

SKRIPSI

**EFISIENSI TRANSFORMASI PLASMID pTA7002-*AtRKD4*
PADA *Escherichia coli* BL21(DE3) DENGAN METODE
KEJUTAN PANAS**

Disusun oleh :
Eunike Priscilla Tanio
NPM : 130801321



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

EFISIENSI TRANSFORMASI PLASMID pTA7002-*AtRKD4* PADA
Escherichia coli BL21(DE3) DENGAN METODE KEJUTAN
PANAS
HALAMAN JUDUL

SKRIPSI

Diajukan kepada Program Studi Biologi
Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta
Guna memenuhi sebagian syarat untuk memperoleh derajat S-1

Disusun oleh :
Eunike Priscilla Tanio
NPM : 130801321



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

PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Eunike Priscilla Tanio

NPM : 130801321

Judul Skripsi : Efisiensi Transformasi Plasmid pTA7002-*AtRKD4* pada
Escherichia coli BL21(DE3) dengan Metode Kejut
Panas

Menyatakan bahwa skripsi dengan judul tersebut di atas adalah benar-benar merupakan hasil karya saya 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, 12 Juli 2017

Yang menyatakan,



Eunike Priscilla Tanio

130801321

LEMBAR PENGESAHAN

Mengesahkan Skripsi dengan Judul:

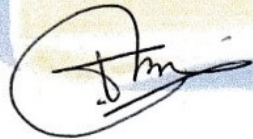
EFISIENSI TRANSFORMASI PLASMID pTA7002-*AtRKD4* PADA *Escherichia coli* BL21(DE3) DENGAN METODE KEJUTAN PANAS

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :
Eunike Priscilla Tanio
NPM : 130801321

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada hari Rabu, tanggal 12 Juli 2017
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

SUSUNAN TIM PENGUJI

Dosen Pembimbing Utama,




(Dr. E Mursyanti, M. Si)

Dosen Penguji,



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

Dosen Pembimbing Pendamping,



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

Yogyakarta, 31 Juli 2017

UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI

Dekan,



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

LEMBAR PERSEMBAHAN

Teruntuk kedua orangtua saya,
Teruntuk teman-teman saya,
Dan Teruntuk diri saya sendiri,

Perhargaan tertinggi dari kerja keras bukanlah pada apa yang Anda HASILKAN,
melainkan BAGAIMANA Anda BERKEMBANG karenanya

=Andrie Wongso=

Lihat, Aku mengutus kamu seperti domba ke tengah-tengah serigala, sebab itu
hendaklah kamu cerdik seperti ular dan tulus seperti merpati

=Matius 10 :18=

Jangan meremehkan dirimu sendiri. Dalam dirimu ada PEJUANG KUAT yang
mungkin belum pernah dilihat orang lain

=Whitehole Indonesia=

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas limpahan berkat dan kasih karunia-Nya kepada penulis sehingga skripsi berjudul “Efisiensi Transformasi Plasmid pTA7002-*AtRKD4* pada *Escherichia coli* BL21(DE3) dengan Metode Kejut Panas” dapat diselesaikan dengan baik. Penulisan skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains bagi mahasiswa S1 di Program Studi Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta.

Penyelesaian skripsi ini terlaksana dengan baik tentunya tidak lepas dari bimbingan, bantuan, dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Orang tua penulis, Bapak Hermanto dan Ibu Noni, serta adik penulis, Ester Abigail Tanio yang senantiasa memberikan dukungan doa dan semangat.
2. Universitas Atma Jaya Yogyakarta yang telah menjadi tempat penulis mengenyam pendidikan sarjana.
3. Dr. E. Mursyanti, M. Si., selaku dosen pembimbing utama, Ir. Ign. Pramana Yuda, M. Si, Ph. D. selaku dosen pembimbing pendamping, dan Drs. B. Boy Rahardjo Sidharta selaku dosen penguji yang senantiasa memberikan bimbingan dan pengarahan selama penelitian dan penulisan naskah skripsi.
4. Ibu Debbie Sofie Retnoningrum, Dr., Apt. dan rekan-rekannya dari Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung yang telah membantu dalam penyediaan bakteri *Escherichia coli* BL21(DE3).

5. Dr. Jose Gutteres-Marcos dari Warwick University yang telah membantu dalam penyediaan plasmid pTA7002-*AtRKD4*
6. Ibu Yuliana Reni Swasti, S. TP., M. TP. selaku kepala laboratorium tempat penulis melakukan penelitian.
7. Mbak Wati, Mbak Puput, Mas Antok selaku staf laboratorium tempat penulis melakukan penelitian.
8. Bapak/Ibu Dosen dan Staf TU yang telah memberikan doa dan semangat bagi penulis
9. Teman-teman 2013 tercinta : Krisna, Anjay We're Kecret (Via, Cinat, Sita), Geng Kecretss (Cifon, Her, Grace, Devina), Cesil, Atha, Novia, Lince, Ranti, dan yang lain yang tidak disebutkan selaku pendukung dan penyemangat serta teman satu lab bahkan satu penelitian selama penulis melaksanakan skripsi.

Penulis menyadari bahwa dalam skripsi ini masih memiliki beberapa kekurangan, sehingga penulis menerima kritik dan saran yang bersifat membangun dari semua pihak. Akhirnya, penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat pembacanya.

Yogyakarta, Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIARISME.....	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
LEMBAR PERSEMBAHAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
INTISARI.....	xv
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Penelitian	1
B. Keaslian Penelitian	3
C. Rumusan Masalah	6
D. Tujuan Penelitian.....	7
E. Manfaat Penelitian.....	7
II. TINJAUAN PUSTAKA	8
A. Pengertian, Fungsi, dan Manfaat Plasmid	8
B. Plasmid pTA7002 dan gen <i>AtRKD4</i>	10
1. Plasmid pTA7002	10
2. Gen <i>AtRKD4</i>	11
C. Kloning Gen	12
D. Transformasi Plasmid ke Sel Inang dan Efisiensi Transformasi.....	13
1. Transformasi plasmid	13
2. Efisiensi transformasi	16
E. <i>Escherichia coli</i> Strain BL21(DE3) Sebagai Sel Inang untuk Proses Transformasi.....	18
F. Kanamisin.....	25
G. Higmisin.....	26

	Halaman
H. Isolasi plasmid.....	27
I. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	30
J. PCR Koloni	32
K. Elektroforesis	33
L. Hipotesis.....	36
III. METODE PENELITIAN.....	37
A. Tempat Dan Waktu Penelitian	37
B. Sampel Penelitian.....	37
C. Alat dan Bahan	37
D. Rancangan Percobaan	39
E. Cara Kerja	40
1. Pembuatan dan sterilisasi medium serta antibiotik	40
2. Uji morfologi, biokimia dan deteksi molekuler <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	43
3. Pengaruh konsentrasi inokulum awal dan kecepatan agitasi terhadap laju pertumbuhan sel <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	47
4. Isolasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> dari <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..	48
5. Transformasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i>	50
6. Penentuan efisiensi transformasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i>	53
F. Analisis Data	54
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	55
A. Uji morfologi, biokimia dan deteksi molekuler <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	55
B. Pengaruh jumlah inokulum awal dan kecepatan agitasi terhadap laju pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	61
C. Isolasi Plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i>	63
D. Transformasi pTA7002- <i>AtRKD4</i> pada <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	65
E. Efisiensi transformasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> dengan <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) sebagai sel inang.....	69
V. SIMPULAN DAN SARAN	74

	Halaman
A. Simpulan.....	74
B. Saran.....	74
DAFTAR PUSTAKA	76
LAMPIRAN.....	82



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Mutasi yang dialami oleh <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	25
Tabel 2. Hubungan konsentrasi agarosa yang diperlukan untuk memisahkan fragmen DNA dengan ukuran tertentu.....	35
Tabel 3. Jenis primer dan susunan basa primer	39
Tabel 4. Rancangan acak faktorial efisiensi transformasi kejutan panas dengan variasi waktu dan suhu.....	40
Tabel 5. Pengaturan suhu dan waktu siklus PCR Gradien.....	46
Tabel 6. Pengaturan siklus PCR untuk deteksi gen <i>HPT</i> dan <i>AtRKD4</i>	50
Tabel 7. Hasil uji kemurnian <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	55
Tabel 8. Hasil pengukuran laju pertumbuhan <i>E. coli</i> BL21(DE3) pada OD ₆₀₀	61
Tabel 9. Hasil pengukuran absorbansi, kemurnian, dan konsentrasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i>	65
Tabel 10. Hasil uji beda nyata rerata efisiensi transformasi pTA7002- <i>AtRKD4</i> pada <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) ($\times 10^4$ CFU/ μ g)	70

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Struktur plasmid	8
Gambar 2. Plasmid dengan resistensi antibiotik	9
Gambar 3. Struktur plasmid pTA7002.....	11
Gambar 4. Struktur T-DNA yang membawa 35S::GAL4:: <i>AtRKD4</i> ::GR.....	12
Gambar 5. Transformasi kejutan panas.....	14
Gambar 6. Reaksi pemecahan glukosa oleh heksokinase	21
Gambar 7. Reaksi pemecahan laktosa oleh β -galaktosidase.....	21
Gambar 8. Reaksi pemecahan sukrosa oleh enzim fosfotransferase sukrosa.	22
Gambar 9. Reaksi hidrolisis pati	22
Gambar 10. Reaksi reduksi nitrat oleh nitrat reduktase	23
Gambar 11. Reaksi pengikatan SA dan NED dalam uji reduksi nitrat	23
Gambar 12. Reaksi pemecahan H ₂ O ₂ oleh katalase.....	24
Gambar 13. Struktur kimia kanamisin monosulfat	26
Gambar 14. Struktur kimia higromisin	27
Gambar 15. Reaksi dasar PCR.....	31
Gambar 16. Arah migrasi pada gel agarosa	33
Gambar 17. Grafik hubungan ukuran DNA terhadap mobilitas elektroforesisnya dengan variasi konsentrasi gel agarosa	36
Gambar 18. (a) Koloni tunggal dan (b) pengecatan Gram <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	56
Gambar 19. Uji katalase <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	57
Gambar 20. Uji motilitas bakteri.....	57
Gambar 21. Uji fermentasi karbohidrat <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	58
Gambar 22. Uji reduksi nitrat <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	59

	Halaman
Gambar 23. Hasil uji hidrolisis pati <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	59
Gambar 24. Hasil amplifikasi fragmen gen 22,4 pada <i>E. coli</i> BL21(DE3)	60
Gambar 25. Hasil pengukuran laju pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) ..	62
Gambar 26. Visualisasi hasil isolasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i>	64
Gambar 27. Visualisasi hasil deteksi molekuler plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i>	66
Gambar 28. Visualisasi hasil amplifikasi gen 22,4 dengan PCR koloni.....	67
Gambar 29. Seleksi hasil transformasi pada medium LB/Kan dan LB/Hig	68
Gambar 30. Visualisasi hasil amplifikasi gen <i>HPT</i> dengan PCR koloni	69
Gambar 31. Pengaruh suhu dan waktu kejutan panas terhadap efisiensi transformasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> menggunakan sel inang <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3).....	71

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Jadwal kegiatan penelitian.....	82
Lampiran 2. Perbanyak <i>Agrobacterium tumefaciens</i> EHA 105 yang mengandung plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i>	83
Lampiran 3. Perbanyak dan pembuatan kultur stok <i>E. coli</i> BL21(DE3)	84
Lampiran 4. Isolasi plasmid menggunakan Presto™ Mini Plasmid Kit	85
Lampiran 5. Perhitungan konsentrasi dan massa plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i>	87
Lampiran 6. <i>Raw Data</i> efisiensi transformasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i>	88
Lampiran 7. Hasil ANAVA efisiensi transformasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> menggunakan metode kejutan panas pada <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	89
Lampiran 8. Hasil DMRT efisiensi transformasi plasmid pTA7002- <i>AtRKD4</i> menggunakan metode kejutan panas pada <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	90

INTISARI

Transformasi plasmid ke dalam sel inang merupakan salah satu tahapan penting dalam teknik kloning gen dan umumnya menggunakan metode kejutan panas. Faktor yang dapat mempengaruhi transformasi kejutan panas adalah suhu dan waktu kejutan panas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suhu dan waktu kejutan panas terhadap transformasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* menggunakan *Escherichia coli* BL21(DE3). Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi uji morfologi, biokimia, dan molekuler *Escherichia coli* BL21(DE3), pengukuran laju pertumbuhan *E. coli* BL21(DE3) dengan variasi konsentrasi (1, 2, dan 3%, v/v) dan agitasi (170, 190, dan 220 rpm) selama 4 jam, isolasi plasmid pTA7002-*AtRKD4* dari *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, uji kemurnian dan kuantitas plasmid, deteksi keberadaan gen *HPT* dan *AtRKD4* dengan metode PCR pada plasmid, pembuatan sel kompeten, transformasi plasmid dengan metode kejutan panas menggunakan rancangan acak factorial dengan dua variabel, yaitu suhu (42°, 44°, dan 46°C) dan waktu (30, 60, 90, 120, dan 240 detik) kejutan panas dengan tiga ulangan, seleksi hasil transformasi menggunakan antibiotik kanamisin dan higromisin, dan penentuan serta analisis efisiensi transformasi pTA7002-*AtRKD4*. Hasil uji karakteristik bakteri menunjukkan bahwa bakteri uji menunjukkan sifat *Escherichia coli* BL21(DE3), yaitu dapat memfermentasi glukosa dan laktosa dan mereduksi nitrat, bersifat katalase positif, tidak dapat menghidrolisis pati dan fermentasi sukrosa, serta memiliki gen *22,4*. Hasil pengukuran laju pertumbuhan menunjukkan bahwa agitasi 220 rpm menghasilkan pertumbuhan bakteri paling cepat dalam waktu inkubasi 4 jam. Konsentrasi inokulum optimum untuk mencapai OD₆₀₀ 0,4 adalah 3% (v/v). Berdasarkan hasil perhitungan efisiensi transformasi, perlakuan transformasi kejutan panas yang terbaik pada penelitian ini adalah suhu 44°C selama 30 detik.