



Transient transformation of lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens* with hepatitis b surface antigen (HBsAg) gene

Student: Indri Hikmah Amalia

Final Project (2010), Degree Program in Biology, School of Life Science and Technology, email: indri.hikmah@yahoo.com

Advisor: Dr. Sony Suhandono

School of Life Science and Technology ITB, email: sony@sith.itb.ac.id

Degree: Degree Sains (S.Si). Conferred October 2010

Abstract

In this research, we have performed the transformation of lettuce leaf (*Lactuca sativa* L.) using *A.tumefaciens* containing the gene of hepatitis B surface antigen (HBsAg). This is done to produce transient lettuce containing HBsAg gene where the gene is a source of vaccine for hepatitis B. The experiments began with sensitivity test of *A.tumefaciens* to cefotaxime antibiotic, optimizations of asetosiringon and triton X-100 concentrations for transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.), and lettuce genetic transformation by using *A.tumefaciens* containing the pCAMBIA 1303 vector and HBsAg (*hepatitis B surface antigen*) gene. Sensitivity test for *A.tumefaciens* to cefotaxime antibiotic was conducted by MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*). Tests carried out with four different concentrations of cefotaxime antibiotic 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm and 400 ppm. The results showed that *A.tumefaciens* was quite sensitive to cefotaxime antibiotic at 300 ppm concentration. Concentration of 300 ppm was then used for sterilization after cocultivation during one night. Optimization of asetosiringon and triton X-100 concentrations were conducted to determine which of the asetosiringon and triton X-100 concentrations were optimal for the transformation of lettuce leaf explants. Asetosiringon concentration optimization was performed at concentrations of 0 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M and 400 μ M, whereas for the triton X-100 at 0%, 0.005%, 0.01%, 0.02% and 0, 03%. It turned out that the 200 μ M of the asetosiringon concentration and 0.01% of the concentration of triton X-100 were optimal for the transformation on lettuce leaves. These results were then used to improve the efficiency of transformation in lettuce leaves. Transformation was done by inoculating the leaf using *A.tumefaciens* containing the pCAMBIA 1303 vector and HBsAg (*hepatitis B surface antigen*) gene. For detection of HbsAg gene expression was used lettuce *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR) method. The results showed that the pCAMBIA 1303 vector successfully integrated in the genome of plants. The primers used were HBS *forward*

and HBS *reverse*. RT-PCR results showed that there was no DNA band in length of which indicated HBsAg gene (743pb).

Key words : Transformation of lettuce, transformation, lettuce leaf, lettuce HBsAg

Transien transformasi daun selada (*Lactuca sativa* L.) menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* yang mengandung gen hepatitis b surface antigen (HBsAg)

Mahasiswa: Indri Hikmah Amalia

Skripsi (2010), Program Studi Sarjana Biologi, SITH

Email: indri.hikmah@yahoo.com

Pembimbing: Dr. Sony Suhandono

SITH-ITB, email: sony@sith.itb.ac.id

Gelar: Sarjana Sains (S.Si), Wisuda Oktober 2010

Abstrak

Pada penelitian ini, telah dilakukan transformasi daun selada (*Lactuca sativa* L.) dengan menggunakan *A. tumefaciens* yang mengandung gen hepatitis B surface antigen (HBsAg). Ini dilakukan untuk menghasilkan transien daun selada yang mengandung gen HBsAg dimana gen ini merupakan sumber vaksin bagi penyakit hepatitis B. Tahapan kerja yang dilakukan dimulai dari uji sensitivitas *A. tumefaciens* terhadap antibiotik sefotaksim, optimasi konsentrasi asetosiringon dan triton X-100 untuk transformasi pada daun selada (*Lactuca sativa* L.), dan transformasi genetik daun selada menggunakan *A. tumefaciens* yang mengandung vektor pCAMBIA 1303 dan gen HBsAg (*hepatitis B surface antigen*). Uji sensitivitas *A. tumefaciens* terhadap sefotaksim dilakukan dengan tes MBC (Minimal Bactericidal Concentration). Uji dilakukan dengan empat konsentrasi sefotaksim yang berbeda yaitu 250 ppm, 300 ppm, 350 ppm dan 400 ppm. Hasil menunjukkan *A. tumefaciens* ternyata cukup sensitif terhadap sefotaksim pada konsentrasi 300 ppm. Konsentrasi 300 ppm ini kemudian akan digunakan untuk tahap sterilisasi hasil transformasi setelah dikokultivasi selama 1 malam. Optimasi konsentrasi asetosiringon dan triton X-100 dilakukan untuk mengetahui konsentrasi asetosiringon dan triton X-100 yang optimal pada transformasi eksplan daun selada. Optimasi konsentrasi asetosiringon dilakukan pada konsentrasi 0 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M dan 400 μ M, sedangkan untuk optimasi konsentrasi triton X-100 dilakukan pada konsentrasi 0 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02% dan 0,03 %. Ternyata 200 μ M dan 0,01% adalah konsentrasi asetosiringon dan triton X-100 yang optimal untuk transformasi pada daun selada. Tahap transformasi dilakukan dengan menginokulasi potongan daun menggunakan *A. tumefaciens* yang mengandung vektor pCAMBIA 1303 dan gen HBsAg (*hepatitis B surface antigen*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa vektor pCAMBIA 1303 berhasil terintegrasi di dalam genom tanaman. Untuk deteksi ekspresi gen HBsAg pada daun selada digunakan metode *Reverse Transcriptase* PCR (RT-PCR). Primer yang digunakan adalah HBS *forward* dan HBS *reverse*. Hasil RT-PCR menunjukkan bahwa tidak terdapat larik DNA berukuran 743pb yang merupakan gen HBsAg.

Kata kunci : Transformasi daun selada, transformasi, daun selada, selada, HBsAg