

**ISOLASI DAN PENGKLONAN PROMOTER GEN *lea3* YANG
TERINDUKSI KEKERINGAN DARI TANAMAN PADI (*Oryza sativa* L.)
LOKAL INDONESIA KULTIVAR ROJOLELE DAN BATUTEGI**



KINASIH PRAYUNI

0304040443



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN BIOLOGI

DEPOK

2008

**ISOLASI DAN PENGKLONAN PROMOTER GEN *lea3* YANG
TERINDUKSI KEKERINGAN DARI TANAMAN PADI (*Oryza sativa* L.)
LOKAL INDONESIA KULTIVAR ROJOLELE DAN BATUTEGI**

**Skripsi diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains**

Oleh:

KINASIH PRAYUNI

0304040443



DEPOK

2008

SKRIPSI : ISOLASI DAN PENGKLONAN PROMOTER GEN *lea3*
YANG TERINDUKSI KEKERINGAN DARI TANAMAN
PADI (*Oryza sativa* L.) LOKAL INDONESIA KULTIVAR
ROJOLELE DAN BATUTEGI

NAMA : KINASIH PRAYUNI

NPM : 0304040443

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, 11 DESEMBER 2008

Dr. SATYA NUGROHO

PEMBIMBING I

RETNO LESTARI, M.Si.

PEMBIMBING II

Tanggal lulus Sidang: 17 Desember 2008

Penguji I : Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. ()

Penguji II : Dr. Abinawanto ()

Penguji III : Dr. Andi Salamah ()



Fa inna ma'al usri yusraa, inna ma'al usri
yusraa

so truly with hardship comes ease,
truly with hardship comes ease

*Untuk Bapak & Ibu Tersayang
Akhirnya ku penuhi janji yang
seharusnya sudah kutepati*

KATA PENGANTAR

Alhamdulillahrabbi'l'amin, puji syukur penulis persembahkan kepada Allah SWT atas segala karunia dan nikmat yang tak terhingga, serta segenap kemudahan dan hikmah yang berharga dalam proses pembelajaran ini. Salawat dan salam senantiasa tercurah kepada Rasulullah SAW serta keluarga dan para sahabat.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Satya Nugroho selaku Pembimbing I dan Retno Lestari, M.Si. selaku Pembimbing II atas pengetahuan, bimbingan serta kesabaran, dan motivasi yang diberikan hingga tersusunnya skripsi ini. Terima kasih kepada Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc., Dr. Abinawanto, dan Dr. Andi Salamah untuk kritik, bantuan, dan saran yang membangun. Terima kasih juga kepada Dr. Luthfiralda Sjahfirdi, M. Biomed, selaku Penasehat Akademik atas bimbingan, semangat, dan motivasi untuk terus maju, serta kepada seluruh staf pengajar dan karyawan Departemen Biologi FMIPA UI atas bekal ilmu pengetahuan, bimbingan, dan bantuannya.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dr. Inez Hortense Slamet-Loedin selaku Pimpinan Kelompok Peneliti Padi, Biologi Molekuler LIPI, yang telah mengizinkan penulis melakukan penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler, Puslit Biotek LIPI, Cibinong. Terima kasih kepada Dr. Sigit Purwantomo, Agus Rachmat, M.Si, dan Yuli Sulistyowati, M.Si. yang telah memberikan ilmu, bantuan, dan dukungan selama penulis melakukan

penelitian. Terima kasih juga kepada Dini Nurdiani, M.Si. atas segenap ilmu, perhatian, bantuan, keceriaan, dan kasih sayang selama masa-masa sulit penelitian. Terima kasih pula untuk Bu Amy, Bu Nung, Bu Ida, Mba Dwi, Mba Anky, Mba Esther, Mba Fat, Mba Carla, Mba Enci, Mba Esti, Mba Yenni, Mba Ade, Mang Dadang, Mas Budi, Mas Opik, dan Bang Adi atas bantuan serta kekeluargaan yang diberikan selama penulis melakukan penelitian.

Terima kasih untuk Maria Swastika atas persahabatan, suka, dan duka yang kita lewati bersama selama penelitian. Terima kasih untuk Sisil, Afi, Eka, Femy, Elly, Fika, Ape, Radutz, Mariana, AE, Caki, dan Anshory untuk semangat, bantuan, dukungan, dan perhatian untuk penulis. Terima kasih kepada Baliveau '2004' untuk tawa, tangis, dan persahabatan yang indah. Terima kasih untuk Fadhlul Hadi Prabowo atas pengertian, perhatian, dukungan, dan semangat yang diberikan selama penulis menyusun skripsi.

Ucapan terima kasih istimewa penulis sampaikan untuk Ibu dan Bapak atas doa, cinta, kasih sayang, perhatian, pengertian, dan dukungan baik moril maupun materil. Untuk adik-adikku tersayang, Niar, Wiwit, dan Ajid atas dukungan dan keceriaan yang selalu diberikan. Hidup ini takkan indah tanpa kalian.

Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat dan membuka wawasan pengetahuan serta berguna untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

Penulis

2008

ABSTRAK

Promoter gen *late embryogenesis abundant 3 (lea3)* merupakan salah satu promoter terinduksi kekeringan pada tanaman. Penelitian bertujuan mengisolasi dan mengklona fragmen promoter gen *lea3* yang terinduksi kekeringan dari padi (*Oryza sativa* L.) kultivar lokal Indonesia Rojolele dan Batutegi dengan menggunakan kultivar Nipponbare sebagai acuan. Penelitian dilakukan di Puslit Biotek LIPI, Cibinong dan berlangsung selama 9 bulan (Maret–November 2008). Fragmen promoter gen *lea3* diamplifikasi secara *in vitro* dengan teknik PCR menggunakan primer LEAP F dan LEAP R yang menghasilkan pita berukuran ± 1.291 bp. Produk PCR kemudian diligasi dengan vektor plasmid pGEM-T *Easy* dan ditransformasi ke dalam *Escherichia coli* DH5 α dengan metode *heat shock*. Hasil penapisan biru putih menunjukkan adanya 19 koloni biru dan 761 koloni putih dari keseluruhan koloni yang tumbuh. Verifikasi dengan digesti menggunakan enzim *EcoRI* menunjukkan hasil positif mengandung sisipan fragmen promoter. Hasil BLASTN pada situs NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) menunjukkan bahwa sekuen hasil klonasi fragmen promoter gen *lea3* dari ketiga kultivar memiliki similaritas 99% dengan sekuen acuan promoter gen *HVA-like* dari kultivar IRAT 109 (GenBank Acc. No. DQ837728). Similaritas yang tinggi menunjukkan keberhasilan proses isolasi dan pengklonaan promoter gen *lea3*.

Kata kunci: batutegi; gen *lea3*; kekeringan; padi; pengklonaan;
promoter terinduksi; rojolele

xi + 109 hlm.; gbr; lamp.; tab.

Bibliografi: 57 (1987--2008)



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
ABSTRAK.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Tanaman padi (<i>Oryza sativa</i> L.).....	5
1. Karakteristik dan klasifikasi tanaman padi.....	5 6
2. Budidaya tanaman padi.....	7
3. Tanaman padi kultivar Rojolele subspecies Javanica dan Batutegi subspecies Indica.....	8 8 8
B. Promoter.....	9
1. Definisi dan karakteristik promoter.....	9
2. Tipe-tipe promoter.....	9
a. Promoter konstitutif.....	9
b. Promoter sintetik.....	10

c. Promoter terinduksi.....	10
d. Promoter jaringan spesifik.....	11
C. Promoter gen <i>late embriogenesis abundant 3 (lea3)</i>	13
D. Cekaman kekeringan.....	14
E. Teknik molekuler dan komponen yang digunakan dalam proses pengklonaan promoter gen <i>lea3</i>	14
1. Isolasi DNA genom.....	16
2. <i>Polymerase chain reaction (PCR)</i>	17
3. Enzim restriksi.....	18
4. Enzim ligase.....	19
5. Transformasi gen.....	20
6. Pengklonaan.....	22
7. Seleksi vektor rekombinan hasil pengklonaan.....	23
8. Elektroforesis gel.....	24
9. <i>Sequencing</i>	26
10. Program <i>basic local alignment search tool (BLAST)</i>	27
BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA.....	27
A. Lokasi dan waktu penelitian.....	27
B. Bahan.....	27
1. Sampel.....	27
2. <i>Buffer</i> isolasi DNA genom padi.....	28
3. Vektor proses pengklonaan.....	28

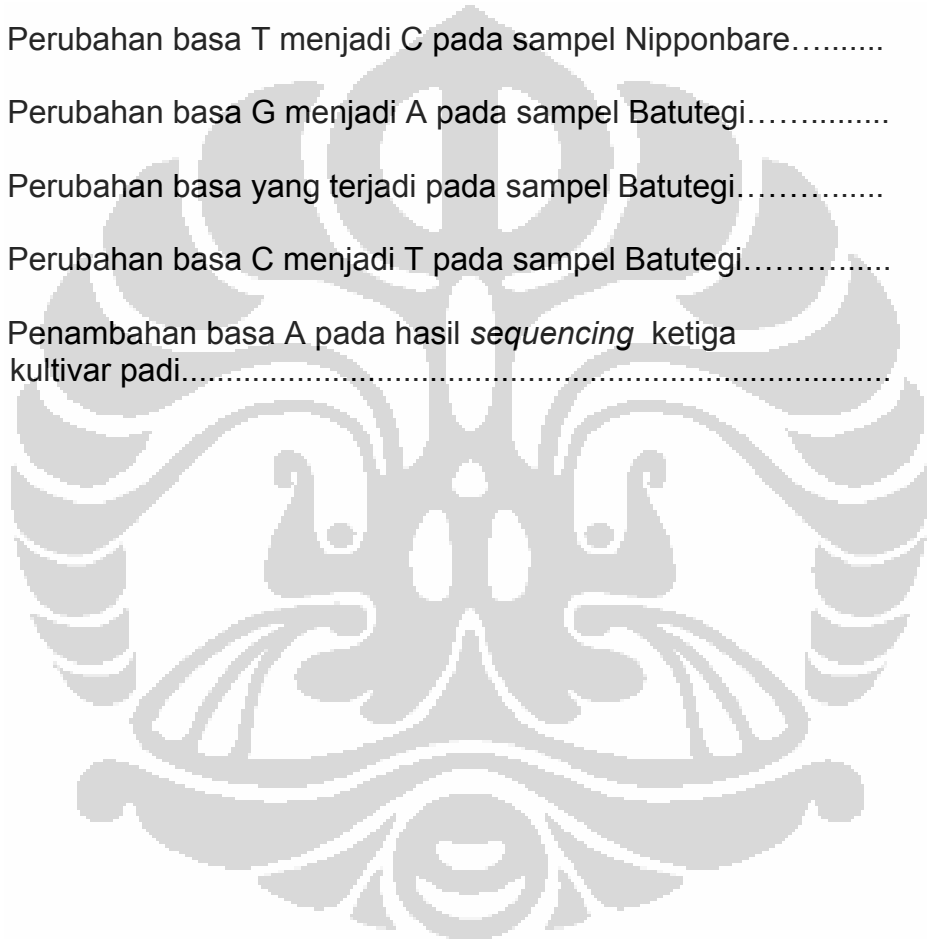
4. Primer.....	28
5. Larutan dan <i>buffer</i>	28
6. Kultur bakteri.....	28
7. Medium.....	28
8. Bahan kimia.....	29
C. Peralatan.....	30
D. Cara kerja.....	30
1. Penyejajaran sekuen dan desain primer.....	30
2. Isolasi DNA genom tanaman padi kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi.....	32
3. <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR) gradien dan PCR standar.....	34
4. Purifikasi DNA hasil PCR dengan <i>Illustra PCR DNA & Gel Band Purification kit</i>	35
5. Ligasi vektor pGEMT-Easy dengan promotor gen <i>lea3</i>	35
6. Pembuatan sel kompeten.....	36
7. Transformasi dengan <i>heat shock</i> , pengklonaan, dan seleksi hasil transforman.....	37
8. Isolasi DNA plasmid rekombinan.....	38
9. Verifikasi DNA plasmid rekombinan dengan proses digesti menggunakan enzim <i>EcoRI</i>	39
10. <i>Sequencing</i> dan analisis sekuen.....	40
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
A. Isolasi DNA genom padi (<i>Oryza sativa</i> L.) kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi.....	42

B. Amplifikasi promoter gen <i>lea3</i> dengan teknik PCR.....	46
C. Ligasi promoter gen <i>lea3</i> dengan vektor pGEM-T Easy dan transformasi plasmid rekombinan.....	48
D. Verifikasi plasmid rekombinan dengan digesti menggunakan enzim <i>EcoRI</i>	51
E. <i>Sequencing</i> dan analisis sekuen.....	57
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	57
A. Kesimpulan.....	58
B. Saran.....	
DAFTAR ACUAN.....	

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur organisasi promotor pada organisme prokariot.....	67
2. Struktur organisasi promotor pada organisme eukariot.....	67
3. Vektor pGEM-T Easy dan <i>multiple cloning site</i> (MCS).....	68
4. Tanaman padi yang digunakan dalam penelitian.....	69
5. Sekuen promotor gen <i>lea3</i> dengan penempelan primer <i>forward</i> dan <i>reverse</i> serta situs restriksi dan <i>start codon</i>	70
6. Skema alur kerja penelitian.....	71
7. Hasil elektroforesis isolasi DNA genom dari kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi.....	72
8. Hasil elektroforesis PCR fragmen promotor gen <i>lea3</i>	73
9. Hasil elektroforesis optimasi PCR dengan faktor pengenceran berbeda.....	74
10. Hasil elektroforesis purifikasi produk PCR fragmen promotor gen <i>lea3</i>	75
11. Koloni <i>E. coli</i> DH5 α hasil pengklonaan.....	76
12. Analisis restriksi sekuen vektor rekombinan.....	77
13. Perkiraan hasil digesti dengan <i>EcoRI</i>	78
14. Hasil elektroforesis verifikasi vektor rekombinan dengan digesti <i>EcoRI</i>	79
15. Elektroferogram sampel Rojolele <i>forward</i>	80
16. Elektroferogram sampel Rojolele <i>reverse</i>	81
17. Elektroferogram sampel Nipponbare <i>forward</i>	82

18. Elektroferogram sampel Nipponbare <i>reverse</i>	83
19. Elektroferogram sampel Batutegi <i>forward</i>	84
20. Elektroferogram sampel Batutegi <i>reverse</i>	85
21. Perubahan basa A menjadi G pada sampel Rojolele.....	86
22. Perubahan basa T menjadi C pada sampel Nipponbare.....	87
23. Perubahan basa G menjadi A pada sampel Batutegi.....	88
24. Perubahan basa yang terjadi pada sampel Batutegi.....	89
25. Perubahan basa C menjadi T pada sampel Batutegi.....	90
26. Penambahan basa A pada hasil <i>sequencing</i> ketiga kultivar padi.....	90



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data hasil uji spektrofotometri.....	92
2. Hasil pengamatan transformasi DNA plasmid rekombinan ke dalam sel <i>Escherichia coli</i> DH5 α	93

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi <i>buffer</i> isolasi metode Cornell University.....	95
2. Komposisi dan cara pembuatan larutan/ <i>buffer</i> yang digunakan dalam penelitian.....	96
3. Hasil penyejajaran primer LEAP F dan LEAP R dengan sekuen acuan BAC kromosom 5 kultivar Nipponbare dengan bantuan <i>software</i> DNAMAN.....	99
4. Penghitungan konsentrasi DNA untuk ligasi secara semikuantitatif.....	100
5. Hasil penyejajaran ganda antara sekuen acuan dan sampel kultivar Nipponbare, Rojolele, dan Batutegi dengan <i>software</i> DNAMAN.....	101
6. Hasil BLASTN sampel kultivar Rojolele, Nipponbare, dan Batutegi.....	104