



**TRANSFORMASI GEN PROTEIN KAPSID SCMV
(*Sugarcane Mosaic Virus*) PADA TANAMAN
TEBU VARIETAS NXI 1-3**

SKRIPSI

Oleh

Weny Nailul Hidayati

NIM 121810401080

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**TRANSFORMASI GEN PROTEIN KAPSID SCMV
(*Sugarcane Mosaic Virus*) PADA TANAMAN
TEBU VARIETAS NXI 1-3**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi S1 (Biologi)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

Weny Nailul Hidayati

NIM 121810401080

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang, saya persembahkan skripsi ini kepada:

1. Bapak Noto Sumarno dan Ibu Musaadah, terima kasih yang tidak terhingga atas kasih sayang, dukungan, dan doa, serta adikku Muhammad Nafi' Zainur Rosyid yang memberikan canda tawa, keceriaan, semangat dan motivasi, semoga Allah senantiasa melindungi dan meridhoi kalian.
2. Keluarga besar serta sahabat-sahabat yang telah begitu banyak memberikan dukungan dalam menuntut ilmu;
4. Para guru sejak Taman Kanak-Kanak sampai Perguruan Tinggi yang telah mendidik, membimbing dengan penuh ikhlas dan sabar, terima kasih atas ilmu yang telah diberikan;
5. Almamater Universitas Jember.

MOTTO

Raihlah ilmu, dan untuk meraih ilmu belajarlah untuk tenang dan sabar.

(Umar bin Khatab)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Weny Nailul Hidayati

NIM : 121810401080

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Transformasi Gen Protein Kapsid SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) Pada Tanaman Tebu Varietas NXI 1-3”** adalah benar-benar hasil karya sendiri kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Penelitian ini dibiayai oleh Insentif Riset SINas RISTEK tahun 2016 atas nama Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.,Sc. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 6 Juni 2017

Yang menyatakan,

Weny Nailul Hidayati

NIM. 121810401080

SKRIPSI

**TRANSFORMASI GEN PROTEIN KAPSID SCMV
(*Sugarcane Mosaic Virus*) PADA TANAMAN
TEBU VARIETAS NXI 1-3**

Oleh

Weny Nailul Hidayati

NIM 121810401080

Pembimbing:

Pembimbing Utama : Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc

NIP. 195510221982121001

Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP

NIP.196504251990022002

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Transformasi Gen Protein Kapsid SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) Pada Tanaman Tebu Varietas NXI 1-3**” telah di uji dan disahkan pada:

Hari, Tanggal :

Tempat :

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota

Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc

NIP. 195510221982121001

Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP

NIP. 196504251990022002

Dosen penguji I,

Dosen penguji II,

Dr. Rike Oktarianti, M.Si.

NIP. 196310261990022001

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.

NIP. 196008161989021001

Mengesahkan

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D

NIP. 196102041987111001

RINGKASAN

Transformasi Gen Protein Kapsid *SCMV* (*Sugarcane Mosaic Virus*) Pada Tanaman Tebu Varietas NXI 1-3; Weny Nailul Hidayati,121810401080; 2017: 27 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) merupakan salah satu penyakit penting yang dapat menurunkan produktivitas tebu. Virus ini menyebabkan gejala bercak kekuning-kuningan yang menunjukkan bahwa terjadi penurunan konsentrasi klorofil pada daun. Salah satu upaya untuk mengatasi serangan *SCMV*, dilakukan perakitan tanaman tebu yang memiliki ketahanan terhadap *SCMV* melalui transformasi genetik. Transformasi genetik dilakukan dengan pendekatan *Pathogen Derived Resistance* (PDR) menggunakan gen *coat protein* *SCMV* (CP-*SCMV*) sebagai perantara resistensi virus.

Pada penelitian ini dilakukan transformasi gen protein kapsid *SCMV* kedalam tanaman tebu menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa konstruk plasmid biner pRI ON 101 +CP725 DNA. Perakitan tanaman transgenik yang mengekspresikan *Coat protein mediated resistance* diharapkan dapat mencegah proses penyelubungan RNA virus oleh protein kapsid (yang telah disandi inang) menjadi partikel utuh dan mencegah atau menunda penyebaran virus secara sistemik, terutama untuk virus se-homolog bila inokulum penyakit mempunyai konsentrasi tinggi dalam tanaman

Penelitian dilakukan bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu yang memiliki sifat tahan terhadap serangan virus *SCMV*. Metode penelitiannya terdiri dari tahap perbanyakan planlet, tahap transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*, aklimatisasi dan analisis PCR. Planlet untuk transformasi di perbanyak secara *in vitro* dengan media MS₀ (Murashige skoog) hingga planlet siap untuk di infeksi. tahap selanjutnya yaitu proses transformasi yang terdiri dari kokultivasi selama 3 hari dengan penambahan senyawa *acetosyringone* pada media MS₀, eliminasi selama 7 hari dengan penambahan antibiotik cefotaxime 500 ppm dan seleksi dilakukan hingga 5 kali seleksi pada setiap masa seleksi

ditumbuhkan selama 2 minggu. Tanaman yang lolos hingga seleksi kelima merupakan tanaman *putative* transforman yang kemudian di aklimatisasi pada media pasir dan *cocoapeat* dengan perbandingan 1:1. Kemudian dianalisis menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa telah diperoleh tanaman putatif transforman dengan tingkat keberhasilan transformasi 8%. Hasil konfirmasi menggunakan primer *nptII* menggunakan metode PCR (*Polymerase chain reaction*) didapatkan 8 tanaman dengan ukuran pita DNA ± 550 bp. Apabila terdeteksi gen *nptII* maka dapat pula menunjukkan telah terinsersinya gen CP-SCMV pada tanaman tebu.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “transformasi gen protein kapsid SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) Pada Tanaman Tebu Varietas NXI 1-3”. Penelitian ini dibiayai oleh Insentif Riset SINas RISTEK tahun 2016 atas nama Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.,Sc. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto M.Agr.Sc selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan pengarahan, bimbingan dan motivasi kepada penulis selama pelaksanaan penelitian;
2. Dr. Rike Oktarianti, M.Si. selaku Dosen penguji 1 dan Drs. Rudju Winarsa, M.Kes. selaku Dosen Penguji 2 atas saran dan masukan guna kesempurnaan penulisan skripsi ini;
3. Dr. Hidayat Teguh Wiyono, M.Pd selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
4. Ibu Kasminah dan Bapak Saeri, terima kasih telah mendidik sejak kecil dengan memberikan banyak pelajaran tentang kehidupan dan mengajarkan bahagianya menjadi sederhana.
5. Kakak senior Retnosari Apriasti, SP, terima kasih atas saran, bimbingan, dukungan dan kerja samanya dalam menyelesaikan penelitian ini, semoga Allah meridhoi dan melancarkan segala urusanmu
6. Sahabat sekaligus rekan-rekan kerja *Sugar Group* (Suvia Widyaningrum, Kiky Mey Putranti, Novita Niswatun A, Reza Anugrah M, Savira Arikha, Suwinda Fibriani, Firdha Narulita A, Wulan Nursyiam, Retna Hermawati, Intan Ria Neliana, Fragaria Vesca, Nurul Mufitdah), *Phage team* (Cahya

Anugrah, Febrian Eka, Guruh Surastomo, Wahyu Cipta, Arie Rahmawati, Diqita Naviri, Agnes), *Cassava group* (Tisa Rena, Amir Muayyad) atas kebersamaan, dan kekompakan selama melakukan penelitian;

7. Teman-Teman BIOLOGI 2012, atas kebersamaan dan telah banyak membantu selama menjalani masa perkuliahan.
8. Teman-Teman Kos Sahida (Mika, Ratna, Yuvita, Hurin'in, Ifa, Ida M, Ida Nur, Tyas), terima kasih atas banyak waktu yang telah dihabiskan bersama dan terimakasih telah mewarnai hari-hari selama menjadi mahasiswa.
9. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah membantu dan memberi dukungan selama berjuang dikampus.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan karya ilmiah tertulis ini masih banyak kekurangan, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi penyempurnaan karya ilmiah tertulis ini. Semoga karya ilmiah tertulis ini bermanfaat khususnya bagi pengembangan ilmu biologi.

Jember, 6 Juni 2017

Penulis

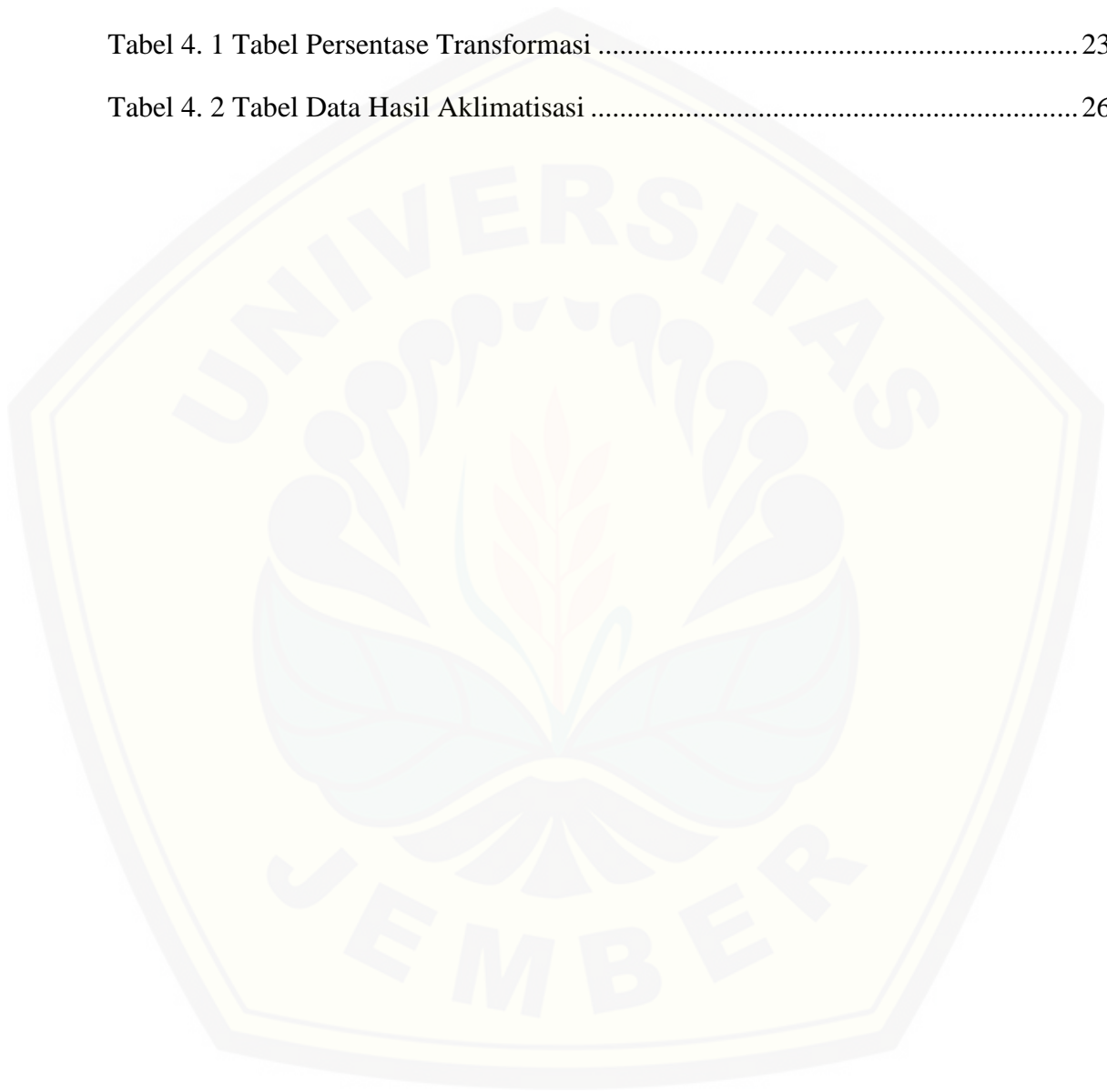
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN	v
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Sugarcane Mosaic Virus (SCMV)	4
2.1.1 Karakteristik sugarcane mosaic virus (SCMV).....	4
2.1.2 Protein kapsid sugarcane mosaic virus (SCMV)	5
2.2 Transformasi gen menggunakan <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
2.3 Mekanisme <i>pathogen derived resistance</i> pada tanaman	8
BAB 3. METODE PENELITIAN	10
3.1 Tempat Dan Waktu Penelitian	10
3.2 Alat dan Bahan	10
3.3 Metode Penelitian	10
3.4 Pelaksanaan Penelitian	11
3.4.1 Konfirmasi <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
3.4.2 Persiapan Eksplan Transformasi	13
3.4.3 Kultur <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13

3.4.4	Infeksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ke pangkal tebu.....	13
3.4.5	Kokultivasi	14
3.4.6	Eliminasi	14
3.4.7	Seleksi eksplan transforman.....	14
3.4.8	Aklimatisasi Tanaman <i>Putative</i> Transforman.....	15
3.4.9	Isolasi DNA genom tanaman putatif transforman	15
3.4.10	Analisis PCR (Polymerase Chain Reaction)	16
3.4.11	Analisis Data	17
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	18
4.1.	Eksplan tunas pangkal tebu <i>in-vitro</i>	18
4.2	Konfirmasi plasmid pRI ON +725 CP DNA pada <i>Agrobacterium tumefaciens</i>.....	18
4.3	Transformasi gen <i>coat protein</i> kedalam genom tanaman tebu.....	19
4.4	Aklimatisasi Tanaman <i>Putative</i> PRG.....	24
4.5	Analisis PCR tanaman <i>putative</i> transforman	26
BAB 5.	PENUTUP.....	28
5.1	Kesimpulan.....	28
5.2	Saran	28
DAFTAR PUSTAKA		29

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Protein Potyvirus dan Fungsinya	5
Tabel 3. 1 Tabel Persentase Transformasi	17
Tabel 4. 1 Tabel Persentase Transformasi	23
Tabel 4. 2 Tabel Data Hasil Aklimatisasi	26



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1	Struktur Genom Potyvirus	4
Gambar 2. 2	Elektroforesis RT-PCR (<i>Reverse transcriptase- polymerase chain reaction</i>)..	6
Gambar 2. 3	Interaksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> dengan sel tanaman	8
Gambar 2. 4	Diagram tahap infeksi virus Tobacco Mosaic Virus (TMV).....	9
Gambar 3. 1	Konstruk plasmid biner pRI ON CP+725bp DNA.....	12
Gambar 4. 1	Eksplant pangkal tunas tebu <i>in vitro</i>	18
Gambar 4. 2	Bagan posisi perlekatan Coat Protein dan prediksi ukuran hasil amplifikasi primer	19
Gambar 4. 3	Konfirmasi plasmid pRI ON +725 CP SCMV pada <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
Gambar 4. 4	Perkembangan eksplant tebu setelah proses transformasi.....	21
Gambar 4. 5	Perbandingan tanaman kontrol dan tanaman perlakuan.....	23
Gambar 4. 6	Aklimatisasi tanaman tebu putative transforman	25
Gambar 4. 7	Hasil analisis PCR menggunakan primer nptII-F dan nptII-R.....	27

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tebu (*Saccharum officinarum*) merupakan salah satu dari tanaman pertanian yang hidup di wilayah tropis dan sub-tropis. Luas area pertanian tebu di Indonesia sekitar 487.095 ha dengan jumlah total produksi tebu mencapai 272.393 ton pada tahun 2015. Pertanian tebu di Indonesia tersebar di wilayah Sumatra, Jawa, Nusa Tenggara, Bali, Sulawesi, Maluku dan Papua. Wilayah Jawa masih menjadi daerah dengan komoditas penghasil tebu terbesar di Indonesia, terutama provinsi Jawa Timur yang memiliki tingkat produktivitas paling tinggi dengan hasil produksi mencapai 1.327.500 ton pada tahun 2015 (Direktorat Jendral Perkebunan, 2015).

Tebu menjadi komoditas penting di Indonesia karena tanaman ini memiliki potensi di bidang industri sebagai penghasil gula, biofiber, bioplastik dan biofuel. Ketersediaan tebu sebagai bahan baku menjadi sangat penting untuk menghasilkan produk hasil pertanian. Oleh karena itu, untuk menjaga ketersediaan tebu sebagai bahan baku, maka perlu upaya untuk meningkatkan adaptasi tebu yang baik dengan daya hasil tinggi, kandungan nutrisi baik, serta tahan terhadap serangan penyakit.

Penyakit yang menyerang tanaman tebu disebabkan oleh jamur, bakteri, nematoda dan virus. Salah satu penyakit yang menginfeksi tanaman tebu akibat serangan virus adalah penyakit mosaik. Penyakit mosaik pada tebu disebabkan oleh *sugarcane mosaic virus* (SCMV) yang penyebarannya merata di wilayah Jawa (Koesmihartono *et al*, 2012). Gejala umum virus mosaik yaitu tampak bercak-bercak perbedaan warna hijau pada helaian daun yaitu warna hijau terang atau kekuning-kuningan yang menunjukkan bahwa terjadi klorosis yaitu penurunan konsentrasi klorofil pada daun (Koike, 1998).

Cara penanganan terhadap serangan virus meliputi pembuatan bibit tebu bebas virus dengan cara kultur meristem, *Hot water treatment* (HWT) dan penggunaan ribavirin. Namun, hal ini kurang efektif dalam menangani gejala yang disebabkan oleh virus SCMV, karena bibit tebu tersebut saat ditanam masih dapat

terserang oleh virus. Oleh karena itu, suatu upaya perbaikan tanaman untuk menghasilkan tanaman yang memiliki keunggulan sifat-sifat tertentu yaitu dengan rekayasa genetik. Teknik ini digunakan untuk menyisipkan gen yang berasal dari tanaman, bakteri, virus dan hewan (Listanto *et al*, 2005). Teknik transformasi yang umum digunakan yaitu transformasi secara tidak langsung menggunakan bantuan bakteri *Agrobacterium tumefaciens*, karena memiliki efisiensi transformasi yang lebih tinggi dan dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium yang sederhana. Pemanfaatan bioteknologi tanaman mempunyai keuntungan antara lain dapat mengurangi biaya produksi dan dapat mengurangi polusi lingkungan yang disebabkan oleh penggunaan pestisida dan herbisida (Singh *et al*, 2013).

Transformasi pada tanaman tebu supaya tahan terhadap serangan virus dilakukan dengan berbagai metode. Salah satunya adalah metode *Pathogen Derived Resistance Coat Protein mediated resistance* (PDR CP-MR). Teori dari metode *pathogen derived resistance* yaitu menjelaskan bahwa hubungan normal antara inang dan patogen dapat dikacaukan, jika tanaman inang mengekspresikan gen *pathogen-derived* esensial. Perakitan tanaman tebu yang tahan terhadap virus SCMV melalui transformasi gen protein kapsid virus SCMV dapat menjadikan tanaman tebu resisten terhadap infeksi virus yang sama (Lindbo & Dougherty, 1992). Penggunaan metode ini di harapkan mampu mencegah penyebaran virus SCMV. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai transformasi protein kapsid pada tanaman tebu. Sehingga dapat menghasilkan tanaman transforman yang tahan terhadap virus SCMV.

1.2 Rumusan Masalah

Untuk mendapatkan tanaman tebu yang tahan terhadap virus SCMV, maka konstruk plasmid yang mengandung protein kapsid harus di masukkan kedalam gen tanaman tebu. Oleh karena itu, konstruk gen protein kapsid SCMV perlu untuk ditransformasikan ke tanaman melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens*.

1.3 Batasan Masalah

Gen protein kapsid SCMV berhasil di transformasikan kedalam tanaman tebu dengan analisis menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan tanaman tebu produk rekayasa genetik (PRG) yang memiliki gen ketahanan terhadap virus SCMV melalui transformasi genetik menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens*.

1.5 Manfaat Penelitian

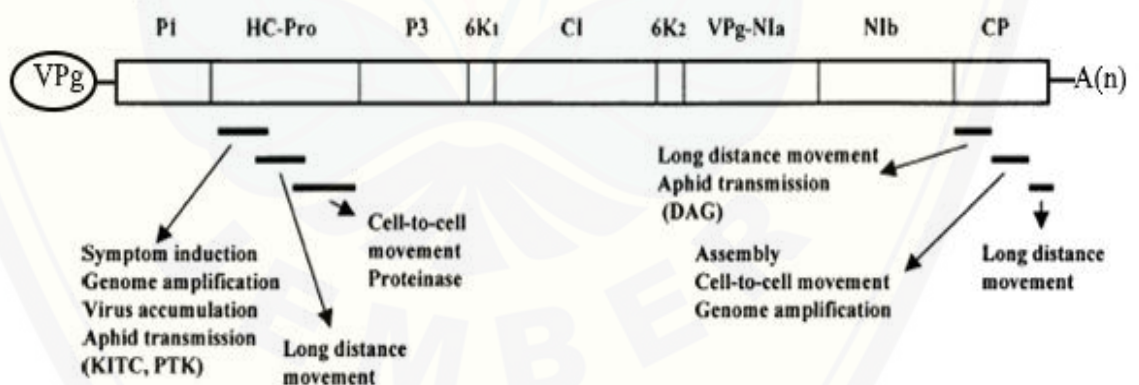
Manfaat dari penelitian ini mendapatkan tanaman tebu yang memiliki ketahanan terhadap virus *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) sehingga, diharapkan mampu menekan penyebaran penyakit oleh virus SCMV.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sugarcane Mosaic Virus (SCMV)

2.1.1 Karakteristik sugarcane mosaic virus (SCMV)

Penyakit pada tanaman tebu salah satunya disebabkan oleh *sugarcane mosaic virus* (SCMV) yang termasuk dalam kelompok potyvirus. Potyvirus adalah kelompok virus yang genomnya adalah positif *single-strand* RNA (+ssRNA), dengan struktur genom sederhana yang mengkode 10 macam protein antara lain *first protein* (P1), *helper component protein* (HC-pro), *third protein* (P3), *first 6K protein* (6K1), *cylindrical inclusion protein* (CI), *second 6K protein* (6K2), *viral genome-linked* (VPg), *nuclear inclusion a protein* (NIa), *nuclear inclusion b protein* (NIb), dan *Coat protein* (CP) (Guo *et al.*, 2015). Karakter lain dari kelompok potyvirus yaitu memiliki panjang partikel 700-900 nm dengan diameter 11 nm. Susunan genom linier dengan berat molekul 3×10^6 , panjang genomnya 9,6-9,8 kb, mempunyai ORF (*Open Reading Frame*) dengan panjang 9,0-9,4 kb untuk menyandi protein 340-355 kD (Wahyuni,2005).



Gambar 2. 1 Struktur Genom Potyvirus (Andrejeva *et al.*, 1999)

2.1.2 Protein kapsid sugarcane mosaic virus (SCMV)

Genom potyvirus mengkode 10 macam protein yang memiliki fungsi masing-masing (Tabel 2.1), salah satunya adalah protein kapsid. Protein kapsid merupakan gen yang menandakan karakteristik dari potyvirus. Fungsi dari protein kapsid yaitu menyelubungi RNA virus dan terlibat dalam transmisi vektor. Selain sebagai transmisi vektor, protein kapsid dari potyvirus mungkin memainkan peran dalam proses infeksi partikel pada tanaman (Shukla,1991). Keberhasilan dari proses transmisi oleh Aphid tergantung dari interaksi dengan protein yang menyandi sebagai pembawa virus, yaitu coat protein dan HC-pro. Tiga pasang asam amino *Aspartic-Alanin-Glycine* (DAG) merupakan daerah konservatif yang berada di dekat N-terminal yang berperan dalam proses transmisi oleh Aphid (Atreya, 1995).

Tabel 2. 1 Protein Potyvirus dan Fungsinya

Protein	Fungsi protein
P1	Proteinase, berperan dalam perpindahan virus dari sel ke sel
Hc-Pro	Berhubungan dengan penularan virus melalui kutu daun
P3	Sifat patogenik terhadap tanaman
CI	Pergerakan RNA helikase dari sel ke sel
CP	Selubung protein, berhubungan dengan penularan melalui vector
NIa-VPg	Replikasi genom
NIa-Pro	Proteinase major
Nib	Replikasi virus (RNA dependent RNA polymerase/RdRp)
6K1	Tidak diketahui
6K2	Replikasi RNA

Sumber: Pramarta, (2014)

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, pita (*band*) protein dari sampel yang terinfeksi SCMV telah dipurifikasi dan kemudian dilakukan staining menggunakan gel SDS-PAGE menunjukkan bahwa sampel yang terinfeksi SCMV diperkirakan berukuran 37 kDa (Mohammadi, 2009), kemudian dilakukan RT-

PCR (*Reverse transcription-polymerase chain reaction*) menggunakan primer reverse dan primer forward sehingga menunjukkan hasil amplifikasi berukuran 900 bp.



Gambar 2. 2 Elektroforesis RT-PCR (*Reverse transcriptase- polymerase chain reaction*). (1) daun sorghum sehat. (2) daun shorgum terinfeksi. (3) Daun sorghum cultivar. Kimia terinfeksi SCMV, (4) Daun jagung cultivar. Pars 403 terinfeksi SCMV, (L1) marker 1000 bp ladder, (L2) marker 100bp ladder (Mohammadi, 2009).

2.2 Transformasi gen menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*

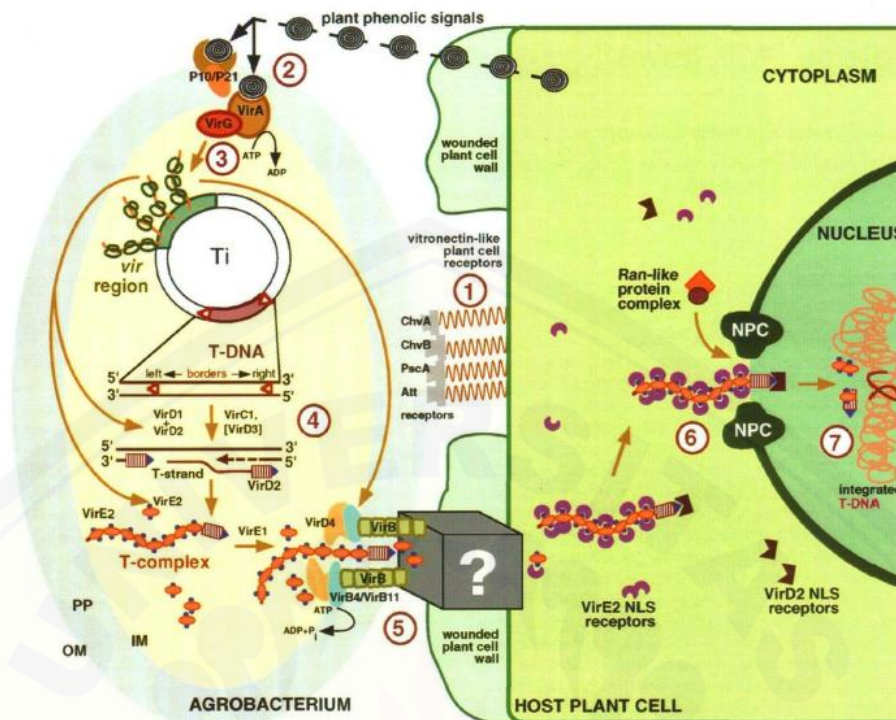
Agrobacterium tumefaciens merupakan bakteri tanah gram positif yang bersifat fitopatogen. Bakteri ini, secara alami mempunyai kemampuan untuk mentransfer potongan DNA-nya yang kemudian dikenal dengan T-DNA (*transfer DNA*) dalam genom tanaman dan menyebabkan terbentuknya tumor (*crown gall*) (Sheng dan Citovsky, 1996).

Ada tiga komponen genetik penting yang terlibat dalam proses pembentukan tumor. Pertama, gen virulen kromosom (*chromosomal virulence* disingkat *chv*), yang terdapat pada kromosom *Agrobacterium* dan berfungsi dalam pelekatan bakteri dengan sel tanaman. Kedua, sekelompok gen virulen (*vir*) yang terdapat dalam plasmid Ti (*Tumor inducing*) yang berukuran besar (200 kb) yang berperan dalam menginduksi transfer dan integrasi T-DNA. Komponen ketiga

adalah daerah T-DNA yang juga terletak pada plasmid Ti (*Tumor inducing*). Daerah T-DNA dibatasi oleh LB (*left border*) dan RB (*rightborder*) yang mengandung gen penting bagi *Agrobacterium*. Kemampuan *Agrobacterium* ini yang dapat dimanfaatkan untuk menyisipkan gen bermanfaat pada tanaman (Rahmawati, 1997).

Proses transfer T-DNA dari *Agrobacterium tumefaciens* ke sel tanaman dibagi menjadi 2 tahap yaitu proses tahapan pada bakteri dan tahapan di dalam sel tanaman. Tahap pada sel bakteri diatur oleh aktivitas dari gen *vir*. Dasar dari transformasi yang menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* yaitu terdapat berbagai protein yang dikode oleh gen *vir* yang digunakan untuk proses transformasi. Protein *VirA* dan *VirG* merupakan dua komponen yang berfungsi sebagai sensor sinyal transduksi (Gelvin, 2003).

Aktivitas gen virulen diinduksi oleh senyawa fenolik akibat pelukaan pada tanaman seperti acetosyringon. Senyawa ini menginduksi protein *virA* yang merupakan antena periplasmik yang merasakan adanya senyawa fenolik tanaman akibat dilukai, kemudian akan mengaktifkan protein *virG*. *virG* yang telah aktif merangsang ekspresi dari daerah virulensi (*vir region*). Daerah virulensi ini menyandikan protein *vir* berbeda yang berperan dalam proses transfer. Protein *VirD2* dan *VirD1* memainkan peran penting dalam proses memotong untai tunggal (*single-strand*) T-DNA dari Ti plasmid. Kemudian *VirD2* mengikat secara kovalen ke ujung 5' pada DNA yang terlepas. Molekul ini kemudian dilepaskan ke sel tanaman melalui sebuah saluran. Saluran ini di bentuk oleh protein *VirB*. Saluran ini juga digunakan untuk mengekspor protein *VirE*. Proses yang terjadi pada sel tanaman yaitu gabungan dari *VirE* dengan *single-stranded* T-DNA dan molekul *VirD2* menjadi struktur T-*complex*. *VirD2* dan protein *VirE2* membawa masuk T-DNA ke nukleus melalui *nuclear pore complexes* (NPC) kemudian di dalam nukleus T-DNA terintegrasi kedalam sel genom tanaman (Tinland,1996) (Gambar 2.4)



Gambar 2.3 Interaksi *Agrobacterium tumefaciens* dengan sel tanaman. (Sheng dan Citovsky, 1996)

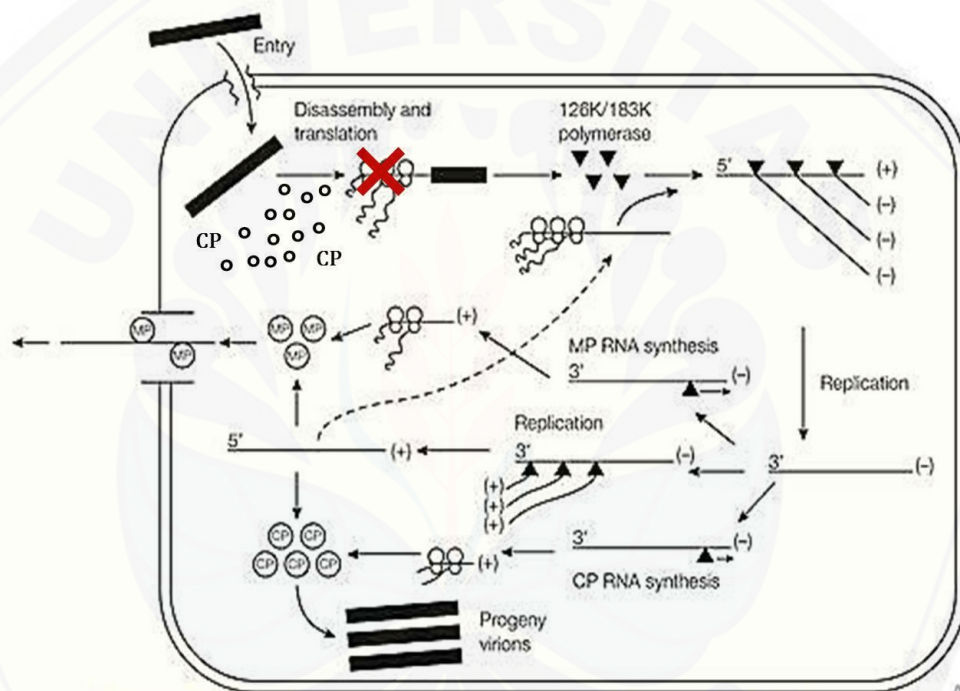
2.3 Mekanisme *pathogen derived resistance* pada tanaman

Pathogen derived resistance (PDR) adalah teori yang menjelaskan bahwa hubungan normal antara inang dan pathogen dapat dikacaukan jika inang mengekspresikan gen turunan yang resisten terhadap pathogen. Organisme inang yang mengekspresikan gen turunan pathogen tersebut dapat menggagalkan tahap perkembangan pathogen yaitu mengganggu siklus replikasi (Lindbo dan Dougherty, 1992).

Penerapan metode PDR salah satunya dengan menggunakan perantara protein kapsid (*Coat protein mediated-resistance*). Protein kapsid berfungsi melindungi asam nukleat virus dari kerusakan dan berperan penting dalam proses infeksi virus termasuk akuisisi dan transmisi virus oleh Aphid (Andrejeva et al., 1999).

Perakitan tanaman transgenik yang mengekspresikan *Coat protein mediated resistance* diharapkan dapat mencegah proses penyelubungan RNA virus oleh protein kapsid (yang telah disandi inang) menjadi partikel utuh dan

mencegah atau menunda penyebaran virus secara sistemik, terutama untuk virus se-homolog bila inokulum penyakit mempunyai konsentrasi tinggi dalam tanaman (Wahyuni, 2005). *Coat protein mediated-resistance* menjelaskan bahwa tanaman transgenik yang mengekspresikan protein kapsid dapat memiliki ketahanan yang tinggi terhadap infeksi dari virus. Sehingga ekspresi dari protein kapsid tersebut dapat menghalangi proses pembongkaran virus yang menginfeksi sel tanaman karena keberadaan protein kapsid yang diekspresikan oleh tanaman (Goldbach, 2003) (Gambar 2.4).



Gambar 2. 4 Diagram tahap infeksi virus Tobacco Mosaic Virus (TMV). MP: Movement protein, CP : Coat Protein.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) divisi biologi molekuler dan bioteknologi tanaman Universitas Jember pada bulan September 2016 sampai Maret 2017.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan adalah peralatan autoklaf, *Laminar air flow* (LAF), dan peralatan standart laboratorium. Bahan yang digunakan adalah media *Murashige-skoog* (MS), media YEP, antibiotik antara lain :*kanamycin*, *cefotaxime*, *gentamycin*, *rifampycin*, planlet tebu varietas NXI 1-3 *in-vitro*, biakan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* yang telah disisipi konstruk gen protein kapsid SCMV.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui 5 tahapan yaitu persiapan eksplan, perbanyakan *Agrobacterium*, infeksi *Agrobacterium* ke bagian basal tebu, analisis PCR dan aklimatisasi.

Tahap 1. Persiapan eksplan

Persiapan transformasi yaitu dengan perbanyakan planlet tebu varietas NXI 1-3 secara *in vitro* dan eksplan yang digunakan adalah tunas basal tebu. Planlet yang akan dijadikan eksplan dipotong bagian pangkal tebu $\pm 0,5$ cm. Jumlah eksplan yang digunakan untuk satu kali transformasi adalah 100 eksplan. Kemudian disiapkan kultur *Agrobacterium tumefaciens* dalam media YEP selektif cair. Proses infeksi pangkal tebu yang digunakan untuk transformasi harus dilukai dahulu kemudian dimasukkan kedalam kultur *Agrobacterium tumefaciens*.

Tahap 2. Perbanyakan *Agrobacterium tumefaciens*

Bakteri yang digunakan untuk transformasi adalah *Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101 yang membawa konstruk plasmid biner pRI 101 ON

DNA di perbanyak dalam media YEP (Yeast, Pepton, NaCl) cair hingga mencapai kerapatan sel (OD = 0,5-0,7).

Tahap 3. Transformasi *Agrobacterium tumefaciens* ke tunas basal tebu

Proses transformasi dilakukan dalam beberapa tahap yaitu infeksi kokultivasi dan seleksi. Eksplan ditumbuhkan bersama-sama dengan *Agrobacterium tumefaciens* pada media kokultivasi selama 3 hari pada kondisi gelap diharapkan eksplan dapat terinfeksi oleh *Agrobacterium tumefaciens* dan DNA target dapat terinsersi ke dalam genom tanaman. Kemudian dilakukan tahap eliminasi untuk mencegah pertumbuhan bakteri yang tidak menginfeksi eksplan. Setelah ditumbuhkan pada media eliminasi, eksplan transforman di seleksi melalui lima kali tahapan seleksi.

Tahap 4. Aklimatisasi

Tanaman putatif yang telah lolos seleksi kelima kemudian dilakukan aklimatisasi untuk mengadaptasikan tanaman dikondisi *in vivo*. Tanaman putatif transforman dipindahkan ke media pasir steril dengan ditambahkan nutrisi *Hoagland* dan letakkan tanaman di *growth chamber*.

Tahap 5. Analisis PCR

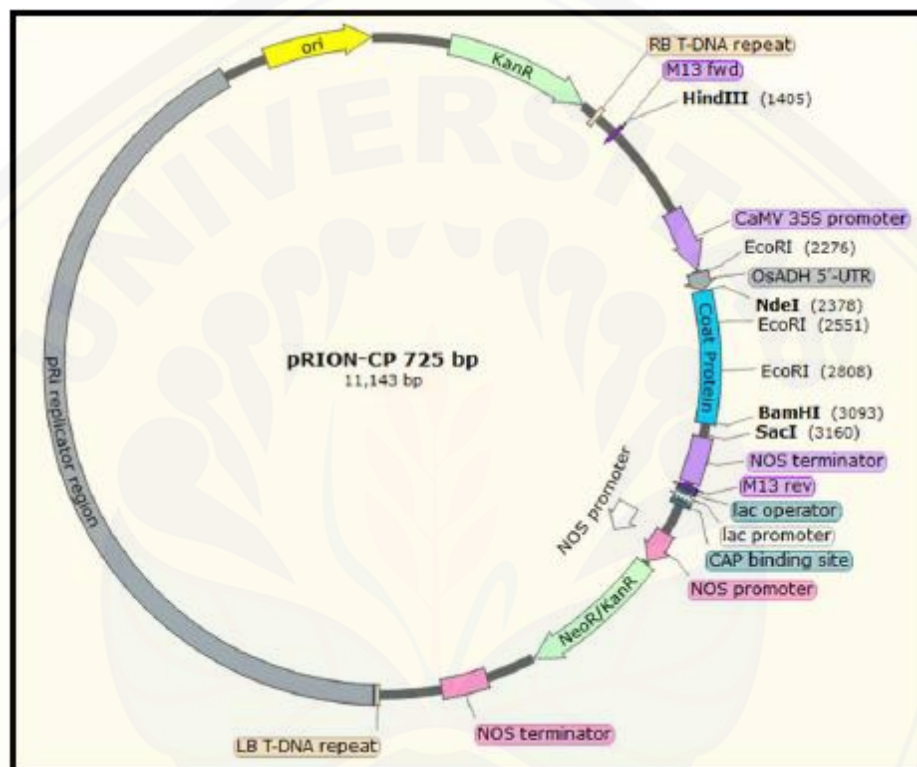
Tanaman yang lolos seleksi kelima dapat disebut tanaman putatif transforman. Untuk memastikan bahwa tanaman tebu tersebut telah terinsersi gen protein kapsid yaitu dilakukan isolasi DNA genom tanaman. Kemudian DNA genom dilakukan analisis menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*) kemudian divisualisasi menggunakan elektroforesis.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Konfirmasi *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens sebagai vektor infeksi dikonfirmasi dahulu dengan melakukan PCR koloni. Konfirmasi digunakan untuk memastikan bahwa terdapat gen target *coat protein* dalam Plasmid pRI 101 ON. Posisi gen target *coat protein* berada diantara 35S CaMV, *NdeI* dan *BamHI*, M13-RV. Sehingga untuk mendeteksi keberadaan gen *coat protein* digunakan dua jenis primer yaitu primer Forward *ndeI* - Reverse *BamHI* dan Primer Forward CaMV – Reverse RV.

Plasmid pRI 101 ON terdiri dari bagian T-DNA yang dibatasi oleh daerah *left border* (LB) dan *right border* (RB). Bagian T-DNA meliputi NOS term: *nopaline synthetase* terminator, NPT II: *neomycin phosphotransferase*, NOS promoter, *Coat protein* (protein kapsid), OsADH 5'-UTR : *Enhancer*, CaMV 35S promoter. Gambar berikut ini merupakan konstruk plasmid biner pRI ON CP+725bp DNA



Gambar 3. 1 konstruk plasmid biner pRI ON CP+725bp DNA

Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan PCR *master mix* kappa. Dalam satu kali reaksi memiliki total volume 20 μ l dengan larutan yang terdiri dari PCR *Master Mix* 10 μ l, masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) 1 μ l, DNA *template* 1 μ l dan ddH₂O 7 μ l. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus yang meliputi tahapan antara lain predenaturasi 95°C selama 5 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 58°C selama 20 detik, extension 72°C selama 1 menit, Final extension 72°C selama 5 menit, *Final hold* 16°C.

3.4.2 Persiapan Eksplan Transformasi

Eksplan tebu yang digunakan adalah pangkal dari planlet *in vitro* tanaman tebu varietas NXI 1-3. Planlet tersebut di subkultur 4 minggu sekali untuk mendapatkan perbanyakan tunas tebu, kemudian tunas tersebut di pindahkan pada media *Murashige-skoog* (MS₀) baru. Planlet ditempatkan pada ruang inkubasi dengan penyinaran lampu TL. Eksplan yang akan digunakan untuk transformasi di potong bagian basalnya. Dalam satu tahapan transformasi dibutuhkan sebanyak 100 eksplan.

3.4.3 Kultur *Agrobacterium tumefaciens*

Kultur *Agrobacterium tumefaciens* yang sebelumnya telah disisipi gen protein kapsid SCMV dalam plasmid biner pRI 101 ON CP+725bp DNA dibiakkan dalam media YEP (Yeast, Pepton, NaCl) yang mengandung antibiotik (kanamycin 50 mgL⁻¹, rifamycin 100 mgL⁻¹, gentamycin 12,5 mgL⁻¹) dalam 2 ml media cair dan diinkubasi shaker dengan kecepatan 150 rpm, suhu 28°C selama 24 jam sebagai starter. Selanjutnya biakan bakteri dipindahkan ke media YEP 50 ml yang mengandung antibiotik (kanamycin 50 mgL⁻¹, rifamycin 100 mgL⁻¹, gentamycin 12,5 mgL⁻¹) di inkubasi selama ±18 jam hingga mencapai kerapatan sel (OD 0,5 – 0,7) yang kemudian biakan tersebut dapat digunakan untuk infeksi.

3.4.4 Infeksi *Agrobacterium tumefaciens* ke pangkal tebu

Koloni tunggal biakan *Agrobacterium tumefaciens* pada media YEP selektif padat diinokulasikan pada media YEP selektif cair 2 ml dan diinkubasi shaker 150 rpm, 28°C selama 48 jam. Starter dituang ke dalam YEP selektif cair 50 ml, diinkubasi shaker 150 rpm, 28°C hingga mencapai kerapatan sel (OD₆₀₀=0,4-0,6).

Eksplan diambil bagian pangkal dari planlet tebu dari media kultur, dipotong bagian pangkal sepanjang ±0,5 cm. Kemudian eksplan tersebut ditusuk-tusuk (dilukai). Eksplan dipindahkan ke dalam media YEP cair yang telah diinokulasi *Agrobacterium tumefaciens* dan ditambah *acetosyringone* 100 mgL⁻¹, diinkubasi shaker 150 rpm, pada suhu 28°C selama 15 menit kemudian eksplan dibilas dengan akuades steril, dikeringkan diatas cawan petri yang telah diletakkan

tisu dan kertas saring steril di atasnya. Selanjutnya eksplan ditumbuhkan pada media kokultivasi.

3.4.5 Kokultivasi

Kokultivasi dilakukan setelah proses infeksi bertujuan untuk menumbuhkan *Agrobacterium tumefaciens* bersama dengan eksplan. Kokultivasi dilakukan dengan menumbuhkan eksplan pada media kokultivasi ($MS_0 + \text{acetosyringone } 100 \text{ mgL}^{-1}$). Kemudian eksplan diinkubasi pada kondisi gelap dengan suhu 25°C selama 3 hari.

3.4.6 Eliminasi

Eliminasi *Agrobacterium tumefaciens* dilakukan dengan tujuan mencegah ledakan pertumbuhan (*over growth*) bakteri pada eksplan. Eksplan dari media kokultivasi dicuci dengan larutan cefotaxime 500 ppm dan dibilas dengan akuades steril setiap setelah pencucian dengan larutan cefotaxime 500 ppm dan dikeringkan di atas kertas saring steril. Eksplan dipindahkan pada media eliminasi ($MS_0 + \text{cefotaxime } 500 \text{ mgL}^{-1}$) dan inkubasi pada suhu 25°C selama 7 hari dalam kondisi terang.

3.4.7 Seleksi eksplan transforman

Tahap seleksi bertujuan untuk menyeleksi planlet yang telah berhasil di transformasi. Tahapan seleksi eksplan transforman dilakukan sebanyak lima kali. Seleksi 1 sampai dengan seleksi 5 ditumbuhkan pada media ($MS + \text{cefotaxime } 500 \text{ mgL}^{-1} + \text{kanamycin } 75 \text{ mgL}^{-1}$), masing-masing tahapan seleksi membutuhkan waktu inkubasi selama 21 hari dalam kondisi terang. Planlet yang telah melewati seleksi kelima ditumbuhkan pada media MS tanpa penambahan antibiotik (MS_0) selama 4 minggu untuk induksi pembentukan akar. Tanaman tebu yang telah melewati seleksi kelima disebut dengan tanaman tebu putatif transforman. Langkah berikutnya yaitu proses aklimatisasi untuk mengadaptasikan planlet pada lingkungan *in vivo*.

3.4.8 Aklimatisasi Tanaman *Putative Transforman*

Aklimatisasi bertujuan untuk mengadaptasikan tanaman dari kondisi *in vitro* ke kondisi *in vivo*. Aklimatisasi dilakukan pada planlet tebu dengan tinggi \pm 3-5 cm dan telah memiliki cukup akar. Planlet dibersihkan dari sisa-sisa media agar dengan air mengalir dan direndam dalam larutan fungisida (*Dithane* 0,1%) selama 1 menit, kemudian ditanam pada media pasir steril. Pemeliharaan saat aklimatisasi dilakukan dengan penyemprotan akuades dan pemberian larutan nutrisi. Aklimatisasi dilakukan bertahap dengan meletakkan tanaman di *growth chamber* selama 2 minggu. Selanjutnya tanaman tebu ditanam pada polybag yang berisi campuran pasir dan *cocoapeat* dengan perbandingan 1:1 dan diletakkan di *green house*.

3.4.9 Isolasi DNA genom tanaman putatif transforman

Isolasi DNA dilakukan untuk mendeteksi keberhasilan integrasi gen yang menyandi ketahanan terhadap virus SCMV pada tanaman tebu. Proses isolasi DNA genom tanaman dilakukan dengan menggerus 0,5 gram daun tanaman tebu dengan Nitrogen cair menggunakan *mortar* dan *pestle* sampai halus. Serbuk daun dipindah ke dalam *microtube* 2 ml yang telah berisi 1 ml buffer ekstraksi pH 8 (100 Mm Tris, 50 Mm EDTA, 500 Mm NaCl), 50 μ l SDS 20% dan 1,25 μ l β -*mercaptoetanol*, divortex sampai homogen, diinkubasi pada suhu 65°C, 10menit. Kemudian ditambahkan 500 μ l *Potassium acetate* 5 M, tube dibolak-balik perlahan (*swirling*), diinkubasi dalam es selama 10 menit. Selanjutnya, disentrifugasi 12.000 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke *microtube* baru, ditambahkan 625 μ l isopropanol, diswirling dan dipresipitasi dengan diinkubasi sampai 20°C selama 1 jam.

Setelah proses presipitasi, dilakukan sentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit untuk mendapatkan pellet. Pellet yang didapatkan ditambah 500 μ l buffer TE dan 10 μ l RNase, diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Proses pemurnian DNA dilakukan dengan penambahan larutan PCI 500 μ l, divortex dan disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit. Supernatan yang didapatkan, dipindahkan ke *microtube* baru, ditambah *chloroform equal volume*

supernatan, divortex dan disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit. Lapisan bagian atas dipindah ke *microtube* baru, ditambah 0,8 x isopropanol dan 0,2x NaAC, diswirling, diinkubasi pada -20°C selama 1 jam.

Setelah proses presipitasi, disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C, selama 10 menit. Pellet dicuci dengan 1 metanol 70%, disentrifugasi 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet dikeringkan dengan *vacum dry* dan ditambahkan 30 µl buffer TE. DNA genom hasil isolasi diukur konsentrasinya menggunakan *Nano Value Plus*, kemudian dilakukan analisis menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

3.4.10 Analisis PCR (Polymerase Chain Reaction)

Analisis PCR dilakukan untuk konfirmasi keberadaan gen target pada plasmid yang diinsersikan pada *Agrobacterium tumefaciens* dan mendeteksi keberadaan gen target pada genom tanaman yang telah ditransformasi. PCR dilakukan dengan menggunakan primer *nptII*: *forward* 5'-TGAATGAACTGCAGGACGAG-3' dan *reverse* 5'-AGCCAACGTATGTCCTGAT-3'. Analisis PCR dilakukan dengan menggunakan PCR *master mix* kappa. Dalam satu kali reaksi memiliki total volume 20 µl dengan larutan yang terdiri dari PCR *Master Mix* 10 µl, masing-masing primer (*forward* dan *reverse*) 1 µl, DNA *template* 1µl dan ddH₂O 7 µl. Proses PCR dilakukan sebanyak 35 siklus yang meliputi tahapan antara lain predenaturasi 95°C selama 5 menit, denaturasi 95°C selama 30 detik, annealing 60°C selama 20 detik, extension 72°C selama 1 menit, Final extension 72°C selama 5 menit, *Final hold* 16°C.

DNA yang telah teramplifikasi oleh PCR dipisahkan dengan 1% *agarose gel* elektroforesis yang mengandung 3 µl *ethidium bromide* dengan tegangan 100 V selama 25 menit. Marker DNA yang digunakan adalah marker 1 Kb *Ladder* sebanyak 2 µl untuk melihat pita DNA yang telah teramplifikasi. Hasil elektroforesis dilihat di *Gel documentation system* dan didokumentasikan. Pada tanaman yang telah dianalisis PCR dan dinyatakan positif transforman, dilakukan perhitungan efektifitas transformasi tanaman positif transforman.

3.4.11 Analisis Data

Proses transformasi pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali sebagai ulangan. Tiap tahapan transformasi dihitung jumlah eksplan yang mampu tumbuh pada media kokultivasi, eliminasi dan media seleksi untuk mengetahui persentase tanaman yang mampu tumbuh sampai akhir seleksi 5.

Tabel 3. 1 Tabel Persentase Transformasi

Transformasi	Jumlah planlet pada tiap tahapan (%)						
	K	E	S1	S2	S3	S4	S5

Keterangan :

K = Kokultivasi, E = Eliminasi dan S = Seleksi 1 – 5 (*kanamycin* 75 mgL⁻¹)

Efektifitas transformasi dihitung berdasarkan jumlah planlet yang mampu tumbuh pada tiap tahapan transformasi yaitu selama tahap kokultivasi, eliminasi dan lima periode seleksi. Perhitungan efektifitas transformasi bertujuan untuk mengetahui persentase keefektifan proses transformasi genetik. Efektifitas transformasi selama lima periode seleksi dihitung berdasarkan rumus:

$$\frac{\text{Jumlah planlet yang tumbuh dalam tiap tahapan transformasi}}{\text{jumlah eksplan awal}} \times 100\%$$

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Transformasi gen protein kapsid pada tanaman tebu melalui *Agrobacterium tumefaciens* dengan vektor biner pRI ON 101 DNA +CP SCMV telah berhasil dilakukan dengan mendapatkan delapan tanaman positif transforman yaitu T_{2.1}, T_{2.2}, T_{2.3}, T_{2.4}, T_{2.5}, T_{2.6}, T_{2.7}, T_{2.8} yang telah dianalisis menggunakan PCR. Persentase keberhasilan transformasi yang diperoleh yaitu sebesar 8 %.

5.2 Saran

Untuk mendapatkan hasil transformasi yang tinggi, hal-hal yang perlu di perhatikan yaitu kondisi planlet sebagai eksplan dianjurkan berusia 1-2 bulan, kondisi tanaman harus sehat, memperhatikan saat proses subkultur harus dalam kondisi yang steril di lingkungan kerja supaya meminimalkan kontaminasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrejeva, J., Puurand, Merits, A., Rabenstein, F., Jarvekulg, L., & Valkonen, J. P. T. 1999. Potyvirus helper component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus-host interactions and the same CP motif affects virus transmission and accumulation. *Journal of General Virology*. 80(5): 1133–1139.
- Atreya, P. L., Chu, M., Atreya, C. D., & Pirone, T. P. 1995. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology*. 76: 265–270.
- Braun, R., & Bennet, D. J. 2001. Antibiotic Resistance Markers in Genetically Modified (GM) Crops. *EFB Task Group Pub Prec Biotech*. 10: 1–4.
- Goldbach, R., Bucher, E., & Prins, M. 2003. Resistance mechanisms to plant viruses : an overview . *Virus Research*. 92: 207-212.
- Direktorat Jendral Perkebunan. 2014. Statistik Perkebunan Indonesia, Tebu (2013-2015). Jakarta: Direktorat Jenderal Perkebunan.
- Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium -Mediated Plant Transformation : the Biology behind the “ Gene-Jockeying ” Tool. *Microbiology And Molecular Biology*. 67(1): 16–37.
- Guo, J., Gao, S., Lin, Q., Wang, H., Que, Y., & Xu, L. 2015. Transgenic Sugarcane Resistant to Sorghum mosaic virus Based on Coat Protein Gene Silencing by RNA Interference. *BioMed Research International*. 2015: 1–9.
- Jensen, S. G., Long-Davidson, B., & Seip, I. 1986. Size Variation Among Proteins Induced By Sugarcane Mosaic Viruses in Plant Tissue. *Phytopathology*. 76: 528-532
- Koesmihartono, L., Tri, P., & Damayanti, A. 2012. Major Diseases Affecting Sugarcane Production in Indonesia. *Global Sciences Books*. 6(2); 124-129.
- Koike, H. 1988. *Sugarcane Diseases: A Guide for field identification*. Rome: Food And Agriculture Organization Of The United Nations.
- Lindbo, J. A., & Dougherty, W. G. 1992. Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* . 5(2): 144-153
- Listanto, E., Pardal, S. J., & Herman, M. 2005. Penyisipan Gen Inhibitor α -amilase pada Plasmid Biner pCambia 1301. *Jurnal Agrobiogen*. 1(2): 45–52.
- Mulyaningsih, E. S., Aswidinnoor, H., Sopandie, D., Ouwerkerk, P. B. F., & Slamet, H. 2010. Transformasi Padi Indica Kultivar Batutegi dan Kasalath dengan Gen Regulator HD-Zip untuk Perakitan Varietas Toleran

- Kekeringan. *Jurnal Agronomi Indonesia*. 38(1): 1–7.
- Mohammadi, M. R., & Hajieghrari, B. 2009. Sugarcane mosaic virus : The causal agent of mosaic disease on sorghum (*Sorghum bicolor* L .) in Tehran province of Iran. *African Journal of Biotechnology*. 8(20): 5271–5274.
- Pramarta. 2014. Identifikasi Spesies Potyvirus Penyebab Penyakit Mosaik Pada Tanaman Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) Melalui Sikuen Nukleotida Gen *Coat Protein*. Tesis. Pascasarjana Universitas Udayana Denpasar
- Rahmawati, S. 1997. Status Perkembangan Perbaikan Sifat Genetik Padi Menggunakan Transformasi *Agrobacterium*. *Jurnal Agrobiogen*. 2(1): 36–44.
- Rashid, H., Afzal, A., Haroon Khan, M. 2010. Effect Of Bacterial Culture Density and Acetosyringone Concentration On *Agrobacterium* Mediated transformation In Wheat. *Pakistan Journal of Botany*. 42(6): 4183-4189.
- Singh, R., Kumar, P., Nn, T., Rastogi, J., & Sp, S. 2013. Current Status of Sugarcane Transgenic : an Overview. *Advancements in Genetic Engineering*. 2(2): 112
- Shukla, D. D., Frcnkel, M. J., & Ward, C. W. 1991. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 13: 178-191.
- Sheng, J., & Citovsky, V. 1996. *Agrobacterium*-Plant Cell DNA Transport : Have Virulence, Will Travel. *The plant cell*. 8: 1699–1710.
- Tiel, K., Enríquez, G. A., Ceballo, Y., Soto, N., Fuentes, A. D., Ferreira, A., Pujol, M. 2006. Development of a system for rapid plant regeneration from in vitro sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue. *Biotechnologia Aplicada*. 23 No.1: 22–24.
- Tinland, B. 1996. The Integration of T-DNA into Plant genomes. *Elsevier Science*. 1(6): 1360-1385.
- Wahyuni, W. 2015. *Dasar-Dasar Virologi Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press
- Widyaningrum, Suvia. 2016. Konstruksi CP- SCMV Pada Vektor Biner pRI 101 ON DNA Untuk Transformasi Tanaman Tebu Tahan *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV). Skripsi. Jurusan Biologi Universitas Jember
- Yu T.A, Yoh S.D, Yang J.S. 2001. Effects of carbenicillin and cefotaxime on callus growth and somatic embryogenesis from adventitious roots of papaya. *Bot. Bull. Acad. Sin.* (2001) 42: 281-286.

LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Komposisi Media *Murashige and Skoog* (MS₀)Tabel A. Komposisi Larutan Stok Media MS₀

Stok	Senyawa	Massa (gr/L)	Konsentrasi dalam Media (mg/L)	Pemakaian per Liter Media (ml)
A	NH ₄ NO ₃	82,50	1650	20
B	KNO ₃	95	1900	20
C	CaCl ₂ .2H ₂ O	22	440	5
D	KI	0,0415	0,83	5
	H ₃ BO ₃	0,31	6,2	
	KH ₂ PO ₄	8,5	170	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0013	0,025	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,0125	0,25	
E	MgSO ₄ .7H ₂ O	18,5	370	5
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,43	8,6	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0013	0,025	
	MnSO ₄ .4H ₂ O	0,7525	22,3	
F	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39	27	5
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	1,86	37	
Vitamin	Myo-inositol	0,001	100	5
	Thiamine	0,008	0,50	
	Pyridoxine	0,08	0,50	

Bahan Pekat	Massa (gr/L)
Sukrosa	30
Phytigel	2,5

LAMPIRAN B. Komposisi Media *Yeast Extract Pepton* (YEP)Tabel B. Komposisi Media *Yeast Extract Pepton* (YEP) untuk biakan *A. tumefaciens*

Bahan	Massa (gr/L)
Yeast	10
Pepton	10
NaCl	5
Agar bakteriologi	14

