

**KLONING cDNA DISULFIDE ISOMERASE (PDI) DARI
KEDELAI (*Glycine max* L.) VARIETAS ARGOMULYO KE
DALAM VEKTOR pTA2**



Oleh:

**ZIA MULIANI
18032075/2018**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2022**

**KLONING cDNA DISULFIDE ISOMERASE (PDI) DARI
KEDELAI (*Glycine max* L.) VARIETAS ARGOMULYO KE
DALAM VEKTOR pTA2**

SKRIPSI

*Diajukan Sebagai Salah Satu Persyaratan Memperoleh Gelar
Sarjana Sains*



Oleh:

**ZIA MULIANI
18032075/2018**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG**

2022

HALAMAN PERSETUJUAN UJIAN SKRIPSI

**KLONING CDNA DISULFIDE ISOMERASE (PDI) DARI
KEDELAI (*Glycine max* L.) VARIETAS ARGOMULYO KE DALAM
VEKTOR pTA2**

Nama : Zia Muliani
Nim/TM : 18032075/2018
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 15 Maret 2022

Disetujui oleh:

Pembimbing 1



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M. Biomed.
NIP.197508152006042001

Pembimbing 2



Rikno Harmoko, M.Sc., Ph.D.
NIP.198303272018011004

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Zia Muliani
NIM/TM : 18032075/2018
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

KLONING cDNA GEN DISULFIDE ISOMERASE (PDI) DARI KEDELAI (*Glycine max* L.) VARIETAS ARGOMULYO KE DALAM VEKTOR pTA2

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi Jurusan
Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Negeri Padang

Padang, 15 Maret 2022

Tim Penguji

Nama

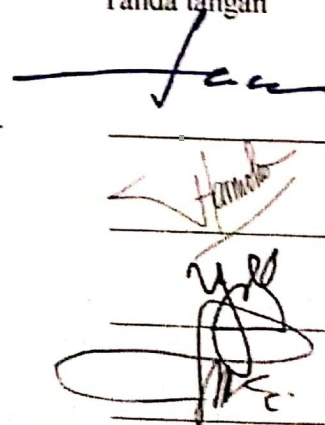
Tanda tangan

1. Ketua : Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.

2. Sekretaris: Rikno Harmoko, M.Sc., Ph.D.

3. Anggota : Dr. Yuni Ahda, S.Si., M.Si.

4. Anggota : Dr. Syamsurizal, M.Biomed



SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Zia Muliani
NIM/TM : 18032075/ 2018
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul “Kloning cDNA Disulfide Isomerase pada Kedelai (*Glycine max* L.) Varietas Argomulyo ke Dalam Vektor pTA2” adalah benar merupakan karya sendiri, bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya yang ditulis dan diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota masyarakat ilmiah.

Padang, Januari 2022

Diketahui oleh,
Ketua Jurusan Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 19750815 2006042 001

Saya yang menyatakan,



Zia Muliani
NIM.18032075

Kloning cDNA Disulfide Isomerase (PDI) dari Kedelai (*Glycine max* L) Varietas Argomulyo ke dalam Vektor pTA2

Zia Muliani

ABSTRAK

Untuk mengatasi penyakit karat pada tanaman kedelai (*Glycine max* L.) perlu dilakukan pemuliaan tanaman dengan menghasilkan varietas-varietas unggul. Untuk mendapatkan varietas baru pada tanaman, maka perlu dilakukan analisis dan kajian luas mengenai karakterisasi suatu tanaman. Salah satu karakter yang perlu dipelajari adalah gen-gen yang terlibat dalam proses ketahanan tersebut. Untuk memahami gen tertentu, dilakukan dengan proses cloning gen. Penelitian ini bertujuan untuk mengklon cDNA *Disulfide Isomerase* dan mengkarakterisasi signal peptide dan domain protein Disulfide Isomerase dari kedelai varietas Argomulyo.

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Tahapan dalam penelitian terdiri dari pengklonan cDNA *Disulfide Isomerase* ke dalam vektor pTA2. Analisis sisipan dilakukan dengan menggunakan enzim restriksi dan selanjutnya disekuensing. Analisis hasil sekuensing digunakan untuk menganalisis keberadaan komponen penting seperti *start codon* dan *stop codon* (*Basic Local Alignment Search Tool*). Hasil sekuensing juga digunakan untuk menganalisis secara *insilico* keberadaan *signal peptide* dan domain khusus yang terdapat pada sequence protein Disulfide Isomerase.

Penelitian ini berhasil mengklon cDNA *Disulfide Isomerase* ke dalam vektor pTA2. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa sekuen nukleotida insert (termasuk *start codon* dan *stop codon*) memiliki kesamaan 100% dengan sequence cDNA *Disulfide Isomerase* dari database NCBI. Analisis secara *in-silico* menunjukkan bahwa protein Disulfide Isomerase memiliki signal peptide pada posisi asam amino 1-30. Kemudian, analisis domain menunjukkan bahwa protein Disulfide Isomerase mengkode domain thioredoxin.

Kata Kunci: *Analisis Signal peptide, Analisis Domain, Glycine max L., Kloning, Vektor pTA2*

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah untuk semua rahmat dan hidayah yang telah engkau perlihatkan, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi ini sehingga dapat diselesaikan tepat pada waktunya. Skripsi ini ditulis berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dengan judul **“Kloning cDNA Disulfide Isomerase (PDI) dari Kedelai (*Glycine max* L.) Varietas Argomulyo ke dalam Vektor pTA2”** sebagai persyaratan untuk memperoleh gelar sarjana pada program studi Biologi, Universitas Negeri Padang.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak akan terselesaikan tanpa adanya dukungan, bantuan, bimbingan, dan nasehat dari berbagai pihak selama penyusunan skripsi ini. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan terimakasih setulus-tulusnya kepada:

1. Ibu Dr.Dwi Hilda Putri, S.Si, M.Biomed, selaku pembimbing I yang telah memberikan banyak pelajaran, bimbingan, masukan, kritikan dan wawasan baru kepada penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan dengan baik.
2. Bapak Rikno Harmoko, M.Sc, Ph.D, selaku dosen pembimbing II selama penulis melakukan magang dan penelitian sampai menyelesaikan penulisan skripsi ini di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Terimakasih juga untuk kesempatan dan kepercayaan yang diberikan sehingga penulis bisa terlibat dalam penelitian kloning ini.
3. Ibu Dr.Yuni Ahda, M.Si. dan bapak Dr.H.Syamsurizal, M.Biomed. sebagai dosen penguji, yang telah memberikan masukan, kritikan, saran, dan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi.

4. Ibu dr. Elsa Yuniarti, S.Ked, M.biomed., AIFO-K sebagai pembimbing akademik yang telah memberikan nasehat dan saran selama di Jurusan Biologi.
5. Seluruh staff pengajar Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang yang telah memberikan ilmu pengetahuan yang tak ternilai selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.
6. Seluruh staff yang berada di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) yang selalu memberikan support dan bimbingannya kepada penulis.
7. Kepada sahabat tercinta yang selalu membersamai penulis dalam segala situasi dan juga kepada seluruh teman-teman angkatan Biologi 2018 yang selalu mensupport penulis.
8. Teristimewa kepada kedua orang tua penulis, ayahanda Sutan Makmur dan ibunda Eli Yusnita, yang selalu memberikan kasih sayang, doa, nasehat, serta kesabaran yang luar biasa dalam setiap langkah hidup penulis yang merupakan anugrah terbesar dalam hidup.
9. Abang penulis tercinta, Agung Pratama, terimakasih atas doa dan segala dukungannya.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih memiliki banyak kekurangan, segala saran dan kritikan yang membangun sangat penulis harapkan dan semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat.

DAFTAR ISI

Halaman

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
A. Kedelai Varietas Argomulyo.....	5
B. Protein Disulfide Isomerase (PDI).....	6
C. Isolasi RNA.....	7
D. RT PCR.....	8
E. Elektroforesis.....	9
F. Kloning.....	10
B. G. Ligasi.....	11
C. H. Transformasi Plasmid.....	12
BAB III METODE PENELITIAN	14
A. Waktu dan Tempat Penelitian.....	14
B. Alat dan Bahan.....	14
C. Prosedur Penelitian.....	15
D. Pelaksanaan Penelitian.....	15
E. Analisis Data.....	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
A. Hasil Penelitian.....	25
B. Pembahasan.....	29

BAB V PENUTUP	33
A. Kesimpulan	33
B. Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	37

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komponen RNA mix (Mizuguchi dkk, 1999).....	17
2. Pengaturan Suhu pada Mesin PCR untuk Sintesis cDNA	17
3. Komposisi PCR mix	18
4. Siklus PCR untuk Amplifikasi cDNA PDI	18
5. Reaksi Penambahan Poli A pada Produk PCR	19
6. Reaksi ligasi pada Vektor pTA2	19
7. Reaksi Restriksi pada Vektor pTA2	23

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Map vektor pTA2 (sumber: Mizuguchi dkk, 1999).....	11
2. Hasil Elektroforesis Produk PCR cDNA PDI pada Gel Agarose 1%	25
3. Konstruksi Plasmid Rekombinan Pembawa cDNA PDI pada vektor pTA2	26
4. Elektroforesis Hasil Skrining Plasmid Rekombinan menggunakan Metode Enzyme Restriksi pada Agarose 1%.	27
5. Hasil Prediksi sinyal Peptida pada protein PDI menggunakan Signal P 6.0 server	28
6. Hasil Prediksi Daerah Domain pada protein PDI	29

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kedelai (*Glycine max* L.) merupakan salah satu bahan makanan yang penting bagi masyarakat Indonesia. Kebutuhan kedelai di Indonesia terus meningkat, namun tidak dengan tingkat produksi nasional. Produksi kedelai dalam 10 tahun terakhir cenderung mengalami penurunan. Luas panen kedelai pada tahun 2008 sebesar 549.412 ha dengan produksi sebesar 723.535 ton tidak mencukupi kebutuhan kedelai nasional (BPS, 2008). Impor kedelai untuk pemenuhan kebutuhan nasional pada kurun waktu 1961-2012 cenderung mengalami laju peningkatan dengan rata-rata mencapai 0,05% per tahun (Supadi, 2009).

Kedelai nasional mengalami kendala dalam meningkatkan produksinya, salah satu kendalanya yaitu seringnya muncul penyakit pada proses tanam. Salah satu penyakit pada tanaman kedelai adalah penyakit karat daun. Penyakit ini disebabkan oleh cendawan *Phakospora phachyrizi*. Tanaman yang terserang menunjukkan gejala seperti bintik coklat yang terdapat pada daun. Bintik tersebut meluas keseluruh permukaan daun kedelai mengakibatkan daun menjadi kering dan pada akhirnya rontok. Jenis penyakit ini menyerang tanaman kedelai yang masih berumur muda dan dapat menyebabkan hampanya polong (Sumartini, 2010).

Tanaman kedelai umumnya dilakukan dengan menggunakan senyawa-senyawa kimia (seperti fungisida) dalam mengatasi penyakit pada tanaman kedelai. Namun cara ini tidak efektif bagi lingkungan maka dilakukan cara lain

untuk mengatasi penyakit pada tanaman kedelai dengan cara memadukan beberapa komponen pengendalian yang ramah lingkungan sebagai upaya mendukung pertanian berkelanjutan. Komponen pengendalian penyakit karat meliputi penanaman varietas tahan serta penggunaan bahan nabati dan hayati (Sumartini, 2010).

Ketahanan suatu varietas terhadap suatu penyakit umumnya tidak berlangsung selamanya. Jika ditemukan strain patogen baru yang lebih virulen, ketahanan varietas tersebut akan terganggu. Oleh karena itu, adanya varietas-varietas baru kedelai yang tahan terhadap penyakit dibutuhkan dalam upaya mengendalikan penyakit tersebut (Freedman RB, 1994)

Upaya mendapatkan varietas baru pada tanaman, perlu dilakukan analisis dan kajian luas mengenai karakterisasi suatu tanaman. Salah satu karakter yang perlu dipelajari adalah ekspresi protein yang terlibat dalam proses ketahanan tersebut. Salah satu protein yang berperan dalam sistem ketahanan dan proteksi tanaman adalah disulfide isomerase (PDI). Protein ini merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi redoks dalam protein-protein sekresi dan ekstraseluler yang terdapat di dalam lumen retikulum endoplasmik sel eukariot (Bardwell dkk., 1993).

Disulfide isomerase bersama-sama dengan peptidil prolil cis-trans isomerase (PPI) dan molekul chaperone membantu proses pelipatan protein baik dalam proses kotranslasi maupun proses pasca translasi (Freedman RB, 1994). Proses pelipatan protein terjadi pada saat biosintesis protein (translasi) maupun setelah sintesis protein (pascatranslasi). Disamping itu, PDI juga mempunyai fungsi lain,

yaitu sebagai subunit sistem enzim yang lebih kompleks, sehingga PDI dikenal sebagai enzim multifungsi (Hayono, dkk, 1995).

Tanaman kedelai unggul yang sudah dikembangkan adalah kedelai varietas Argomulyo. Tanaman ini merupakan kedelai dengan varietas unggul yang memiliki ketahanan rebah dan toleran terhadap karat daun. Varietas Argomulyo mengandung protein sebanyak 39% dan lemak sebanyak 20,8% (Balitkabi, 2013).

Sampai saat ini belum ada penelitian yang mengkloning dan mengkaraterisasi protein PDI pada kedelai varietas Argomulyo. Cara untuk bisa mempelajari karakteristik suatu protein adalah dengan mengekspresikan protein PDI secara in vitro untuk kemudian dilakukan proses karakterisasi. Untuk bisa mengekspresikan protein PDI secara in vitro, maka perlu dilakukan isolasi gen tersebut, dan kemudian mengklonnya ke dalam vektor plasmid.

Untuk memudahkan proses cloning, biasanya peneliti mengisolasi gen dan memasukkannya ke vektor kloning. Salah satu vektor kloning yang banyak digunakan untuk proses ini adalah vektor pTA2. Vektor plasmid ini disebut juga vektor T karena memiliki basa timin (T) pada ujung 3'. Dengan timin pada ujung 3' vektor akan memudahkan fragmen DNA hasil amplifikasi menempel tanpa adanya tahap pemotongan dengan enzim restriksi.

Berdasarkan masalah yang telah diuraikan sebelumnya, maka telah dilakukan penelitian yang berjudul: Kloning cDNA Disulfide Isomerase (PDI) dari Kedelai (*Glycine max* L.) Varietas Argomulyo ke dalam Vektor pTA2.

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana keberhasilan kloning cDNA PDI dari kedelai varietas Argomulyo ke dalam vektor pTA2?
2. Bagaimana karakterisasi signal peptide dan domain protein Disulfide Isomerase dari kedelai varietas Argomulyo secara *in-silico*?

C. Tujuan Penelitian

1. Untuk melihat keberhasilan kloning cDNA PDI dari kedelai varietas Argomulyo ke dalam vektor plasmid
2. Untuk mengkarakterisasi signal peptide dan domain protein Disulfide Isomerase dari kedelai varietas Argomulyo secara *in-silico*.

D. Manfaat Penelitian

1. Menghasilkan clone cDNA *PDI* pada plasmid rekombinan sehingga dapat dijadikan rujukan penelitian selanjutnya.
2. Mendapatkan material genetik yang dapat digunakan untuk studi fungsi gen.
3. Menambah wawasan tentang kajian ilmu molekuler.