



INTRODUKSI GEN *LYZ-C* PENYANDI LISOZIM KE DALAM TANAMAN KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) KULTIVAR IPB CP3

PASMAWATI



PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2021

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA*

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Introduksi Gen *LYZ-C* Penyandi Lisozim ke dalam Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Kultivar IPB CP3” adalah benar karya saya bersama dengan komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Januari 2021

Pasmawati
NIM P051170061

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



RINGKASAN

PASMAWATI. Introduksi Gen *LYZ-C* Penyandi Lisozim ke dalam Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) Kultivar IPB CP3. Dibimbing oleh SUHARSONO dan ARIS TJAHOLEKSONO.

Kentang merupakan salah satu komoditas tanaman pangan utama ketiga dunia berdasarkan jumlah konsumsi setelah padi dan gandum. Di Indonesia, kentang dibudidayakan dan dimanfaatkan sebagai bahan sayuran maupun bahan kentang olahan seperti kentang goreng (*french fries*) dan kripik (*chip*). Kendala utama produksi kentang adalah ketersediaan bibit yang bermutu rendah, kurang terjangkau, iklim yang kurang mendukung dan tingginya gangguan penyakit. Penyebab utama penyakit pada tanaman kentang adalah bakteri patogen *Ralstonia solanacearum* yang menyebabkan penyakit layu bakteri. Merakit kultivar tahan merupakan salah satu upaya yang dilakukan untuk meningkatkan ketahanan tanaman kentang terhadap infeksi penyakit bakteri. Lisozim merupakan protein antimikroba yang memiliki aktivitas bakteriolitik mampu menghidrolisis ikatan β -1,4-glikosida dari peptidoglikan antara asam N-asetil glukosamin dan asam N-asetil muramat yang merupakan penyusun dinding sel bakteri baik pada bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. Oleh karena itu, ekspresi berlebih gen *LYZ-C* penyandi lisozim pada tanaman kentang mampu meningkatkan resistensi terhadap infeksi bakteri.

Kentang kultivar IPB CP3 merupakan hasil mutasi kultivar Agria yang dirilis oleh Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati (PPSHB) IPB. Kentang kultivar IPB CP3 memiliki produksi umbi tinggi, daging umbi berwarna kuning, mampu beradaptasi dengan baik di dataran tinggi pada musim kemarau dan dapat dimanfaatkan sebagai bahan kentang olahan baik kripik maupun kentang goreng. Akan tetapi kentang kultivar IPB CP3 agak rentan terhadap infeksi penyakit. Oleh karena itu, pada penelitian ini dilakukan introduksi gen *LYZ-C* penyandi lisozim ke dalam tanaman kentang kultivar IPB CP3 untuk meningkatkan resistensinya terhadap penyakit bakteri.

Introduksi gen telah dilakukan pada sebanyak 372 eksplan ruas batang melalui perantara *A. tumefaciens* strain LBA4404 yang membawa pCXS_N-Lyz. Efisiensi transformasi dan efisiensi regenerasi diperoleh sebesar 47,61 % dan 30,59 %. Hasil analisis pada 16 klon tanaman transgenik yang resisten terhadap higromisin sebagai penanda seleksi dengan PCR menggunakan primer Lyz114-F dan Nost2-R menunjukkan adanya pita berukuran 574 bp. Hasil ini menunjukkan bahwa gen *LYZ-C* telah berhasil diintroduksi ke dalam genom tanaman kentang kultivar IPB CP3. Uji resistensi secara *in vitro* pada tiga klon tanaman transgenik terhadap bakteri patogen *R. solanacearum* menunjukkan bahwa klon tanaman transgenik CP3lyz1, CP3lyz2 dan CP3lyz6 lebih resisten terhadap *R. solanacearum* dibandingkan dengan tanaman CP3 non-transgenik.

Kata kunci: *Agrobacterium tumefaciens*, gen *LYZ-C*, kentang kultivar IPB CP3, penyakit layu bakteri

SUMMARY

PASMAWATI. Introduction of *LYZ-C* gene encoding for lysozyme into potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar IPB CP3. Supervised by SUHARSONO and ARIS TJAHOLEKSONO.

Potatoes are one of the third main food crop commodities in the world based on total consumption after rice and wheat. In Indonesia, potatoes are cultivated and used as vegetables or processed potato fries and chips. The main obstacles to potato production are the population of low quality, less affordable, unfavorable climate and disease disorders. The main cause of disease in potatoes is the pathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* which causes bacterial wilt disease. Assembling resistant cultivars is one of the efforts made to increase the resistance of potato plants to bacterial infection. Lysozyme is an antimicrobial protein that has a bacteriolytic activity that can hydrolyze the β -1,4-glycoside bonds of peptidoglycan between N-acetyl glucosamine acid and N-acetyl muramic acid which is a constituent of bacterial cell walls in both gram-positive and gram-negative bacteria. Therefore, the overexpression of the *LYZ-C* gene encoding for lysozyme in potato plants can increase resistance to bacterial infection.

The IPB CP3 cultivar potato is a mutant of the Agria cultivar released by *The Center for Biological Resources Research* (PPSHB) IPB. The Potato cultivar IPB CP3 has high tuber production, has yellow tuber flesh, can adapt well to the highlands in the dry season and can be used as an ingredient in processed potatoes both chips and fried potatoes. However, the IPB CP3 cultivar potato was somewhat susceptible to disease attacks. Therefore in this study, the introduction of the *LYZ-C* gene encoding for lysozyme was carried out in the IPB CP3 cultivar potato plant to increase resistance to bacterial diseases.

Gene introduction was carried out on 372 stem explants via *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 carrying pCXS_N-Lyz. The transformation efficiency and regeneration efficiency were obtained at 47,61 % and 30,59 %. The results of analysis on 16 clones of transgenic plants that were resistant to hygromycin as a marker for selection by PCR using Lyz114-F and Nost2-R primers showed a band measuring 574 bp. These results indicate that *LYZ-C* gene has been successfully introduced into the potato cultivar IPB CP3. In vitro resistance assay on four transgenic plant clones against pathogenic bacteria, *R. solanacearum* showed that the transgenic CP3lyz1, CP3lyz2, and CP3lyz6 clones were more resistant to *R. solanacearum* than non-transgenic CP3 plants.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *LYZ-C* gene, potato cultivar IPB CP3, bacterial wilt disease



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2021 Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.

Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.



INTRODUKSI GEN *LYZ-C* PENYANDI LISOZIM KE DALAM TANAMAN KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) KULTIVAR IPB CP3

PASMAWATI

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Sains pada
Program Studi Bioteknologi

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2021**

- Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
 2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.



@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPBUniversity.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

Penguji Luar Komisi pada Ujian Tesis: Dr. Ir. Abdjad Asih Nawangsih, M.Si



Judul Tesis : *Introduksi Gen LYZ-C Penyandi Lisozim ke dalam Tanaman Kentang (Solanum tuberosum L.) Kultivar IPB CP3*

Nama : Pasmawati
NIM : P051170061

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Ir. Suharsono, DEA

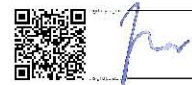


Pembimbing 2:
Dr. Ir. Aris Tjahjoleksono, DEA



Diketahui oleh

Ketua Program Studi Bioteknologi:
Prof. Dr. Ir. Suharsono, DEA
NIP 196104281987031003



Dekan Sekolah Pascasarjana:
Prof. Dr. Ir. Anas Miftah Fauzi, M.Eng
NIP 196004191985031002



Tanggal Ujian: 25 Januari 2021

Tanggal Lulus:

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkannya dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis dengan judul “Introduksi gen *LYZ-C* penyandi lisozim ke dalam tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) kultivar IPB CP3 berhasil diselesaikan. Penelitian ini didanai oleh (1) Riset Terapan dengan topik “Pengembangan kentang untuk industri keripik dan kentang sayur” atas nama Prof. Dr. Ir. Suharsono, DEA dan (2) Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP).

Terima kasih penulis ucapkan kepada Bapak Prof. Dr. Ir. Suharsono, DEA dan Bapak Dr. Ir. Aris Tjahjoleksono, DEA yang telah meluangkan waktu dan kesempatannya untuk memberikan bimbingan serta saran selama dilaksanakannya penelitian dan penulisan tesis ini. Terima kasih penulis sampaikan kepada Ibu Dr. Ir. Abdjad Asih Nawangsih, M.Si sebagai penguji luar komisi pada ujian tesis yang telah memberikan banyak masukan.

Ungkapan terima kasih penulis ucapkan kepada seluruh dosen dan staf Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, IPB yang telah memberikan bekal ilmu dan bantuan sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, IPB yang telah menyediakan fasilitas laboratorium untuk penelitian.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Alina Akhdiya, S.Si., M.Si dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian (BB Biogen) atas pemberian isolat bakteri *Ralstonia solanacearum*. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada rekan-rekan mahasiswa S2 Bioteknologi angkatan 2017 yang telah banyak memberikan dukungan serta semangat selama perkuliahan dan penelitian. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada sahabat dan keluarga *plant genetic and engineering* 2017 yaitu mbak Melati Paramita Putri, mbak Arum kartika W, Nurul Aisyah, Musawira, dan Akbar Velayati yang telah banyak membantu dan bekerjasama dengan sangat baik dalam melewati suka duka selama penelitian.

Terima kasih juga penulis ucapkan kepada Bapak Abdul Mulya, mbak Pepi Elvavina, mbak Nia Dahniar, mbak Sarah, Pak Asep, Pak Sairi dan seluruh pegawai PPSHB yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini. Penulis mengucapkan terima kasih kepada keluarga besar Laboratorium BIORIN (*Biotechnology Research Indonesia-the Netherland*) Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi (PPSHB) atas semua bantuannya. Ungkapan terima kasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada kedua orang tua yaitu Ramatta (alm) dan Tuo, kakak Eko, Maya, Arman, Sartika serta seluruh keluarga atas segala do'a dan dukungan selama penulis menjalani pendidikan magister di IPB.

Akhir kata, semoga karya ilmiah ini dapat bermanfaat dalam perkembangan ilmu pengetahuan dan bagi seluruh masyarakat Indonesia.

Bogor, Januari 2021

Pasmawati

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
1.3 Manfaat Penelitian	2
II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Mekanisme Transfer Gen oleh <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3
2.2 Rekayasa Genetik pada Tanaman Kentang	5
2.3 Lisozim	6
2.4 Penyakit Bakteri pada Tanaman Kentang	8
2.5 Ketahanan Tanaman terhadap Infeksi Patogen	9
III METODE	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Bahan Penelitian	11
3.3 Prosedur Penelitian	11
3.3.1 Perbanyakkan Eksplan dan Persiapan <i>A. tumefaciens</i>	11
3.3.2 Transformasi Genetik Tanaman Kentang Kultivar IPB CP3	12
3.3.3 Analisis Integrasi Gen <i>LYZ-C</i>	12
3.3.4 Analisis Resistensi secara <i>In vitro</i>	13
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	14
4.1 Transformasi Genetik Tanaman Kentang dengan Gen <i>LYZ-C</i>	14
4.2 Analisis Integrasi Gen <i>LYZ-C</i>	16
4.3 Analisis Resistensi secara <i>In Vitro</i>	17
V SIMPULAN DAN SARAN	20
5.1 Simpulan	20
5.2 Saran	20
DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	29
RIWAYAT HIDUP	32



DAFTAR TABEL

1	Tingkat resistensi klon kentang terhadap infeksi patogen	13
2	Efisiensi transformasi dan regenerasi tanaman kentang kultivar IPB CP3	15
3	Tingkat resistensi tanaman terhadap <i>R. solanacearum</i>	18

DAFTAR GAMBAR

1	Tahapan utama proses transfer dan integrasi T-DNA	4
2	Struktur tiga dimensi protein lisozim	6
3	Struktur dinding sel bakteri dan reaksi pemutusan ikatan $\beta(1,4)$ -glikosida antara NAM dan NAG pada peptidoglikan	8
4	Peta daerah T-DNA plasmid pCXSN- <i>Lyz</i> yang membawa gen <i>LYZ-C</i>	11
5	Tahapan transformasi genetik tanaman kentang kultivar IPB CP3 dengan Gen <i>LYZ-C</i>	14
6	Hasil amplifikasi gen aktin pada DNA genom kentang menggunakan pasangan primer ActT-F dan ActT-R	16
7	Hasil amplifikasi gen <i>LYZ-C</i> menggunakan pasangan primer <i>Lyz114-F</i> dan <i>NosT2-R</i>	17
8	Morfologi tanaman hasil uji resistensi terhadap bakteri <i>R. solanacearum</i>	17

DAFTAR LAMPIRAN

1	Komposisi media dasar MS (Murashige dan Skoog 1962)	29
2	Komposisi media <i>Luria Bertani</i> (LB)	29
3	Komposisi media infeksi	30
4	Komposisi media pra-kultur (PC)	30
5	Komposisi media induksi kalus (CIM)	30
6	Rumus perhitungan efisiensi transformasi dan regenerasi	30
7	Komposisi <i>buffer Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> (CTAB)	31
8	Komposisi media <i>casamino acid pepton glucose</i> (CPG)	31
9	Rumus perhitungan frekuensi penyakit (fp)	31