540	40160	14,0
4	139470	35280	25,3
	201890	49370	24,5
	227560	54820	24,1
	253470	33650	13,3
	84520	24180	28,6
	123640	31870	25,8
	Rerata		26,7
	42680	16590	38,9
	54730	23940	43,7
	186920	51280	27,4
	266450	37490	14,1
5	145670	32980	22,6
	194780	46530	23,9
	236890	53760	22,7
	251230	30840	12,3
	77840	21450	27,6
	118270	34780	29,4
	Rerata		26,3
Ulangan		Pendok	
	Luas Kalus (px2)	Luas Browning (px2)	Browning (%)
	28721	8751	30,5
1	49789	18473	37,1
	207360	54743	26,4
	249750	33946	13,6

	134780	31.954	23,7
	178340	41.235	23,1
	215670	52.140	24,2
	246890	36.540	14,8
	68950	21.430	31,1
	112360	29.875	26,6
	Rerata		25,1
	30540	9120	29,9
	52360	18.940	36,2
	198450	52.130	26,3
	241780	33.640	13,9
2	142360	33.580	23,6
	185230	43.760	23,6
	209540	50.430	24,1
	252340	38.120	15,1
	73450	22890	31,2
	118760	31650	26,7
	Rerata		25
	29680	8950	30,2
	48640	17890	36,8
	212340	56320	26,5
	254670	34580	13,6
3	138450	32980	23,8
	176540	41320	23,4
	223450	53870	24,1
	245780	36540	14,9
	71540	21980	30,7
	109870	28940	26,3
	Rerata		25,1
	41870	12760	30,5
	56320	20450	36,3
	187940	48210	25,7
	276430	39120	14,2
4	154680	28740	18,6
	169250	45680	27,0
	234560	61790	26,3
	251890	33860	13,4
	78210	24530	31,4
	121450	31670	26,1
	Rerata		24,9
	39250	18470	47,1
	64890	22760	35,1
5	173420	59430	34,3
	289760	41250	14,2
	142830	36790	25,8

	198540	52140	26,3
	216780	44860	20,7
	263910	30580	11,6
	85420	19340	22,6
	117690	28450	24,2
	Rerata		26,2

Ulangan	Ketan Hitam		
	Luas Kalus (px2)	Luas Browning (px2)	Browning (%)
1	44120	15830	35,9
	58940	26170	44,4
	189560	53490	28,2
	273780	38540	14,1
	143980	34120	23,7
	198230	45890	23,1
	233670	52170	22,3
	257890	33380	12,9
	82940	22370	27,0
	127480	35690	28,0
	Rerata		26
2	28750	9640	33,5
	64520	21870	33,9
	154380	47290	30,6
	312640	58320	18,7
	89740	30150	33,6
	226580	41890	18,5
	47890	16340	34,1
	191230	52970	27,7
	268450	34780	13,0
	72310	25460	35,2
	Rerata		27,9
3	35690	12780	35,8
	84230	28640	34,0
	173560	49180	28,3
	295870	62140	21,0
	112430	36470	32,4
	241560	43920	18,2
	52980	18450	34,8
	208740	54890	26,3
	276320	35940	13,0
	68750	23680	34,4
	Rerata		27,8
4	42180	14570	34,5
	93840	31290	33,3
	162470	46380	28,5

	328950	59760	18,2
	101560	33840	33,3
	219870	40670	18,5
	58420	19730	33,8
	187540	51780	27,6
	284630	37250	13,1
	76490	24980	32,7
	Rerata		27,4
	30980	10840	35,0
	71650	24590	34,3
	146780	43820	29,9
	301240	57490	19,1
5	95730	31980	33,4
	233450	42560	18,2
	49560	17280	34,9
	196340	53620	27,3
	259780	34170	13,2
	81260	26790	33,0
	Rerata		27,8

g. Tingkat kematian eksplan pada fase regenerasi-seleksi

Ulangan	Varietas	Jumlah eksplan yang tersisa	Jumlah kalus yang mati	Persentase
	Pandanwangi	131	61	47
1	Pendok	154	73	47
	Ketan Hitam	54	31	57
	Pandanwangi	130	61	47
2	Pendok	139	71	47
	Ketan Hitam	78	48	62
	Pandanwangi	120	55	46
3	Pendok	146	83	54
	Ketan Hitam	73	36	49
	Pandanwangi	139	73	47
4	Pendok	129	59	54
	Ketan Hitam	54	33	61
	Pandanwangi	110	60	45
5	Pendok	154	85	56
	Ketan Hitam	118	66	44

h. Greenspot fase regenerasi-seleksi

Ulangan	Pandanwangi		
	Luas Kalus (px2)	Luas Greenspot (px2)	Greenspot (%)
	34304	12995	42,2
	58972	19289	63,5
1	31922	18792	53,1
	47692	16377	49,3
	39739	20367	61

	28345	17034	55,6
	30293	19405	50,1
	32562	21786	66,1
	37012	13093	64,9
	31095	17995	43,6
	Rerata		59,9
	35691	19827	65,4
	29990	20703	52,9
	30447	19056	63,7
	33976	20340	53,8
2	30976	17508	53,8
	32895	19997	60,8
	34802	19928	69,4
	29367	20930	60,6
	30921	21092	62,4
	39403	19804	42,2
	Rerata		58,5
	29852	18920	65,4
	30998	17343	63,4
	32910	18920	61,8
	28918	20192	57
3	33829	17283	63,1
	28937	20920	61,4
	30182	18255	62,1
	39810	20384	49,5
	36122	17199	47,6
	35620	19203	56,4
	Rerata		58,7
	29110	15910	54,7
	30921	17623	59,8
	28918	18945	61,6
	32019	18920	55,7
4	30261	20931	62,5
	29812	20201	70,2
	33028	17829	61,2
	35710	16520	59,1
	32518	21992	46
	35930	19207	38,7
	Rerata		56,9
	39012	15092	66
	29160	19256	63,3
5	28918	18292	58,2
	32518	18928	54,1
	30922	16720	67,6
	29081	19673	50,5

	30992	15665	48,6
	38663	12995	38,7
	33604	16724	56,1
	29837	20478	56
	Rerata		55,1

Ulangan	Pendok		
	Luas Kalus (px2)	Luas Greenspot (px2)	Greenspot (%)
1	36553	14529	50
	29039	19024	62,8
	71608	35623	49,7
	60345	45048	74,7
	56839	43955	77,3
	68406	36370	53,2
	67345	39682	58,9
	60245	38304	63,6
	56402	32237	57,2
	54998	39540	71,9
	Rerata		61
2	52965	29283	55,3
	68424	43389	63,4
	43817	27392	62,5
	38920	30282	63,5
	58365	20244	52
	60935	42996	73,7
	43672	40182	65,9
	40283	27373	62,7
	39282	28905	71,8
	48580	19383	49,3
	Rerata		62
3	37382	26379	54,3
	38954	21920	58,6
	54729	28390	72,9
	39476	37829	69,1
	42829	29181	73,9
	43790	30157	70,4
	39019	26384	60,3
	37829	19287	49,4
	49033	25634	67,8
	59207	29386	59,9
	Rerata		63
4	47509	38755	65,5
	36723	25744	54,2
	29037	21938	59,8
	48875	19276	66,4

	43686	29345	60
	28039	19208	44
	56932	19107	68,1
	37655	39022	68,5
	48561	21092	56
	26279	27644	56,9
	Rerata		59
	49562	15736	59,9
	37462	29155	58,8
	58363	20286	54,2
	47388	29375	50,3
5	28363	19376	40,9
	46222	22093	77,9
	29475	29377	63,6
	45940	18336	62,2
	30492	25355	55,2
	48957	25737	84,4
	Rerata		60
Ulangan	Ketan Hitam		
	Luas Kalus (px2)	Luas Greenspot (px2)	Greenspot (%)
	32739	28003	57,2
	43118	18574	56,7
	57849	31313	72,6
	40962	36032	62,3
1	62309	29064	71
	51211	39793	63,9
	60092	30830	60,2
	43288	45759	76,1
	53904	30972	71,5
	44987	36740	68,2
	Rerata		56
	53390	29208	64,9
	63815	39928	74,8
	36489	48365	43,5
	57297	28381	35,2
2	48099	21883	49,8
	46527	23632	39,6
	31426	32669	46,1
	37185	20188	48,1
	62431	28364	43,4
	46290	42209	45,8
	Rerata		49
3	35279	27363	49,3
	53725	21817	47

	30476	27160	43,5
	48347	17152	35,2
	42710	28371	49,8
	50275	21917	39,6
	44270	39386	46,1
	35289	29287	48,1
	38490	19286	43,4
	36622	28834	45,8
	Rerata		44
	39338	33281	68,8
	43928	25727	65,4
	52819	32492	74
	37430	39104	74
4	42935	20338	54,3
	38940	30944	72,1
	52919	26389	67,8
	44822	38492	72,7
	39273	27388	61,1
	45390	20192	51,4
	Rerata		60
	37185	20188	48,1
	62431	28364	43,4
	46290	42209	45,8
	35279	27363	49,3
	53725	21817	47
5	30476	27160	43,5
	48347	17152	35,2
	42710	28371	49,8
	50275	21917	39,6
	44270	39386	46,1
	Rerata		44