



RESPON EKSPLAN KALUS TANAMAN PADI (*Oryza Sativa* L.) JAPONICA CV. ILMU PADA PERLAKUAN TRANSFORMASI GEN MENGGUNAKAN *Agrobacterium Tumefaciens*

SKRIPSI

Oleh

**Fika Ayu Safitri
NIM 081510501027**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2013**



RESPON EKSPLAN KALUS TANAMAN PADI (*Oryza Sativa* L.) JAPONICA CV. ILMU PADA PERLAKUAN TRANSFORMASI GEN MENGGUNAKAN *Agrobacterium Tumefaciens*

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pertanian

Oleh

Fika Ayu Safitri
NIM 081510501027

PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2013

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Fika Ayu Safitri

NIM : 081510501027

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Karya Tulis Ilmiah yang berjudul “Respon Eksplan Kalus Tanaman Padi (*Oryza Sativa* L) Japonica cv. Ilmi pada Perlakuan Transformasi Gen Menggunakan *Agrobacterium Tumefaciens*” adalah benar – benar hasil karya sendiri, kecuali jika disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi mana pun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan yang telah saya buat dengan sebenarnya tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 29 Mei 2013

Yang Menyatakan,

Fika Ayu Safitri
NIM 081510501027

**KARYA ILMIAH TERTULIS
(SKRIPSI)**

**RESPON EKSPLAN KALUS TANAMAN PADI (*Oryza
Sativa* L) JAPONICA CV. ILMI PADA PERLAKUAN
TRANSFORMASI GEN MENGGUNAKAN *Agrobacterium
Tumefaciens***

Oleh

Fika Ayu Safitri
NIM. 081510501027

Pembimbing :

Pembimbing Utama : Dr. Ir. Miswar, M.Si

Pembimbing Anggota : Ir. Soetilah Hardjosoedarmo, MS

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Respon Eksplan Kalus Tanaman Padi (*Oryza Sativa* L) Japonica cv. Ilmi pada Perlakuan Transformasi Gen Menggunakan *Agrobacterium Tumefaciens*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian pada :

Hari, tanggal : Jumat, 17 Mei 2013

Tempat : Ruang Sidang Fakultas Pertanian UNEJ

Tim Penguji:

Anggota 1,

Dr. Ir. Miswar, M.Si
NIP. 196410191990021002

Anggota 2,

Anggota 3,

Ir. Soetilah Hardjosoedarmo, MS
NIP. 194908141976032001

Ir. Irwan Sadiman, MP.
NIP. 195310071983031001

Mengesahkan
Dekan,

Dr. Ir. Jani Januar, M. T.
NIP. 195901021988031002

Fika Ayu Safitri

Program Studi Agroteknologi. Fakultas Pertanian, Universitas Jember

ABSTRACT

The gene of the AtBI-1, Arabidopsis thaliana Bax inhibitor, was introduced into Japonica cultivars of rice ('Ilmi') by Agrobacterium-mediated transformation, and a large number of transgenic plants were produced. The neomycin phosphotransferase II (NPTII) gene was used as a selectable marker. The activity of neomycin phosphotransferase could be successfully detected in transgenic rice callus. The introduction of the AtBI-1 gene was also proven by PCR using AtBI-specific oligonucleotide primers in regenerated plants. Stable integration and expression of the AtBI-1 gene in plants were confirmed by GFP analysis.

Keywords: *AtBI-1-GFP, Japonica, Rice.*

RINGKASAN

Respon Eksplan Kalus Tanaman Padi (*Oryza Sativa L*) Japonica cv. Ilmi pada Perlakuan Transformasi Gen Menggunakan *Agrobacterium Tumefaciens*; Fika Ayu Safitri; 081510501027; 2013: 39 halaman; Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Gen Arabidopsis Bax Inhibitor (AtBI-1) merupakan gen Bax Inhibitor (BI) yang diisolasi dari tanaman *Arabidopsis Thaliana*, dengan fungsi dapat menginduksi protein BAX dalam Program Kematian Sel eukariotik. Mekanisme gen AtBI-1 dalam mengontrol Program Kematian sel (PCD) yaitu diawali dengan ekspresi gen UPR (Unfolded Protein) yang diinduksi karena adanya stress pada Retikulum Endoplasma akibat adanya stress yang menyerang sel. Karena hal tersebut, AtBI-1 aktif untuk mengontrol sinyal kematian sel. Jika tanaman mendapatkan stress secara terus menerus, maka UPR tidak akan cukup untuk mengembalikan keadaan retikulum Endoplasma yang mengakibatkan kematian sel. Dengan peningkatan jumlah AtBI-1 pada sel tanaman, maka diharapkan terdapat peningkatan kontrol sinyal kematian sel.

Dalam penelitian ini, Gen AtBI-1 dikonstruksi pada plasmid pBIN19 untuk digunakan pada proses transformasi ke dalam genom tanaman padi menggunakan media *Agrobacterium tumefaciens*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui respon eksplan kalus tanaman Padi (*Oryza Sativa L.*) jenis Japonica cv. Ilmi pada perlakuan transformasi gen AtBI-1-GFP menggunakan vektor *Agrobacterium Tumefaciens*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang metode transformasi gen menggunakan *Agrobacterium Tumefaciens* pada padi (*Oryza Sativa L*) jenis Japonica cv. Ilmi kepada pembaca dan terutama kepada peneliti yang tertarik untuk meneliti jenis padi Japonica cv. Ilmi.

Penelitian ini dilakukan pada bulan oktober 2012 hingga februari 2013 di Laboratorium Pembiakan Molekuler, Divisi *Biosciences* Tanaman, Fakultas Pertanian & *Life Science*, Universitas Kyungpook, Korea Selatan. Bahan – bahan

yang digunakan antara lain : Benih Padi (*Oryza Sativa* L.) Japonica cv. Ilmi, *Agrobacterium Tumefaciens* strain LBA 4404, plasmid pBin-AtBI-1-GFP, Media MS-Basaal (Murashige Skoog), Hormon (2,4 D, Kinetin, NAA), LB Broth, Antibiotik (Kanamycin, Streptomycin dan Rifampicin), PCR Kit (Miniprep Qiagen). Tahapan penelitian yang dilakukan, antara lain : 1) Konfirmasi gen AtBI-1-GFP pada *Agrobacterium Tumefaciens*::pBin-AtBI-1-GFP; 2) Persiapan *Agrobacterium Tumefaciens*; 3) Persiapan Eksplan; 4) Isolasi DNA genomik tanaman hasil transformasi dan 5) Persiapan visualisasi GFP pada organ daun padi transgenik. Hasil transformasi gen AtBI-1-GFP pada kalus padi dapat diketahui dengan jumlah kalus yang memiliki kemampuan bertahan pada media yang mengandung antibiotik kanamycin 50 ppm dengan hasil yang didapatkan sebesar 57%, kemudian dilanjutkan dengan analisis PCR serta diperkuat dengan analisis GFP pada tanaman transgenik.

SUMMARY

Response of Explants of Calli Rice (*Oryza Sativa* L.) Japonica cv. “Ilmi” to Gene Transformation Using *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated; Fika Ayu Safitri; 081510501027; 2013: 39 pages; Agrotechnology Study Program, Faculty of Agriculture, Jember University.

Arabidopsis gene Bax Inhibitor (AtBI-1) is the gene Bax Inhibitor (BI) was isolated from Arabidopsis Thaliana, the function of this gene can induce protein BAX in Program Cell Death. Mechanism of the AtBI-1 gene in controlling Program of cell Death (PCD) is began by expression gene for inducing UPR (Unfolded Protein) because of stress in the endoplasmic reticulum and then the AtBI-1 active to control cell death signal. If the plants get stress continuously, the UPR will not be enough to restore the State of the endoplasmic reticulum which lead to cell death. Increasing number of AtB-1 on cells of plants can increase control of cell death signal in Reticulum Endoplasmic .

In this research, AtBI-1 gene was constructed on plasmid pbin19 to prepared for processing transformation into the genome rice plants using *Agrobacterium Tumefaciens*. The purpose of this research is to know the response explants rice callus (*Oryza Sativa* L.) Japonica cv. Ilmi on gene transformation of AtBI-1-GFP treatment using *Agrobacterium Tumefaciens*. The results of this study are expected to provide information of transformation methods using *Agrobacterium Tumefaciens* on genome rice (*Oryza Sativa* L.) varieties of Japonica cv. Ilmi to readers and especially to researchers who are interested in researching on rice Japonica cv. Ilmi.

This research was done in October 2012 to March 2013 at the Laboratory of Molecular Breeding, Division of Biosciences, Faculty of Agriculture & Life Science, Kyungpook University, South Korea. Material on this research, such us: seed rice (*Oryza Sativa* L.) Japonica cv. Ilmi, *Agrobacterium Tumefaciens* strains LBA4404, plasmid pBin-AtBI-1-GFP, media MS-basal (Murashige Skoog), hormone (2,4 D; Kinetin; NAA), LB Broth, Antibiotic (Streptomycin, Kanamycin, and Rifapmycin),and PCR kit (Miniprep Qiagen).

The stages of this research were : 1) Confirmation of the AtBI-1 gene-GFP in *Agrobacterium Tumefaciens*::pBin-AtBI-1-GFP; 2) Preparation of *Agrobacterium Tumefaciens*; 3) Explant Preparation; 4) Isolation of DNA plant genomic 5) Preparation of GFP visualization transgenic rice leaves on the organ. The result of transformation can be known by The number of survival explant on media containing antibiotic kanamycin 50 ppm was 57%, and then we used PCR analyze and GFP analyze in trasgenic plants.

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat, nikmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi) dengan Judul “Respon Eksplan Kalus Tanaman Padi (*Oryza Sativa* L) Japonica cv. Ilmi pada Perlakuan Transformasi Gen Menggunakan *Agrobacterium Tumefaciens*” sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan Program Strata Satu (S1) pada Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember. Dalam proses penulisan skripsi ini penulis menyadari tidak terlepas dari bantuan dan kerjasama dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada:

1. Bapak S. Ito Wijiantoro, Mama Sulistyowati, Novwida, dan Yogi yang selalu memberikan doa serta dukungan, baik moriil maupun materiil.
2. Dr. Ir. Miswar, M.Si selaku Dosen Pembimbing Utama, Ir. Soetilah Hardjosoedarmo, MS selaku Dosen Pembimbing Anggota dan Ir. Irwan Sadiman, MP selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan bimbingan selama penulis melaksanakan penelitian dan penyusunan skripsi.
3. Dr. Ir. Slameto, MP, Mas Ubed dan Prof. Kyung-Min Kim yang telah membantu proses penelitian yang dilaksanakan oleh penulis.
4. Dr. Ir. Jani Januar, M. T. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
5. Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D., DIC selaku Ketua Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
6. Ir. Sigit Soeparjono, M.S., Ph.D selaku Ketua Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
7. Pengurus dan Staf di Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
8. Pejuang Tingkat Akhir 2008 (Clue, Siska, Bul2, Ayu, Derry, Herlia, Apis, Asfia, Aida) Perjuangan kita belum berakhir kawan!! Irwanto, Liris dan SeongKyu Oppa, terima kasih telah mendengarkan cerita selama penulisan ini,

serta teman-teman agroteknologi 2008 yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih atas kebersamaannya.

9. Keluarga Besar Kultur Jaringan Tanaman (Haikal, Noorita, Jazil, Via), Keluarga Lab Pembiakan Molekuler (Seulgi Eonni, Yejin Eonni, Jinheui eonni, GyuHo Oppa, GiHo Oppa, HoSeong Oppa, JeongHoon, Ara) serta teman - teman yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih dukungan dan semangatnya yang diberikan selama proses penelitian berlangsung.
10. Semua pihak yang telah membantu penyelesaian penelitian dan penulisan skripsi yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis memohon maaf apabila dalam penulisan skripsi ini masih terdapat beberapa kesalahan. Saran dan Kritik yang positif sangat kami harapkan untuk perbaikan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca, Amin.

Penulis

Jember, Mei 2013

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN	ii
HALAMAN PEMBIMBING	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
ABSTRACT	v
RINGKASAN	vi
SUMMARY	viii
KATA PENGANTAR	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan dan manfaat	3
1.3.1 Tujuan	3
1.3.2 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Padi Japonica (<i>Oryza Sativa</i> . L. spp. Japonica) cv.Ilmi	4
2.2 Kultur jaringan tanaman padi	6
2.3 Tranformasi gen dan <i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	7
2.4 Arabidopsis Bax Inhibitor (AtBI-1)	11
2.5 Hipotesis	13
BAB 3. METODOLOGI.....	14
3.1 Waktu dan tempat	14
3.2 Alat dan bahan	14
3.3 Metode pelaksanaan	14

3.3.1 Konfirmasi gen AtBI-1-GFP pada <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> ::pBin-AtBI-1-GFP	14
a. Kultur <i>Agrobacterium</i> :: pBin-AtBI-1-GFP	14
b. Isolasi AtBI-1-GFP dari <i>Agrobacterium</i> :: pBin- AtBI-1-GFP	15
c. Analisis PCR dan enzim restriksi pBin-AtBI-1-GFP	15
1) Analisis enzim restriksi pBin-AtBI-1-GFP	15
2) Analisis PCR	16
3.3.2 Persiapan <i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	17
3.3.3 Persiapan eksplan	17
3.3.4 Proses transformasi	18
a. Proses infeksi dan Co-cultivasi	18
b. Regenerasi tanaman	18
3.3.5 Isolasi DNA genomik tanaman hasil transformasi.....	18
3.3.6 Persiapan visualisasi GFP pada organ daun padi transgenik	19
3. 4 Parameter pengamatan	20
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 Konfirmasi plasmid	21
4.2 Induksi kalus	23
4.3 Infeksi dan Co-cultivasi kalus dengan <i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	25
4.4 Tahapan regenerasi dan seleksi	26
4.5 Perkembangan kalus menjadi planlet tak lengkap	29
4.6 Hasil Analisis PCR	31
4.7 Hasil Analisis GFP	32
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	33
5.1 Kesimpulan	33
5.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Susunan bahan yang digunakan pada pengujian menggunakan enzim retriaksi	16
3.2 Susunan bahan yang digunakan pada analisis PCR	16
3.3 Tabel komposisi media yang digunakan pada proses transformasi	17
4.1 Total kalus yang hidup pada media seleksi dan regenerasi setelah 3 minggu pencucian	29
4.2 Perkembangan kalus menjadi planlet tak lengkap (albino dan <i>white- green</i>) setelah satu bulan co-cultivation.....	30

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Perbedaan morfologi biji ketiga jenis padi.....	5
2.2 Perbedaan <i>penicle</i> dari ketiga jenis padi	5
2.3 Bagian <i>Agrobacterium Tumefaciens</i>	8
2.4 Proses transfer T-DNA dari <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> ke sel tanaman	9
2.5 Mekanisme AtBI-1 (BI-1) dalam mengontrol kematian sel (PCD) pada tingkatan sel	12
3.1 Kalus yang siap digunakan untuk eksplan transformasi	18
4.1 Konstruksi plasmid pbin19 sebelum diligasi dengan gen pBIN- AtBI-1- GFP	21
4.2 konstruksi plasmid pbin19 setelah diligasi dengan gen pBIN- AtBI-1-GFP menjadi pBIN- AtBI-1-GFP	22
4.3 Hasil pemotongan dengan enzim restriksi menggunakan enzim <i>Sma</i> I dan <i>Eco</i> RI	23
4.4 Perkembangan kalus selama 35 hari	24
4.5 Tahap Co-cultivasi	26
4.6 Perkembangan kalus pada media seleksi dan regenerasi	28
4.7 Tipe perkembangan kalus menjadi planlet tak lengkap	30
4.8 Hasil analisis PCR.....	31
4.9 Gambar luminescent daun.....	32

DAFTAR SINGKATAN

PCI	= <i>Pika Callus Induction</i>
PIL	= <i>Pika Infection Liquid</i>
PB	= <i>Pika Broth</i>
PCo	= <i>Pika Co-Cultivation</i>
PSR	= <i>Pika Selection and Regeneration</i>
PA	= <i>Pika Acclimatitation</i>
MS	= <i>Murashige and Skoog</i>
LB	= <i>Luria-Bertani Broth</i>
2,4 D	= <i>2,4 Dichlorophenoxyacetic acid</i>
NAA	= <i>Naftalen Asam Asetat</i>

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Komposisi media yang digunakan pada proses Transformasi.....	34
B. Komposisi media media Murashige-Skoog	35
C. Komposisi media LB-Broth	36