



REGENERASI *IN VITRO* DAN TRANSFORMASI GENETIK *InMYB1-CCD4a* DENGAN PERANTARA *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 PADA *Tagetes erecta*

HINDUN SITI ZAHROH



**PROGRAM STUDI PEMULIAAN DAN BIOTEKNOLOGI TANAMAN
FAKULTAS PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB University

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Regenerasi *in vitro* dan transformasi genetik *InMYB1-CCD4a* dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 pada *Tagetes erecta*” adalah karya saya dengan arahan dari dosen 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, Mei 2024

Hindun Siti Zahroh
A2503201013

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

RINGKASAN

HINDUN SITI ZAHROH. Regenerasi *in vitro* dan transformasi genetik *InMYB1-CCD4a* dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 pada *Tagetes erecta*. Dibimbing oleh DEWI SUKMA, SUDARSONO, dan MUHAMAD SYUKUR.

Marigold (*Tagetes erecta*) merupakan komoditas florikultura yang memiliki banyak manfaat terutama sebagai tanaman hias, bunga potong dan bahan baku industri. Marigold memiliki daya tarik dari warna bunga yang beragam, meskipun demikian pemulia tanaman terus berupaya dalam meningkatkan variasi warna bunga tersebut. Salah satu metode yang digunakan untuk modifikasi warna bunga adalah rekayasa genetik. Rekayasa genetik yang dilakukan adalah dengan mengintroduksi gen *InMYB1-CCD4a* ke dalam genom tanaman dengan tujuan untuk mengurangi pigmentasi warna oranye pada *T. erecta* cv. Sudamala Oranye 1 dengan cara mendegradasi senyawa karotenoid secara spesifik pada mahkota bunga dan diharapkan tidak mengubah sifat lain. Transformasi dapat dilakukan apabila serangkaian kegiatan kultur jaringan dalam regenerasi tanaman telah diperoleh, oleh karena itu rangkaian tahapan dalam kultur jaringan dalam meningkatkan efisiensi transformasi regenerasi merupakan hal penting dalam melaksanakan rekayasa genetik tanaman.

Penelitian ini memiliki tujuan utama yaitu untuk memodifikasi warna bunga tanaman marigold (*T. erecta* cv. Sudamala Oranye 1) bunga berwarna oranye menjadi bunga berwarna putih. Tujuan khusus dari penelitian ini adalah (1) memperoleh informasi mengenai media regenerasi tunas dari eksplan daun marigold dengan penambahan zat pengatur tumbuh sitokinin thiadiazuron (TDZ) atau Benzylaminopurine (BAP), (2) memperoleh kandidat tanaman transforman yang membawa gen *InMYB1-CCD4a* melalui analisis secara molekuler.

Percobaan pertama adalah evaluasi respon organogenesis tunas dari eksplan daun marigold terhadap pemberian sitokinin TDZ dan BAP. Percobaan ini dilakukan dari bulan Mei 2021 hingga Mei 2022 di laboratorium kultur jaringan 1, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor. Hasil percobaan menunjukkan TDZ dengan konsentrasi 0,25 mgL⁻¹ mampu meningkatkan rata-rata jumlah tunas sebanyak 4 tunas dengan persentase eksplan bertunas sebesar 73,3% dan rata-rata jumlah akar sebanyak 1 akar dengan persentase eksplan berakar sebesar 11,1%. Penggunaan sitokinin lain yaitu BAP pada konsentrasi 7 mgL⁻¹ rata-rata menghasilkan 6 tunas dengan persentase eksplan bertunas sebesar 100% dan rata-rata jumlah akar sebanyak 1 akar dengan persentase eksplan berakar sebesar 11,1%. Dari kedua jenis sitokinin yang digunakan, penggunaan BAP lebih efektif dibandingkan TDZ karena dapat menginduksi 100% eksplan tunas dan jumlah tunas lebih banyak. Selain itu, secara morfologi penambahan TDZ membuat daun menjadi abnormal yang disebabkan karena konsentrasi yang tinggi dapat menghambat elongasi tunas sehingga tunas menjadi kerdil dan kualitasnya rendah.

Percobaan kedua adalah transformasi genetik gen *InMYB1-CCD4a* pada marigold (*T. erecta* cv. Sudamala Oranye 1). Percobaan ini dilakukan pada bulan Juni 2022 hingga April 2023 di Laboratorium kultur jaringan 1, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor.

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



Percobaan transformasi menghasilkan 6 tanaman putatif transgenik *T. erecta* cv Sudamala oranye 1 dengan efisiensi transformasi yang dihasilkan adalah 1%, efisiensi regenerasi 29,17%. Hasil analisis PCR menggunakan primer spesifik gen *InMYB1-CCD4a* dengan ukuran 1200 bp menunjukkan enam dari 17 tanaman putatif transforman positif mengandung gen *InMYB1-CCD4a*. Pengamatan fenotipik menunjukkan adanya perbedaan antara tanaman kontrol (*wild type*) dan transforman yaitu daun yang berukuran kecil dan laju pertumbuhan yang lama.

Kata kunci: BAP, karotenoid, marigold, TDZ

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

SUMMARY

HINDUN SITI ZAHROH. *In vitro* regeneration and genetic transformation *InMYB1-CCD4a* genes by *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 in *Tagetes erecta*. Supervised by DEWI SUKMA, SUDARSONO, dan MUHAMAD SYUKUR.

Marigolds (*Tagetes erecta*) is a floriculture commodity with many benefits, especially as an ornamental plant, cut flower, and industrial raw material. Marigolds have the variety of flower colors, however plant breeders are still trying to increase the variety of marigold's flower colors. The alternative method to modify flower colour is genetic engineering. In this research, the genetic engineering of marigold was done by introducing the *InMYB1-CCD4a* gene into the plant genome to reduce orange pigmentation in *Tagetes erecta* var. Sudamala Orange 1, specifically degrades carotenoid compounds in the flower and is expected not to change other properties. Transformation can be carried out if a series of tissue culture activities in plant regeneration are established. Therefore, a series of stages in tissue culture to increase the efficiency of regeneration transformation is important in plant genetic engineering.

This study aims to modify the flower color of marigold plants (*T. Erecta* cv. Sudamala Orange 1) from orange to white flowers. The specific objectives of this research include (1) to obtain marigold regeneration media with the addition of cytokinin growth regulators and (2) to obtain candidate transformant plants using the molecular transformation method of the *InMYB1-CCD4a* gene.

The first experiment was the organogenesis response of marigold leaf explants to the cytokinin Thidiazuron (TDZ) and Benzyl Amino Purine (BAP) treatment. This experiment was carried out from May 2021 to May 2022 in tissue culture laboratory 1, Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture, IPB University. The experimental results show TDZ with a concentration of 0.25 mgL⁻¹ increased the average number of 4 shoots with a percentage of 73.3% and 0 root with a percentage of 0%. Another use of cytokinin is BAP at a concentration of 7 mgL⁻¹, which can produce an average number of 6 shoots with a percentage of 100%, 1 root with percentage of rooted of 11.1%. Of the two types of cytokinin used, the use of BAP is more effective than TDZ because it can 100% induce shoots; apart from that, morphologically, the addition of TDZ makes the leaves abnormal because the high concentration can inhibit shoot elongation so that the shoots become stunted and of low quality.

The second experiment was the genetic transformation of *InMYB1-CCD4a* in marigold (*T. erecta* cv. Sudamala Orange 1). This experiment was carried out from June 2022 to April 2023 at Tissue Culture Laboratory 1, Department of Agronomy and Horticulture, Faculty of Agriculture, Bogor Agricultural Institute. The transformation experiment produced six putative transgenic plants, *T. erecta* cv Sudamala orange 1, resulting in a 1% regeneration efficiency of 29.17%. The results of PCR analysis using the specific primer *InMYB1-CCD4a* with a size of 1200bp showed that six of the 17 putative transformant plants were positive for containing the *InMYB1-CCD4a* gene. Phenotypic observations showed differences between control plants (*wild type*) and transformants that have: smaller leaves and slower growth rates.

Keywords: BAP, *caretenoid*, marigold, TDZ



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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2024
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.



**REGENERASI *IN VITRO* DAN TRANSFORMASI GENETIK
GEN *InMYB1-CCD4a* DENGAN PERANTARA *Agrobacterium
tumefaciens* EHA 105 PADA *Tagetes erecta***

HINDUN SITI ZAHROH

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman

**PROGRAM STUDI PEMULIAAN DAN BIOTEKNOLOGI TANAMAN
FAKULTAS PERTANIAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024**



@Hak cipta milik IPB University

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Tim Penguji pada Ujian Tesis:

1. Dr. Ir. Syarifah Iis Aisyah, M.Sc.Agr.



@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Judul Tesis : Regenerasi *in vitro* dan transformasi genetik *InMYBI-CCD4a* melalui *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 pada tanaman *Tagetes erecta* cv. Sudamala Oranye 1
Nama : Hindun Siti Zahroh
NIM : A2503201013

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Dewi Sukma, S.P., M.Si.
Pembimbing 2:
Prof. Dr. Ir. Sudarsono, M.Sc.
Pembimbing 3:
Prof. Dr. Muhamad Syukur, S.P., M.Si.

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:
Prof. Dr. Dewi Sukma, S.P., M.Si.
NIP 197004041997022001
Dekan Fakultas/Sekolah:
Prof. Dr. Ir. Suryo Wiyono, M.Sc.A.gr
NIP 196902121992031003

Tanggal Ujian:
17 Mei 2024

Tanggal Lulus: 15 JUL 2024

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Mei 2021 sampai bulan Agustus 2023 ini ialah transformasi genetik, dengan judul “Regenerasi *in vitro* dan transformasi genetik gen *InMYB1-CCD4a* dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 pada *Tagetes erecta*”.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya juga penulis sampaikan kepada

1. Prof. Dr. Dewi Sukma, S.P., M.Si. selaku Ketua Prodi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman (PBT) sekaligus ketua komisi pembimbing dan penanggung jawab penelitian atas kesempatan, dukungan dan saran yang telah diberikan kepada penulis.
2. Prof. Dr. Ir. Sudarsono, M.Sc., dan Prof. Dr. Muhamad Syukur, S.P., M.Si. selaku komisi pembimbing yang telah memberikan dukungan dan saran selama penelitian dan penyusunan tesis ini.
3. Prof. Dr. Ir. Satriyas Ilyas, M.S. selaku moderator seminar
4. Dr. Ir. Syarifah Iis Aisyah, M.Sc.Agr. selaku penguji sidang tesis dan Dr. Arya Widura Ritonga, S.P., M.Si. selaku perwakilan prodi pada sidang tesis ini.
5. Dosen di lingkungan Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman yang telah memberi banyak ilmu kepada penulis selama perkuliahan.
6. Gubernur Bali Dr. Ir. Wayan Koster, M.M., dan Dinas Pertanian dan Ketahanan Pangan, Provinsi Bali yang telah mendukung pendanaan untuk penelitian ini.
7. Dr. Ming-Tsair Chan, *Academia sinica-Biotechnology Center in Southern Taiwan (AS-BCST)* yang membantu dalam konstruksi gen yang digunakan pada penelitian ini.
8. Staf Laboratorium Departemen AGH IPB, serta rekan-rekan Laboratorium Kultur Jaringan 1 dan Laboratorium *Plant Molecular and Biology 1 (PMB 1)* yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian.
9. Rekan-rekan mahasiswa/i Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman Angkatan 2020 yang telah banyak membantu dalam proses perkuliahan.
10. Keluarga tercinta almarhum ayah (KH. Zainal Arifin), mamah (Siti Fathonah), ibu (Tuti Mutiarsih) serta seluruh kakak (Eddy Muhammad Wahyudin, Dede Noor Zaman, Alie Muhammad Abdurrachman, Yessy Mu'minawati, Muhammad Zaqi, Laila Syifaul Jamil, Helmia Zayinunnisya, Fitriyah Baissuzzain) dan kekasih tercinta Muhammad Agung Rizky yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan magister ini.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Mei 2024

Hindun Siti Zahroh



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iii
DAFTAR LAMPIRAN	iii
PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan	3
1.3 Hipotesis	3
1.4 Manfaat	3
1.5 Ruang Lingkup	3
TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Deskripsi Tanaman <i>Tagetes erecta</i> cv. Sudamala Oranye 1	5
2.2 Regenerasi <i>Tagetes erecta</i>	6
2.3 Gen <i>InMYB1-CCD4a</i>	7
2.4 Transformasi Genetik <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
2.5 Analisis Tanaman Transgenik	12
III RESPON EKSPLAN DAUN TERHADAP TDZ DAN BAP DALAM INDUKSI ORGANOGENESIS <i>Tagetes erecta</i> (cv. Sudamala Oranye 1)	13
3.1 Abstrak	13
3.2 Pendahuluan	13
3.3 Metode Penelitian	14
3.4 Hasil dan Pembahasan	15
3.5 Simpulan	18
IV TRANSFORMASI GENETIK gen <i>InMYB-CCD4a</i> PADA <i>Tagetes erecta</i> cv. Sudamala Oranye 1	19
4.1 Abstrak	19
4.2 Pendahuluan	19
4.3 Metode Penelitian	20
4.4 Hasil dan Pembahasan	22
4.5 Simpulan	26
V PEMBAHASAN UMUM	27
VI SIMPULAN DAN SARAN	29
6.1 Simpulan	29
6.2 Saran	29
DAFTAR PUSTAKA	30
LAMPIRAN	35
RIWAYAT HIDUP	35

DAFTAR TABEL

1	Pengaruh TDZ pada organogenesis eksplan daun marigold	16
2	Pengaruh BAP pada organogenesis eksplan daun marigold	17
3	Sekuen primer gen <i>InMYB1-CCD4a</i>	21
4	Jumlah kalus pada media seleksi antibiotik hasil transformasi	23
5	Efisiensi transformasi dan regenerasi <i>T. erecta</i> melalui <i>A. tumefaciens</i>	24

DAFTAR GAMBAR

6	Diagram alir penelitian transformasi genetik	4
7	Tipe bunga marigold Sudamala Oranye 1	5
8	Peta konstruksi gen <i>InMYB1-CCD4a/pGWB513</i>	7
9	DNA Plasmid	9
10	Respon eksplan pada media organogenesis hormon TDZ	16
11	Respon kalus pada media organogenesis hormon BAP	18
12	Kondisi kalus setelah empat kali subkultur pada media seleksi	24
13	Hasil elektroforegram produk PCR gen <i>InMYB1-CCD4a</i>	25
14	Perbandingan transforman putatif setelah dua kali subkultur	26

DAFTAR LAMPIRAN

15	Deskripsi <i>Tagetes erecta</i> cv Sudamala Oranye 1	36
16	komposisi media kultur jaringan	39
17	Komposisi media pertumbuhan bakteri	42

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



@Hak cipta milik IPB University

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 mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.