

DAFTAR ISI

	Hal.
Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan	iii
Pernyataan Bebas Plagiasi.....	iv
Prakata.....	v
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel	xii
Daftar Gambar.....	xiii
Daftar Lampiran	xvi
Daftar Arti Lambang dan Singkatan	xvii
Intisari	xix
<i>Abstract</i>	xxi
I. Pendahuluan.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Permasalahan	6
C. Tujuan Penelitian	7
D. Keaslian Penelitian	7
E. Manfaat.....	12
II. Tinjauan Pustaka	13
A. Tinjauan Pustaka.....	13
1. <i>Coffea</i> sp.: Sejarah, Habitat Pertumbuhan, Manfaat	13
2. <i>Coffea arabica</i> L. Klon Andungsari 2K (AS2K)	16
3. Pemuliaan <i>Coffea</i> sp.: Tujuan dan Batasan.....	18
4. Perbanyakan <i>in vitro</i> Embriogenesis Somatik	20
4.1. Gambaran Umum Embriogenesis Somatik <i>Coffea</i> sp.....	20
4.2. Konsep Umum Embriogenesis Somatik	21
4.3. Metode Tahapan Embriogenesis Somatik <i>Coffea</i> sp.....	22
5. Proses Pensinyalan Embriogenesis Somatik Tanaman	24
5.1. Embriogenesis Somatik Awal	24
5.2. Tahapan Perkembangan Embrio	25
5.3. Peran Zat Pengatur Tumbuh Selama Induksi Embriogenesis Somatik.....	26
5.4. Respon Gen Selama Induksi Embriogenesis Somatik	28
5.5. Faktor Transkripsi dan Transduksi Sinyal Yang Terlibat Dalam Embriogenesis Somatik.....	29
6. Transformasi Genetik dengan Perantara <i>A. Tumefaciens</i> pada <i>Coffea</i> sp.....	32
7. Regulasi Faktor Transkripsi <i>RKD4</i> dalam Embriogenesis	34
B. Landasan Teori.....	38
C. Hipotesis.....	42
III. Metode Penelitian.....	43
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	43
B. Alat.....	43
C. Bahan	44
1. Bahan Tanaman.....	44

2. Bahan Kimia	45
D. Rancangan Penelitian.....	47
E. Cara Kerja	48
1. Sterilisasi Eksplan Daun	48
2. Mikropropagasi Embriogenesis Somatik <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K dengan Metode Kultur Padat.....	48
2.1. Induksi Kalus	49
2.2. Diferensiasi Kalus Menjadi Embrio Somatik	49
2.3. Pertunasan dan Perakaran	51
2.4. Pembuatan Preparat Anatomi.....	52
2.5. Analisis Karakter Morfologis dan Histologis.....	53
2.6. Analisis Statistik.....	53
3. Mikropropagasi Embriogenesis Somatik <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K dengan Metode Kultur Padat-Cair.....	54
3.1. Induksi Kalus Embriogenik.....	54
3.2. Perkecambahan Embrio Somatik Menjadi Planlet.....	55
3.3. Analisis Statistik.....	57
4. Transformasi Genetik dengan <i>Gen AtRKD4</i>	58
4.1. Transformasi Genetik Pada Berbagai Eksplan <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K dengan Gen <i>AtRKD4</i> Dalam Konstruksi <i>35S::GR::AtRKD4</i>	59
4.1.1. Kultur <i>Agrobacterium</i> Strain EHA 105 Pembawa Plasmid pTA7002 dan Gen <i>35S::GR::AtRKD4</i>	59
4.1.2. Konfirmasi Gen <i>AtRKD4</i> Pada Plasmid pTA7002.....	59
4.1.3. Transformasi dan Regenerasi Planlet Transforman.....	60
5. Konfirmasi Integrasi Gen <i>AtRKD4</i> Pada Genom Kandidat Transforman <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K.....	61
5.1. Isolasi DNA Genom Kandidat Transforman dan Non-Transforman	61
5.2. Elektroforesis DNA Genom Kandidat Transforman dan Non-Transforman	62
5.3. Deteksi Integrasi Gen <i>AtRKD4</i> dan <i>HPT</i> Pada Genom <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K dengan PCR	62
5.4. Pengamatan Pertumbuhan Planlet Transforman	63
5.5. Induksi Embriogenesis Somatik Dengan Kombinasi 2,4-D dan BAP	63
5.6. Analisis Ekspresi Gen <i>35S::GR::AtRKD4</i> Pada <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K.....	64
5.7. Analisis Protein <i>AtRKD4</i> Pada Planlet Transforman <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K	66
6. Studi <i>In Silico</i> Fungsi Gen <i>RKD4</i> Pada <i>C. arabica</i> L. dan Tanaman Budidaya Lainnya	68
6.1. Identifikasi Sekuen Nukleotida Gen <i>RKD4</i>	68
6.2. Analisis Polimorfisme Gen <i>RKD4</i>	69
6.3. Analisis Kekerabatan Filogenetik	72
6.4. Analisis Struktur Gen dan Motif Protein <i>RKD4</i>	72

6.5. Analisis Fisikokimia.....	74
6.6. Permodelan Dua Dimensi dan Tiga Dimensi Protein RKD4.....	74
6.7. Analisis Elemen <i>cis-Acting</i> di Daerah Promoter.....	74
IV. Hasil dan Pembahasan	75
A. Perbanyakkan <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K Melalui Teknik Somatik Embriogenesis Secara Tidak Langsung dengan Metode Kultur Padat...	75
1. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Induksi Kalus.....	75
2. Karakteristik Pembentukan Kalus.....	78
3. Jenis Kalus Berdasarkan Analisis Morfologis dan Histologis.....	81
4. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Regenerasi Embrio Somatik.....	86
5. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Regenerasi Planlet	90
B. Perbanyakkan <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K Melalui Teknik Somatik Embriogenesis Secara Tidak Langsung dengan Metode Kultur Padat-Cair.....	96
1. Induksi Embriogenik Kalus	96
2. Perkecambahan Embrio Somatik Menjadi Planlet.....	102
C. Transformasi Genetik dengan Gen <i>35S::GR::AtRKD4</i> Pada <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K.....	107
1. Pengaruh Konsentrasi <i>A. tumefaciens</i> dan Asetosiringon Terhadap Jumlah Kopi Transforman Yang Dihasilkan.....	109
2. Pengaruh Lama Pra-Kultur Dalam <i>A. tumefaciens</i> Terhadap Efisiensi Transformasi Pada <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K	111
3. Pengaruh Durasi Ko-Kultivasi Terhadap Efisiensi Transformasi Pada <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K.....	113
4. Regenerasi dan Seleksi Eksplan Tahan Terhadap <i>Hygromycin-B</i>	115
5. Analisis Molekular Planlet Transforman	120
6. Induksi Embrio Somatik Langsung Dari Planlet Transforman.....	124
7. Analisis Ekspresi Transgen <i>AtRKD4</i> Terhadap Induksi Embrio Somatik.....	134
8. Deteksi Protein <i>AtRKD4</i> Pada Planlet Transgenik <i>C. arabica</i> L. Klon AS2K.....	136
D. Analisis <i>In Silico</i> Fungsi Gen <i>RKD4</i> Pada <i>C. arabica</i> L.	139
1. Analisis Polimorfisme Gen <i>RKD4</i>	139
2. Analisis Motif Protein RKD4	145
3. Analisis Karakterisasi Fisikokimia Pada Protein RKD4 Pada <i>C. arabica</i> L. dan Tanaman Budidaya Lainnya	153
4. Analisis Struktur Protein RKD4	154
5. Analisis Elemen <i>cis-Acting</i> di Daerah Promoter.....	159
V. Pembahasan Umum.....	162
VI. Simpulan dan Saran	171
A. Simpulan	171
B. Saran.....	172

Ringkasan.....	174
<i>Summary</i>	178
Daftar Pustaka	182
Lampiran	205

DAFTAR TABEL

	Hal.
Tabel 1. Daftar penelitian somatik embriogenesis <i>C. arabica</i> L. dan transformasi genetik dengan menggunakan gen <i>AtRKD4</i>	8
Tabel 2. Komposisi media induksi kalus dan media regenerasi embrio pada mikropropagasi embrio somatik <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	50
Tabel 3. Komposisi media pertunasan dan perakaran <i>C. arabica</i> L. klon AS2K hasil perbanyakan embriogenesis somatik	51
Tabel 4. Komposisi media kalus embriogenik <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	55
Tabel 5. Daftar urutan pasang primer	62
Tabel 6. Komposisi reaksi untuk sintesis rantai pertama cDNA	65
Tabel 7. Komponen reaksi PCR untuk deteksi gen <i>AtRKD4</i> , <i>HPT</i> dan <i>Actin</i>	66
Tabel 8. Daftar sekuen nukleotida gen <i>RKD4</i> <i>C. arabica</i> L. dan tanaman budidaya lainnya	70
Tabel 9. Pengaruh lima media kombinasi yang berbeda terhadap induksi kalus dari sepuluh bagian eksplan daun <i>C. arabica</i> L. klon AS2K.	97
Tabel 10. Pengaruh dua puluh protokol yang berbeda pada kultur <i>in vitro</i> perkecambahan embrio <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	103
Tabel 11. Optimasi berbagai faktor yang mempengaruhi transformasi genetik pada <i>C. arabica</i> L. klon AS2K terhadap frekuensi transformasi berdasarkan seleksi antibiotik 10 mg/L <i>Hygromycin-B</i> setelah 2 bulan kultur.....	112
Tabel 12. Efisiensi transformasi genetik pada <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	119
Tabel 13. Jumlah dan ukuran embrio somatik pada tahap inisiasi embrio somatik setelah 60 hari kultur pada planlet transforman dan non-transforman <i>C. arabica</i> L. klon AS2K...	129
Tabel 14. Jumlah fase perkembangan embrio somatik setelah 60 hari kultur pada planlet transforman dan non-transforman <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	129
Tabel 15. Perkecambahan embrio somatik menjadi planlet setelah 60 hari kultur pada planlet transforman dan non-transforman <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	130
Tabel 16. Deskripsi dan fungsi motif protein RKD4 <i>Coffea arabica</i> L. dan tanaman budidaya lainnya	151
Tabel 17. Karakterisasi fisikokimia pada protein RKD4 pada <i>C. arabica</i> L. dan tanaman budidaya lainnya.....	153

DAFTAR GAMBAR

	Hal.
Gambar 1. Distribusi negara penghasil <i>Coffea</i> sp. di dunia	15
Gambar 2. Peta persebaran <i>C. arabica</i> L. dan <i>C. canephora</i> di Indonesia.	15
Gambar 3. Biosintesis auksin selama induksi embriogenesis somatik	25
Gambar 4. Skema sistem embriogenesis somatik pada tanaman <i>Arabidopsis</i>	31
Gambar 5. Regulasi pemanjangan zigot dan pembagian asimetris pada tanaman <i>Arabidopsis</i>	37
Gambar 6. Konstruksi T-DNA 35S:: <i>GR</i> :: <i>AtRKD4</i> pada plasmid pTA7002/ EHA 105	45
Gambar 7. Berbagai bagian eksplan daun <i>Coffea arabica</i> L. untuk induksi kalus embriogenik	55
Gambar 8. Dua puluh protokol perkecambahan embrio pada berbagai fase subkultur, ukuran embrio dan media perkecambahan	57
Gambar 9. Pembentukan kalus embriogenesis somatik secara tidak langsung pada <i>C. arabica</i> L. klon AS2K pada hari ke 56 setelah kultur di media CIM (<i>Callus Inducing Medium</i>).....	76
Gambar 10. Persentase pembentukan kalus embriogenesis somatik secara tidak langsung pada <i>C. arabica</i> L. klon AS2K pada hari ke 14, 28, 42 dan 56 setelah kultur di media CIM (<i>Callus Inducing Medium</i>).	77
Gambar 11. Karakteristik pembentukan kalus <i>C. arabica</i> L. klon AS2K berdasarkan letak (seluruh tepi daun dan bagian tertentu daun) dan tipe pertumbuhan kalus (rendah, sedang, dan tinggi) pada 14, 28, 42, dan 56 hari setelah kultur pada media CIM (<i>Callus Inducing Medium</i>).	79
Gambar 12. Karakteristik pembentukan kalus <i>C. arabica</i> L. klon AS2K berdasarkan struktur (morfogenik dan non-morfogenik) dan warna kalus (kecoklatan, krem, dan keputihan) pada 14, 28, 42, dan 56 hari setelah kultur pada media CIM (<i>Callus Inducing Medium</i>).....	80
Gambar 13. Tiga jenis struktur kalus yang diinduksi dari eksplan daun <i>C. arabica</i> L. klon AS2K yang dikulturkan pada media CIM (<i>Callus Inducing Medium</i>).....	82
Gambar 14. Histologis pembentukan kalus primer pada ruas daun <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	85
Gambar 15. Karakteristik histologis dan morfologis embriogenesis somatik secara tidak langsung pada <i>C. arabica</i> L. klon AS2K.	87
Gambar 16. Jumlah berbagai tahapan perkembangan embrio somatik pada <i>C. arabica</i> L. klon AS2K pada hari ke 60 dan 90 setelah kultur di media ERM (<i>Embryo Regeneration Medium</i>).....	88
Gambar 17. Jumlah akar dan tunas pada planlet <i>C. arabica</i> L. klon AS2K pada hari ke 14, 28, 42, 56, 70, 84 hari setelah kutur pada media SRM (<i>Shooting and Rooting Medium</i>)	92
Gambar 18. Regenerasi planlet dari embrio berkotiledon pada media	

	kombinasi yang berbeda setelah kultur 84 hari	94
Gambar 19.	Karakteristik histologis dan morfologis tahapan perkembangan embrio pada <i>C. arabica</i> L. klon AS2K fase globular, hati, torpedo dan kotiledon.	95
Gambar 20.	Tahapan proses perbanyakan <i>C. arabica</i> L. klon AS2K melalui teknik embriogenesis somatik secara tidak langsung dengan menggunakan eksplan daun	96
Gambar 21.	Bi-plot dengan komponen PCA pertama dan kedua berdasarkan frekuensi induksi kalus dari sepuluh bagian eksplan daun yang berbeda	101
Gambar 22.	Bi-plot dengan komponen pca pertama dan kedua terhadap parameter pengamatan seperti persentase akar, panjang akar, panjang hipokotil, kotiledon terbuka dan persentase perkecambahan <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	106
Gambar 23.	Eksplan yang digunakan dalam transformasi genetik dengan gen <i>35S::GR::AtRKD4</i> pada <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	108
Gambar 24.	Seleksi <i>C. arabica</i> L. klon AS2K hasil transformasi genetik pada media seleksi dengan antibiotik <i>Hygromycin-B</i>	116
Gambar 25.	Seleksi <i>C. arabica</i> L. klon AS2K hasil transformasi genetik setelah tiga bulan pada media seleksi dengan antibiotik <i>Hygromycin-B</i>	117
Gambar 26.	Regenerasi planlet transforman <i>C. arabica</i> L. klon AS2K.....	120
Gambar 27.	Deteksi integrasi gen <i>AtRKD4</i> , <i>HPT</i> dan <i>Actin</i> dalam genom planlet transforman dan non-transforman <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	123
Gambar 28.	Tahapan induksi embrio somatik langsung setelah 60 hari kultur pada planlet transforman <i>C. arabica</i> L. klon AS2K	126
Gambar 29.	Grafik perbandingan percepatan inisiasi induksi embrio somatik dan persentase induksi embrio somatik planlet transforman dan non-transforman <i>C. arabica</i> L. klon AS2K...	127
Gambar 30.	Pembentukan embrio somatik pada planlet transforman dan non-transforman <i>C. arabica</i> L. klon AS2K...	132
Gambar 31.	Konfirmasi keberadaan transgen <i>AtRKD4</i> pada planlet transforman pembawa transgen <i>35S::GR::AtRKD4</i> hasil induksi embrio somatik	133
Gambar 32.	Ekspresi transgen <i>AtRKD4</i> , <i>HPT</i> dan <i>Actin</i> pada planlet transgenik dan non-transgenik <i>C. arabica</i> L. klon AS2K yang diinduksi dengan 1 mg/L 2,4-D dan 1 mg/L BAP.....	135
Gambar 33.	SDS PAGE protein daun (protein total) pada planlet transgenik dan non-transgenik dengan menggunakan buffer ekstraksi	137
Gambar 34.	SDS PAGE protein daun (protein total) pada planlet transgenik dan non-transgenik tanpa menggunakan buffer ekstraksi	137
Gambar 35.	Pensejajaran nukleotida gen <i>RKD4</i> pada <i>C. arabica</i> L. dan tanaman budidaya lainnya menggunakan <i>software</i> Multalin ...	143

Gambar 36.	Analisis polimorfisme sekuen gen <i>RKD4</i> <i>C. arabica</i> L. dan tanaman budidaya lainnya	144
Gambar 37.	Sekuen pensejajaran protein <i>RKD4</i> <i>C. arabica</i> L. dan tanaman budidaya lainnya	147
Gambar 38.	Analisis filogenetik, ekson-intron gen <i>RKD4</i> dan motif protein <i>RKD4</i> pada <i>C. arabica</i> L. dan tanaman budidaya lainnya	149
Gambar 39.	Motif protein <i>RKD4</i> pada <i>C. arabica</i> L. dan tanaman budidaya lainnya.....	150
Gambar 40.	Struktur protein <i>RKD4</i> dua dimensi <i>C. arabica</i> L. dan tanaman lainnya.....	157
Gambar 41.	Struktur tiga dimensi protein <i>RKD4</i> <i>C. arabica</i> L. dan tanaman budidaya lainnya	158
Gambar 42.	Jumlah dan jenis elemen <i>cis-Acting</i> di setiap wilayah promotor <i>RKD4</i> <i>C. arabica</i> L. dan tanaman budidaya lainnya.....	160
Gambar 43.	Analisis elemen <i>cis-Acting</i>	161

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lampiran 1. Struktur plasmid pTA7002	205
Lampiran 2. Konfirmasi gen <i>AtRKD4</i> pada plasmid pTA7002	205
Lampiran 3. Kurva standar uji Bradford konsentrasi BSA versus absorbansi 595 nm	206
Lampiran 4. Komposisi buffer isolasi protein dengan metode SDS-PAGE.	206
Lampiran 5. Persamaan linear profil protein I	208
Lampiran 6. Persamaan linear profil protein II	209
Lampiran 7. Daftar komposisi media Murashige and Skoog	211
Lampiran 8. Deskripsi <i>C. arabica</i> L. klon AS2K berdasarkan SK Mentan No. 885/kpts/SR.120/5/2010	211
Lampiran 9. Komposisi media Luria Bertani (LB)	213

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
APS	: Ammonium persulfate
<i>AtRKD4</i>	: Arabidopsis thaliana RWP-RK Domain containing 4
BA	: 6-Benzyladenine
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BSA	: Bovine Serum Albumin
<i>CaMV</i>	: Cauliflower Mosaic Virus
cDNA	: Complementary DNA
CIM	: Callus Induction Medium
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	: Deoxyribonucleic acid
dNTP	: deoxyribonucleotide triphosphat
EtBr	: Ethidium Bromide
FAA	: Formalin - asam asetat glasial - alkohol absolut
GR	: Glucocorticoid Receptor
GRD	: GROUNDED
HCl	: Hydrochloric acid
HPT	: Hygromycin Phosphotransferase
LAF	: Laminar Air Flow
LB	: Luria Bertani
LGB	: Lower Gel Buffer
MS	: Murashige & Skoog
mRNA	: messenger Ribonucleic Acid
NAA	: Naphthalene Acetic Acid
NaClO	: Sodium hypochlorite
NaOH	: Sodium hydroxide
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NFW	: Nuclease Free Water
NT	: Non Transforman

PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCA	: Principal Component Analysis
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RHS	: Royal Horticultural Society
RNA	: Ribonucleic acid
RT-PCR	: Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RWPRK	: Faktor transkripsi yang tersusun atas asam amino arginin (R), triptofan (W), prolin (P), arginin (R), dan lisin (K)
SAM	: Shoot Apical Meristem
SDS	: Sodium Dodecyl Sulfate
T	: Transforman
T-DNA	: Transfer-Deoxyribose Nucleic Acid
TAE	: Tris-acetate-EDTA
TDZ	: Thidiazuron (1-phenyl-3-(thiadiazol-5-yl) urea)
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: Tetramethyl ethylenediamine
UGB	: Upper Gel Buffer
ZPT	: Zat Pengatur Tumbuh