

**ANALISIS INSERSI T-DNA PEMBAWA TRANSPOSON *Ac/Ds* PADA T0
DAN AKTIVITAS *Ds* PADA T1 TANAMAN PADI (*Oryza sativa* L.)
KULTIVAR NIPPONBARE**



MELINDA REMELIA

030404054Y



UNIVERSITAS INDONESIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN BIOLOGI

DEPOK

2008

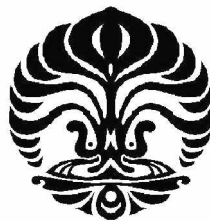
**ANALISIS INSERSI T-DNA PEMBAWA TRANSPOSON *Ac/Ds* PADA T0
DAN AKTIVITAS *Ds* PADA T1 TANAMAN PADI (*Oryza sativa* L.)
KULTIVAR NIPPONBARE**

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

Oleh :

MELINDA REMELIA

030404054Y



DEPOK

2008

SKRIPSI : ANALISIS INSERSI T-DNA PEMBAWA TRANSPOSON
Ac/Ds PADA T0 DAN AKTIVITAS *Ds* PADA T1 TANAMAN
PADI (*Oryza sativa* L.) KULTIVAR NIPPONBARE

NAMA : MELINDA REMELIA

NPM : 030404054Y

SKRIPSI INI TELAH DIPERIKSA DAN DISETUJUI

DEPOK, 30 JUNI 2008

Dr. SATYA NUGROHO
PEMBIMBING I

RETNO LESTARI, M.Si.
PEMBIMBING II

Tanggal Ujian Lulus Sidang Sarjana: 7 Juli 2008

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

Penguji II : Dr. Abinawanto

Penguji III : Dr. Andi Salamah

KATA PENGANTAR

Salam sejahtera di dalam kasih Tuhan. Segala puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus karena hanya atas anugerah, hikmat, dan kasih karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Satya Nugroho selaku Pembimbing I dan Retno Lestari, M.Si. selaku Pembimbing II yang telah memberikan banyak bimbingan, pengetahuan, bantuan, dan semangat selama penelitian berlangsung dan penyusunan skripsi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Abinawanto, Dr. Andi Salamah, dan Dr. Wibowo Mangunwardoyo, M.Sc. atas saran dan kritik yang membangun dalam perbaikan skripsi ini. Terima kasih pula kepada Dr. Luthfirda Sjahfirdi, M.Biomed, selaku Pembimbing Akademik yang telah banyak memberikan nasihat dan semangat, serta seluruh staf pengajar dan karyawan Departemen Biologi FMIPA UI yang telah memberi bantuan bagi penulis selama penyusunan skripsi ini.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Dr. Inez Hortense Slamet-Loedin selaku pimpinan Kelompok Padi, Biologi Molekuler LIPI, yang telah mengizinkan penulis melakukan penelitian di Laboratorium Biologi Molekuler, Puslit Biotek LIPI, Cibinong. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Amy Estiati, Dr. Sigit Purwantomo, Agus Rachmat, M.Si., dan Yuli Sulisetyowati, M.Si. yang telah memberikan informasi, bantuan, dan dukungan selama penulis melakukan penelitian.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Mba Anky, Mba Dwi, Mba Esther, Mba Enci, Mba Fat, Mba Dini, Mba Carla, Mba Yenni, Mba Ade, Mang Dadang, Mas Budi, Mas Opik, Pak Eman, dan Bang Adi atas segala bantuan serta kekeluargaan yang diberikan selama penulis melakukan penelitian. Terima kasih untuk teman seperjuangan di LIPI, Tika dan Ina serta untuk sahabatku Valentine, MM, Yossy, dan Sander yang telah memberikan banyak semangat dan bantuan suka maupun duka selama penulisan skripsi ini. Terima kasih pula untuk teman-teman Biologi 2004 "Baliveau", khususnya AE, Ape, Mariana, Toni, dan teman-teman di Laboratorium Genetika Biologi FMIPA UI.

Penulis ucapkan terima kasih kepada Mama, Bapak, Renat, Kak Butet, Inanguda Okto, dan Bapauda Tombos atas doa, pengertian, dukungan baik moril maupun materil. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi yang masih jauh dari sempurna ini, dapat berguna untuk penelitian-penelitian selanjutnya.

Penulis

2008

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan menganalisis DNA genom 118 generasi pertama (T0) dengan metode *Southern hybridization* dan 549 generasi kedua (T1) dengan metode PCR dan uji seleksi pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.) hasil transformasi T-DNA yang mengandung transposon *Ac/Ds* pembawa *activation tag*, melalui metode infeksi *Agrobacterium tumefaciens* L. dengan plasmid pMO22. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI, Cibinong selama 10 bulan (Agustus 2007--Mei 2008). Analisis *Southern hybridization* menunjukkan 9 dari 46 tanaman T0 mengandung *single copy* T-DNA. Generasi T1 yang diperoleh dari 9 parental (T0) yaitu sebanyak 549 tanaman. Analisis aktivitas transposon *Ds* pada 161 tanaman T1 dari 5 parental T0 dengan PCR eksisi menunjukkan 110 tanaman memiliki aktivitas transposon *Ds*. Keberadaan transposon *Ac/Ds* pada genom tanaman T1 dideteksi dengan penanda reporter gen *gfp*, *bar*, dan *hpt*. Uji GFP tidak berhasil mendeteksi gen *gfp* dalam transposon *Ds* karena ekspresi gen tersebut lemah. Uji seleksi basta dan uji higromisin pada 161 tanaman T1 dari 5 parental T0 menunjukkan 78 tanaman mutan yang mengandung transposon *Ds* stabil (tidak mengandung transposon *Ac*). Penelitian berhasil membuktikan sistem transposon *Ac/Ds* dapat digunakan untuk memperoleh populasi tanaman padi mutan yang mengandung transposon *Ds* stabil pembawa *activation tag*, dengan posisi yang berbeda-beda.

Kata kunci: *activation tag*; *Oryza sativa* L.; PCR eksisi; *Southern hybridization*; transposon *Ac/Ds*.

xi + 103 hlm.; gbr.; lamp.; tab.

Bibliografi: 54 (1987--2008)



DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
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
2. Budidaya tanaman padi	6
3. Tanaman padi kultivar Nipponbare	6
B. Transposon	7
1. Definisi dan karakteristik transposon	7
2. Tipe-tipe transposon	8
3. Transposon <i>Ac/Ds</i>	9
C. <i>Activation tag</i>	11
D. Penanda reporter gen dalam uji seleksi	12
1. Gen <i>gfp</i>	12
2. Gen <i>hpt</i>	13

3. Gen <i>bar</i>	13
E. Teknik-teknik biologi molekuler	14
1. Isolasi DNA	14
2. Spektrofotometri	18
3. Digesti dengan enzim restriksi DNA	18
4. Elektroforesis	19
5. <i>Southern hybridization</i>	23
6. <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	27
a. Definisi dan karakteristik teknik PCR	27
b. Komponen-komponen dalam PCR	28
c. Tahap-tahap dalam siklus PCR	29
d. Peranan primer dalam PCR	29
BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA	31
A. Lokasi dan waktu penelitian	31
B. Bahan	31
1. Sampel	31
2. Isolasi DNA	31
3. Primer	32
4. Larutan dan <i>buffer</i>	32
5. Bahan kimia	32
C. Peralatan	33
D. Cara Kerja	34

1. Isolasi DNA genom tanaman padi T0	34
2. Digesti DNA genom tanaman padi T0 dengan enzim restriksi	36
3. <i>Southern hybridization</i> dengan <i>probe hpt</i>	37
a. Elektroforesis DNA hasil ekstraksi pada gel agarosa	37
b. Pencucian gel dengan larutan depurinasi, denaturasi, dan netralisasi	38
c. Transfer pita DNA dari gel ke membran selama 18 jam	38
d. Isolasi fragmen <i>hpt</i> dari plasmid pTRA	39
e. Pembuatan <i>probe hpt</i>	41
f. Hibridisasi <i>probe hpt</i> terhadap membran selama 18 jam	41
g. <i>Expose</i> membran terhadap kertas film dan kaset	42
h. Pencucian film dengan larutan <i>developer</i> , <i>stopper</i> , dan <i>fixer</i>	42
4. Penanaman benih tanaman padi T1	43
5. Isolasi DNA tanaman padi T1	43
6. Pemeriksaan aktivitas transposon <i>Ds</i> pada tanaman padi T1 dengan metode PCR	44
7. Uji seleksi	45
a. Uji GFP	45
b. Uji higromisin	45
c. Uji basta	45

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	47
A. Isolasi DNA genom tanaman padi	47
B. Digesti DNA	48
C. Penentuan jumlah <i>copy</i> T-DNA dengan teknik <i>Southern hybridization</i>	49
D. Analisis aktivitas transposon <i>Ds</i> melalui teknik PCR eksisi	52
E. Analisis keberadaan transposon <i>Ac/Ds</i> dengan penanda reporter gen.....	56
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	61
A. Kesimpulan	58
B. Saran	58
DAFTAR ACUAN	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur transposon yang terdiri atas gen transposase dan diapit oleh <i>inverted repeat (transposable element)</i>	71
2. Mekanisme kerja sistem transposon <i>Ac/Ds</i>	71
3. Mekanisme kerja sistem <i>activation tag</i> terhadap suatu gen	72
4. Posisi pelekatan P1, P2, P3 pada PCR eksisi	72
5. Bagan alur kerja penelitian	73
6. Alur kerja <i>Southern hybridization</i>	74
7. Program PCR eksisi dengan <i>Thermal cycler</i> [Biometra T-Gradient]	74
8. Visualisasi DNA genom tanaman padi (<i>O.sativa</i>) dan DNA hasil digesti dengan <i>EcoRI</i>	75
9. Situs restriksi <i>EcoRI</i> pada konstruksi T-DNA pembawa transposon <i>Ac/Ds</i> yang mengandung <i>activation tag</i>	75
10. Situs restriksi <i>BamHI</i> pada plasmid pTRA dan visualisasi hasil digesti serta isolasi fragmen <i>hpt</i>	76
11. Penentuan jumlah <i>copy number</i> (jumlah salinan) T-DNA pada DNA genom tanaman T) dengan analisis <i>Southern hybridization</i>	77
12. Visualisasi hasil PCR eksisi dengan menggunakan primer P1, P2, dan P3 untuk mengetahui aktivitas transposon <i>Ds</i>	78
13. Pengamatan uji basta setelah tiga hari diberi perlakuan	79
14. Pengamatan uji higromisin setelah tiga hari diberi perlakuan	80

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data hasil isolasi dan digesti DNA genom tanaman padi (<i>O. sativa</i> L.) kultivar Nipponbare ras Japonica generasi pertama (T0)	82
2. Data hasil uji spektrofotometri pada 23 sampel DNA genom tanaman generasi pertama (T0)	84
3. Data jumlah salinan (<i>copy number</i>) T-DNA pada 46 sampel tanaman T0 berdasarkan analisis <i>Southern hybridization</i>	85
4. Data hasil uji PCR eksisi pada 161 sampel DNA tanaman generasi kedua (T1) dari 5 parental (T0)	86
5. Data hasil uji basta dan higromisin untuk menyeleksi tanaman mutan yang mengandung transposon <i>Ds</i> stabil pada 161 tanaman generasi kedua (T1) dari 5 parental (T0) ..	91

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi <i>buffer</i> isolasi metode Cornell	97
2. Komposisi <i>buffer</i> isolasi metode Van Heusden	98
3. Komposisi <i>buffer</i> PCR eksisi	100
4. Komposisi bahan kimia dan cara pembuatan larutan/ <i>buffer</i> yang digunakan dalam penelitian.....	101

