IPB University
— Bogor Indonesia —
@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.
IPB University
Perpustakaan IPB University

I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kentang (*Solanum tuberosum*, L) merupakan tanaman hortikultura yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan termasuk salah satu tanaman pangan terpenting ketiga dunia setelah padi dan gandum. Total produksi kesecara global tahun 2017 melebihi 350 juta ton dan penyumbang produksi terbesar berasal dari negara-negara Asia sebesar 50,3 %, diikuti oleh Eropa 31,3 % (FOASTAT 2020). Konsumsi kentang yang cenderung terus meningkat terutama dalam bentuk kentang olahan seperti kentang goreng (*french fries*) dan keripik (*chip*) mengakibatkan permintaan bahan baku kentang untuk industri juga meningkat. Sementara itu, produksi kentang di Indonesia terutama kentang yang digunakan sebagai bahan baku kentang industri masih rendah sehingga sebagian kebutuhan kentang industri tersebut dipenuhi melalui impor. Data statistik menunjukkan bahwa jumlah impor kentang olahan dalam bentuk kentang beku mengalami peningkatan dimana pada tahun 2019 sebesar 8533 ton dan meningkat menjadi dua kali lipat pada tahun 2020 yaitu sebesar 15.723 ton (BPS 2020). Selain produktivitas yang rendah, infeksi penyakit merupakan kendala utama dalam budidaya tanaman kentang. Kiloes *et al*. (2015), melaporkan bahwa biaya terbesar yang harus dikeluarkan oleh petani adalah keperluan benih yaitu sebesar 49 % dari total biaya dan disusul oleh biaya penggunaan pestisida yaitu sebesar 20 %.

Penyakit pada tanaman kentang sangat mudah berkembang karena kentang dibudidayakan dengan perbanyakan secara vegetatif. Terdapat beberapa patogen yang menyebabkan penyakit pada tanaman kentang diantaranya bakteri, fungi dan virus (Davidson dan Xie 2014). Pada tanaman kentang, penyakit layu bakteri (*bacterial wilt*) yang disebabkan oleh *R. solanacearum* merupakan penyakit yang paling penting (Charkowski *et al*. 2020). *R. solanacearum* termasuk peringkat 10 teratas sebagai bakteri patogen pada tanaman berdasarkan hasil survei terhadap ahli bakteri patogen tanaman yang berasasosiasi dengan jurnal *Molecular Plant Pathology* (Mansfield *et al*. 2012). *R. solanacearum* dilaporkan menyerang lebih dari 250 spesies tanaman yang sebagian besar inangnya tersebut termasuk dalam famili Solanaceae dan Musaceae (Peeters *et al*. 2013). Bakteri patogen *R. solanacearum* ditularkan melalui tanah dan menginfeksi tanaman melalui luka, ujung akar atau retakan akibat perkembangan akar lateral. Bakteri yang telah menginfeksi kemudian menjajah korteks akar, menyerang pembuluh xilem dan menyebar ke bagian tanaman yang lain (Mansfield *et al*. 2012).

Strategi yang umum dilakukan untuk menanggulangi infeksi dan penyebaran bakteri patogen pada tanaman kentang diantaranya menggunakan bibit yang tersertifikasi dan mendesinfeksi umbi sebelum penyimpanan (Davidson dan Xie 2014). Strategi lain yang dilakukan untuk mengendalikan penyakit yaitu merakit kultivar tahan (*resistant*) patogen. Untuk mendapatkan kultivar yang tahan terhadap penyakit bakteri, beberapa klon tanaman kentang telah dirakit, yaitu melalui fusi protoplas antar spesies (Fock *et al*. 2000), introduksi gen *non-origin* tanaman yang menyandikan protein antimikroba seperti lisozim (Mourgues *et al*. 1998) dan introduksi gen resisten penyakit tanaman (*R gene*) yang memiliki kemampuan untuk mendeteksi infeksi dan menginduksi respon ketahanan bawaan tanaman

(Gururani *et al*. 2012). Namun beberapa komponen respon ketahanan bawaan tanaman bersifat tidak spesifik (Wiesner-Hanks dan Nelson 2016).

Lisozim merupakan salah satu protein antimikroba yang telah banyak dikaji serta dapat ditemukan secara luas di alam dan memiliki aktivitas bakteriolitik mampu mendegradasi peptidoglikan komponen penyusun dinding sel bakteri (Jollès 1996). Gen penyandi lisozim telah banyak diintroduksikan baik pada tanaman model maupun tanaman komersial untuk meningkatkan ketahanan terhadap infeksi patogen penyebab penyakit. Introduksi gen penyandi *T4 lysozyme* pada tanaman rumput *tall fescue* (*Festuca arundinacea* Schreb.) menghasilkan tanaman rumput transgenik yang resisten terhadap *Rhizoctonia solani* dan *Magnaporthe grisea* (Dong *et al*. 2008). Gen *HL* penyandi *human lysozyme* dilaporkan telah berhasil diintroduksikan pada tanaman pisang (*Musa* spp) menghasilkan tanaman pisang transgenik yang resisten terhadap *Fusarium oxysporum* (Pei *et al*. 2005). Gen *LYZ-C* penyandi lisozim tipe c telah diintroduksikan ke dalam tanaman kentang kultivar Desiree yang menghasilkan tanaman kentang transgenik yang meningkat resistensinya terhadap *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* (Serrano *et al*. 2000) dan kultivar Jala Ipam yang menghasilkan tanaman kentang transgenik yang meningkat resistensinya terhadap *R. solanacearum* secara *in vitro* (Senjaya 2017) dan di lapangan (Alfian *et al*. 2020). Kentang kultivar Jala Ipam tidak fertil sehingga gen *LYZ-C* yang terdapat di dalam tanaman kentang Jala Ipam transgenik tersebut tidak bisa dipindahkan ke kentang kultivar lain melalui persilangan. Oleh karena itu, gen *LYZ-C* digunakan untuk merakit tanaman kentang kultivar IPB CP3 tahan terhadap bakteri patogen penyebab penyakit layu bakteri. Kentang kultivar IPB CP3 merupakan varietas kentang yang memiliki karakteristik yang cocok untuk kebutuhan industri sebagai kentang olahan baik kripik maupun kentang goreng.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah mengintroduksikan gen *LYZ-C* penyandi lisozim ke dalam tanaman kentang (*S. tuberosum* L.) kultivar IPB CP3 untuk meningkatkan resistensinya terhadap penyakit bakteri *R. solanacearum*.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memperoleh tanaman kentang kultivar IPB CP3 transgenik yang mengekspresikan gen *LYZ-C* penyandi lisozim serta tahan terhadap penyakit bakteri *R. solanacearum*.

IPB University — Bogor Indonesia —
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 University
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

IPB University
— Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPB University
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPB University
Perpustakaan IPB University

II TINJAUAN PUSTAKA

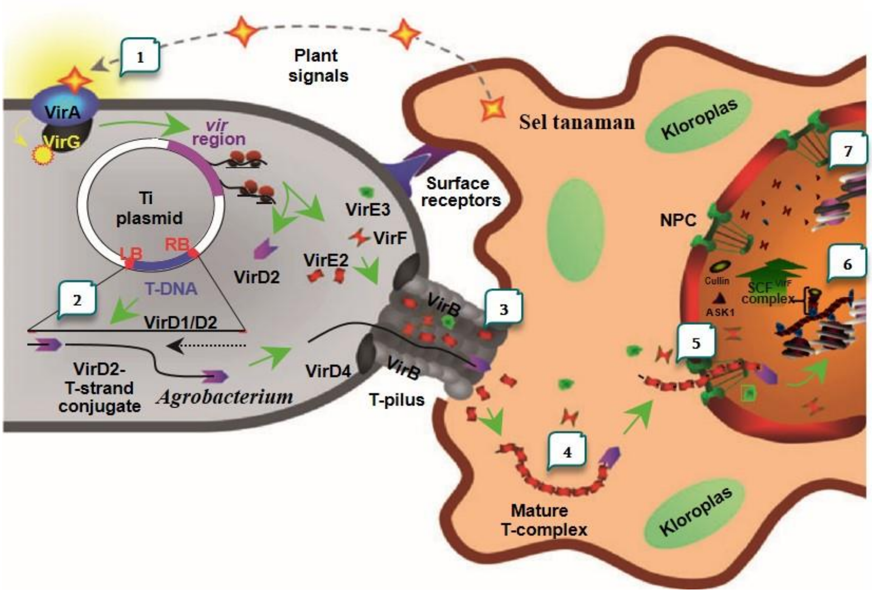
2.1 Mekanisme Transfer Gen oleh *Agrobacterium tumefaciens*

Transfer gen ke dalam tanaman kentang dapat dilakukan secara langsung menggunakan *mikroprojectile bombardment* (Craig *et al*. 2005), maupun secara tidak langsung melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* (Banerjee *et al*. 2006). Metode transformasi dengan *mikroprojectile bombardment* dan perantara *A. tumefaciens* merupakan metode yang paling umum digunakan untuk mengintroduksikan gen ke dalam tanaman karena kemampuannya mentransformasi gen secara utuh (Kole *et al*. 2010). Meskipun demikian, transformasi dengan perantara *A. tumefaciens* lebih umum digunakan karena lebih efisien dan lebih mudah mendapatkan salinan transgen tunggal (Krenek *et al*. 2015). *A. tumefaciens* tipe liar di alam dikenal sebagai agen penyebab penyakit '*crown-gall*' akibat dari transfer segmen T-DNA (*transfer DNA*) dari plasmid bakteri yang menginduksi tumor (Ti) pada sel inang (Gelvin 2012). T-DNA merupakan wilayah plasmid Ti dari *A. tumefaciens* antara 23 bp sekuen berulang untai tunggal dan ditransfer ke dalam sel tanaman inang selama infeksi. Kemampuan mentransfer T-DNA tersebut ke dalam sel inang membutuhkan protein-protein yang dikodekan oleh gen virulensi kromosom (chv) bakteri dan gen virulensi T-plasmid (vir) (McCullen dan Binns 2006).

Proses transfer gen dari *A. tumefaciens* ke dalam genom tanaman melalui beberapa tahapan yaitu pengenalan sinyal untuk menginduksi sistem virulensi bakteri yang selanjutnya mengaktivasi gen-gen vir, pembentukan T-DNA *complex* yang selanjutnya ditransfer ke dalam sitoplasma sel tanaman, perakitan T-DNA *complex* matang yang akan ditransfer ke inti sel tanaman, penargetan kromatin dan integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman, dan ekspresi gen T-DNA (Gambar 1). Tahapan awal proses transformasi pada tanaman yaitu pengenalan sinyal berupa senyawa fenolik seperti *acetosyiringone*, *α-hydroxyacetosyringone* dan *p-hydroxybenzoate* yang diproduksi oleh tanaman sebagai respon adanya stres biotik maupun abiotik seperti pelukaan (Bhattacharya *et al*. 2010). *A. tumefaciens* mendeteksi sinyal tersebut melalui sensor permukaan sel dan merespon dengan mengoptimalkan aktivitas sistem virulensinya (Lacroix dan Citovsky 2013). Sinyal tersebut memicu sistem respon sensorik komponen VirA dan VirG yang selanjutnya menginduksi ekspresi gen-gen vir lainnya yang mengkodekan sebagian besar komponen protein yang diperlukan untuk transfer T-DNA (McCullen dan Binns 2006). Protein Vir yang diinduksi oleh senyawa fenolik tersebut adalah VirD1 dan VirD2 yang bekerja sama memotong untai T-DNA pada wilayah plasmid Ti membentuk *nick* pada batas sekuen berulang yang dibatasi oleh *left border* (LB) dan *right border* (RB) (Gelvin 2016).

Selama pemrosesan T-DNA, VirD2 berikatan secara kovalen pada ujung 5' dari T-DNA utas tunggal (*T-strand*) (Gelvin 2012). VirD2/*T-strand* dan beberapa protein Vir lainnya seperti VirE2, VirE3 dan VirF selanjutnya di transfer ke dalam sitoplasma sel tanaman melalui VirB/VirD4 pada sistem sekresi tipe IV. Konjugat untai VirD2/*T-strand* didalam sel inang dikemas oleh molekul-molekul VirE2 untuk membentuk *T-complex* yang matang (Tzfira *et al*. 2004; Citovsky *et al*. 2007). VirE2 dan VirD2 berperan dalam penargetan *T-complex* ke inti sel melalui interaksi dengan *importin α* dan melalui pori-pori inti. VirD2 mengandung wilayah C-

terminal yang berisi sekuen *nuclear localization signal* (NLS) bipartit yang berperan penting dalam mentransfer *T-strand* ke inti sel tanaman (Krenek *et al*. 2015). Selain dari itu, VirE2 juga berperan melindungi *T-strand* dari degradasi nukleolitik dalam sel tanaman (Gelvin 2012).



Gambar 1 Tahapan utama proses transfer dan integrasi T-DNA. (1) Pengenalan sinyal tanaman oleh bakteri melalui sistem sensori VirA/VirG, diikuti dengan aktivasi gen-gen Vir dan penempelan bakteri ke sel inang, (2) *T-strand* dikeluarkan dari wilayah T-DNA oleh VirD2/VirD1, (3) *T-strand* ditransfer dengan molekul VirD2 yang melekat secara kovalen dan beberapa protein Vir lainnya ke dalam sitoplasma sel tanaman melalui VirB/VirD4 sistem sekresi tipe IV, (4) Di dalam sel inang, konjugat untai VirD2 dan *T-strand* dikemas oleh molekul-molekul VirE2 untuk membentuk *T-complex* yang matang, (5) *T-complex* menuju nukleus melalui interaksi dengan beberapa protein sel inang seperti importins α, VIP1 dan protein-protein *dynein-like*, (6) *T-complex* menargetkan integrasi pada situs integrasi dan protein yang berasosiasi dengan *T-complex* dihilangkan melalui degradasi proteasom melalui jalur SCF^{VirF} yang dimediasi oleh VBF dan (7) *T-strand* dikonversi menjadi utas ganda dan diintegrasikan ke dalam genom inang melalui perangkat perbaikan DNA sel inang (Citovsky *et al*. 2007).

Setelah translokasi dari sitoplasma ke inti sel, *T-strand* selanjutnya terintegrasi pada kromatin sel inang. Beberapa protein tanaman berinteraksi dengan komponen *T-strand* kompleks serta memediasi penargetan *T-strand* ke kromatin sel inang (Lacroix dan Citovsky 2013). VirD2 dapat berinteraksi dengan *cyclin-dependent kinase activating kinase* CAK2M. CAK2M juga berinteraksi pada C-terminal sub unit besar RNA polymerase II yang kemudian mengenali TATA box *binding protein* (TBPs). TBP berperan penting dalam inisiasi transkripsi (Bako *et al*. 2003). Asosiasi antara VirD2 dengan TATA box dapat memandu *T-strand*

IPB University — Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPB University
Perpustakaan IPBUniversity

IPB University
— Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

kompleks menuju wilayah kromatin yang ditranskripsikan secara aktif (Gelvin 2010). Protein VirD2 dan VirE2 yang terikat pada T-DNA perlu dilepaskan agar dapat diakses oleh sistem replikasi dan transkripsi molekul DNA genom sel inang. T-kompleks tersebut dapat didegradasi oleh aktifitas sistem ubiquitin/proteosom (UPS) (Magori dan Citovsky 2011). Proteolisis tersebut tergantung *Skp1-Cullin-F-box protein* yang disebut SCF^{VirF} yang dimediasi *VIP 1-binding F-box protein* (VBF). VirF maupun VBF tidak dapat berinteraksi secara langsung dengan VirE2 (Tzfira *et al*. 2004). Gelvin 2016, mengemukakan bahwa terdapat dua mekanisme integrasi *T-Strand* ke dalam genom tanaman yaitu *nonhomologous end-joining* (NHEJ) dan *microhomology-mediated end-joining* (MMEJ). Mekanisme berdasarkan MMEJ yaitu VirD2/*T-strand* menargetkan wilayah *microhomology* antara T-DNA, sedangkan mekanisme berdasarkan NHEJ yaitu sekuen DNA tanaman dan utas tunggal *T-strand* direplikasi di dalam inti sel tanaman menjadi utas ganda yang kemudian terintegrasi pada bagian *double-strand* yang putus dalam genom inang (Gelvin 2012). Beberapa faktor yang mempengaruhi transfer T-DNA dan intergasinya ke dalam genom melalui perantara *A. tumefaciens* yaitu tipe eksplan, komposisi media kultur, kerapatan sel *A. tumefaciens*, suhu ko-kultivasi, lama ko-kultivasi dan jenis *selectable marker* yang digunakan (Ziemienowicz 2014).

2.2 Rekayasa Genetik pada Tanaman Kentang

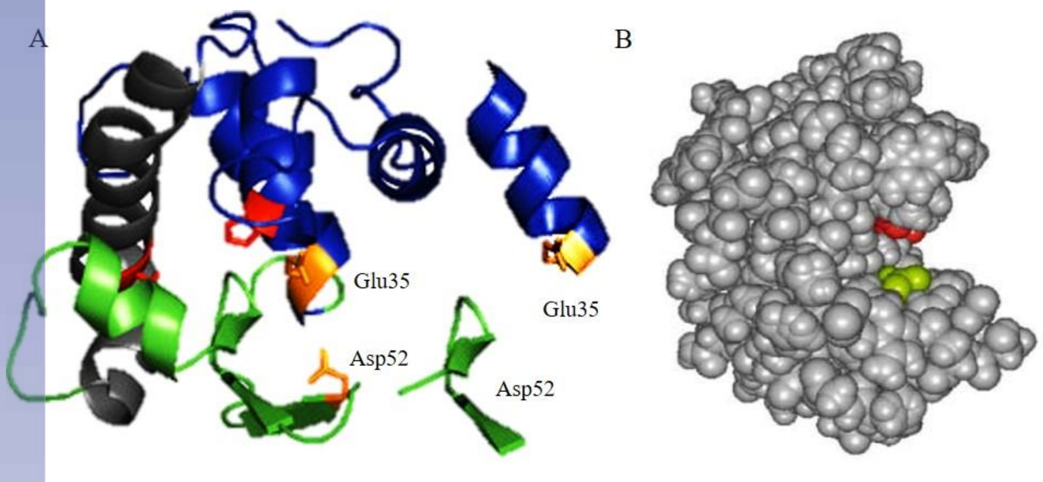
Agrobacterium tumefaciens secara luas telah digunakan sebagai perantara untuk merakit tanaman kentang transgenik dengan menggunakan eksplan berupa ruas batang, daun dan umbi (Visser 1991). Transformasi genetik telah dilakukan pada kentang kultivar Atlantik (Nurhasanah *et al*. 2003; Manguntungi 2014), kultivar Desirée (Serrano *et al*. 2000), kultivar Spunta (Rivero *et al*. 2013), dan kultivar Jala Ipam (Senjaya 2017) untuk mendapatkan kentang yang resisten terhadap infeksi bakteri patogen. Tranformasi genetik juga telah dilakukan untuk mendapatkan kentang yang tahan terhadap infeksi virus (Cavatorta *et al*. 2011; Chung *et al*. 2013), serangga (Lecardonnel *et al*. 1999; Birch *et al*. 2002), dan cendawan (Rivero *et al*. 2012; Khan *et al*. 2016).

Transformasi genetik pada tanaman kentang juga dilakukan untuk meningkatkan produktivitas dan kandungan nutrisi pada umbi kentang. Introduksi gen *MmPMA* penyandi H+-ATPase membran plasma dari *Melastoma malabathricum* L. dapat meningkatkan jumlah pembukaan stomata, lebar pembukaan stomata, tinggi tanaman dan toleransi tanaman terhadap pH rendah lebih tinggi (Farhana *et al*. 2017). Ekspresi gen *Hd3a* (*heading date 3a*) yang berfungsi untuk menginduksi pembungaan dan pengumbian pada tanaman kentang dapat meningkatkan produksi bobot umbi (Gea *et al*. 2017; Rahmansyah 2019). Ekspresi yang berlebih (*over expression*) gen penyandi *cytosolic Dehydroascorbate reductase* (DHAR) dapat meningkatkan aktivitas DHAR dan kandungan *Ascorbic acid* (AsA) pada daun dan umbi kentang (Qin *et al.* 2011). Introduksi gen penyandi protein AmA1 (*Amaranth Albumin 1*) dari *Amaranthus hypochondriacus* dapat meningkatkan kandungan protein dan beberapa jenis asam amino essensial pada umbi kentang (Chakraborty *et al*. 2010).

2.3 Lisozim

Enzim yang mendegradasi peptidoglikan (*murein*) bakteri secara umum terbagi menjadi tiga kelompok yaitu *N-Acetylmuramyl-L-alanine amidase* (Mur*N*Ac-LAAs), *Endopeptidase* dan *N-Acetyl-β-D-muramidase*. *N-acetyl-β-D-muramidase* atau *N-acetylmuramic* merupakan enzim yang mampu memutuskan rantai polisakarida pada peptidoglikan (Lesnierowski dan Kijowski 2007; Vollmer *et al*. 2008). *N-acetylmuramic* dikelompokkan menjadi beberapa jenis salah satunya adalah lisozim (Vollmer *et al*. 2008). Lisozim terdistribusi secara luas di alam dan dapat diisolasi dari berbagai sumber seperti mikrob, virus, serangga dan hewan. Lisozim juga dapat ditemukan pada cairan tubuh manusia seperti saluran air mata, kelenjar air liur dan kelenjar susu (Masschalck dan Michiels 2003).

Lisozim diklasifikasikan menjadi 6 tipe yaitu *chicken-type* (c-type), *goose-type* (g-type), *phage-type*, *bacterial-type*, *plant-type*, dan *invertebrata-type* (i-type) (Jollès 1996). Lisozim tipe c (*chicken type*), tipe T4 (*phage-type*), tipe g (*goose-type*) dan tipe i (*invertebrata-type*) memiliki kesamaan pada struktur tiga dimensinya (Thammasirirak *et al*. 2010). Lisozim tipe c merupakan protein monomerik yang terdiri atas 129 asam amino dan memiliki berat molekul 14.3 kDa (Blake *et al*. 1965). Berdasarkan karakterisasi oleh kristalografi sinar X, struktur lisozim tipe c terbagi menjadi dua domain celah dalam yang berisi situs aktif. Satu domain mengandung tiga *β-strands* antiparalel yang membentuk struktur *β-sheet* dan domain lainnya yaitu *α-helix* pusat yang dihubungkan oleh *α-heliks* panjang (Jollès 1996; Van Herreweghe dan Michiels 2012). Gen *LYZ-C* terdiri dari empat ekson dimana ekson kedua mengkodekan wilayah pusat enzim yaitu Glu-35 dan Asp-52 yang merupakan bagian enzim lisozim yang memiliki aktivitas katilitik (Gambar 2A).



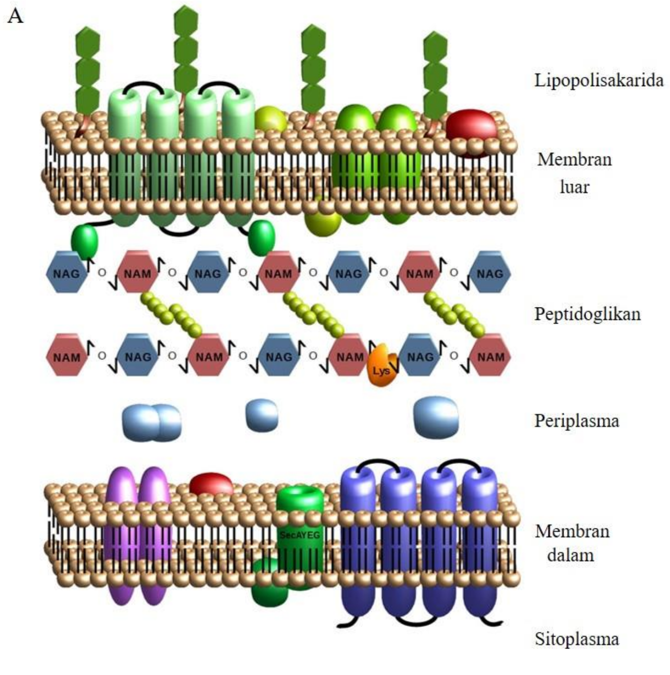
Gambar 2 Struktur tiga dimensi protein lisozim. (A) Lisozim tipe c memiliki dua struktur utama yaitu struktur jepit rambut *β-sheet* (hijau) dan domain *α-helix* (biru), memiliki interkoneksi helix (abu-abu) dan dua sisi aktif yaitu Glu35 dan Asp52 dan (B) Model bagian situs aktif yaitu residu katalitik (Glu dan Asp) berwarna merah dan hijau (Callewaert dan Michiels 2010; Van Herreweghe dan Michiels 2012).

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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 University
IPB University — Bogor Indonesia —
Perpustakaan IPBUniversity

Residu asam glutamat melekat pada domain *α-heliks* di bagian C-terminal sedangkan residu aspartat pada bagian dari *β-sheet* dan keduanya menonjol ke bagian dalam (Gambar 2B) pada celah situs aktif dari sisi yang berlawanan (Van Herreweghe dan Michiels 2012). Kedua wilayah tersebut didefenisikan sebagai inti struktural umum dari superfamili lisozim (Wohlkönig *et al*. 2010). Situs aktif terdiri atas enam subsitus yaitu A, B, C, D, E, dan F yang mengikat hingga enam residu gula berturut-turut. Pada konfigurasi ini, ikatan glikosidik antara NAM pada subsitus D dan NAG pada subsitus E dilemahkan oleh distorsi sterik cincin gula pada subsitus D yang merupakan target pembelahan secara hidrolitik (Callewaert dan Michiels 2010).

Mekanisme katalitik oleh enzim lisozim dalam menghidrolisis ikatan β(1,4)-glikosida antara N-asetil-D-muramat (NAM) dengan N-asetil-D-glukosamin (NAG) pada peptidoglikan secara umum mencakup distorsi substrat, pembentukan zat kovalen intermediet dan migrasi elektrofilik C1 di sepanjang koordinat reaksi (Vocadlo *et al*. 2001). Peptidoglikan penyusun dinding sel bakteri yang terdiri dari polimer gula dan asam amino (Gambar 3A) merupakan substrat utama dari enzim lisozim (Callewaert dan Michiels 2010; Callewaert *et al*. 2012; Brown *et al*. 2015).

Aktivitas enzimatik diawali dengan pengikatan substrat polisakarida oleh enzim. Enzim mengikat substrat sedemikian rupa sehingga atom-atom dari ikatan C-O dapat dijangkau oleh dua grup katalitik Glu-35 dan Asp-52 (Gambar 3B). Glu-35 berperan dalam memprotonasi ikatan oksigen glikosidik dan juga berperan langsung dalam memutus ikatan C-O. Sementara itu, grup karboksil dari Asp-52 berperan sebagai nukleofil untuk membentuk glikosil intermediet yang akan membentuk inversi pada konfigurasi. Selanjutnya enzim karboksilat dihilangkan dari enzim glikosil intermediet dengan air, dengan demikian terjadi konversi konfigurasi membentuk konfigurasi asal (Kirby 2001; Vocadlo *et al*. 2001; Callewaert dan Michiels 2010).



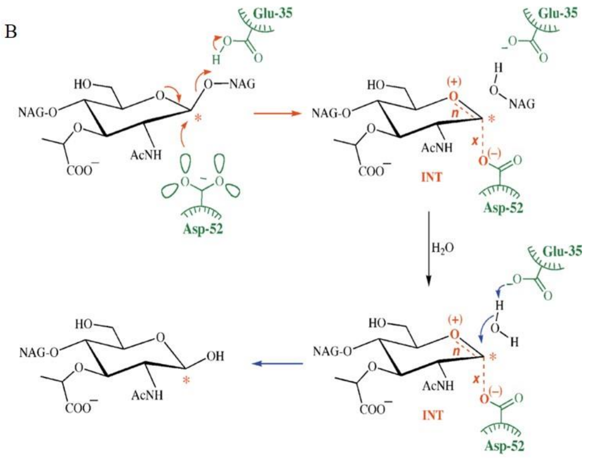
IPB University — Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPB University
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan 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.
IPB University
Perpustakaan IPB University

@Hak cipta milik IPB University

IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.

Perpustakaan IPB University



Gambar 3 Struktur dinding sel bakteri dan reaksi pemutusan ikatan β(1,4)-glikosida antara NAM dan NAG pada peptidoglikan. (A) Struktur dinding sel bakteri dan (B) Reaksi katalisis oleh enzim lisozim dimana substrat diikat oleh enzim sehingga grup oksigen, grup 4-OH dari residu *N-acetylglucosamine* (NAG) diprotonasi saat terlepas dari grup COOH pada Glu-35. Molekul berwarna hijau pada gambar adalah enzim dan pergerakan proton berwarna merah (Kirby 2001; de Acuña *et al*. 2017).

Enzim lisozim diketahui memiliki aktivitas antimikroba dan telah diaplikasikan secara luas pada industri makanan (You *et al*. 2010; Aminlari *et al*. 2014; Gyawali dan Ibrahim 2014). Enzim lisozim dikategorikan sebagai faktor penting dalam pertahanan terhadap infeksi bakteri patogen oleh tanaman (Holm dan Sander 1994; Sytawala *et al*. 2015). Wang *et al*. (2005), telah melaporkan sebuah enzim yang memiliki aktivitas seperti lisozim dengan massa molekul 14,4 kDa yang diisolasi dari *Phaseolus mungo* yang menunjukkan aktivitas anti jamur serta anti bakteri. Berdasarkan kemampuannya dalam menghidrolisis dinding sel bakteri, gen penyandi lisozim telah banyak diintroduksikan pada hewan maupun tumbuhan.

2.4 Penyakit Bakteri pada Tanaman Kentang

Penyakit pada tanaman kentang dapat disebabkan oleh bakteri, fungi dan virus. Jenis penyakit pada tanaman kentang yang disebabkan oleh bakteri di antaranya *zebra chip*, *ring rot*, *blackleg*, *brown rot*, *common scab*, busuk lunak (*soft rot*) dan layu bakteri (*bacterial wilt*) (Davidson dan Xie 2014). Penyakit layu bakteri pada tanaman kentang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* yang sebelumnya dinamakan *Pseudomonas solanacearum* (Yabuuchi *et al*. 1995). *R. solanacearum* termasuk famili *Ralstoniaceae* yang merupakan agen penyebab penyakit layu bakteri yang menyerang lebih dari 250 spesies tanaman yang tergolong dalam 54 famili tanaman baik tanaman tropis maupun substropis termasuk pada tanaman kentang (Peeters *et al*. 2013). Bakteri ini sangat heterogen, secara historis dibagi menjadi lima ras (berdasarkan rentang inang tanaman), lima biovars (berdasarkan pemanfaatan karbon) (Denny 2006) dan dikelompokkan menjadi empat filotipe yang sesuai dengan asal filogenetik dan geografi berdasarkan analisis menggunakan urutan gen *Internal Trascribed Spacer* (ITS), *egl*, *hrpB* dan *mutS*. Filotipe I merupakan strain yang berasal dari Asia, filotipe II berasal dari Amerika, filotipe III berasal dari Afrika dan filotipe IV berasal dari

IPB University
— Bogor Indonesia —

@Hak cipta milik IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.

IPB University

Perpustakaan IPB University

Indonesia, Australia serta Jepang (Kado 2010). *R. solanacearum* dapat ditularkan melalui tanah, air dan tanaman yang terinfeksi serta menginfeksi melalui situs luka. *R. solanacearum* berkoloni secara cepat pada pembuluh xilem dan menghasilkan eksopolisakarida yang menghalangi trasport air sehingga menyebabkan tanaman menjadi layu dan mengalami kematian secara perlahan (Tans-Kersten *et al*. 2004; Genin dan Denny 2012). Kemampuan mendegradasi dinding sel disebabkan karena *R solanacearum* menghasilkan *β-1,4 endoglukanase* (Egl), *endopolygalacturonase* (PglA), *Eksopolygalacturonase* (PehB dan PehC), *pectin methylesterase* (PmeA) dan *cellulase* (CelA) (González dan Allen 2003).

2.5 Ketahanan Tanaman terhadap Infeksi Patogen

Tanaman melibatkan sistem ketahanan bawaan (*innate immune system*) untuk mengenali adanya invasi patogen dan mengeluarkan respon pertahanan. Respon awal tanaman terhadap infeksi patogen yaitu mengenali molekul umum yang dimiliki oleh mikrob yang dikenal sebagai *Pathogen Associated Molecular Pattern*/*Microbial Associated Molecular Pattern* (PAMP/MAMP). Respon kedua yaitu merespon faktor virulensi patogen (Jones dan Dangl 2006). PAMP/MAMP merupakan molekul sinyal spesifik yang dimiliki oleh mikrob atau patogen (Staskawicz *et al*. 1995) dan dapat dikenali oleh *Pattern Recognition Receptor* (PRR) tanaman. PRR merupakan reseptor yang terlokalisasi pada membran plasma yang mengenali PAMP/MAMP di lingkungan ekstraseluler (Boller dan Felix 2009).

Protein PRR tanaman dapat berupa *receptor kinase* (RK) atau *receptor like protein* (RLP) yang terlokalisasi dipermukaan dan mengandung berbagai ligan pengikat ektodomain yang selain mengenali adanya PAMP juga dapat mengenali *damage associated molecular pattern* (DAMP) (Zipfel 2014). DAMP merupakan elisitor endogen yang dihasilkan oleh tanaman akibat adanya invasi dari mikrob (Lotze *et al*. 2007). PAMP maupun elisitor endogen DAMP dapat memicu berbagai respon seluler pada tanaman sebagai sinyal peringatan adanya infeksi. Respon seluler yang diinduksi oleh PAMP dan DAMP tersebut menyebabkan munculnya respon pertahanan tanaman yang di kenal sebagai PAMP-*triggered immunity* (PTI) yang dapat menunda kolonisasi bakteri patogen (Wu *et al*. 2014).

Protein PRR tanaman dapat mengenali molekul *Archetypal bacterial* atau PAMP seperti flagellin bakteri, *elongation factor Tu* (Ef-Tu), peptidoglikan (PGN) atau lipopolisakarida (LPS) (Boller dan Felix 2009). Sejauh ini, telah banyak reseptor PAMP/DAMP yang telah diidentifikasi pada spesies tanaman yang berbeda. Beberapa reseptor yang telah diketahui fungsinya yaitu FLS2 (*FLAGELLIN SENSING 2*) yang mengenali flagellin bakteri, Ef-Tu/EFR yang mengenali faktor elongasi Tu (Boller dan Felix 2009) dan LysM (*Lysin motif*) yang mengenali GlcNAc (*N-acetylglucosamine*) yang merupakan komponen umum kitin pada fungi dan peptidoglikan pada bakteri (Gust *et al*. 2012). Respon pertahanan awal akibat infeksi PAMP yang mengatur gen ketahanan di antaranya dimerisasi reseptor, aktivasi *receptor like cytoplasmic kinase* (RLCK), MAP kinase (MAPK), CDPK dan degradasi protein yang dimediasi oleh ubiquitin (Wu *et al*. 2014).

Respon pertahanan tanaman terhadap infeksi patogen lainnya yaitu pengenalan melalui reseptor interseluler pada molekul virulensi patogen berupa efektor (Cui *et al*. 2015). Protein efektor merupakan molekul yang diproduksi oleh patogen tanaman seperti bakteri, virus, nematoda, fungi dan insekta (Boller dan Felix 2009; Gururani *et al*. 2012). Setiap strain bakteri patogen dapat menghasilkan

20-30 protein efektor selama infeksi yang disekresikan ke sitoplasma tanaman melalui sistem sekresi III (TTSS) (Macho dan Zipfel 2014). Protein efektor tersebut selain membantu dalam proses kolonisasi patogen, mengganggu aktivasi pertahanan tanaman dan meningkatkan virulensinya (Chisholm *et al*. 2006). Efektor-efektor ini dapat dideteksi oleh protein *polymorphic nucleotida binding and leucin rich repeat* (NB-LRR) yang umumnya dikodekan oleh gen R (*R gene*) (Jones dan Dangl 2006) dan menginduksi ketahanan yang disebut *Effector Triggered Immunity* (ETI). Respon ETI sering dikaitkan dengan *hypersensitive response* yang merupakan respon pertahanan lokal yang dapat menghentikan pertumbuhan patogen dan menyebabkan kematian sel (Boller dan Felix 2009; Cui *et al*. 2015).

@Hak cipta milik IPB University

IPB University
Bogor Indonesia

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.

IPB University

Perpustakaan IPB University

IPB University
— Bogor Indonesia —
@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.
IPB University
Perpustakaan IPB University

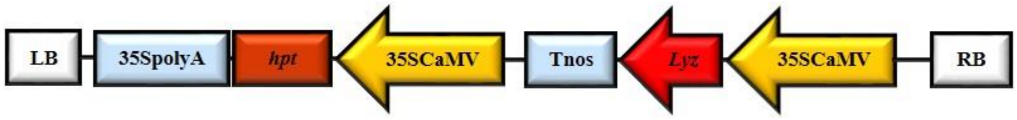
III METODE

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2019 hingga Maret 2020 di *Laboratorium Biotechnology Research Indonesia-the Netherland* (BIORIN) dan Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Tanaman (BMST), Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati dan Bioteknologi, LPPM, IPB Bogor.

3.2 Bahan Penelitian

Tanaman kentang kultivar IPB CP3 *in vitro* digunakan sebagai sumber eksplan untuk transformasi genetik. Bakteri *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) strain LBA4404 yang membawa vektor biner pCXSN-*Lyz* (Gambar 4) digunakan sebagai perantara transformasi genetik. Isolat bakteri *Ralstonia solanacearum* (*R. solanacearum*) (Koleksi Laboratorium Biokimia, BB Biogen) digunakan untuk uji resistensi tanaman transgenik. Primer ActT-F dan ActT-R digunakan untuk analisis integritas DNA genom. Primer Lyz114-F dan NosT2-R digunakan untuk analisis integrasi gen *LYZ-C* pada tanaman transgenik.



Gambar 4 Peta daerah T-DNA dari plasmid pCXSN-*Lyz* yang membawa gen *LYZ-C* di bawah kendali promoter *cauliflower mosaic virus* 35S (35S CaMV) dan terminator *nopaline synthase* (Tnos) serta *hpt* (*hygromycin phosphotransferase*) (Senjaya 2017)

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui empat tahapan utama yaitu perbanyakan eksplan berupa tanaman kentang kultivar IPB CP3 dan persiapan *A. tumefaciens,* transformasi genetik tanaman kentang kultivar IPB CP3 dengan gen *LYZ-C*, analisis integrasi gen *LYZ-C* tanaman transgenik putatif dan analisis resistensi tanaman kentang kultivar IPB CP3 transgenik terhadap bakteri patogen *R. solanacearum* secara *in vitro*.

3.3.1 Perbanyakan Eksplan dan Persiapan *A. tumefaciens*

Tanaman kentang kultivar IPB CP3 diperbanyak secara *in vitro* dengan menggunakan stek buku tunggal. Stek ditanam pada media dasar MS (Murashige dan Skoog 1962) (Lampiran 1) selama tiga sampai empat minggu, selanjutnya ditumbuhkan di dalam ruang kultur pada suhu 24-25 ºC dengan fotoperiode 18 jam dan intensitas cahaya 2000-3000 lux.

Bakteri *A. tumefaciens* LBA4404 yang membawa vektor rekombinan pCXSN-*Lyz* stok dalam gliserol diambil sebanyak 200 µL kemudian diinokulasikan ke dalam 3 mL media Luria Bertani (LB) cair (Lampiran 2) yang ditambah dengan antibiotik kanamisin 50 mg/L, higromisin 50 mg/L dan streptomisin 100 mg/L, kemudian diinkubasi selama 36 jam dengan penggoyangan pada kecepatan 150 rpm di suhu ruang dalam kondisi gelap. Sebanyak 100 µL dari biakan tersebut diambil dan dibiakkan kembali ke dalam

IPB University
— Bogor Indonesia —

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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 IPBUniversity

IPBUniversity

Perpustakaan IPBUniversity

20 mL media LB cair yang ditambah dengan antibiotik sampai OD_{600} mencapai 0,5 hingga 0,8. Kultur bakteri disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, endapan kemudian diresuspensi dengan media infeksi (Lampiran 3) sampai OD_{600} mencapai 0,2 hingga 0,3.

3.3.2 Transformasi Genetik Tanaman Kentang Kultivar IPB CP3

Eksplan yang digunakan berupa ruas batang (*internodus*) tanpa mata tunas dari tanaman kentang *in vitro* yang berumur tiga sampai empat minggu dengan ukuran 0,5-1,0 cm. Eksplan ditumbuhkan pada media pra-kultur (Lampiran 4) selama dua hari. Eksplan kemudian direndam di dalam media infeksi selama 10 menit. Setelah ditiriskan di atas tisu steril, eksplan selanjutnya ditanam pada media ko-kultivasi yang komposisinya sama dengan media pra-kultur selama dua sampai tiga hari di dalam ruang gelap. Eksplan selanjutnya dicuci menggunakan akuades steril yang mengandung *cefotaxime* 200 mg/L sebanyak tiga kali. Eksplan kemudian dikeringkan dengan tisu steril dan ditumbuhkan pada media induksi kalus (Lampiran 5) selama tiga minggu. Kalus selanjutnya disubkultur di media seleksi yaitu media induksi kalus yang mengandung higromisin 10 mg/L, setiap dua minggu hingga beregenerasi membentuk tunas. Tunas selanjutnya diperbanyak dengan subkultur setiap tiga minggu di media dasar MS yang mengandung higromisin dengan konsentrasi yang meningkat setiap subkultur dari 10 mg/L, 20 mg/L dan 30 mg/L. Kalus yang hidup pada media seleksi dan kalus yang menghasilkan tunas dihitung untuk mengetahui efisiensi transformasi dan efisiensi regenerasi (Lampiran 6).

Sebagai kontrol positif digunakan eksplan ruas batang yang diko-kultivasi dengan *A. tumefaciens* yang tidak membawa pCXSN-*Lyz* dan ditumbuhkan pada media tanpa higromisin. Kontrol negatif menggunakan ruas batang non-transgenik yang ditumbuhkan pada media yang mengandung higromisin 30 mg/L.

3.3.3 Analisis Integrasi Gen *LYZ-C*

DNA genom kentang diisolasi dengan metode CTAB (Suharsono 2002) yang dimodifikasi menggunakan buffer CTAB 2 % (Lampiran 7). Integritas DNA total yang diisolasi dianalisis dengan PCR terhadap gen aktin dengan menggunakan primer ActT-F (5' CCT CTT AAC CCG AAG GCT AA-3') dan ActT-R (5'-GAA GGT TGG AAA AGG ACT TC-3'). Kondisi PCR yang digunakan adalah pra-PCR pada suhu 95 ºC selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang meliputi denaturasi pada suhu 95 ºC selama 30 detik, *annealing* pada suhu 56 ºC selama 45 detik dan *extention* pada suhu 72 ºC selama 1 menit. Setelah siklus ke 35 reaksi diakhiri dengan pasca PCR pada suhu 72 ºC selama 5 menit. Integrasi transgen pada tanaman transgenik dianalisis dengan PCR menggunakan pasangan primer Lyz114-F (5'-TAT GAA GCG TCA CGG ACT TG- 3') dan NosT2-R (5'-GAA TCC TGT TGC CGG TCT TGC G-3'). Kondisi PCR yang digunakan adalah pra-PCR pada suhu 95 ºC selama 5 menit, dilanjutkan 35 siklus yang meliputi denaturasi pada suhu 95 ºC selama 30 detik, *annealing* pada suhu 55 ºC selama 45 detik dan *extention* pada suhu 72 ºC selama 1 menit. Setelah siklus ke 35 reaksi diakhiri dengan pasca PCR pada suhu 72 ºC selama 5 menit. Hasil PCR dimigrasikan pada gel agarosa 1 % dengan voltase 100 V selama 28 menit dan menggunakan marker 1kb DNA *ladder* (*Thermo Fisher Scientific*).

IPB University
— Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPB University
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

3.3.4 Analisis Resistensi secara *In vitro*

Uji resistensi secara *in vitro* dilakukan pada tiga klon tanaman transgenik dan satu tanaman non-transgenik menggunakan bakteri *R. solanacearum* dengan metode infeksi menurut Habe (2018). Kultur bakteri yang digunakan untuk pengujian disiapkan dengan mengambil sebanyak satu koloni bakteri virulen, kemudian diinokulasikan ke dalam 3 mL media *casamino acid pepton glucose* (CPG) cair (Lampiran 8) dan diinkubasi selama 18 jam dengan penggoyangan pada kecepatan 200 rpm di suhu ruang. Sebanyak 1 mL dari biakan tersebut dikulturkan kembali ke dalam 50 mL media CPG dan diinkubasi pada suhu 28 ºC hingga OD_{600} mencapai 0,5. Tanaman uji ditumbuhkan pada media skrining yang mengandung 40 mL *vermeculite* dan 30 mL media MS cair. Uji resistensi dilakukan dengan menyiram batang tanaman sebanyak 200 µL inokulum bakteri yang telah dibuat dengan kepekatan 2 x 10^9 cfu/mL. Induksi luka dilakukan dengan menggunting akar menggantung dan daun bagian bawah pada batang sebelum melakukan penyiraman. Tanaman uji kemudian diinkubasi pada suhu 28 ºC. Penyiraman juga dilakukan pada tanaman uji dengan air steril sebagai kontrol. Uji resistensi dilakukan terhadap 30 tanaman yang berumur 28 hari untuk tiap genotipe atau klon.

Respon yang diamati yaitu jumlah kejadian penyakit. Berdasarkan kejadian penyakit dapat dihitung frekuensi penyakit (Lampiran 9). Kejadian penyakit diamati 10 hari setelah inokulasi. Tingkat resistensi tanaman ditentukan dengan mengkonversi nilai persentase frekuensi penyakit (Tabel 1).

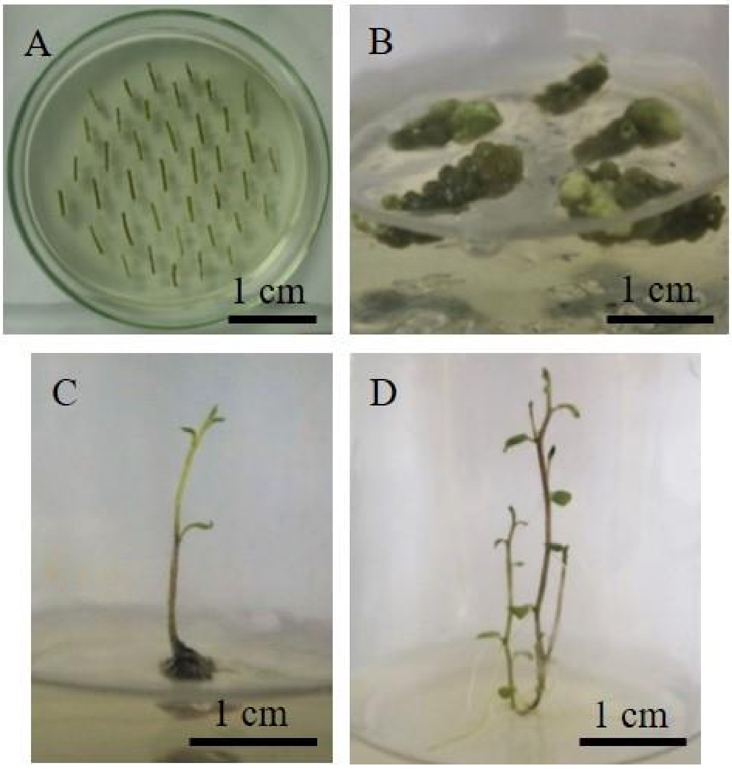
Tabel 1 Tingkat resistensi klon kentang terhadap infeksi patogen (Thaveechai *et al.* 1989)

Frekuensi penyakit (%)	Tingkat resistensi
0 – 20	Resisten (R)
21 -40	Agak Resisten (AR)
41 - 60	Agak Sensitif (AS)
61- 100	Sensitif (S)

IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Transformasi Genetik Tanaman Kentang dengan Gen *LYZ-C*

Gen *LYZ-C* telah berhasil diintroduksikan ke dalam genom tanaman kentang kultivar IPB CP3 dengan menggunakan perantara *A. tumefaciens* LBA4404 yang mengandung plasmid pCXSN-*Lyz*. *Agrobacterium tumefaciens* banyak digunakan untuk mengintroduksikan gen karena secara alami *A. tumefaciens* mampu mentransfer dan mengintegrasikan suatu fragmen DNA yang terdapat di daerah T-DNA ke dalam genom tanaman inang, lebih efisien dan gen yang ditransfer terintegrasi secara stabil (Hwang *et al*. 2017). Tahapan dan hasil transformasi genetik dari eksplan sampai dengan tanaman transgenik putatif disajikan pada gambar 5.



Gambar 5 Tahapan transformasi genetik tanaman kentang kultivar IPB CP3 dengan gen *LYZ-C*. (A) Eksplan ruas batang pada media pra-kultur, (B) Kalus pada media induksi kalus, (C) Regenerasi tunas pada media seleksi dan (D) Tanaman transgenik putatif pada media pembesaran.

Penelitian ini menggunakan ruas batang yang berukuran 0,5-1,0 cm (Gambar 5A) sebagai eksplan untuk transformasi genetik. Ruas batang merupakan eksplan yang umum digunakan pada proses transformasi pada tanaman kentang (Farhanah *et al*. 2017; Gea *et al*. 2017; Liu *et al*. 2017). Perlakuan eksplan pada media pra-kultur sebelum inokulasi dengan *A. tumefaciens* meningkatkan produksi tanaman flax (*Linum usitatissimum* L.) transgenik (McHughen *et al*. 1989). Selama pertumbuhan di media pra-kultur sebagian besar eksplan mengalami

IPB University — Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPB University
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPB University
Perpustakaan IPBUniversity

IPB University
— Bogor Indonesia —
@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.
IPB University
Perpustakaan IPB University

pembengkakan jaringan. Sangwan *et al*. (1992), menjelaskan bahwa perlakuan pra-kultur meningkatkan jumlah sel kompeten untuk ditransformasi dengan perantara *A. tumefaciens*. Perlakuan eksplan pada media pra-kultur berperan untuk penyesuaian ekplan di kondisi yang baru sehingga mencegah eksplan mengalami cekaman akibat ko-kultivasi dengan *Agrobacterium*. Untuk menginduksi proses transfer gen dari *A. tumefaciens* ke ekplan tanaman, media ko-kultivasi ditambah dengan asetosiringon 40 mg/mL. Penambahan senyawa fenolik seperti asetosiringon mampu menginduksi ekspresi gen vir dan meningkatkan efektivitas infeksi *A. tumefaciens* (Stachel *et al*. 1985; Turk *et al*. 1994). Senyawa fenolik asetosiringon meningkatkan efisiensi transformasi dengan perantara *A. tumefaciens* pada kapas (Sunilkumar dan Rathore 2001), tanaman hias *Eustoma grandiflorum* (Nakano 2017) dan pada tanaman *Melastoma malabathricum* serta *Tibouchina semidecandra* (Yong *et al*. 2006).

Eksplan ruas batang mulai membentuk kalus pada dua minggu setelah ditumbuhkan di media induksi kalus. Kalus terbentuk mulai dari ujung-ujung ruas batang dan berkembang menutupi seluruh permukaan eksplan (Gambar 5B). Kalus mulai beregenerasi membentuk tunas pada umur empat minggu. Eksplan ruas batang berkembang membentuk kalus dan beregenerasi membentuk tunas pada media MS yang mengandung hormon IAA 1 mg/L, GA3 0,5 mg/L dan trans-zeatin 3 mg/L. Masekesa *et at.* (2016), menunjukkan bahwa keberhasilan induksi kalus dan regenerasi tergantung pada genotipe eksplan dan kombinasi yang tepat dari konsentrasi sejumlah hormon yang digunakan. Hormon sitokinin berupa *trans-zeatin* mampu menginduksi kalus dengan baik dan mempercepat pembentukan tunas (Beaujean *et al*. 1998; Park *et al*. 2003; Anjun dan Ali 2004).

Beberapa eksplan mampu tetap tumbuh membentuk kalus dan beregenerasi membentuk tunas pada media seleksi yang mengandung higromisin 10 mg/L. Namun beberapa eksplan juga secara perlahan berubah warna menjadi kecoklatan (*browning*) dan mengalami nekrosis. Pencokelatan pada eksplan juga disebabkan oleh senyawa fenolik (Leng *et al*. 2009). Pelukaan menginduksi akumulasi senyawa fenolik (Reyes dan Cisneros-Zevallos 2003). Dari tiga kali percobaan, efisiensi transformasi berkisar antara 41,73 % dan 51,63 % dengan rata-rata 47,58 % (Tabel 2).

Tabel 2 Efisiensi transformasi dan regenerasi tanaman kentang kultivar IPB CP3

Percobaan	Jumlah Eksplan	Jumlah Kalus Resisten	Jumlah Kalus Beregenerasi	Efisiensi Transformasi (%)	Efisiensi Regenerasi (%)
1	127	53	16	41,73	30,18
2	123	61	25	49,59	40,98
3	122	63	13	51,63	20,63
Jumlah	372	177	54	-	-
Rata-rata	124	59	18	47,58	30,51

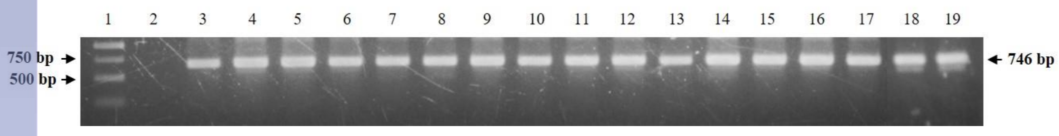
Efisiensi transformasi pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan transformasi pada kentang kultivar Jala Ipam dengan gen *MmPMA* (Farhanah *et al*. 2017) dan kultivar IPB CP1 dengan gen *Hd3a* (Gea *et al*. 2017). Eksplan yang diinokulasi dengan *A. tumefaciens* yang tidak mengandung pCXSN-*Lyz*, semuanya

membentuk kalus di media yang tidak mengandung higromisin, tetapi semuanya mengalami kematian di media seleksi yang mengandung higromisin 10 mg/L. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan yang digunakan mempunyai viabilitas yang baik dan higromisin yang digunakan sebagai agen seleksi dalam keadaan baik. Berdasarkan jumlah kalus yang resisten terhadap higromisin, efisiensi regenerasi kalus yang membentuk tunas berkisar antara 20,63 % dan 40,98 % dengan rata-rata 30,51 % (Tabel 2). Efisiensi regenerasi ini berada di antara efisiensi regenerasi yang diperoleh Gea *et al*. (2017) dan Farhanah *et al*. (2017).

Tunas hasil regenerasi dari kalus yang sudah besar (Gambar 5C), dipisahkan dari kalusnya supaya membentuk akar dan untuk perbanyakan (Gambar 5D). Dari tunas-tunas yang tumbuh dari 54 kalus yang resisten terhadap 10 mg/L higromisin yang mampu beregenerasi, diambil 31 tunas yang tumbuhnya cepat untuk diperbanyak dan dianalisis lebih lanjut. Tunas-tunas tersebut disebut dengan klon transgenik putatif. Hasil seleksi resistensi tunas terhadap 30 mg/L higromisin menunjukkan bahwa 16 klon dari tanaman tersebut adalah resisten terhadap higromisin dan membentuk akar. Hal ini menunjukkan bahwa tanaman tersebut mengandung dan mengekspresikan gen penanda seleksi gen *hpt* yang terpaut dengan transgen *LYZ-C* pada daerah T-DNA. Gen *hpt* merupakan penyandi enzim *hygromycin phosphotransferase* yang mampu mengkatalisis fosforilasi senyawa hidroksil dalam antibiotik higromisin sehingga menjadi tidak aktif (Brasileiro dan Aragao 2001).

4.2 Analisis Integrasi Gen *LYZ-C*

Isolasi DNA telah berhasil dilakukan terhadap 16 klon tanaman transgenik putatif dan satu tanaman non-transgenik. Keberhasilan isolasi DNA dan integritas DNA genom yang diisolasi dianalisis dengan PCR terhadap gen aktin. PCR terhadap gen aktin dengan primer aktin ActT-F dan ActT-R menunjukkan bahwa DNA dari semua tanaman baik klon transgenik maupun non-transgenik menghasilkan amplikon yang berukuran 746 bp (Gambar 6). Hal ini menunjukkan bahwa isolasi DNA dari seluruh tanaman kentang berhasil dengan baik dan DNA tersebut mempunyai integritas yang baik. Untuk memastikan bahwa primer ActT-F dan ActT-R adalah spesifik untuk mengamplifikasi gen aktin, maka plasmid pCXSN-*Lyz* digunakan sebagai kontrol negatif. PCR dengan primer ActT-F dan ActT-R dengan menggunakan plasmid pCXSN-*Lyz* sebagai DNA cetakan tidak menghasilkan amplikon (Gambar 6). Hasil ini menunjukkan bahwa primer tersebut bersifat spesifik untuk gen aktin dan aktin tidak terdapat di plasmid pCXSN-*Lyz*.

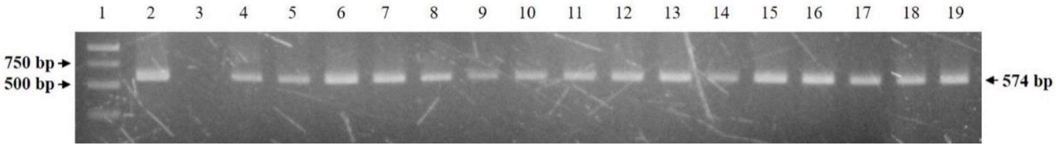


Gambar 6 Hasil amplifikasi gen aktin dengan menggunakan pasangan primer ActT-F dan ActT-R (746 bp). 1: Marker 1 kb DNA ladder, 2: Plasmid pCXSN-*Lyz*, 3: IPB CP3 non-transgenik dan 4-19: IPB CP3 transgenik.

Analisis PCR terhadap 16 klon tanaman transgenik putatif dengan primer Lyz114-F dan NosT2-R menunjukkan bahwa semua klon mengandung transgen *LYZ-C* dan terminator nopalin sintase (Tnos). Hasil amplifikasi PCR dengan primer

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 University
IPB University — Bogor Indonesia —
Perpustakaan IPBUniversity

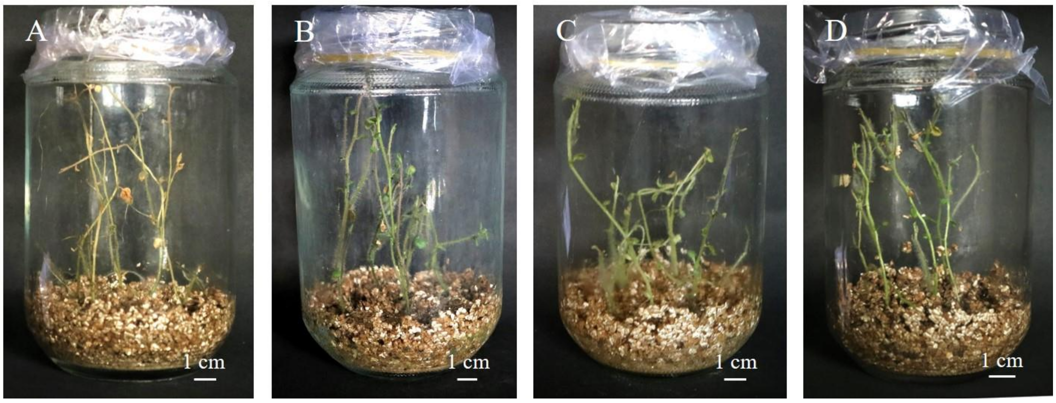
tersebut pada tanaman transgenik adalah fragmen DNA yang berukuran 574 bp. Hasil amplifikasi yang sama diperoleh dengan menggunakan plasmid pCXSN-*Lyz* sebagai DNA cetakan. Sebaliknya, tanaman non-transgenik (NT) tidak menghasilkan amplikon tersebut (Gambar 7). Hasil ini menunjukkan bahwa primer Lyz114-F dan NosT2-R adalah spesifik untuk mengamplifikasi daerah antara gen *LYZ-C* dan Tnos dan 16 klon kentang adalah transgenik yang mengandung transgen *LYZ-C* yang difusikan dengan Tnos.



Gambar 7 Hasil amplifikasi gen *LYZ-C* dengan menggunakan pasangan primer Lyz114-F dan NosT2-R (574 bp). 1: Marker 1 kb DNA ladder, 2: Plasmid pCXSN-*Lyz*, 3: IPB CP3 non-transgenik dan 4-19: IPB CP3 transgenik.

4.3 Analisis Resistensi secara *In Vitro*

Analisis resistensi terhadap bakteri patogen *R. solanacearum* penyebab layu bakteri dilakukan pada tiga klon yang dipilih berdasarkan pertumbuhan yang cepat yaitu klon CP3lyz1, klon CP3lyz2 dan klon CP3lyz6 dari total 16 klon tanaman transgenik dan 1 tanaman IPB CP3 non-transgenik sebagai kontrol. Gejala penyakit dari tanaman yang sensitif ditandai oleh daun yang menguning secara perlahan, diikuti oleh batang roboh dan akhirnya mati. Gejala penyakit pada tanaman non-transgenik lebih tinggi dibandingkan dengan gejala pada tanaman transgenik. Beberapa tanaman transgenik mampu bertahan dengan tingkat resistensi yang berbeda-beda (Gambar 8). Peristiwa layu pada tanaman yang terinfeksi oleh bakteri patogen *R. solanacearum* disebabkan oleh adanya disfungsi sistem vaskular tanaman. *R. solanacearum* berkembang biak dan berkoloni pada pembuluh xylem sehingga menghalangi transport air dan mineral (Lowe-Power *et al*. 2018) yang menyebabkan tanaman menjadi layu.



Gambar 8 Morfologi tanaman hasil uji resistensi terhadap bakteri *R. solanacearum*. (A) Kentang kultivar IPB CP3 non-transgenik, (B) Kentang transgenik klon CP3lyz1, (C) Klon CP3lyz2 dan (D) Klon CP3lyz6.

IPB University — Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

Frekuensi penyakit layu bakteri dari empat klon tanaman berkisar antara 16,7 % hingga 100,0 %. Berdasarkan Thaveechai *et al*. (1989), klon CP3lyz1 dan CP3lyz6 adalah klon resisten terhadap *R. solanacearum*, sementara itu klon CP3lyz2 termasuk klon yang agak resisten terhadap *R. solanacearum*, sedangkan tanaman IPB CP3 non-transgenik termasuk sensitif terhadap *R. solanacearum* (Tabel 3).

Perbedaan tingkat resistensi pada tanaman transgenik yang mengandung gen *LYZ-C* di bawah kendali promotor 35S CaMV yang sama dapat disebabkan oleh perbedaan tingkat ekspresi dari gen *LYZ-C*. Enzim lisozim yang disandi oleh gen *LYZ-C* mampu menghidrolisis ikatan β'(1,4)-glikosida antara N-asetil-D-muramat (NAM) dengan N-asetil-D-glukosamin (NAG) pada peptidoglikan yang merupakan komponen dinding sel bakteri (Sytwala *et al*. 2015). Rusaknya dinding sel bakteri menyebabkan kematian bakteri. Perbedaan ekspresi transgen biasa terjadi di berbagai tanaman transgenik yang mengandung transgen yang sama (Kohli *et al*. 2006). Perbedaan resistensi tanaman kentang varietas Jala Ipam transgenik terhadap *R. solanacearum* juga disebabkan oleh perbedaan ekspresi gen *LYZ-C* (Alfian *et al*. 2020).

Perbedaan tingkat ekspresi transgen disebabkan oleh jumlah salinan transgen, pembungkaman RNA, situs penyisipan transgen dan penggunaan regulator untuk mengendalikan ekspresi transgen (Butaye *et al*. 2005). T-DNA menyisip pada genom tanaman secara acak dan terdistribusi di sepanjang kromosom dan seluruh kromosom (Azpiroz-Leehan dan Feldmann 1997; Ko *et al*. 2018), sehingga dapat menyisip pada daerah penyandi maupun daerah bukan penyandi. Penyisipan yang acak tersebut dapat mempengaruhi ekspresi transgen pada tanaman transgenik melalui pengaruh dari efek penyisipan (*insertion effect*) dan pengaruh terhadap efek posisi (*position effect*). Efek dari penyisipan dapat menyebabkan kehilangan atau penambahan fungsi dari transgen maupun gen-gen lain yang terpaut dalam T-DNA (Filipecki dan Malepszy 2006). Faktor lain yang terkait dengan pembungkaman gen adalah jumlah salinan transgen pada genom. Transgen yang terintegrasi pada situs kromosom yang sama lebih efektif menginduksi pembungkaman daripada transgen yang terintegrasi secara menyebar pada setiap kromosom (Stam *et al*. 1997; Hammond *et al*. 2001).

Tabel 3 Tingkat resistensi tanaman terhadap *R. solanacearum*

Klon	Jumlah tanaman yang diinokulasi	Jumlah tanaman yang terserang patogen	Frekuensi Penyakit (%)	Tingkat Resistensi*
CP3 NT	30	30	100,0	S
CP3lyz1	30	6	20,0	R
CP3lyz2	30	11	36,7	AR
CP3lyz6	30	5	16,7	R

*Keterangan: S= sensitif, R= resisten, AR= agak resisten

Selain memiliki kemampuan bakteriolitik, lisozim memiliki aktivitas bakterisidal kuat baik pada bakteri gram negatif maupun bakteri gram positif dengan mengganggu struktur dinding sel (Ibrahim *et al*. 1996; Ibrahim *et al*. 2001). Aktivitas antimikroba lisozim dikaitkan dengan faktor struktural dan domain

@Hak cipta milik IPB University

IPB University
Bogor Indonesia

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.

IPB University

Perpustakaan IPBUniversity

IPB University
— Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

bakterisidal yang dapat menginduksi penghambatan pertumbuhan bakteri secara nonkatalitik (Mine *et al*. 2004). Ibrahim *et al*. (2001), mengemukakan bahwa lisozim yang kekurangan aktivitas katalitiknya masih mempertahankan sifat bakterisidalnya. Aktivitas bakterisidal lisozim secara tidak langsung dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (Lesnierowski dan Kijowski 2007). Proses lisis pada bakteri gram negatif oleh lisozim terjadi setelah terjadi gangguan permeabilitas terhadap membran luar (Ibrahim *et al*. 2002). Kemampuan lisozim dalam meningkatkan ketahanan tanaman kentang terhadap infeksi bakteri patogen didukung oleh adanya sistem ketahanan bawaan tanaman yang menghasilkan sinergisitas dalam menghambat maupun membunuh bakteri. Aktivitas lisozim sangat dipengaruhi oleh interaksinya terhadap membran bakteri. Membran luar dinding sel bakteri gram negatif akan diuraikan oleh sistem ketahanan bawaan pada tanaman seperti defensin yang memiliki sifat permeabilitas terhadap membran sehingga mampu berikatan dan membentuk pori (Thevissen *et al*. 1999; Gao 2000). Gangguan pada dinding sel tersebut akan mempermudah kerja lisozim. Liu *et al.* (2014), melaporkan bahwa sebuah *lysozyme-like enzyme* (LYS1) yang diproduksi tanaman *Arabidopsis* yang terinfeksi patogen mampu memecahkan peptidoglikan kompleks bakteri membentuk fragmen-fragmen peptidoglikan.

IPB University
— Bogor Indonesia —
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 University
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

V SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Introduksi gen *LYZ-C* pada tanaman kentang kultivar IPB CP3 telah berhasil dilakukan dengan perantara *A. tumefaciens*. Rata-rata efisiensi transformasi dan efisiensi regenerasi pada penelitian adalah 47,58 % dan 30,51 %. Analisis molekuler pada 16 klon tanaman transgenik putatif menunjukkan semua klon tanaman mengandung gen *LYZ-C*. Uji resistensi secara *in vitro* pada tiga klon tanaman transgenik menunjukkan bahwa klon transgenik lebih resisten terhadap infeksi *R. solanacearum* dibandingkan dengan tanaman non-transgenik. Hal tersebut menunjukkan bahwa gen *LYZ-C* yang terdapat di dalam klon kentang kultivar IPB CP3 transgenik dapat meningkatkan resistensi terhadap *R. solanacearum*, walaupun ketiga klon transgenik tersebut mempunyai tingkat resistensi yang bervariasi.

5.2 Saran

Analisis stabilitas dan ekspresi gen *LYZ-C* secara kuantitatif pada tanaman kentang kultivar IPB CP3 transgenik perlu dilakukan. Analisis resistensi *in vivo* di rumah kaca atau lapangan dengan menghitung nilai indeks penyakit perlu dilakukan untuk melakukan konfirmasi resistensi secara *in vitro*.

IPB University
— Bogor Indonesia —

@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.

IPBUniversity

Perpustakaan IPBUniversity

DAFTAR PUSTAKA

Alfian A, Suharsono, Tjahjoleksono A. 2020. Expression of *c-lysozyme* gene in transgenic potatoes cv. jala ipam against bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *Int J Agric Biol.* 23(6):1136-1140.

Aminlari L, Hashemi MM, Aminlari M. 2014. Modified lysozymes as novel broad spectrum natural antimicrobial agents in foods. *J Food Sci.* 79(6):1-14.

Anjun MA, Ali H. 2004. Effect of culture medium on direct organogenesis from different explants of various potato genotypes. *Biotechnology*. 3(2):187-193.

Azpiroz-Leehan R, Feldmann KA. 1997. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: Going back and forth. *Trends Genet.* 13(4):152-156.

Banerjee AK, Prat S, Hannapel DJ. 2006. Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L. ssp. *andigena*) plants via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Sci*. 170:732-738.

Bako L, Umeda M, Tiburcio AF, Schell J, Koncz C. 2003. The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium* transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. *Proc Natl Acad Sci.* 100(17):10108-10113.

Beaujean A, Sangwan RS, Lecardonnel A, Sangwan-Norreel BS. 1998. Agrobacterium-mediated transformation of three economically important potato cultivars using sliced internodal explants: An efficient protocol of transformation. *J Exp Bot.* 49(326):1589-1595.

Bhattacharya A, Sood P, Citovsky V. 2010. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. *Mol Plant Pathol.* 11(5):705-719.

Birch ANE, Geoghegan IE, Griffiths DW, McNicol JW. 2002. The effect of genetic transformations for pest resistance on foliar solanidine-based glycoalkaloids of potato (*Solanum tuberosum*). *Ann Appl Biol*. 140(2):143-149.

Blake CCF, Koenig DF, Mair GA, North ACT. 1965. Structure of hen egg-white lysozyme. *Nature*. 206:757-761.

Boller T, Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol.* 60(1):379-406.

[BPS] Badan Pusat Statistik. 2020. Impor menurut komoditi tahun 2017 [Internet]. [diunduh 2020 Maret 10]. Tersedia pada: http://www.bps.go.id/all_newtemplate.php.

Brasileiro ACM, Aragão FJL. 2001. Markers genes for *in vitro* selection of transgenic plants. *J Plant Biotechnol*. 3(3):113-121.

Brown L, Wolf JM, Prados-rosales R, Casadevall A. 2015. Through the wall: extracellular vesicles in gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Rev*. hlm1-11.

Butaye KMJ, Cammue BPA, Delauré SL, De Bolle MFC. 2005. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Mol Breed.* 16(1):79-91.

Callewaert L, Michiels CW. 2010. Lysozme in the animal kingdom. *J Biosci*. 35:127-160.

Callewaert L, Van Herreweghe JM, Vanderkelen L, Leysen S, Voet A, Michiels CW. 2012. Guards of the great wall: bacterial lysozyme inhibitors. *Trends Microbiol.* 20(10):501-510.

Cavatorta J, Perez KW, Gray SM, Van Eck J, Yeam I, Jahn M. 2011. Engineering virus resistance using a modified potato gene. *Plant Biotechnol J*. 9(9):1014-1021.

Chakraborty S, Chakraborty N, Agrawal L, Ghosh S, Narula K, Shekhar S, Naik PS, Pande PC, Chakrborti SK, Datta A. 2010. Next-generation protein-rich potato expressing the seed protein gene *AmA1* is a result of proteome rebalancing in transgenic tuber. *Proc Natl Acad Sci*. 07(41):17533-17538.

Charkowski A, Sharma K, Parker ML, Secor GA, Elphinstone J. 2020. Bacterial diseases of potato. Di dalam: Campos H, Ortiz O, editor. *The Potato Crop: Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind*. Lima: Springer Publishing. hlm 351-388.

Chisholm ST, Coaker G, day B, Staskawicz. 2006. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Elsevier Cell*. 124:803-814.

Chung BN, Yoon JY, Palukaitis P. 2013. Engineered resistance in potato against potato leafroll virus, potato virus A and potato virus Y. *Virus Genes*. 47(1):86-92.

Citovsky V, Kozlovsky S V, Lacroix B, Zaltsman A, Dafny-Yelin M, Vyas S, Tovkach A, Tzfira T. 2007. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cell Microbiol.* 9(1):9-20.

Craig W, Gargano D, Scotti N, Nguyen TT, Lao NT, Kavanagh TA, Dix PJ, Cardi T. 2005. Direct gene transfer in potato: A comparison of particle bombardment of leaf explants and PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Cell Rep*. 24:603-611.

Cui H, Tsuda K, Parker JE. 2015. Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annu Rev Plant Biol.* 66(1):487-511.

Davidson RD, Xie K. 2014. Seed potato production. Di dalam: Navarre R, Pavek M, editor. *The Potato: Botany, Production and Uses*. London: CAB International. hlm 115-130.

de Acuña JM, Hidalgo-Dumont C, Pacheco N, Cabrera A, Poblete-Castro I. 2017. A novel programmable lysozyme-based lysis system in *Pseudomonas putida* for biopolymer production. *Sci Rep.* 7(1):1-11.

Denny TP. 2006. Plant pathogenic Ralstonia species. Di dalam: Gnanamanickam SS, editor. *Plant-Associated Bacteria*. Dordrecht: Springer Netherlands. hlm 573-644.

Dong S, Shew HD, Tredway LP, Lu J, Sivamani E, Miller ES, Qu R. 2008. Expression of the bacteriophage T4 lysozyme gene in tall fescue confers resistance to gray leaf spot and brown patch diseases. *Transgenic Res*. 17:47-57.

Farhanah A, Suharsono, Wattimena GA, Widyastuti U. 2017. Genetic engineering of potato plant (*Solanum tuberosum* L.) cv. Jala Ipam with *MmPMA* gene encoding plasma membran H^+-ATPase. *Pak J Biotechnol*. 14(1):37-42.

Filipecki M, Malepszy S. 2006. Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *J Appl Genet*. 47(4):277-286.

IPB University — Bogor Indonesia —
@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.
IPB University
Perpustakaan IPB University

IPB University
— Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

[FAOSTAT] Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. Crops and livestock products [Internet]. [diunduh 2020 Maret 10]. Tersedia pada: http://www.fao.org/faostat/en/#search/potatoes.

Fock I, Collonnier C, Purwito A, Luisetti J, Souvannavong V, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G, Sihachakr D. 2000. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Sci.* 160(1):165-176.

Gao J. 2000. Perspective on "Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme." *Theor Chem Acc.* 103(3-4):328-329.

Gea N, Suharsono, Wattimena GA, Widyastuti U. 2017. Introduction of *Hd3a* gene in IPB CP1 potato cultivar through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation under the control of use 35S CaMV promoter. *Pak J Biotechnol*. 14(2):129-134.

Gelvin SB. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol*. 51:223-256.

Gelvin SB. 2010. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Annu Rev Phytopathol*. 48:45-68.

Gelvin SB. 2012. Traversing the cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome. *Front Plant Sci.* 3:1-11.

Gelvin SB. 2016. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annu Rev Genet*. 51:195-217.

Genin S, Denny TP. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu Rev Phytopathol.* 50(1):67-89.

González ET, Allen C. 2003. Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Mol Plant-Microbe Interact.* 16(6):536-544.

Gururani MA, Venkatesh J, Upadhyaya CP, Nookaraju A, Pandey SK, Park SW. 2012. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiol Mol Plant Pathol.* 78:51-65.

Gust AA, Willmann R, Desaki Y, Grabherr HM, Nürnberger T. 2012. Plant LysM proteins: Modules mediating symbiosis and immunity. *Trends Plant Sci.* 17(8):495-502.

Gyawali R, Ibrahim SA. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*. 46:412-429.

Habe I. 2018. An *in vitro* assay method for resistance to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in Potato. *Am J Potato Res*. hlm 1-6.

Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. 2001. Post-transcriptional gene silencing by doublestranded RNA. *Nature*. 2:110-119.

Holm L, Sander C. 1994. Structural similarity of plant chitinase and lysozymes from animals and phage. *FEBS Letters*. 340:129-132.

Hwang HH, Yu M, Lai EM. 2017. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *Arab B.* 15:1-32.

Ibrahim H, Aoki T, Pellegrini A. 2002. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. *Curr Pharm Des.* 8(9):671-693.

Ibrahim HR, Higashiguchi S, Juneja LR, Kim M, Yamamoto T. 1996. A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. *J Agric Food Chem.* 44(6):1416-1423.
Ibrahim HR, Matsuzaki T, Aoki T. 2001. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic funcion. *FEBS Lett*. 506(1):27-32.
Jollès P. 1996. *Lysozymes: Model Enzymes in Biochemistry and Biology*. Basel (DE): Birkhäuser Verlag. hlm 449.
Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature*. 444(7117):323-329.
Kado CI. 2010. *Plant Bacteriology*. Saint Paul (MN): APS pr.
Khan A, Nasir IA, Tabassum B, Aaliya K. 2017. Expression studies of chitinase gene in transgenic potato against *Alternaria solani*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 128(3):563-576.
Kiloes AM, Sayekti AL, Anwarudin MJ. 2015. Evaluasi daya saing komoditas kentang di sentra produksi pengalengan kabupaten Bandung. *J Hort*. 25(1):88-96.
Kirby AJ. 2001. The lysozyme mechanism sorted - After 50 years. *Nat Struct Biol.* 8(9):737-739.
Ko DK, Nadakuduti SS, Douches DS, Buell CR. 2018. Transcriptome profiling of transgenic potato plants provides insights into variability caused by plant transformation. *PLoS One*. 13(11):1-16.
Kohli A, González-Melendi P, Abranches R, Capell T, Stoger E, Paul Christou P. 2006. The quest to understand the basis and mechanisms that control expression of introduced transgenes in crop plants. *Plant Signal Behav*. 1(4):185-195.
Kole C, Michler CH, Abbott AG, Hall TC. 2010. Transgenic crop plant. Volume ke-1. Di dalam: Ganeshan S, Chibbar RN, editor. *Gene transfer methods*. London: Springer-Verlag. hlm 57-75.
Krenek P, Samajova O, Luptovciak I, Doskocilova A, Komis G, Samaj J. 2015. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles, methods and applications. *Biotechnol Adv.* 33(6):1024-1042.
Lacroix B, Citovsky V. 2013. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium* mediated genetic transformation. *Int J Dev Biol.* 57(6-8):467-481.
Lecardonnel A, Chauvin L, Jouanin L, Beaujean A, Prévost G, Sangwan-Norreel B. 1999. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Sci*. 140(1):71-79.
Leng PH, Su SC, Wei F, Yu F, Duan YF. 2009. Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. *Acta Horticulturae*. 829:127-132.
Lesnierowski G, Kijowski J. 2007. Bioactive Egg Compounds. Di dalam: Huopalahti R, López-Fandiño R, Anton M, Schade R, editor. *Lysozyme*. Bern: Springer-Verlag. hlm 33-42.
Liu X, Grabherr HM, Willmann R, Kolb D, Brunner F, Bertsche U, Kühner D, Franz-wachtel M, Amin B, Felix G, Ongena M, Nürnberger T, Gust AA. 2014. Host-induced bacterial cell wall decomposition mediates pattern-triggered immunity in *Arabidopsis*. *Plant Biology*. hlm 1-24.

IPB University — Bogor Indonesia —
@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.
Perpustakaan IPB University
IPB University

Liu Q, Guo Q, Akbar S, Zhi Y, El Tahchy A, Mitchell M, Li Z, Shrestha P, Vanhercke T, Ral JP, Liang G, Wang MB, White R, Larkin P, Singh S, Petrie J. 2017. Genetic enhancement of oil content in potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) through an integrated metabolic engineering strategy. *Plant Biotechnol J.* 15(1):56-67.

Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, DeVera ME, Liang X, Tor M, Billiar T. 2007. The grateful dead: Damage associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev*. 220:60-81.

Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C. 2018. How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. *Trends Microbiol.* 26(11):929-942.

Macho AP, Zipfel C. 2014. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol Cell*. 54(2):263-272.

Magori S, Citovsky V. 2011. Epigenetic control of *Agrobacterium* T-DNA integration. *Biochim Biophys Acta-Gene Regul Mech.* 1809(8):388-394.

Manguntungi B. 2014. Transformasi genetik kentang (*Solanum tuberosum* L.) kultivar Atlantik dengan gen penyandi lisozim melalui perantara *Agrobacterium tumefaciens* [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P, Dow M, Verdier V, Beer SV. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol.* 13(6):614-629.

Masekesa TR, Gasura E, Ngadze E, Icishahayo D, Kujeke GT, Chidzwondo F, Robertson I. 2016. Efficacy of Zeatin, Kinetin and Thidiazuron in induction of adventitious root and shoot from petiole explants of sweetpotato cv. Brondal. *South African J Bot.* 104:1-5.

Masschalck B, Michiels CW. 2003. Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 29(3):191-214.

McCullen CA, Binns AN. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22(1):101-127.

McHughen A, Jordan M, Feist G. 1989. A preculture period prior to *Agrobacterium* inoculation increases production of transgenic plants. *J Plant Physiol*. 135 (2):245-248.

Mine Y, Ma F, Lauriau S. 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J Agric Food Chem*. 52(5):1088-1094.

Mourgues F, Brisset MN, Chevreau E. 1998. Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends Biotechnol.* 16(5):203-209.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15(3):473-497.

Nakano Y. 2017. Effect of acetosyringone on *Agrobacterium*-mediated transformation of *Eustoma grandiflorum* Leaf Disks. *Japan Agric Res Q.* 51 (4):351-355.

Nurhasanah, Wattimena GA, Purwito A, Wiendi NMA, Suharsono. 2003. Transformasi genetik tanaman kentang cv. Atlantik dengan mengintroduksikan gen *Hordothionin* untuk mendapatkan ketahanan terhadap bakteri. *Bul Agron*. 31(2):63-67.

IPB University — Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

Park SH, Morris JL, Park JE, Hirschi KD, Smith RH. 2003. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation. *J Plant Physiol.* 160(10):1253-1257.

Peeters N, Guidot A, Vailleau F, Valls M. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol Plant Pathol.* 14(7):651-662.

Pei XW, Chen SK, Wen RM, Ye S, Huang JQ, Zhang YQ, Wang BS, Wang ZX, Jia SR. 2005. Creation of transgenic bananas expressing human lysozyme gene for Panama wilt resistance. *J Integr Plant Biol.* 47(8):971-977.

Qin A, Shi Q, Yu X. 2011. Ascorbic acid contents in transgenic potato plants overexpressing two dehydroascorbate reductase genes. *Mol Biol Rep.* 38(3):1557-1566.

Rahmansyah. 2019. Analisis ekspresi gen Hd3a pada tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) kultivar Jala Ipam transgenik. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Reyes FL, Cisneros-Zevallos L. 2003. Wounding stress increases the phenolic content and antioxidant capacity of Purple-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *J Agric Food Chem.* 51:5296-5300.

Rivero M, Furman N, Mencacci N, Picca P, Toum L, Lentz E, Bravo-Almonacid F, Mentaberry A. 2012. Stacking of antimicrobial genes in potato transgenic plants confers increased resistance to bacterial and fungal pathogens. *J Biotechnol.* 157(2):334-343.

Sangwan RS, Bourgeois Y, Brown S, Vasseur G, Sangwan-Norreel B. 1992. Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 188:439-456.

Senjaya SK. 2017. Rekayasa genetik tanaman kentang (*Solanum tuberosum* L.) kultivar Jala Ipam dengan gen *c-lisozim* [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Serrano C, Arce-Johnson P, Torres H, Gebauer M, Gutierrez M, Moreno M, Jordana X, Venegas A, Kalazich J, Holuigue L. 2000. Expression of the chicken lysozyme gene in potato enhances resistance to infection by *Erwinia carotovora subsp. atroseptica*. *Am J Potato Res.* 77(3):191-199.

Stachel SE, Messens E, Van Montagu M, Zambryski P. 1985. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*. 318(6047):624-629.

Stam M, Mol JNM, Kooter JM. 1997. The silence of genes in transgenic plants. *Ann Bot.* 79(1):3-12.

Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG. 1995. Molecular genetics of plant disease resistance. *Blackwell Scientific.* 268:661-667.

Suharsono. 2002. Konstruksi pustaka genom kedelai kultivar Slamet. *Hayati.* 9(3):67-70.

Sunilkumar G, Rathore KS. 2001. Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Molec Breeding.* 8:37-52.

Sytawala S, Günther F, Melzig MF. 2015. Lysozyme and chitinase activity in latex bearing plants of genus Euphorbia - A contribution to plant defense mechanism. *Plant Physiol Biochem.* 95:35-40.

IPB University — Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPB University
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPB University
Perpustakaan IPB University

IPB University
— Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

Tans-Kersten J, Brown D, Allen C. 2004. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol Plant-Microbe Interact.* 686(6):686-695.

Thammasirirak S, Pukcothanung Y, Preecharram S, Daduang S, Patramanon R, Fukamizo T, Araki T. 2010. Antimicrobial peptides derived from goose egg white lysozyme. *Comp Biochem Physiol.* 151(1):8491.

Thaveechai N, Hartman GL, Kosittratana W. 1989. *Bacterial Wilt Resistance Screening*. *Laboratory Course on Bacterial Wilt of Tomato*. Bangkok (TH). Kasetsart University.

Thevissen K, Terras FRG, Broekaert WF. 1999. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol.* 65(12):5451-5458.

Turk SCHJ, van Lange RP, Regensburg-Tuïnk TJG, Hooykaas PJJ. 1994. Localization of the VirA domain involved in acetosyringone-mediated vir gene induction in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol.* 25(5):899-907.

Tzfira T, Li J, Lacroix B, Citovsky V. 2004. *Agrobacterium* T-DNA integration: Molecules and models. *Trends Genet.* 20(8):375-383.

Van Herreweghe JM, Michiels CW. 2012. Invertebrate lysozymes: Diversity and distribution, molecular mechanism and in vivo function. *J Biosci.* 37(2):327-348.

Visser RGF. 1991. Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Tissue Cult Man*. 301-309.

Vocadlo DJ, Davies GJ, Laine R, Withers SG. 2001. Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*. 412(6849):835-838.

Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS* Microbiol. *Rev.* 32(2):259-286.

Wang S, Ng TB, Chen T, Lin D, Wu J, Rao P, Ye X. 2005. First report of a novel plant lysozyme with both antifungal and antibacterial activities. *Biochem Biophys Res Commun.* 327(3):820-827.

Wiesner-Hanks T, Nelson R. 2016. Multiple disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol.* 54(1):229-252.

Wohlkönig A, Huet J, Looze Y, Wintjens R. 2010. Structural relationships in the lysozyme superfamily: Significant evidence for glycoside hydrolase signature motifs. *PLoS One*. 5(11):1-10.

Wu S, Shan L, He P. 2014. Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. *Plant Sci.* 228:118-126.

Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta H, Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two burkholderia and an alcaligenes species to *Ralstonia* gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. *Microbial Immunol*. 39(11):897-904.

Yong WTL, Abdullah JO, Mahmood M. 2006. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transformation parameters for *Melastomataceae* spp. using green fluorescent protein (GFP) as a reporter. *Scientia Horticulturae*. 109:78-85.

You SJ, Udenigwe CC, Aluko RE, Wu J. 2010. Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Res Int.* 43(3):848-855.

Ziemienowicz A. 2014. Agrobacterium-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatal Agric Biotechnol.* 3(4):95-102.

Zipfel C. 2014. Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35(7):345-351.

IPB University
— Bogor Indonesia —

@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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 IPBUniveristy.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPBUniversity.

IPBUniversity

Perpustakaan IPBUniverity

IPB University
— Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

LAMPIRAN

Lampiran 1 Komposisi media dasar MS (Murashige dan Skoog 1962)

Nama stok	Bahan	Konsentrasi senyawa dalam media (mg/l)
A	NH_4NO_3	1650
B	KNO_3	1900
C	KH_2PO_4	170
	H_3BO_3	6,2
	$NaMoO_4.2H_2O$	0,25
	$CoCl_2.6H_2O$	0,025
	KI	0,83
D	$CaCl_2.2H_2O$	440
E	$MgSO_4.7H_2O$	370
	$MnSo_4.4H_2O$	22,3
	$ZnSO_4.7H_2O$	8,6
	$CuSO_4.5H_2O$	0,025
F	Na_2EDTA	37,3
	$FeSO_4.7H_2O$	27,8
Vitamin	Thiamine-HCl	0,1
	Niacin (asam nikotinat)	0,5
	Pyridoxine-HCl	0,5
	Glycine	2
Myo	Myo inositol	100
Sukrosa	Sukrosa	30.000
	pH	5,8
Agar	Agar	8.000

Lampiran 2 Komposisi media *Luria Bertani* (LB)

Komposisi media LB	Jumlah
Bacto-Tripton	10 g/l
Bacto-Yeast	5 g/l
NaCl	10 g/l
Bacto-Agar	25 g/l

IPB University
— Bogor Indonesia —
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 University
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity

Lampiran 3 Komposisi media infeksi

Komposisi media infeksi	Jumlah
Garam MS	1 x
myo-inositol	0,1 g/l
Vitamin MS	1x
glukosa	16,0 g/l
2,4-D	2,0 mg/l
trans-zeatin	0,8 mg/l
asetosiringon	40,0 mg/l

Lampiran 4 Komposisi media pra-kultur (PC)

Media pra-kultur (PC)	Jumlah
Garam MS	1 x
myo-inositol	0,1 g/l
glukosa	16,0 g/l
2,4-D	2,0 mg/l
Vitamin MS	1x
Agar (Gelzan™)	2,5 g/l
trans-zeatin	0,8 mg/l

Lampiran 5 Komposisi media induksi kalus (CIM)

Media induksi kalus (CIM)	Jumlah
Garam MS	1 x
glukosa	16,0 g/l
myo-inositol	0,1 g/l
IAA	1,0 mg/l
GA3	0,5 mg/l
Vitamin MS	1x
Agar (Gelzan™)	2,5 g/l
trans-zeatin	3,0 mg/l
cefotaxime	100,0 mg/l

Lampiran 6 Rumus perhitungan efisiensi transformasi dan regenerasi

$$\text{\% efisiensi transformasi} = \frac{\text{jumlah kalus resisten higromisin}}{\text{jumlah total kalus yang terbentuk}} \times 100\ \%$$

$$\text{\% efisiensi regenerasi} = \frac{\text{jumlah kalus resisten yang beregenerasi}}{\text{jumlah total kalus resisten higromisin}} \times 100\ \%$$

IPB University
— Bogor Indonesia —

@Hak cipta milik IPBUniversity

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.

IPBUniversity

Perpustakaan IPBUniversity

Lampiran 7 Komposisi *buffer Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB)

Komposisi *buffer* CTAB	Jumlah
CTAB	2,0 %
Tris-HCl	0,1 M
EDTA	20,0 mM
NaCl	1,4 M
polyvinil pirolidine	1,0 %

Lampiran 8 Komposisi media *casamino acid pepton glucose* (CPG)

Komposisi media CPG	Jumlah
glukosa	5 g/l
pepton	10 g/l
yeast	1 g/l
casamino acid	1 g/l

Lampiran 9 Rumus perhitungan frekuensi penyakit (fp)

$$\text{Frekuensi penyakit (Fp)} = \frac{\text{Jumlah tanaman mati (n)}}{\text{Jumlah tanaman yang diamati (N)}} \times 100\ \%$$

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Kabupaten Enrekang, Provinsi Sulawesi Selatan pada tanggal 10 November 1993, sebagai anak ke dua dari lima bersaudara pasangan Bapak Ramatta (alm) dan Ibu Tuo. Penulis menyelesaikan pendidikan program Strata 1 (S1) dengan program studi Biologi di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Makassar dan lulus pada tahun 2015. Kemudian pada tahun 2017 penulis melanjutkan pendidikan magister di Institut Pertanian Bogor pada program studi Bioteknologi dengan bantuan beasiswa pendidikan LPDP Kemenkeu. Selama menjalani pendidikan magister, penulis pernah menjadi asisten praktikum pada mata kuliah Genetika Molekuler dan Rekayasa Genetika. Selain itu, penulis bergabung dalam kepengurusan organisasi Himpunan Mahasiswa Muslim Pascasarjana (HIMPAS) IPB (2018-2019). Sebagian dari hasil penelitian ini telah ditulis dalam bentuk artikel ilmiah yang diajukan pada *Indonesian Journal of Biotechnology* (IJBiotech) dengan judul Obtention of transgenic potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar IPB CP3 containing *LYZ-C* gene resistant to bacterial wilt disease. Artikel tersebut saat ini masih dalam status *in review*.

IPB University — Bogor Indonesia —
@Hak cipta milik IPBUniversity
Hak Cipta Dilindungi Undang-undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebukan 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.
IPBUniversity
Perpustakaan IPBUniversity