

INTISARI

Tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) memiliki potensi besar dalam pengembangan *molecular farming*, diantaranya produksi protein terapeutik, vaksin, dan senyawa bioaktif lain melalui metode rekayasa genetik. Metode rekayasa genetik yang sering digunakan pada tanaman adalah transformasi genetik dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens*. Metode ini memanfaatkan kemampuan *Agrobacterium* untuk mentransfer sebagian DNA-nya ke dalam genom tanaman. Namun, efisiensi transformasi gen khususnya pada tanaman tembakau masih terbilang rendah, yaitu sekitar 10-17% dari eksplan yang ditransformasi. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor, seperti jenis eksplan dan konsentrasi bakteri. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengoptimalkan protokol transformasi gen pada tembakau dan meningkatkan efisiensi serta stabilitas ekspresi gen yang ditransfer. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efisiensi transformasi genetik melalui kombinasi jenis eksplan (daun, nodus, kalus) dan kepadatan sel *Agrobacterium* ($OD_{600} = 0,6$ dan $0,8$) secara *in vitro* kultur jaringan serta mengkonfirmasi gen target dan ekspresinya pada tanaman tembakau. Sebelum memasuki tahapan transformasi genetik, eksplan tanaman harus dipersiapkan terlebih dahulu, dimana tahapannya meliputi sterilisasi benih, perbanyakan eksplan, dan persiapan *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 yang mengandung vektor biner pRI101AN-GFP. Eksplan yang lolos pada tahapan ko-kultivasi dan *resting* kemudian diseleksi ketahanan terhadap antibiotik kanamicyn, dan dikonfirmasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Setiap eksperimen transformasi genetik menggunakan 20 eksplan dengan 3 kali ulangan yang diinfeksi dengan suspensi bakteri dengan $OD_{600} = 0,6$ dan $0,8$. Berdasarkan hasil, efisiensi transformasi tertinggi didapatkan dari eksplan daun dengan $OD_{600} 0,8$ sebesar 38,3%, kalus dengan $OD_{600} 0,8$ sebesar 26,7%, dan nodus dengan $OD_{600} 0,6$ sebesar 20%. Keberhasilan ekspresi *Green Fluorescent Protein* (GFP) pada tanaman tembakau menunjukkan potensi besar dalam *molecular farming* sebagai alternatif sistem produksi protein. Inovasi ini mendukung pengembangan *molecular farming* di Indonesia dan menjadi langkah strategis dalam membangun kemandirian produk biofarmasi di masa depan.

Kata kunci: *Agrobacterium tumefaciens*; *in vitro*; pRI101AN-GFP; tembakau; transformasi genetik

ABSTRACT

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) have significant potential in the field of molecular farming, including the production of therapeutic proteins, vaccines, and other bioactive compounds through genetic engineering methods. One of the plant genetic transformation techniques is *Agrobacterium* mediated transformation. This method exploits the ability of *Agrobacterium* to transfer a portion of its DNA into the plant genome. However, the transformation efficiency in tobacco remains relatively low, with only about 10–17% of the explants successfully transformed. This low efficiency is influenced by several factors, including the type of explant and the bacterial concentration. Therefore, it is necessary to optimize the genetic transformation protocol in tobacco in order to increase both the transformation efficiency and the stability of transgene expression in vitro genetic transformation in tobacco. This study aims to evaluate the efficiency of different combinations of explant types (leaf, node, and callus) and *Agrobacterium* cell density ($OD_{600} = 0.6$ and 0.8) also to confirm the presence of the target gene and its expression. Before the genetic transformation process, the seed sterilization, explant preparation, and preparation of *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 harboring the binary vector pRI101AN-GFP are required. Explants were selected for kanamycin resistance, and confirmed using Polymerase Chain Reaction (PCR). The explants that used for gene transformation are 20 infected explants with three replication. The highest transformation efficiency was obtained from leaf explants at $OD_{600} = 0.8$ (38.33%), followed by callus at $OD_{600} = 0.8$ (26.67%), and node explants at $OD_{600} = 0.6$ (20.00%). The successful expression of the *Green Fluorescent Protein* (GFP) in tobacco plants demonstrates the great potential for production of recombinant protein in tobacco. This innovation provides the development of molecular farming in Indonesia.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; in vitro; pRI101AN-GFP; tobacco; genetic transformation