

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN DEKAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN TIM PENGUJI	iii
HALAMAN PENGESAHAN TIM PROMOTOR.....	iv
PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
INTISARI.....	xvii
ABSTRACT	xix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Permasalahan	6
C. Tujuan Penelitian.....	6
D. Keaslian Penelitian	7
E. Manfaat Penelitian.....	11
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	12
A. Deskripsi Tanaman Anggrek <i>Phalaenopsis amabilis</i>	12
A.1. Habitat <i>Phalaenopsis amabilis</i>	12
A.2. Morfologi <i>Phalaenopsis amabilis</i>	12
B. Penambahan senyawa organik kompleks terhadap perkecambahan biji anggrek	17
C. Embriogenesis Tanaman.....	19
D. Zat Pengatur Tumbuh	23
E. Transformasi Genetik Pada Tanaman Anggrek melalui <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
F. Regulasi Genetik Embriogenesis Tanaman	28
G. Struktur dan Fungsi Gen <i>RKD4</i> dalam Proses Embriogenesis.....	34
H. Ekspresi Gen Dengan Sistem Induksi Senyawa Kimia	37
I. <i>RNA sequencing</i>	42
I.1. Kontrol kualitas RNA hasil ekstraksi.....	42
I.2. <i>Library preparation</i>	44
I.3. Sekuensing (Illumina)	45
J. Landasan Teori	46

K. Hipotesis	49
BAB III METODE PENELITIAN	50
A. Lokasi dan Waktu Penelitian	50
B. Bahan	50
B.1. Bahan tanaman.....	50
B.2. Bakteri.....	51
B.3. Bahan kimia	52
C. Alat	54
D. Tahap Penelitian	55
E. Prosedur Kerja	58
E.1.Pembuatan medium.....	58
E.1.a. Medium perkecambahan biji	58
E.1.b. Medium induksi embriogenesis somatik.....	59
E.2.Perkecambahan biji dan pertumbuhan embrio anggrek <i>P. amabilis</i>	60
E.2.Induksi embriogenesis somatik pada macam eksplan <i>in vitro</i> anggrek <i>P. amabilis</i> dengan ZPT	61
E.3.a. Induksi embrio somatik	61
E.3.b. Pembuatan preparat anatomi embrio somatik	61
E.4.Induksi embriogenesis somatik anggrek <i>P. amabilis</i> dengan transformasi genetik	62
E.4.a. Kultur <i>Agrobacterium</i> strain EHA105 pembawa plasmid pTA7002 dan gen 35S::GR::AtRKD4.....	62
E.4.b. Konfirmasi gen <i>AtRKD4</i> pada plasmid pTA7002	63
E.4.c. Transformasi genetik pada protokorm <i>P. amabilis</i>	65
E.4.d. Deteksi transgen <i>AtRKD4</i> pada kandidat transforman	67
E.4.e. Perhitungan efisiensi transformasi.....	69
E.4.f. Induksi embrio somatik pada organ tanaman transforman dengan DEX.....	69
E.4.g. Pembuatan preparat anatomi embrio somatik	70
E.5. Analisis kemampuan pembentukan embrio somatik dan ekspresi transgen <i>AtRKD4</i> pada tanaman transgenik <i>P. amabilis</i>	70
E.6. Analisis RNA-sequencing tanaman transgenik <i>P. amabilis</i> pembawa transgen <i>AtRKD4</i> selama induksi.....	73
E.6.a. Isolasi RNA dan pengecekan integrasi RNA.....	73
E.6.b. <i>Library preparation</i>	74
E.6.c. RNA sequencing	80
E.6.d. Analisis data hasil sekuensing	81
E.6.e. Validasi dengan RT-PCR	82

E.7. Kloning dan ekspresi gen putatif <i>PRKD</i>	82
E.7.a. Penentuan kandidat gen putatif <i>PRKD</i>	82
E.7.b. <i>Gateway cloning</i> gen putatif <i>PRKD</i>	83
E.7.c. Transformasi plasmid γ -OLE yang mengandung insert gen <i>PRKD</i> pada <i>Agrobacterium</i>	88
E.7.d. Transformasi genetik <i>Arabidopsis thaliana</i> dengan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> pembawa plasmid pMDC7- OLE yang mengandung transgen <i>PRKD</i>	88
E.7.e. Seleksi kandidat tanaman transforman <i>Arabidopsis</i> yang membawa transgen <i>PRKD</i> terhadap induksi dengan estradiol.....	89
E.7.f. Induksi embriogenesis somatik tanaman transforman <i>Arabidopsis</i> yang membawa transgen <i>PRKD</i>	90
E.7.g. Pewarnaan Sudan Red 7B	90
F. Analisis Data.....	90
G. Bagan Alir Penelitian.....	91
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	93
A. Pengaruh pepton terhadap perkembangan embrio zigotik anggrek <i>P. amabilis</i>	93
B. Pengaruh ZPT terhadap induksi embriogenesis somatik pada berbagai eksplan <i>in vitro</i> anggrek <i>P. amabilis</i>	97
B.1. Penentuan konsentrasi thidiazuron (TDZ) yang tepat untuk menginduksi embriogenesis somatik.....	97
B.2. Pengaruh kombinasi TDZ dan auksin (NAA, 2,4-D, atau IAA) terhadap pembentukan embrio somatik.....	103
B.2.1. Pengaruh kombinasi TDZ dan NAA terhadap pembentukan embrio somatik	103
B.2.2. Pengaruh kombinasi TDZ dan 2,4-D terhadap pembentukan embrio somatik	105
B.2.3. Pengaruh kombinasi TDZ dan IAA terhadap pembentukan embrio somatik	107
C. Analisis transkriptomik tanaman transgenik <i>P. amabilis</i> yang mengekspresikan transgen <i>AtRKD4</i>	112
C.1. Transformasi genetik protokorm dengan <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i> strain EHA105 pembawa T-DNA 35S:: <i>GR</i> :: <i>AtRKD4</i>	112
C.2. Pertumbuhan tanaman transgenik <i>P. amabilis</i> pembawa transgen 35S:: <i>GR</i> :: <i>AtRKD4</i>	117
C.3. Penentuan konsentrasi <i>dexamethasone</i> yang tepat dan respon organ tanaman terbaik untuk induksi embriogenesis somatik..	119

C.4. Ekspresi transgen <i>AtRKD4</i> terhadap induksi embriogenesis somatik dengan Dex	125
C.5. Analisis RNA <i>sequencing</i> (RNA-seq) tanaman transgenik <i>P. amabilis</i> yang membawa transgen <i>AtRKD4</i> selama induksi embriogenesis somatik dengan Dex	128
C.5.1. Pengukuran kualitas RNA	128
C.5.2. cDNA <i>library preparation</i>	131
C.5.3. <i>Quality control</i>	132
C.5.4. Pemetaan <i>reads</i> terhadap genom referensi	134
C.5.5. <i>General clustering</i>	135
C.5.6. Analisis DEGs selama induksi embriogenesis somatik tanaman transgenik <i>P. amabilis</i> yang membawa transgen <i>AtRKD4</i> dengan Dex	137
C.5.7. Analisis DESeq2 dan <i>gene ontology</i> (GO)	140
C.5.8. Validasi hasil RNA-seq dengan RT-PCR	149
D. Kloning gen sintetik <i>Phalaenopsis RKD</i> (<i>PRKD</i>) dan ekspresinya pada tanaman <i>Arabidopsis</i>	153
D.1. Penentuan kandidat <i>PRKD</i>	153
D.2. <i>Gateway cloning</i> gen <i>PRKD</i>	156
D.3. Transformasi genetik pada tanaman <i>Arabidopsis thaliana</i>	160
D.4. Induksi embriogenesis somatik pada tanaman <i>Arabidopsis</i> pembawa transgen <i>PRKD</i>	163
BAB V PEMBAHASAN UMUM	165
BAB V SIMPULAN DAN SARAN	179
A. Simpulan	179
B. Saran	180
RINGKASAN	181
SUMMARY	185
DAFTAR PUSTAKA	189
LAMPIRAN	211

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Daftar penelitian perkecambahan biji anggrek dan induksi embriogenesis somatik pada anggrek <i>Phalaenopsis</i> dengan ZPT (TDZ dan NAA) dan transformasi genetik dengan penyisipan gen <i>AtRKD4</i> melalui <i>A. tumefaciens</i> dibawah sistem induksi senyawa glukokortikoid	9
2. Pengaruh pepton terhadap perkembangan embrio anggrek <i>P. amabilis</i> setelah 8 minggu kultur.....	96
3. Pengaruh berbagai konsentrasi TDZ terhadap pembentukan embrio somatik pada berbagai eksplan <i>P. amabilis</i>	98
4. Pengaruh kombinasi TDZ dan NAA terhadap pembentukan embrio somatik pada berbagai tipe eksplan anggrek <i>P. amabilis</i>	104
5. Pengaruh kombinasi TDZ dan 2,4-D terhadap pembentukan embrio somatik pada berbagai tipe eksplan anggrek <i>P. amabilis</i>	106
6. Pengaruh kombinasi TDZ dan IAA terhadap pembentukan embrio somatik pada berbagai tipe eksplan anggrek <i>P. amabilis</i>	107
7. Efisiensi transformasi genetik pada protokorm <i>P. amabilis</i>	117
8. Pengaruh variasi konsentrasi Dex terhadap pembentukkan embrio somatik pada berbagai eksplan tanaman transforman <i>P. amabilis</i> ..	120
9. Respon galur <i>P. amabilis</i> pembawa transgen <i>AtRKD4</i> terhadap induksi pembentukan embrio somatik.....	125
10. RIN total RNA tanaman transgenik dan non-transgenik <i>P. amabilis</i> yang diinduksi dan tidak diinduksi dengan Dex	130
11. Ukuran cDNA <i>libraries</i> tanaman transgenik dan non-transgenik yang diinduksi dan tidak diinduksi dengan Dex.....	132
12. Rata-rata <i>alignment</i> antar <i>libraries</i> tanaman transgenik dan non-transgenik <i>P. amabilis</i> yang diinduksi dan tidak diinduksi dengan Dex.....	135
13. Analisis DESeq2 pada sampel tanaman transgenik dan non-transgenik yang diinduksi dengan Dex.....	141
14. Daftar GO term gen-gen yang mengalami upregulasi dan downregulasi selama induksi Dex pada tanaman transgenik dan non-transgenik	147
15. Hasil pencarian blastp kandidat protein PRKD terhadap genom anggrek <i>P. equestris</i>	155

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi <i>P. amabilis</i>	17
2. Tahapan perkembangan embrio zigotik <i>Phalaenopsis</i>	20
3. Tahap perkembangan embrio somatik pada tanaman monokotil	22
4. Jalur regulasi genetik embriogenesis zigotik tanaman	31
5. Jalur regulasi genetik embriogenesis somatik tanaman.....	34
6. Regulasi molekular tahap elongasi dan pembelahan asimetrik zigot pada <i>Arabidopsis</i>	36
7. Sistem induksi glukokortikoid.....	41
8. <i>Output Agilent Bioanalyzer</i>	43
9. Alur kerja <i>Library prep</i>	44
10. Plantlet dan protokorm yang digunakan sebagai bahan eksplan	51
11. Konstruksi T-DNA plasmid.....	52
12. Bagan alir penelitian	92
13. Fase perkembangan biji anggrek <i>P. amabilis</i> secara <i>in vitro</i> pada medium dasar NO	95
14. Perkembangan embrio anggrek <i>P. amabilis</i> umur 8 minggu pada medium dengan penambahan variasi pepton.....	97
15. Tahap perkembangan embrio somatik <i>P. amabilis</i> pada eksplan potongan protokorm yang diinduksi dengan TDZ	100
16. Anatomi perkembangan embrio somatik <i>P. amabilis</i> pada eksplan batang.....	102
17. Tahap perkembangan embrio somatik <i>P. amabilis</i> pada eksplan akar, batang, daun, dan protokorm	110
18. Pertumbuhan tanaman transforman <i>P. amabilis</i> pembawa transgen <i>35S::GR::AtRKD4</i>	113
19. Deteksi transgen <i>AtRKD4</i> pada genom tanaman kandidat transforman <i>P. amabilis</i>	116
20. Grafik perbandingan pertumbuhan tanaman non-transgenik dan transgenik <i>P. amabilis</i> pembawa transgen <i>AtRKD4</i>	118
21. Pembentukan embrio somatik pada potongan eksplan daun, batang, dan akar tanaman transgenik <i>P. amabilis</i> yang membawa transgen <i>AtRKD4</i>	122
22. Struktur anatomi perkembangan embrio somatik pada batang tanaman transgenik <i>P. amabilis</i> yang membawa transgen <i>AtRKD4</i>	123

23. Konfirmasi keberadaan transgen <i>AtRKD4</i> pada tanaman transgenik pembawa transgen <i>35S::GR::AtRKD4</i> hasil induksi embrio somatik	124
24. Pembentukan embrio somatik pada daun galur tanaman transgenik <i>P. amabilis</i> pembawa transgen <i>AtRKD4</i> setelah 8 minggu induksi	126
25. Ekspresi transgen <i>AtRKD4</i> pada tanaman transgenik dan non-transgenik <i>P. amabilis</i>	127
26. Elektroforegram total RNA daun tanaman transgenik dan non-transgenik <i>P. amabilis</i> yang diinduksi dan tidak diinduksi dengan Dex.....	128
27. Elektroforegram total RNA hasil <i>Bioanalyzer</i>	129
28. Elektroforegram cDNA <i>libraries</i>	131
29. <i>Volcano plot</i> perbandingan ulangan untuk <i>quality control</i> dalam setiap kelompok.....	133
30. <i>Scree plot</i> PCA dari <i>libraries</i> daun tanaman transgenik dan non-transgenik yang diinduksi dan tidak diinduksi dengan Dex	136
31. <i>Heatmap distance matrix</i> profil ekspresi gen dari sampel daun tanaman transgenik dan non-transgenik yang diinduksi dan tidak diinduksi dengan Dex	137
32. <i>Heatmap</i> DEGs pada sampel tanaman transgenik dan non-transgenik yang diinduksi dan tidak diinduksi dengan Dex	139
33. <i>GO functional enrichment upregulated</i> DEGs pada tanaman transgenik dan non-transgenik yang diinduksi dengan Dex	149
34. Elektroforegram ekspresi gen pada tanaman transgenik dan non-transgenik yang diinduksi dengan Dex.....	150
35. Hasil MSA protein RKD dengan Multalin	153
36. Elektroforegram fragmen DNA gBlocks gen <i>PRKD</i> sepanjang 922 bp	157
37. Elektroforegram hasil PCR koloni <i>E. coli</i> TOP10.....	158
38. Pertumbuhan tanaman transforman <i>Arabidopsis</i> yang membawa transgen <i>PRKD</i>	162
39. Morfologi perkembangan embrio somatik pada tanaman transgenik <i>Arabidopsis</i> yang membawa transgen <i>PRKD</i>	163

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi medium <i>New Phalaenopsis</i> (Islam et al., 1998).....	211
2. Komposisi penyusun medium Murashige dan Skoog (Murashige dan Skoog, 1962)	212
3. Bahan kimia untuk isolasi plasmid bakteri dengan metode alkali lisis.....	213
4. Daftar urutan pasangan primer yang digunakan.....	214
5. Kombinasi perlakuan induksi embrio somatik	215
6. Hasil spektrofotometri sampel total RNA untuk analisis <i>RNA-sequencing</i>	217
7. Hasil Bioanalyzer sampel total RNA.....	218
8. Hasil Bioanalyzer cDNA <i>libraries</i> tanaman transgenik dan non-transgenik yang diinduksi dan tidak diinduksi Dex.....	230
9. Urutan asam amino kandidat protein PRKD hasil <i>multiple sequence alignment</i> (257 aa)	238
10. Hasil tblastn kandidat protein PRKD	239
11. Urutan gen <i>PRKD</i> (807 bp)	240
12. Urutan gen <i>PRKD</i> hasil optimasi genom <i>Arabidopsis</i> (922 bp).....	241
13. Hasil <i>alignment</i> plasmid pDONR207 yang mengandung insert gen <i>PRKD</i>	242
14. Hasil <i>alignment</i> plasmid pDONR207 yang mengandung insert gen <i>PRKD</i>	246

DAFTAR SINGKATAN

2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
AP2	: APETALA 2
AtRKD4	: Arabidopsis thaliana RWP-RK Domain 4
ARR	: Arabidopsis Response Regulator
BBM	: BABY BOOM
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
CaMV	: Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	: complementary DNA
CIM	: Callus Induction Medium
DEGs	: Differential Expressed Genes
Dex	: Dexamethasone
DNA	: Deoxyribose Nucleic Acid
dNTP	: deoxyribonucleotide triphosphate
ERF	: Ethylene Responsive Factor
GR	: Glucocorticoid Receptor
GRD	: GROUNDED
GO	: Gene Ontology
GVG	: GAL4 VP16 GR
HPT	: Hyfromycin Phosphotransferase
IAA	: Indole Acetic Acid
LB	: Luria Bertani
LEA	: Late Embryogenesis Abundant Protein
MAP	: Mitogen Activated Protein
MP	: Meristem Pucuk
MPK	: MAP Kinase
mRNA	: messenger Ribonucleic Acid
MS	: Murashige and Skoog
MSA	: Multiple Sequence Alignment
MST	: Minggu Setelah Tanam
NAA	: Napthalene Acetic Acid
NP	: New Phalaenopsis
NPP0	: New Phalaenopsis ditambah Pepton 0 g/L
NPP1	: New Phalaenopsis ditambah Pepton 1 g/L
NPP2	: New Phalaenopsis ditambah Pepton 2 g/L
NPP3	: New Phalaenopsis ditambah Pepton 3 g/L
NT	: Non-transgenik

PCA	: Principal Component Analysis
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PD	: Primordia Daun
PDF-1	: Protodermal Factor-1
PLB	: Protocorm Like Bodies
PRKD	: Phalaenopsis RKD
RAM	: Root Apical Meristem
RIN	: RNA Integrity Number
RNA	: Ribo Nucleic Acid
RNA-seq	: RNA-sequencing
rRNA	: ribosomal Ribo Nucleid Acid
RT-PCR	: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SAM	: Shoot Apical Meristem
T	: Transgenik
T-DNA	: Transfer-Deoxyribo Nucleic Acid
TBE	: Tris Boric Acid EDTA
TE	: Tris EDTA
TD	: Transgenic Dexamethasone
TDZ	: Thidiazuron
TM	: Transgenic Mock
WIND1	: WOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION1
WOX	: Wuschel Homeobox
WT	: Wild Type
WtD	: Wild Type Dexamethasone
WtM	: Wild Type Mock
ZPT	: Zat Pengatur Tumbuh