

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUTAN	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iv
PRAKATA.....	v
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
ABSTRAK.....	xvi
<i>ABSTRACT</i>	xvii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	4
E. Ruang Lingkup Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
A. <i>Paphiopedilum primulinum</i> M. W. Wood & P. Taylor.....	6
B. Transformasi Genetik dengan Perantara <i>Agrobacterium</i>	11
C. Agroinfiltrasi dan Ekspresi Transien Gen.....	17
D. Gen Reporter	20
E. Strain <i>A. tumefaciens</i> untuk Transformasi Genetik.....	24

BAB III LANDASAN TEORI DAN HIPOTESIS	27
A. Landasan Teori.....	27
B. Hipotesis.....	29
BAB IV METODE PENELITIAN	30
A. Tempat dan Waktu Penelitian	30
B. Bahan dan Alat	30
C. Rancangan Penelitian	36
D. Prosedur Kerja.....	39
E. Analisis Data	52
BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	53
A. Morfologi Anggrek <i>P. primulinum</i> M. W. Wood & P. Taylor	53
B. Uji Kemurnian dan Seleksi Bakteri <i>A. tumefaciens</i> GV3101 pRI 101-AN:: <i>GFP</i>	58
C. Transformasi Genetik dengan Metode Agroinfiltrasi pada <i>P.</i> <i>primulinum</i>	70
D. Ekspresi Transien Gen <i>GFP</i> pada <i>P. primulinum</i> Kandidat Transforman	74
E. Pengaruh AS, Volume Injeksi, dan Densitas Bakteri, terhadap Ekspresi Transien Gen <i>GFP</i>	79
F. Efisiensi Transformasi Genetik dengan Metode Agroinfiltrasi	88
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	93
A. Kesimpulan.....	93
B. Saran.....	94
RINGKASAN	95
<i>SUMMARY</i>	96
DAFTAR PUSTAKA	97
LAMPIRAN.....	109

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Transformasi genetik anggrek dengan perantara <i>Agrobacterium</i>	14
Tabel 2.	Primer yang digunakan untuk deteksi T-DNA	34
Tabel 3.	Rancangan pengambilan data uji konfirmasi morfologi dan biokimia <i>A. tumefaciens</i> GV3101 pRI 101-AN:: <i>GFP</i>	36
Tabel 4.	Rancangan pengambilan data uji konfirmasi deteksi molekuler <i>A. tumefaciens</i> GV3101 pRI 101-AN:: <i>GFP</i>	37
Tabel 5.	Rancangan pengambilan data pengaruh densitas bakteri (OD ₆₀₀), penggunaan AS, dan volume suspensi bakteri yang diinjeksi terhadap efisiensi transformasi genetik	38
Tabel 6.	Rancangan pengambilan data pengaruh densitas bakteri (OD ₆₀₀), penggunaan AS, dan volume suspensi bakteri yang diinjeksi terhadap intensitas pendaran GFP pada kandidat transforman.....	39
Tabel 7.	Komposisi reagen dan kultur untuk reaksi PCR.....	43
Tabel 8.	Kondisi reaksi PCR untuk amplifikasi fragmen DNA <i>GFP</i> dan <i>NPTII</i>	43
Tabel 9.	Kondisi reaksi PCR untuk amplifikasi fragmen DNA <i>CaMV</i> dan sekuens internal pada beberapa posisi di T-DNA.....	43
Tabel 10.	Komposisi reagen untuk reaksi PCR DNA genom	51
Tabel 11.	Kondisi reaksi PCR untuk amplifikasi fragmen <i>GFP</i> , <i>NPTII</i> , <i>trnL-F</i> , dan <i>ACTIN</i>	51
Tabel 12.	Perbandingan warna media dengan <i>RHS Colour Chart</i>	63
Tabel 13.	Rangkuman hasil uji morfologi dan biokimia	66
Tabel 14.	Rekap hasil elektroforesis amplifikasi kultur bakteri.....	70
Tabel 15.	Deteksi fragmen <i>GFP</i> , <i>NPTII</i> , dan kontrol internal <i>trnL-F</i> + <i>ACTIN</i> pada kandidat transforman.....	90

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	<i>Paphiopedilum primulinum</i> M. W. Wood & P. Taylor).....	7
Gambar 2.	Skema tahapan utama transformasi genetik melalui <i>A. tumefaciens</i>	12
Gambar 3.	Struktur anatomi daun <i>P. amabilis</i> transforman di bawah cahaya UV dan diamati dengan mikroskop konfokal.....	19
Gambar 4.	<i>Aequorea aequorea</i> dan pendaran GFP	21
Gambar 5.	Struktur 3 dimensi dari GFP	22
Gambar 6.	Tahapan maturasi kromofor.....	23
Gambar 7.	Mekanisme transfer proton pada sistem kromofor sehingga terjadi pendaran warna hijau.....	24
Gambar 8.	Konstruksi plasmid pRI101-AN:: <i>GFP</i>	31
Gambar 9.	T-DNA pembawa konstruksi P35S:: <i>GFP</i> ::Tnos – Pnos:: <i>NPTII</i> ::Tnos	32
Gambar 10.	Peta fragmen sekuens internal pada beberapa posisi di T-DNA pembawa konstruksi P35S:: <i>GFP</i> ::Tnos – Pnos:: <i>NPTII</i> ::Tnos.....	42
Gambar 11.	Skema proses agroinfiltrasi dan pengamatan.....	47
Gambar 12.	Fragmen intergenik <i>trnL-F</i> pada DNA kloroplas tanaman.....	50
Gambar 13.	Habitus <i>Paphiopedilum primulinum</i> M. W. Wood & P. Taylor....	53
Gambar 14.	Bunga <i>Paphiopedilum primulinum</i> M. W. Wood & P. Taylor.....	56
Gambar 15.	Pengecatan Gram <i>A. tumefaciens</i> GV3101	59
Gambar 16.	Morfologi koloni bakteri.....	61
Gambar 17.	Perbandingan warna pada perlakuan penggunaan sumber karbohidrat yang berbeda.....	62
Gambar 18.	Hasil uji katalase menggunakan H ₂ O ₂	65
Gambar 19.	Kultur bakteri <i>A. tumefaciens</i> GV3101 pRI 101-AN:: <i>GFP</i> dan <i>A. tumefaciens</i> LB4404 tanpa plasmid.....	67

Gambar 20. Peta fragmen T-DNA dan elektroforegram hasil amplifikasinya pada <i>A. tumefaciens</i> GV3101 pRI 101-AN:: <i>GFP</i>	69
Gambar 21. Agroinfiltrasi pada <i>P. primulinum</i>	71
Gambar 22. Pengaruh injeksi pada planlet	74
Gambar 23. Ekspresi transien gen <i>GFP</i> pada daun <i>P. primulinum</i>	75
Gambar 24. Perbandingan ekspresi transien gen <i>GFP</i> pada daun <i>P. primulinum</i> transforman dan WT	76
Gambar 25. Diagram perbandingan intensitas pendaran per perlakuan	80
Gambar 26. Perbandingan intensitas pendaran pada masing-masing perlakuan pada hari ke-7	81
Gambar 27. Diagram pola intensitas pendaran selama 1 minggu pengamatan di masing-masing perlakuan	85
Gambar 28. Elektroforegram hasil amplifikasi fragmen <i>GFP</i> dan <i>NPTII</i> hari ke-1, 2, 3, dan 7 setelah agroinfiltrasi.....	89

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Desain Primer	109
Lampiran 2. Tabel perbandingan intensitas pendaran per perlakuan di hari ke-1 (24 jam); hari ke-2 (48 jam); hari ke-3 (72 jam); dan hari ke-7 (168 jam)	112
Lampiran 3. Analisis data statistik hari ke-1	113
Lampiran 4. Analisis data statistik hari ke-2	115
Lampiran 5. Analisis data statistik hari ke-3	117
Lampiran 6. Analisis data statistik hari ke-7	119
Lampiran 7. Tabel rekap signifikansi interaksi antar perlakuan di semua waktu pengamatan ekspresi transien gen <i>GFP</i>	121
Lampiran 8. Perbandingan intensitas pendaran pada masing-masing perlakuan pada hari ke-1, 2, dan 3	122

DAFTAR SINGKATAN

μl	: mikroliter
μM	: mikromolar
$\frac{1}{2}$ MS	: $\frac{1}{2}$ komponen makro dan mikro dari media Murashige dan Skoog
a.u.	: <i>arbitrary units</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
APG	: <i>Angiosperm Phylogeny Group's classification system</i>
AS	: <i>Acetosyringone</i>
C	: Celcius
<i>CaMV</i>	: <i>Cauliflower Mosaic Virus</i>
CITES	: <i>Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora</i>
cm	: centimeter
CR	: <i>Critically Endangered</i>
CTAB	: <i>Cetyl Trimethylammonium Bromide</i>
ddH ₂ O	: <i>double-distilled H₂O</i>
DNA	: <i>Deoxyribose Nucleic Acid</i>
dNTPs	: <i>deoxynucleotide triphosphates</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
GBIF	: <i>the Global Biodiversity Information Facility</i>
<i>GFP</i>	: <i>Green Fluorescent Protein</i>
<i>GUS</i>	: <i>β-glucuronidase</i>
IUCN	: <i>International Union for Conservation of Nature</i>
LAF	: <i>Laminar Air Flow</i>
LB	: <i>Luria-Bertani</i>
<i>LUC</i>	: <i>Luciferase</i>
M	: Molar
mdpl	: meter di atas permukaan laut
MES	: <i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>

ml	: milliliter
MM	: MES – MgCl ₂
mm	: millimeter
mM	: millimolar
MMA	: MES – MgCl ₂ - <i>Acetosyringone</i>
nm	: nanometer
<i>NPTII</i>	: <i>Neomycin Phosphotransferase II</i>
OD ₆₀₀	: <i>Optical Density</i> di panjang gelombang 600 nm
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLB	: <i>Protocorm-Like Bodies</i>
POWO	: <i>Plants of the World Online</i>
TAE	: <i>Tris-Acetate-EDTA</i>
T-DNA	: <i>Transfer-DNA</i>
TE	: <i>Tris-EDTA</i>
tRNA	: <i>transfer-Ribonucleic Acid</i>
WFO	: <i>World Flora Online</i>
WT	: <i>Wild Type</i>