

SKRIPSI

**EFISIENSI TRANSFORMASI PLASMID pTA7002-*AtRKD4*
PADA *Agrobacterium tumefaciens* EHA105
DENGAN METODE *FREEZE THAW***

**Disusun oleh:
Fernando Prayogo Natanael
NPM: 130801401**



**UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
YOGYAKARTA
2017**

SKRIPSI

**EFISIENSI TRANSFORMASI PLASMID pTA7002-*AtRKD4*
PADA *Agrobacterium tumefaciens* EHA105
DENGAN METODE *FREEZE THAW***

**Disusun oleh:
Fernando Prayogo Natanael
NPM: 130801401**



**UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
YOGYAKARTA
2017**

PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Fernando Prayogo Natanael

NPM : 130801401

Judul Skripsi : EFISIENSI TRANSFORMASI PLASMID pTA7002-*AtRKD4*
PADA *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 DENGAN METODE
FREEZE THAW

Menyatakan bahwa skripsi dengan judul tersebut di atas adalah benar-benar merupakan hasil karya sendiri dan saya susun dengan sejujurnya berdasarkan norma akademik dan bukan merupakan hasil plagiat. Adapun semua kutipan di dalam skripsi ini telah saya sertakan nama penulisnya dan telah saya cantumkan ke dalam Daftar Pustaka.

Pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya dan apabila ternyata di kemudian hari ternyata saya terbukti melanggar pernyataan saya tersebut, saya bersedia menerima sanksi akademik yang berlaku (dicabut predikat kelulusan dan gelar kesarjanaan saya).

Yogyakarta, 13 Juni 2017

Yang menyatakan



Fernando Prayogo Natanael

130801401

PENGESAHAN

Mengesahkan Skripsi dengan Judul
EFISIENSI TRANSFORMASI PLASMID pTA7002-*AtRKD4* PADA
Agrobacterium tumefaciens EHA105
DENGAN METODE *FREEZE THAW*

yang dipersiapkan dan disusun oleh:

Fernando Prayogo Natanael

NPM: 130801401

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
Pada hari Selasa, 13 Juni 2017
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

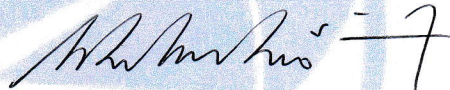
SUSUNAN TIM PENGUJI

Dosen Pembimbing Utama,

Anggota Tim Penguji



(Dr. E. Mursyanti, M.Si)



(Drs. B. Boy Rahardjo Sidharta, M. Sc)

Dosen Pembimbing Pendamping,



(Ir. Ign. Pramana Yuda, M.Si, Ph.D.)

Yogyakarta, 22 Juni 2017
UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI

Dekan,



Drs. B. Boy Rahardjo Sidharta, M. Sc

KATA PENGANTAR

Puji, hormat, dan syukur penulis sampaikan kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala limpahan berkat, hikmat dan Roh Kudus serta kasih karunia-Nya selama penelitian dan penulisan naskah skripsi sehingga penulis dapat menyelesaikannya dengan baik. Skripsi berjudul “Efisiensi Transformasi Plasmid pTA7002-*AtRKD4* Pada *Agrobacterium Tumefaciens* EHA105 Dengan Metode *Freeze Thaw*” disusun sebagai tugas akhir dan syarat kelulusan untuk menyelesaikan studi S-1 di Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Terlaksananya penelitian dan terselesaikannya naskah skripsi ini dengan baik tentunya atas bimbingan, dukungan serta bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dekan Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta yang telah memberikan izin dan dukungan kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian dan naskah skripsi ini.
2. Ibu Dr. E. Mursyanti, M. Si. selaku dosen pembimbing utama yang telah memberikan izin, ilmu, pengalaman, bimbingan, dukungan, saran, dan motivasi kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian dan naskah skripsi ini.
3. Bapak Ir. Ign. Pramana Yuda, M.Si, Ph.D. selaku dosen pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, diskusi, dukungan dan saran kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian dan naskah skripsi ini.
4. Bapak Drs. Bernardus Boy Rahardjo Sidharta, M.Sc., selaku dosen penguji yang telah banyak memberi saran, masukan, dan pemahaman bagi penulis dalam penyusunan naskah skripsi ini.

5. Keluarga penulis terkhusus mama Herrina, koko Denny Afrianto Natanael S. Kom., adik Cheristine Aprilia, Tua Tio, Tua I, koko Edi Susanto, cik Maya Damamain, Akou Kuitang, dan Dionysia Heviarie Primasiwi sekeluarga yang selalu memberikan doa, motivasi, semangat, nasehat serta dukungan kepada penulis untuk menyelesaikan penelitian dan naskah skripsi ini.
6. Ibu Brigitta Narindri yang telah memberikan masukan, diskusi, dukungan dan motivasi kepada penulis dalam melaksanakan penelitian.
7. Ko Markus Hendra yang telah memberikan masukan, dukungan dan motivasi kepada penulis agar berani mengambil molekuler sebagai topik penelitian.
8. Mbak Era, Mbak Ratna dan Pak Toni yang telah menyediakan waktu untuk berdiskusi mengenai penelitian yang dilakukan oleh penulis
9. Hermanto, Robert Fernando, Agustinus Candra, Garvin Candra, Bernardus Andy, kak Andrea Adyajati Kirana, Kak Vika Dhavesia, dan Kak Ade Irma Damayanti yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.
10. Teman-teman komsel “The Great Steel”, teman-teman “Musik Pujian Kids Impact”, serta teman-teman pelayan Tuhan di Kids Impact yang telah memberikan doa dan motivasi kepada penulis selama penelitian dan penulisan naskah.
11. Teman-teman “Sebut Saja FTB 2013” dan adik-adik “Koloni Tanpa Kontam 2014” yang telah memberikan dukungan, doa, dan warna selama masa studi dan penelitian penulis.

12. Aldwin, Surya, Hermanto, Robert, Ko Levin, Kak Tio serta teman-teman “Kos Ijo” lainnya yang telah mendukung serta memberikan warna-warni, canda tawa dan rasa kebersamaan selama penulis tinggal di kos.
13. Seluruh Dosen Fakultas Teknobiologi UAJY yang telah membagikan pengetahuan dan wawasan selama kuliah, Staf Tata Usaha Fakultas Teknobiologi UAJY yang telah banyak membantu urusan administrasi selama studi sarjana penulis, serta staff laboratorium khususnya Mbak F. R. Sulistyowati, Mas Albertus A. Adirianto, Mbak C. Puput, dan Mas Wisnu yang telah banyak memberikan bantuan selama pelaksanaan penelitian.
14. Personil “Vessel Band” yang telah memberikan dukungan, warna warni pertemanan dan telah berprestasi bersama dalam bidang musik selama studi di UAJY.

Penulis menyadari bahwa Skripsi ini bukanlah karya yang sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima kritik dan saran yang membangun penyempurnaannya. Semoga penelitian dan Skripsi ini dapat menginspirasi lahirnya penelitian-penelitian selanjutnya dan menjadi karya yang bermanfaat bagi masyarakat secara luas.

Yogyakarta, 3 Juni 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

Halaman judul	i
Halaman pengesahan.....	ii
Halaman pernyataan bebas plagiarisme	iii
Kata pengantar.....	iv
Daftar Isi.....	vii
Daftar Tabel.....	ix
Daftar Gambar	x
Daftar Lampiran	xii
Intisari.....	xiii
I. Pendahuluan	1
A. Latar Belakang	1
B. Keaslian Penelitian.....	3
C. Perumusan masalah.....	6
D. Tujuan Penelitian.....	6
E. Manfaat Penelitian.....	6
II. Tinjauan Pustaka	7
A. Deskripsi, Fungsi, dan Kegunaan Plasmid.....	7
B. Plasmid pTA7002-AtRKD4.....	9
C. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	11
D. Pola Pertumbuhan Bakteri pada <i>Batch Culture</i>	12
E. Transformasi Pada Bakteri <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	14

	Halaman
F. Efisiensi Transformasi.....	19
G. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) dan PCR Koloni	19
H. Elektroforesis	21
I. Hipotesis	23
III. Metode Penelitian.....	23
A. Waktu dan Tempat Penelitian	24
B. Alat dan Bahan	24
C. Rancangan Percobaan.....	26
D. Tahapan Pelaksanaan.....	27
IV. Hasil dan Pembahasan.....	40
A. Kemurnian <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105.....	40
B. Pola Pertumbuhan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	46
C. Konfirmasi Gen <i>AtRKD4</i> dan <i>HPT</i> pada Koloni <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 transforman dengan Metode PCR Koloni.....	48
D. Isolasi DNA plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> dari <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 transforman	48
E. Pengaruh Nilai OD ₆₀₀ Kultur <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 Terhadap Efisiensi Transformasi	53
F. Pengaruh Waktu Inkubasi pada Nitrogen Cair Terhadap Efisiensi Transformasi.....	61
V. Simpulan dan Saran.....	67
A. Simpulan.....	67
B. Saran.....	67
Daftar Pustaka	69
Lampiran	75

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Konsentrasi agarosa untuk pemisahan fragmen DNA dengan berbagai ukuran.....	23
Tabel 2. Perlakuan variasi nilai OD ₆₀₀ kultur terhadap efisiensi transformasi plasmid pTA 7002- <i>AtRKD4</i> ke dalam dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105.....	27
Tabel 3. Perlakuan variasi waktu inkubasi pada nitrogen cair terhadap efisiensi transformasi plasmid pTA 7002- <i>AtRKD4</i> ke dalam dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105.....	27
Tabel 4. Hasil uji kemurnian <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105.....	41
Tabel 5. Hasil Pengamatan Variasi Nilai OD ₆₀₀ Kultur <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 pada <i>Batch Culture</i>	47
Tabel 6. Hasil Pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA Plasmid.....	53
Tabel 7. Hasil DMRT Efisiensi Transformasi plasmid pTA 7002- <i>AtRKD4</i> ke dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 dengan variasi nilai OD ₆₀₀ kultur	56
Tabel 8. Hasil Efisiensi Transformasi plasmid pTA 7002- <i>AtRKD4</i> ke dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 dengan variasi waktu inkubasi dalam nitrogen cair.....	62

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur plasmid secara superkoil, tertutup kovalen, dan terbuka	7
Gambar 2. Struktur Plasmid pTA7002 (Sumber: Addgene, 2016).....	10
Gambar 3. Pola pertumbuhan bakteri dalam <i>batch culture</i>	13
Gambar 4. Pembuatan sel kompeten dengan menggunakan larutan CaCl ₂ dan proses transformasi.....	15
Gambar 5. Jalur transformasi pada bakteri Gram negatif	17
Gambar 6. T-DNA yang membawa konstruksi 35S::GAL4::AtRKD4::GR dalam plasmid pTA7002	25
Gambar 7. Hasil uji pertumbuhan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 pada medium LB cair, serta uji morfologi koloni pada medium LB agar petri dan medium LB agar tegak.....	40
Gambar 8. Sel <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 berbentuk <i>rods</i> dan berwarna merah.....	42
Gambar 9. Hasil uji fermentasi karbohidrat <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 dalam medium glukosa, sukrosa dan laktosa	43
Gambar 10. Reaksi pemecahan hidrogen peroksida (H ₂ O ₂) oleh enzim katalase pada uji katalase.....	44
Gambar 11. Hasil uji katalase <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105, terbentuk gelembung udara pada biakan.....	44
Gambar 12. Reaksi reduksi nitrat menjadi nitrit oleh enzim nitratase	45
Gambar 13. Hasil uji reduksi nitrat oleh <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 serta kontrol negatif medium nitrat.....	45
Gambar 14. Reaksi pembentukan senyawa azo dalam uji reduksi nitrat.....	46
Gambar 15. Grafik pola pertumbuhan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 pada <i>batch culture</i>	47

Gambar 16. Konfirmasi gen <i>AtRKD4</i> dan <i>HPT</i> pada <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 transforman dengan metode PCR Koloni.....	48
Gambar 17. Hasil elektroforesis plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i>	49
Gambar 18. Konfirmasi gen <i>AtRKD4</i> dan <i>HPT</i> pada hasil isolasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> dengan metode PCR.....	52
Gambar 19. Grafik pengaruh variasi nilai OD ₆₀₀ kultur terhadap efisiensi transformasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> ke dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105.....	57
Gambar 20. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105 transforman yang ditransformasi menggunakan metode <i>Freeze thaw</i> dengan variasi nilai OD ₆₀₀ kultur.....	58
Gambar 21. Konfirmasi gen <i>AtRKD4</i> pada koloni <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105 transforman yang ditransformasi menggunakan metode <i>Freeze thaw</i> dengan variasi nilai OD ₆₀₀ kultur	60
Gambar 22. Grafik pengaruh variasi waktu inkubasi dalam nitrogen cair terhadap efisiensi transformasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> ke dalam <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105	62
Gambar 23. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105 transforman yang ditransformasi menggunakan metode <i>Freeze thaw</i> dengan variasi waktu inkubasi dalam nitrogen cair	65
Gambar 24. Konfirmasi gen <i>AtRKD4</i> pada koloni <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105 transforman yang ditransformasi menggunakan metode <i>Freeze thaw</i> dengan variasi waktu inkubasi dalam nitrogen cair.....	66

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Jadwal Pelaksanaan Penelitian	75
Lampiran 2. Komponen Geneaid Presto™ Mini Plasmid Kit PDH 100.....	76
Lampiran 3. Pembuatan Gel Agarosa 1,4% dan Elektroforesis	77
Lampiran 4. Data Mentah Efisiensi Transformasi Plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> pada <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> EHA105 Menggunakan Metode <i>Freeze Thaw</i> dengan Variasi Nilai OD ₆₀₀ Kultur	78
Lampiran 5. Hasil ANAVA Efisiensi Transformasi Plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> Pada <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 Menggunakan Metode <i>Freeze Thaw</i> Dengan Variasi Nilai OD ₆₀₀ Kultur	79
Lampiran 6. Hasil DMRT Efisiensi Transformasi Plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> Pada <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 Menggunakan Metode <i>Freeze Thaw</i> dengan Variasi Nilai OD ₆₀₀ Kultur	80
Lampiran 7. Data Mentah Efisiensi Transformasi Plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> Pada <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 menggunakan metode <i>freeze thaw</i> dengan variasi waktu inkubasi dalam nitrogen cair.....	81
Lampiran 8. Hasil ANAVA Efisiensi Transformasi Plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> Pada <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA105 Menggunakan Metode <i>Freeze Thaw</i> Dengan Variasi Waktu Inkubasi Dalam Nitrogen Cair	82

INTISARI

Agrobacterium tumefaciens EHA105 merupakan salah satu strain yang sering digunakan sebagai perantara transformasi genetik untuk pembuatan tanaman transgenik. Salah satu langkah awal dalam pembuatan tanaman transgenik adalah menyediakan *Agrobacterium tumefaciens* yang mengandung DNA rekombinan. Transformasi DNA rekombinan ke *Agrobacterium tumefaciens* umumnya menggunakan metode *freeze thaw*. Penelitian ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* pada *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 menggunakan metode *Freeze thaw*. Optimasi dilakukan terhadap nilai OD₆₀₀ kultur *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 dan waktu inkubasi dalam nitrogen cair pada proses transformasi. Variasi nilai OD₆₀₀ kultur yang digunakan adalah 0,2 hingga 0,7; sedangkan variasi waktu inkubasi dalam nitrogen cair yang digunakan adalah 3 hingga 7 menit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai OD₆₀₀ kultur *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 yang paling optimum dalam proses transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* adalah 0,5; dengan efisiensi transformasi sebesar $3,39 \times 10^3$ CFU/ μ g. Waktu inkubasi dalam nitrogen cair yang paling optimum dalam proses transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* ke *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 adalah 5 menit; dengan efisiensi transformasi sebesar $2,40 \times 10^3$ CFU/ μ g. Keberhasilan proses transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* pada *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 dikonfirmasi dari hasil amplifikasi fragmen DNA dengan ukuran 380 bp yang merupakan gen *AtRKD4* menggunakan metode PCR koloni.