

**Transformasi Genetik Gen Pembungaan *Hd3a* (Heading date 3a)
Pada Empat Kultivar Padi Hitam (*Oryza sativa* L.)**

Tesis

**Untuk memenuhi sebagian persyaratan
Mencapai derajat *Master of Biotechnology***

**Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana
Universitas Gadjah Mada**



Diajukan oleh:

**Resta Dewi Komala Sari
12/337525/PMU/7355**

Kepada

**PROGRAM STUDI BIOTEKNOLOGI
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS GADJAH MADA
YOGYAKARTA
2016**

TESIS

**Transformasi Genetik Gen Pembungaan *Hd3a* (Heading date 3a)
Pada Empat Kultivar Padi Hitam (*Oryza sativa* L.)**

Dipersiapkan dan disusun oleh:


Resta Dewi Komala Sari

12/337525/PMU/7355


Telah dipertahankan didepan Dewan Penguji
Pada tanggal 29 Juni 2016

Susunan Dewan Penguji

Pembimbing Utama,


Dr. Yekti Asih Purwestri, M. Sc.

Anggota Tim Penguji lain


Rani Agustina Wulandari, Ph. D.

Pembimbing Pendamping



Prof. Sukarti Moeljopawiro, Ph. D.

Pengelola Program Studi Bioteknologi


Dr. Ir. Donny Widiyanto, M. Sc.

Tesis ini diterima sebagai salah satu persyaratan
Untuk memperoleh gelas Master
Tanggal : 09 SEP 2016

Ketua Program Studi Bioteknologi


Dr. Ir. Donny Widiyanto, M.Sc.

NIP.19611031 198803 1 002

Mengetahui,
Wakil Direktur Bidang Akademik
Pengembangan dan Kerjasama
Sekolah Pascasarjana


Prof. Ir. Survo Purwono, MA. Sc., Ph. D.

NIP.19611119 198601 1 001

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.



ogyakarta, Juni 2016

Resta Dewi Komala Sari

12/337525/PMU/7355

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah Subbanahu wa Ta'ala atas rahmat yang telah diberikan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan pembuatan naskah tesis yang berjudul **Transformasi Genetik Gen Pembungaan *Hd3a* (Heading date 3a) Pada Empat Kultivar Padi Hitam (*Oryza sativa L.*)** sebagai syarat untuk memenuhi mata kuliah wajib. Penelitian ini dilaksanakan di Laboraturium Rekayasa Genetika PAU Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada pada bulan Mei 2013 sampai mei 2016. Untuk itu, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Dr. Yekti Asih Puwestri, M.Sc selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah dengan sabar membimbing, mengarahkan dan memberi masukan selama penelitian dan penyusunan naskah tesis.
2. Prof. Sukarti Moeljoprawiro, M.App.Sc., Ph.D selaku Pembimbing Pendamping yang telah dengan sabar membimbing, dan memberi motivasi selama penelitian dan pengujian berlangsung.
3. Ibu Rani Agustina Wulandari, Ph.D selaku dosen penguji yang telah bersedia menguji dan memberikan arahan dan masukan untuk peningkatan kualitas penulisan tesis.
4. Dr. Ir. Donny Widiyanto, M.Sc selaku penguji dan pengelola Program Studi Bioteknologi yang telah bersedia memberi masukan dan arahan selama pengujian berlangsung.

5. Kedua Orang tua, Ibu tercinta (Rusmalana) & Ayah tersayang (Yanto), dan adik ku (Ardhy Pranata Yudha) serta keluarga besar lainnya yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu, yang selalu memberikan dukungan moril kepada penulis selama penelitian tesis.
6. Suamiku Ricky Nanda Prima Jamil, atas dukungan moral dan spiritual serta tenaga dan waktunya dengan penuh ketulusan dan tiada henti untuk selalu membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian dari awal perjalanan hingga akhir penulisan naskah ini.
7. Bapak Toni, selaku Laboran Laboratorium Rekayasa Genetika, PAU Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada yang telah membantu mengarahkan dan menyediakan fasilitas kepada penulis selama melaksanakan penelitian. Serta Pak Jono, Bu Arsiah, dan Bu Tri yang telah banyak membantu dalam menyediakan fasilitas dan motivator selama penelitian berlangsung.
8. Rekan, Sahabat Arung Desah, Nazera (era), dan Febri A. S. yang telah banyak membantu dalam penyusunan naskah ini, sahabat sesama peneliti di Laboratorium Rekayasa Genetika PAU, Sri Lestari, Dani Dwi Karlina, Dili, Mute, Mas egi, Mba isa, Margo yang telah memberikan semangat dan dukungan moril selama penulis melakukan penelitian.
9. Sahabat tersayang Ayu Meil, Pita, Lia, Adel, telah memberikan dukungan moril dan motivasi dalam menjalani penelitian ini.
10. Teman-teman Bioteknologi Angkatan 2012 yang terbaik dan teristimewa untuk semangat perjuangan yang kita lalui bersama.

11. Seluruh Staf dan Karyawan Program Pascasarjana Program Studi Bioteknologi atas dukungan dan kemudahan yang selalu diberikan kepada penulis.
12. Serta pihak-pihak yang telah membantu dalam penyusunan laporan ini yang tidak dapat penyusun tuliskan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan ini masih banyak terdapat kekurangan dan jauh dari sempurna. Untuk itu, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca sehingga dalam penyusunan tugas atau laporan yang sifatnya serupa agar dapat menjadi lebih baik lagi kedepannya. Demikian laporan penelitian tesis ini disusun, semoga laporan ini bermanfaat bagi pembaca dan pihak lain yang berkepentingan.

Yogyakarta, Juni 2016
Salam,

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN	xi
INTISARI	xii
ABSTRACT	xiii
I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	4
C. Tujuan penelitian	4
D. Manfaat Penelitian.....	5
E. Keaslian Penelitian	5
II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Padi Hitam (<i>Oryza sativa</i> L.)	6
1. Klasifikasi <i>Oryza sativa</i>	6
2. Morfologi Padi	7
B. Kalus.....	8
C. Medium	9
1. Medium MS	9
2. Medium N6.....	10
3. Zat Pengatur Tumbuh 2,4-D.....	11
D. Transformasi Gen <i>Hd3a</i>	12
1. Promoter <i>rolC</i>	12
2. Gen <i>Hd3a</i>	14
E. <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> sebagai mediator transformasi genetik	15
F. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	17
III. LANDASAN TEORI DAN HIPOTESIS	
A. Landasan Teori	20
B. Hipotesis	22
IV. METODE DAN PENELITIAN	
A. Tempat dan Waktu Penelitian	23
B. Alat dan Bahan Penelitian	23
1. Alat	23
2. Bahan.....	24
C. Cara kerja.....	25
1. Pembuatan Medium	25

a.	Medium N6	25
b.	Medium MS	26
c.	Medium MSL.....	27
d.	Medium N ₆ CO	27
e.	Medium Skrining I (MS ₂ D)	27
f.	Medium Skrining II (Re).....	28
g.	Medium LB	28
2.	Inisiasi Kalus	29
3.	Proses Transformasi Sel Kalus melalui <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
4.	Skrining I.....	30
5.	Skrining II.....	30
6.	Isolasi DNA genom kalus.....	30
7.	Deteksi keberadaan transgen <i>rolC::Hd3a-GFP</i> pada genom padi hitam	31
8.	Pengamatan Pertumbuhan Kalus.....	33
V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
A.	Respon pertumbuhan kalus dari padi hitam yang ditanam di medium MS dan N6	34
B.	Pertumbuhan kalus dari eksplan padi hitam Pakem, padi hitam Kulon Progo, padi hitam Indmira dan padi hitam Sleman pada medium N6.....	38
1.	Persentase pertumbuhan kalus padi hitam Pakem, Kulon Progo, Indmira dan Sleman pada medium N6.....	38
2.	Pertumbuhan Massa Kalus padi hitam Pakem, Kulon Progo, Sleman, dan Indmira.....	41
C.	Transformasi Gen <i>Hd3a</i> pada kalus embriogenik padi hitam Pakem, padi hitam Kulon Progo, padi hitam Indmira dan padi hitam Sleman dengan metode <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
D.	Analisis molekular untuk melihat keberadaan gen <i>Hd3a</i> hasil transformasi di dalam genom kalus padi hitam.....	47
VI.	SIMPULAN DAN SARAN	
A.	Simpulan	54
B.	Saran.....	54
VII.	DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	60

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Komposisi Medium MS	10
2. Komposisi Medium N6	11
3. Komposisi Reaksi PCR	32
4. Komposisi Medium MS dan Medium N6	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Struktur Kimia 2,4-D	12
2. Skema T-DNA yang menunjukkan posisi primer dan daerah yang diamplifikasi dengan primer spesifik gen pemicu pembungaan dan antibiotic selectable marker.	13
3. Skema gen penyandi pembungaan pada tanaman hari panjang dan hari pendek .	14
4. Peta vektor plasmid P2K1-Binary Vector dengan promotor rolC.	15
5. Morfologi luar biji padi hitam Pakem, padi hitam Kulon Progo, padi hitam Indmira dan padi hitam Sleman	24
6. Persentase pertumbuhan kalus padi hitam Pakem pada Medium MS dan N6.....	35
7. Laju pertumbuhan kalus padi hitam Pakem yang menggunakan medium berbeda MS dan N6.....	37
8. Pertumbuhan kalus padi hitam berbagai varietas menggunakan Medium N6.....	38
9. Laju pertumbuhan kalus pada empat varietas biji Padi Hitam.....	40
10. Pertumbuhan kalus dilihat dari masa kalus yang terbentuk pada padi hitam Pakem, Kulon Progo, Indmira, dan Sleman setiap minggu.	41
11. Pertumbuhan koloni tunggal bakteri <i>Agrobacterium tumefaciens</i> yang membawa plasmid p2K1-binary vector (<i>rolC::Hd3aGFP</i>) umur 48 jam	43
12. Hasil analisis PCR koloni <i>Agrobacterium tumefaciens</i> yang membawa konstruk gen <i>Hd3a</i> dengan panjang pita gen sepanjang 174 bp dan <i>HPT</i> dengan panjang pita gen sepanjang 455bp.....	44
13. Proses inkubasi pada saat inisiasi kalus padi hitam oleh bakteri <i>Agrobacterium tumefaciens</i> yang membawa gen <i>rolC::Hd3a-GFP</i> pada medium N ₆ CO selama 3 hari	46
14. Kalus padi hitam hasil transformasi pada medium MS ₂ D dengan antibiotik kanamisin dan hygromisin 50 mg/l.....	48
15. Kalus padi hitam non transforman. Pada medium MS ₂ D dengan antibiotik higromisin dan kanamisin (masing-masing 50 mg/L)..	49
16. Elektroforegram DNA hasil amplifikasi DNA genom kalus transforman.....	50
17. Kalus transforman padi hitam Sleman yang telah mengalami pertumbuhan Shoot (bagian yang dilingkari). Pertumbuhan kalus selama 2 minggu pada medium Regenerasi (Re).....	52

DAFTAR SINGKATAN

2,4-D	: 2,4 <i>Dichlorophenoxy Acetic Acid</i>
CIAA	: <i>Chloroform isoamyl alcohol</i>
CTAB	: <i>Cetyl trimethylammonium bromide</i>
DNA	: Deoxyribose Nucleic Acid
EtBr	: <i>Ethidium bromide</i>
<i>Hd3a</i>	: <i>Heading date 3a</i>
LAF	: Laminar Air Flow
LB	: Luria Bertani
MS	: Murashige and Skoog
N6	: <i>Chu</i> medium
PCR	: Polymerase Chain Reaction
Re	: Regenerasi
TBE	: Tris-Boric Acid-EDTA
TE	: Tris-EDTA