

INTISARI

Selada Green Romaine (*Lactuca sativa* L. var. *Longifolia*) adalah tanaman yang memiliki potensi untuk diubah secara genetik agar menghasilkan berbagai zat yang bermanfaat bagi kesehatan manusia, misalnya vitamin, antioksidan, atau vaksin. Oleh karena itu, selada dapat menjadi pilihan tanaman pertanian molekuler yang memberikan dampak positif bagi pangan, kesehatan, dan lingkungan. Metode rekayasa genetik yang sering digunakan pada selada adalah transformasi gen dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Metode ini memanfaatkan kemampuan *Agrobacterium* untuk mentransfer sebagian DNA-nya ke dalam genom tanaman. Namun, efisiensi transformasi gen pada selada masih terbilang rendah, yaitu sekitar 8-20% dari eksplan yang ditransformasi. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, seperti jenis eksplan, konsentrasi bakteri, lama perendaman eksplan, dan kondisi ko-kultivasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengoptimalkan protokol transformasi gen pada selada dan meningkatkan efisiensi serta stabilitas ekspresi gen yang ditransfer. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode transformasi genetik *in vitro* yang optimal melalui infeksi *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 dengan vektor plasmid biner pRI101AN-GFP. Tahapan transformasi genetik meliputi sterilisasi benih, multiplikasi eksplan, pemilihan eksplan yang sesuai untuk transformasi, penyesuaian konsentrasi bakteri dan durasi infeksi eksplan, serta penambahan asetosiringon (Acs). Eksplan yang tidak mengalami *overgrowth* pada tahapan ko-kultivasi dan *resting* kemudian diseleksi ketahanan terhadap antibiotik kanamisin, lalu diaklimatisasi, dan dianalisis secara molekuler dengan PCR. Setiap eksperimen transformasi genetik menggunakan 30 eksplan yang diinfeksi dengan suspensi bakteri dengan $OD_{600} = 0,5$ atau $0,6$. Berdasarkan hasil optimasi protokol penyisipan gen, diperoleh metode transformasi genetik dengan menggunakan eksplan nodus kotiledon dan nodal dari selada kultivar Green Romaine yang direndam dalam larutan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* dengan kepadatan $0,6$ selama 10 menit, kemudian ditempatkan pada media ko-kultivasi yang mengandung 100 mg/L asetosiringon. Hasil perhitungan efisiensi transformasi tertinggi didapatkan dari eksplan nodus kotiledon sebesar 32,5 %. Angka ini menunjukkan bahwa metode ini cukup efektif dalam mengubah sifat genetik sel target. Metode ini diharapkan dapat menjadi referensi untuk penelitian selanjutnya mengenai transformasi genetik pada tanaman selada dengan gen-gen target yang berbeda.

Kata kunci : *Agrobacterium tumefaciens*, *in vitro*, pRI101AN-GFP, selada, transformasi genetik

ABSTRACT

Green Romaine Lettuce (Lactuca sativa L. var. Longifolia) is a plant that has the potential to be genetically modified to produce various substances that are beneficial for human health, such as vitamins, antioxidants, or vaccines. Therefore, lettuce can be a choice of molecular agricultural plant that provides positive impacts for food, health, and environment. The genetic engineering method that is often used on lettuce is gene transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. This method utilizes the ability of *Agrobacterium* to transfer part of its DNA into the plant genome. However, the gene transformation efficiency on lettuce is still relatively low, which is about 8-20% of the explants that are transformed. This is caused by several factors, such as the type of explant, the concentration of bacteria, the soaking time of explant, and the co-cultivation condition. Therefore, further research is needed to optimize the gene transformation protocol on lettuce and increase the efficiency and stability of gene expression that is transferred. This research aims to develop an optimal *in vitro* genetic transformation method through infection of *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 with binary plasmid vector pRI101AN-GFP. The stages of genetic transformation include seed sterilization, explant multiplication, selection of suitable explants for transformation, adjustment of bacterial concentration and infection duration of explants, and addition of acetosyringone (Acs). Explants that did not experience overgrowth at the co-cultivation and resting stages were then selected for resistance to kanamycin antibiotic, acclimatized, and analyzed molecularly by PCR. Each genetic transformation experiment used 30 explants that were infected with bacterial suspension with $OD_{600} = 0.5$ or 0.6 . Based on the optimization of gene insertion protocol, a genetic transformation method was obtained using cotyledon node and nodal explants of green Romaine lettuce cultivar that were soaked in *Agrobacterium tumefaciens* bacterial solution with a density of 0.6 for 10 minutes, then placed on co-cultivation media containing 100 mg/L acetosyringone. The highest transformation efficiency calculation result was obtained from cotyledon node explants of 32.5%. This number indicates that this method is quite effective in changing the genetic characteristics of the target cells. This method is expected to be a reference for further research on genetic transformation in lettuce plants with different target genes.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *in vitro*, pRI101AN-GFP, lettuce, genetic transformation.