

TRANSFORMASI GEN KNAT1 KE DALAM PROTOCORM ANGGREK Dendrobium lasianthera J. J. Sm.: UPAYA MENINGKATKAN PRODUKSI BIBIT

by Edy Setiti Wida Utami

Submission date: 10-Apr-2018 12:39PM (UTC+0800)

Submission ID: 944134439

File name: n_Pelaksanaan_Pen_No._018._SP2H._LT._DRPM._II._2016._Ketua..pdf (674.93K)

Word count: 9781

Character count: 59925

88
**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 2016**



**TRANSFORMASI GEN *KNATI* KE DALAM *PROTOCORM*
ANGGREK *Dendrobium lasianthera* J. J. Sm.:
UPAYA MENINGKATKAN PRODUKSI BIBIT**

Tahun ke-2 dari rencana 3 tahun

87

1. Dr. Edy Setiti Wida Utami, M.S, NIDN 0021045707
2. Dr. Sucipto Hariyanto, DEA, NIDN 0009025604
3. Dr. Y. Sri Wulan Manuhara, M.Si, NIDN 0003036404

23

Dibiayai oleh

Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi
Sesuai dengan Surat Perjanjian Penugasan Pelaksanaan Program Penelitian
Nomor: 018/SP2H/LT/DRPM/II/2016, Tanggal 17 Februari 2016

Universitas Airlangga

Oktober, 2016

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : TRANSFORMASI GEN KNATI KE DALAM
PROTOCOL ANGGREK *Dendrobium lasianthera* J. J.
Sm. : UPAYA MENINGKATKAN PRODUKSI BIBIT

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. EDY SETITI WIDA UTAMI Dra.,M.S.
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0021045707
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Biologi
Nomor HP : 081332954433
Alamat surel (e-mail) : edysetiti@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dr. SUCIPTO HARIYANTO DEA.
NIDN : 0009025604
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
Nama Lengkap : Dr. YOSEPHINE SRI WULAN M M.Si.
NIDN : 0003036404
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada) : -
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 50.000.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp 150.000.000,00

Mengetahui,
Dekan FST Unair


(Prof. Wia Darmanto, Ph.D)
NIP/NIK 196106161987011001

Surabaya, 11 - 10 - 2016
Ketua,


(Dr. EDY SETITI WIDA UTAMI Dra.,M.S.)
NIP/NIK 195704211984032003

Menyetujui,
Ketua LPI UNAIR


(Prof. Hery Purnobasuki, Ph.D)
NIP/NIK 196705071991021001

RINGKASAN

¹ *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm adalah jenis anggrek yang dikenal sebagai anggrek stroberi dan sebagai tanaman obat. Dari 3 organ vegetatif yaitu akar, batang dan daun bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.

Tujuan penelitian tahun ke-2 adalah (1) Induksi *protocorm-like bodies* (plb) sebagai target transformasi, (2) Mendapatkan konsentrasi kanamisin yang tepat untuk seleksi transforman dan non transforman tanaman anggrek *D. lasianthera*, (3) Mengetahui lama waktu ko-kultivasi terhadap hasil efisiensi transformasi..

Pada penelitian ini menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404 yang membawa plasmid PG35S; *Knat1* dan *protocorm-like bodies* (PLB) digunakan sebagai target transformasi. Induksi PLB dari daun anggrek dilakukan dalam kultur *in vitro* pada media VW padat + 0,5 mg/L NAA + 1 mg/L thidiazuron + 2 g/L pepton. *Protocorm-like bodies* embriogenik (bentuk membulat, remah, berwarna kuning, tampak mengkilat) dan belum berdiferensiasi digunakan sebagai target transformasi. Uji ketahanan PLB terhadap antibiotik kanamisin dilakukan pada media 1/2MS padat + 30g/L sukrosa + 2g/L pepton + 0,5 mg/L BA + 1 mg/L thidiazuron yang mengandung kanamisin konsentrasi 25 mg/L, 50 mg/L, 75 mg/L, dan 100 mg/L. Konsentrasi kanamisin 50 mg/L dinyatakan sebagai konsentrasi terbaik yang digunakan pada medium seleksi untuk membedakan antara transforman dan non transforman. Perlakuan lama ko-kultivasi 24 jam, 48 jam, dan 72 jam dilakukan pada media VW padat diberi 100 μ M acetosiringone. Ko-kultivasi 72 jam memberikan hasil transformasi tertinggi yaitu 16%.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, transformasi, gen *Knat1*, ko-kultivasi.

PRAKATA

Alhamdulillah, puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu Wa Ta'ala, berkat bimbinganNYA penelitian dengan judul Transformasi Gen *KNATI* ke dalam *Protocorm* Anggrek *Dendrobium lasianthera* J. J. Sm.: Upaya Meningkatkan Produksi Bibit (Penelitian Tahun ke-2) dapat terlaksana dengan lancar. Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian. Pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Pimpinan Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi, Pimpinan Fakultas Sains dan Teknologi yang telah berkenan memfasilitasi dan membiayai penelitian ini.
2. Ketua Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.
3. Mahasiswa angkatan 2012, Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga yang telah berperan serta dalam penelitian ini.
4. Rekan-rekan yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini yang belum penulis sebutkan satu persatu.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan dari tulisan ini. Akhirnya, semoga karya penelitian ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Oktober 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	
43 HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I. PENDAHULUAN	viii
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	1
2.1 Tinjauan Tentang <i>Dendrobium</i>	5
2.2 Transformasi tanaman dengan perantara <i>A tumefaciens</i>	5
2.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
2.4 Transformasi genetik pada tanaman anggrek	10
2.5 Tinjauan tentang Gen <i>KNAT1</i>	12
2.6 Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan transformasi	12
2.7 Identifikasi keberhasilan transformasi	16
53 BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	20
BAB IV. METODE PENELITIAN	21
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	36
85 DAFTAR PUSTAKA	37

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
5.1.	Persentase PLB angrek <i>D. lasianthera</i> yang bertahan hidup dalam media VW yang mengandung kanamisin berbagai konsentrasi pada minggu ke 3, 6 dan 9.	31
5.2.	Pengaruh lama ko-kultivasi terhadap efisiensi trnasformasi angrek <i>D. lasianthera</i>	34

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1.	Habitus, morfologi bunga, dan buah anggrek <i>D. lasianthera</i>	6
2.2.	<i>Protocorm-like bodies D. lasianthera</i>	8
2.3.	<i>Agrobacterium</i>	10
2.4.	Mekanisme transfer T-DNA <i>Agrobacterium</i> ke genom tanaman	11
2.5.	Struktur T-DNA dari plasmid pG35S dan pG35SKNAT1	14
2.6.	Struktur kimia kanamisin	17
4.1.	Konstruksi gen pada <i>A. tumefaciens</i>	21
5.1.	<i>Protocorm-like bodies D. lasianthera</i>	30
5.2.	<i>Protocorm-like bodies D. lasianthera</i> umur 6 minggu pada media VW diberi kanamisin	31
5.3.	<i>Protocorm-like bodies D. lasianthera</i> beregenerasi membentuk <i>plantlet</i> pada medium seleksi	35

DAFTAR LAMPIRAN

1. Komposisi media Vacin and Went (VW)
2. Komposisi media Luria Bertani (LB)
3. Personalia tenaga peneliti dan kualifikasinya

BAB I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Saat ini anggrek telah menjadi komoditas perdagangan yang penting di Indonesia. Anggrek memiliki potensi ekonomi sebagai komoditas ekspor non migas yang dapat menambah devisa negara. Selain sebagai penopang industri bunga potong, ternyata anggrek khususnya genus *Dendrobium* telah dikenal luas sebagai obat tradisional. Produk obat-obatan tradisional yang berasal dari anggrek bahkan telah lama diperdagangkan di China (Bulpitt, 2005). Berbagai metabolit sekunder bibenzyls, fluorenones dan gigantol telah di isolasi dari *Dendrobium nobile* yang mempunyai aktivitas antioksidan lebih tinggi dibanding vitamin C yang potensial sebagai antikanker (Rosa, 2010; Zhang *et al.*, 2007). Ekstrak daun, batang, akar dan speudobulb anggrek *Dendrobium crumenatum* mempunyai aktivitas antimikroba (Uma *et al.*, 2004). Senyawa baru dendroside D, dendroside E, dendroside F dan dendroside G telah ditemukan pada *Dendrobium nobile* dan menunjukkan aktivitas immunomodulatory (Ye *et al.*, 2012). Satu diantara jenis anggrek Indonesia yang berpotensi sebagai obat antikanker adalah anggrek stroberi *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm.

Hartanto *et al.* (2011) telah meneliti toksisitas dan potensi antikanker pada berbagai organ vegetatif *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm. Dari 3 organ vegetatif (akar, batang dan daun), semua organ bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker, namun organ yang paling toksik dan mempunyai aktivitas antikanker payudara T47D adalah batangnya dengan nilai LC50 ($\mu\text{g/mL}$) = $117 \pm 6,35$. Sehubungan dengan potensinya yang cukup besar sebagai bahan baku obat antikanker dan untuk produksi bunga potong maka anggrek *Dendrobium lasianthera* ini merupakan tanaman bernilai ekonomi tinggi dan sangat potensial untuk dikembangkan.

Permasalahan utama dalam pengembangan tanaman anggrek untuk dapat digunakan sebagai bahan baku obat adalah 1) teknik perbanyakkan masal relatif sulit, 2) terlalu lamanya fase vegetatif dalam siklus hidupnya (1-2 tahun), dan 3) stabilitas genetik tanaman. Anggrek dapat diperbanyak secara generatif dengan biji dan secara vegetatif. Anggrek menghasilkan biji dalam jumlah besar (2-3 juta biji/buah), namun karena biji anggrek tidak mempunyai endosperm fungsional, maka hanya 0,2-0,3% biji yang mampu berkecambah di alam dan *seedling* yang dihasilkan dari perkecambahan biji mempunyai variasi genetik yang luas, sehingga penyediaan bibit menjadi terbatas dan bervariasi (Arditti,1991). Perbanyakkan anggrek secara vegetatif dapat dilakukan melalui 3 cara yaitu dengan pemotongan (stek), pemotongan tunas (keiki) dan dengan pemisahan rumpun, namun perbanyakkan vegetatif memerlukan waktu yang lama dan sulit memperoleh anakan yang cukup. Maka diperlukan metode perbanyakkan yang efisien untuk menghasilkan anakan secara masal. Dalam upaya meningkatkan produksi tanaman anggrek dapat dilakukan melalui rekayasa genetika dengan cara menyisipkan gen *KNAT1* ke dalam genom tanaman anggrek *Dendrobium lasianthera* dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens*.

Penggunaan gen *KNAT1* untuk meningkatkan produksi bibit anggrek *Dendrobium lasianthera* didasarkan pada kemampuan gen tersebut dalam mengatur pembentukan, perkembangan dan pemeliharaan meristem ujung batang (Barton, 2001). Penelitian transformasi genetik dengan penyisipan gen *KNAT1* (*KNOTTED1* like *Arabidopsis thaliana*) ke dalam anggrek *Phalaenopsis amabilis* Blume telah dilakukan Semiarti *et al.* (2007) yang berhasil memperoleh fenotip multiple shoot dari satu *protocorm*. Frugis *et al.* (1999) mendapatkan bahwa overekspresi gen *KNAT1* pada tanaman lettuce (*Lactuca sativa*) menginduksi pembentukan struktur yang menyerupai

daun pada bagian tepi daun. Pada tanaman *Arabidopsis thaliana*, overekspresi gen *KNAT1* menyebabkan terbentuknya tunas adventif pada permukaan atas dan bawah daun serta adanya bentuk daun yang berlekuk tepi daunnya (*lobbed leaves*) (Lincoln *et al.*, 1994; Chuck *et al.*, 1996), namun penelitian transformasi gen *KNAT1* ke dalam *protocorm* tanaman obat *D. lasianthera* belum pernah dilakukan.

Dasar keberhasilan transformasi genetik adalah kemampuan sel target berkembang menjadi tanaman lengkap. Teknik kultur jaringan membuka peluang untuk menyediakan sel target yang terdapat dalam organ tanaman (daun, batang, hipokotil, kotiledon, *protocorm*), kalus, atau kultur suspensi sel, protoplas dan *protocorm-like bodies (PLB)*. Pada penelitian ini menggunakan *protocorm-like bodies (PLB)* sebagai target transformasi. *Protocorm-like bodies* digunakan sebagai target transformasi tanaman anggrek karena *protocorm-like bodies* belum teregenerasi (terdiferensiasi menjadi tunas/akar) dan responsif sehingga memiliki tingkat keberhasilan tinggi (Semiarti *et al.*, 2010). Faktor yang menentukan keberhasilan transformasi genetik dengan perantara *A. tumefaciens* diantaranya adalah eksplan, ko-kultivasi dan antibiotik.

Ko-kultivasi merupakan waktu yang dibutuhkan *Agrobacterium* untuk menginfeksi dan mentransfer gen (T-DNA) ke tanaman, yang dilakukan setelah eksplan diinfeksi dan sebelum eksplan diseleksi pada media seleksi yang mengandung antibiotik. Lama ko-kultivasi berbeda pada setiap spesies dan eksplan yang digunakan, beberapa tanaman yaitu kubis (*Brassica oleracea*) eksplan tunas dan hipokotil ko-kultivasi optimal 3 hari (Rafat *et al.*, 2010). Utomo (2004) melaporkan bahwa eksplan embrio *immature* tanaman jagung (*Zea mays*) ko-kultivasi yang optimal adalah 1-2 hari dengan efisiensi 5,8%. Kumar *et al.* (2010) melaporkan bahwa eksplan daun *Jatropha curcas* ko-kultivasi yang optimal adalah 4 hari dengan efisiensi 22,2% sedangkan Pambudi (2009) memperoleh hasil bahwa daun tembakau ko-kultivasi optimal 2

hari. Anggrek juga memerlukan lama ko-kultivasi yang berbeda-beda pada setiap spesies, ko-kultivasi paling efisien untuk anggrek *D. nobile* dengan efisiensi 18%, *Vanda* sp. dan *Cattleya* efisiensi 90% pada uji GUS adalah 2-3 hari menggunakan eksplan PLB (Men *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010) sedangkan pada spesies *Vanda kasem* efisiensi 70% pada uji GUS dan *Phalaenopsis amabilis* eksplan protocorm efisiensi 1,7% dengan lama ko-kultivasi efisien yaitu 4 hari (Gnasekaran *et al.*, 2014; Semiarti *et al.*, 2007). Perbedaan lama ko-kultivasi pada spesies anggrek dijadikan sebagai dasar penelitian ini sehingga dilakukan optimasi ko-kultivasi selama 1, 2, 3, dan 4 hari untuk mengetahui lama waktu ko-kultivasi yang optimal untuk *D. lasianthera*.

1.2. Rumusan Masalah

1. Berapakah konsentrasi kanamicin yang tepat untuk seleksi tanaman anggrek *D. lasianthera* transforman dan non transforman ?
2. Bagaimanakah pengaruh lama ko-kultivasi (0, 24, 48, dan 72 jam) terhadap hasil efisiensi transformasi ?

¹ BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang *Dendrobium*

Dendrobium, merupakan genera anggrek kedua terbesar setelah *Bulbophyllum*. Tersebar dari India, China, Asia Tenggara, Jepang, Papua, Australia, dan kepulauan di kawasan Pasifik. Habitat penyebaran yang luas dari daerah tropis hingga subtropis menjadikan jenis anggrek ini memiliki keanekaragaman dan keunikan tersendiri sehingga menjadi penopang utama industri bunga potong dan tanaman pot bagi beberapa negara khususnya di Asia Tenggara. Selain sebagai penopang industri bunga potong, beberapa jenis anggrek telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional (Bullpitt *et al.*, 2007). Produk obat-obatan tradisional yang berasal dari anggrek bahkan telah lama diperdagangkan di China. Hasil penelitian pada berbagai spesies anggrek telah berhasil di isolasi berbagai macam senyawa metabolit penting yaitu Dendrobin yang mempunyai aktivitas antikanker dan dendrin, nobilonine, dendroxime dan dendramine yang berkhasiat menurunkan kadar gula darah dan berpotensi sebagai antimikroba. Senyawa tersebut diproduksi pada batang dan pseudobulb anggrek *Dendrobium nobile* (Bulpitt *et al.*, 2007).

Indonesia kaya species anggrek, satu diantaranya adalah *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm. *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm. ⁸ dikenal sebagai anggrek stroberi, dalam bahasa Inggris dikenal dengan *Wooly Pollina Dendrobium*. Anggrek tersebut merupakan salah satu anggrek asli Indonesia yang endemik di Papua dan Papua New Guinea. *Dendrobium lasianthera* J. J. Sm. umumnya tumbuh di daerah dataran rendah (0-500 m dpl). Anggrek tersebut tumbuh subur pada daerah bersuhu ⁸¹ 16-19° C pada malam hari dan 24-32° C pada siang hari, dengan kisaran kelembapan antara 50% dan 80%, serta derajat keasaman media alami ⁸ (pH) 7-7,5. Di alam liar biasa ditemukan hidup di sekitar daerah aliran sungai, rawa-rawa, dan

hutan di dataran rendah Papua. *D. lasianthera*. Tanaman ini memiliki ukuran yang dapat mencapai lebih dari dua meter (Gambar 1.A), dengan daun berbentuk lanset dan tata letak daun berseling.



Gambar 2.1. (A) Habitus (bar: 5 cm), (B) morfologi bunga (bar: 1 cm) dan (C). morfologi buah anggrek *D. lasianthera* berumur 4,5 bulan setelah polinasi (bar: 1 cm).

Anggrek *D. lasianthera* mempunyai bunga yang indah, dalam satu tandan bisa muncul antara 10-30 kuntum. Warna bunganya pun sangat bervariasi mulai dari merah gelap, merah muda, merah keunguan, dan merah jingga dengan gradasi indah dan petal melintir berdekatan (Gambar 1.B). Buah berwarna hijau berbentuk bulat memanjang berukuran 3-5 cm (Gambar 1.C) dan biji di dalamnya berjumlah 1-3 juta berwarna kuning berukuran 100-300 μm (panjang 1.0-3.0 mm dan lebar 0.5-1.0 mm). Biji anggrek tersusun dari testa atau kulit biji dan embrio, dengan struktur hanya terdiri dari 4-200 sel, sehingga kapasitas cadangan makanan sangat terbatas (Mursidawati, 2007)

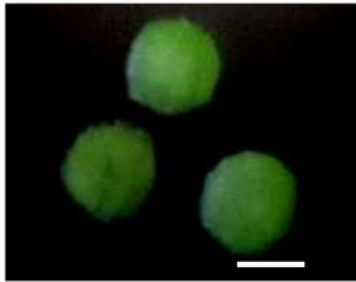
Dendrobium lasianthera diklasifikasikan ke dalam famili Orchidaceae dengan sistematika sebagai berikut:

Kingdom : ⁸ Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Classis : Liliopsida
Ordo : Asparagales
Famili : Orchidaceae
Genus : Dendrobium
Spesies : *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm (Simpson, 2006)

Dendrobium lasianthera mengandung senyawa metabolit sekunder yang berkhasiat sebagai obat. Hasil metabolit sekunder yang telah banyak dikenal dari genus *Dendrobium* adalah denbinobin, moscatilin, nobilonine, dendrobin dan dendramine. Senyawa tersebut memiliki khasiat sebagai antikanker, antioksidan, antimikroba dan berkhasiat menurunkan kadar gula dalam darah (Adelheid *et al.*, 1992). Nugroho *et al.*, (2011) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa *D. lasianthera* berpotensi sebagai penghasil senyawa antikanker dari semua bagian organ vegetatifnya. Batang *D. lasianthera* adalah ¹⁹ organ vegetatif paling toksik dan mempunyai kemampuan antikanker payudara T47D dengan nilai $117 \pm 6,35$ sedangkan daun $358 \pm 9,86$ dan akar $140 \pm 10,26$. Aktivitas penghambatan antikanker oleh senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh batang lebih tinggi dibandingkan daun dan akar. Kadar kandungan senyawa hasil ekstrak 20 gram sampel batang 0,96 gram, 20 gram sampel daun dan 50 gram akar menghasilkan 0,84 gram senyawa metabolit sekunder.

Eksplan pada proses transformasi genetik dapat berasal dari semua bagian tanaman, akan tetapi keberhasilan transformasi sangat bergantung pada sifat totipotensi dan daya

regenerasi eksplan. Eksplan yang digunakan sebagai target transformasi dalam penelitian ini adalah *protocorm-like bodies*. *Protocorm-like bodies* (Gambar 2.2.) belum mengalami differensiasi dan regenerasi (menjadi tunas atau rhizoid) sehingga dapat dimanipulasi dengan menyisipkan gen *knat1* sebagai gen penumbuh tunas agar dapat menghasilkan multitunas.



Gambar 2.2. *Protocorm-like bodies* *D. lasianthera* (bar: 100 μ m)

Menurut ⁶⁷ Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES, 2011), *Dendrobium lasianthera* tergolong dalam kategori Appendix II. Appendix II memuat semua jenis tumbuhan dan satwa liar yang belum terancam punah, ⁷⁰ namun dapat terancam punah jika perdagangan tidak diatur ketat.

³¹ 2.2 Transformasi tanaman dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens*

Transformasi tanaman dengan perantara *A. tumefaciens* merupakan metode yang paling sering digunakan untuk induksi gen asing ke dalam sel tanaman untuk selanjutnya dihasilkan tanaman transgenik ²² (de la Riva *et al.*, 1998).

Secara alamiah *A. tumefaciens* menginfeksi bagian yang luka dari tanaman dan menyebabkan terbentuknya tumor. Strain virulen dari *A. tumefaciens* memiliki suatu plasmid yang besar (> 200kb) disebut Ti (*Tumor inducing*) plasmid yang berperan dalam induksi tumor. Selama infeksi, suatu segmen DNA yang bersifat ‘mobil’ dari Ti plasmid

disebut T-DNA ditransfer ke inti sel tanaman dan terintegrasi ke dalam genom tanaman (Nester *et al.*, 1984; Binns and Thomashaw, 1988). T-DNA mengandung 2 tipe gen yaitu (1). Gen-gen *oncogenic* mengkode enzim-enzim yang mensintesa auksin dan sitokinin yang bertanggung jawab terhadap pembentukan tumor; (2). Gen yang mengkode enzim untuk sintesa opin. Opin disintesa dan disekresi oleh sel-sel tumor dan dikonsumsi oleh *A. tumefaciens* sebagai sumber karbon dan nitrogen (Zupan and Zambrysky, 1995). Fragmen T-DNA dibatasi oleh 25bp *direct repeats* yang merupakan elemen kunci dalam transfer (Watson *et al.*, 1992).

Proses transfer T-DNA dimediasi oleh kerjasama dari protein-protein yang dikode oleh gen-gen yang terdapat pada '*virulence region*', disebut *vir-genes* yang terdapat pada Ti plasmid dan juga oleh gen-gen yang terdapat pada kromosom bakteri. Sifat alamiah tersebut di atas dari *A. tumefaciens* dalam menginduksi tumor pada tanaman kemudian dimanfaatkan dalam rekayasa genetika pada tanaman. Tiga hal penting yang mendasari proses transfer T-DNA ke sel tanaman adalah sebagai berikut:

1. Pembentukan tumor

Merupakan proses transformasi yang dihasilkan dari transfer dan integrasi T-DNA ke sel tanaman dan ekspresi gen-gen T-DNA.

2. Gen-gen T-DNA ditranskripsi hanya dalam sel tanaman dan tidak berperan selama proses transfer

3. Suatu DNA asing yang disisipkan diantara T-DNA border dapat ditransfer ke sel-sel tanaman (Hamilton, 1997).

Transformasi gen dengan perantara *A. tumefaciens* pada monokotil dengan metode yang efisien dan *reproducible* telah berhasil diaplikasikan pada padi (Hiei *et al.*, 1994;

pisang (May *et al.*, 1995); jagung (Frame *et al.*, 2002); gandum (Cheng *et al.*, 1997) tebu (Enriquez-Obregon, 1997); anggrek ⁵¹ *Oncidium* (Liau *et al.*, 2003); anggrek *Phalaenopsis amabilis* (Semiarti *et al.*, 2007).

2.3. *Agrobacterium tumefaciens*.

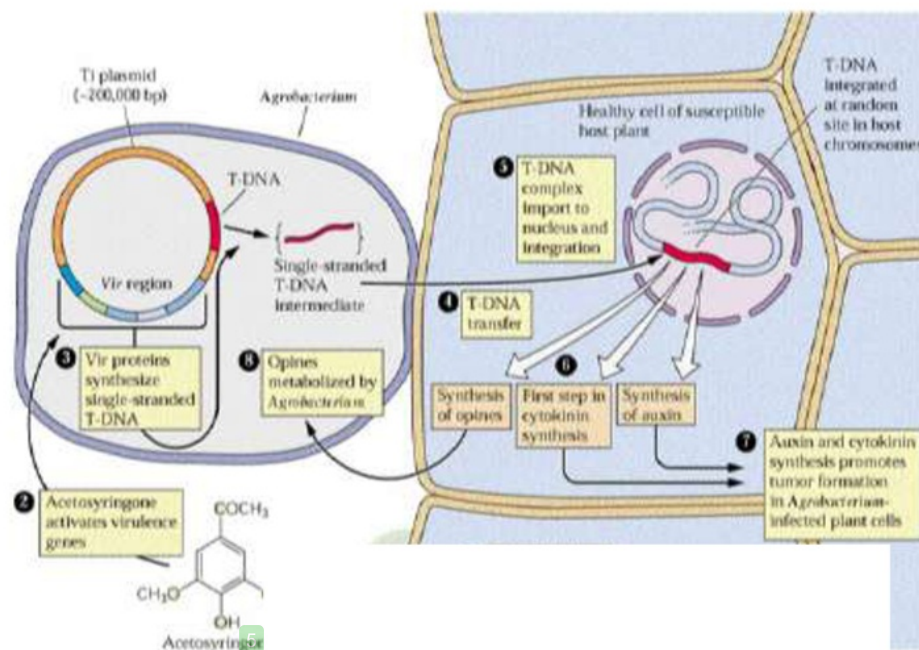
Agrobacterium tumefaciens berbentuk batang (rod) (Gambar 2. 3), merupakan bakteri fitopatogen gram negatif dalam tanah yang secara alami dapat menginfeksi jaringan luka berbagai tanaman dikotil dan menyebabkan terbentuknya *crown gall* (tumor) akibat transfer fragmen T-DNA dari plasmid Ti (*tumor inducing*). Karena sifat tersebut *Agrobacterium* dapat digunakan untuk transfer gen asing kedalam tanaman dengan cara menyisipkan gen tertentu pada T-DNA (Smith and Townsend, 1907). Ti plasmid merupakan *single copy* berukuran sekitar 200 kb dan stabil pada temperatur dibawah 30°C. Ti plasmid mengandung gen yang terlibat dalam proses infeksi dan sebagian dari sequennya berintegrasi dengan kromosom tanaman yaitu bagian T-DNA (Rachmawati, 2000).



Gambar 2.3. *Agrobacterium* (Smith and Townsend, 1907)

Agrobacterium tumefaciens memiliki tiga komponen utama yang digunakan untuk menginfeksi, yaitu T-DNA, gen *vir* (virulen region) dan gen *chromosomal virulence* (*chv*). T-DNA dapat diekspresikan oleh sel tanaman berupa ⁶ sintesis fitohormon (auksin dan

sitokinin) dan opin yang mengakibatkan jaringan akan berproliferasi. Gen *vir* akan mensintesis protein virulen yang dapat menginduksi terjadinya transfer dan integrasi T-DNA dalam genom tanaman. Gen *vir* dapat terekspresi jika ada inducer berupa senyawa monosiklik fenolik seperti asetosyringone (AS). Asetosyringone ditambahkan dalam media ko-kultivasi dengan konsentrasi 100-200 μM untuk menginduksi pergerakan *Agrobacterium* secara kemotaksis mendekati sel tanaman dan akan mengaktifkan gen-gen virulen pada plasmid Ti yang akan memicu transfer T-DNA ke genom tanaman (Gambar 2. 4). Komponen ketiga yaitu gen *chromosomal virulence* (*chv*) berfungsi untuk pelekatan bakteri ke dalam sel tanaman dengan membentuk senyawa protein β -1,2-glukan (Sheng, 1996).



Gambar 2.4. Mekanisme transfer T-DNA *Agrobacterium* ke genom tanaman (Zupan *et al.*, 2000)

2.4. Transformasi genetik pada tanaman anggrek

Semiarti *et al.* (2007) mendapatkan bahwa overekspresi gen *BP/KNAT1* dengan promotor 35S dari *CAMV* (*Cauliflower Mosaic Virus*) pada tanaman anggrek *Phalaenopsis amabilis* menghasilkan fenotip multiple shoot serta bentuk daun menyerupai terompet dan belah ketupat (*rectangular*).

Gen *DOH1* (*Dendrobium Orchid Homeobox 1*) telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari tanaman anggrek hibrid *Dendrobium* Madame Thong-in dan diduga sebagai satu-satunya gen *KNOX* kelas 1 yang terdapat pada anggrek tersebut (Yu *et al.*, 2000). *DOH1* memegang peranan penting dalam memelihara arsitektur dasar pada tanaman anggrek melalui kontrol dari pembentukan dan perkembangan meristem ujung akar dan struktur batang. *Downregulation* (penonaktifan) *DOH1* pada meristem ujung batang diperlukan untuk transisi pembungaan (*Floral transition*) (Yu *et al.*, 2000). Overekspresi dari gen *DOH1* pada anggrek *Dendrobium* Madame Thong-in menghasilkan fenotip multiple shoot yang menunjukkan peran gen *DOH1* dalam pembentukan dasar arsitektur tanaman anggrek (Yu *et al.*, 2001).

2.5. Tinjauan tentang Gen *KNAT1*

Gen *KNAT1* (*Knotted like-Arabidopsis thaliana*) diisolasi dan dikarakterisasi dari tanaman *Arabidopsis thaliana*. Gen *KNAT1* terutama diekspresikan di sekitar shoot apical meristem (SAM) dan berperan mengatur perkembangan SAM *Arabidopsis thaliana* (Byrne *et al.*, 2002). Bersama-sama dengan gen *KNOX* lain seperti *AS1* (*Asymmetric Leaves 1*) dan *STM* (*SHOOTMERISTEMLESS*) berfungsi mengatur pembentukan, perkembangan dan pemeliharaan meristem ujung batang (Barton, 2001).

Pada tanaman *Arabidopsis thaliana*, overekspresi gen *KNAT1* menyebabkan terbentuknya tunas adventif pada permukaan atas dan bawah daun serta adanya bentuk daun yang berlekuk tepi daunnya (*lobbed leaves*) (Lincoln *et al.*, 1994; Chuck *et al.*, 1996). Frugis *et al.* (2001) mendapatkan bahwa overekspresi gen *KNAT1* pada tanaman lettuce (*Lactuca sativa*) menginduksi pembentukan struktur yang menyerupai daun pada bagian tepi daun. Dari penelitian tersebut juga didapatkan bahwa kemampuan regenerasi dari *transformed callus* (kalus yang telah ditransformasi) lebih tinggi dibandingkan non-transforman setelah dipindah ke medium standar untuk regenerasi tanaman lettuce. Pada tanaman *Nicotiana tabacum*, overekspresi *KNAT1* menyebabkan terbentuknya meristem ektopik pada daun (Chuck *et al.*, 1996).

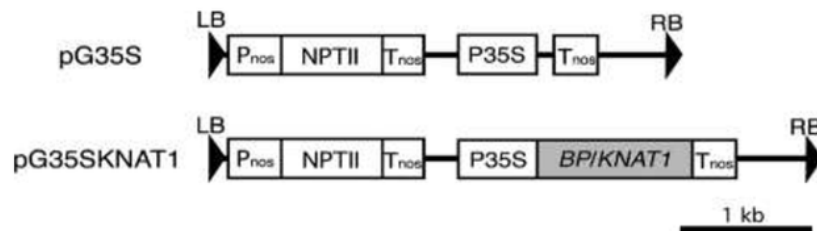
2.6. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberhasilan transformasi.

2.6.1. Optikal densitas (OD)

Pemilihan strain *Agrobacterium* dan vektor sangat berpengaruh pada keberhasilan transformasi. Strain *Agrobacterium* yang tepat akan meningkatkan efisiensi transformasi dengan menghasilkan daerah infeksi yang luas, hal tersebut akan berpengaruh pada tingkat virulensi strain yang digunakan (Hiei *et al.*, 1994; Smith and Hood, 1995). Beberapa strain yang umum digunakan dan memiliki virulensi yang tinggi adalah LBA4404 dan EHA101/105 dengan optikal densitas (OD₆₀₀) 0,6-0,8. Pada penelitian ini digunakan strain *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 pada optikal densitas (OD₆₀₀) 0,8 karena pada studi literatur beberapa spesies anggrek optimal pada densitas tersebut, diantaranya dari hasil optimasi optikal densitas Gnasekaran *et al.*, (2014) pada anggrek *Vanda kasem* diketahui dengan panjang gelombang 600, optikal densitas yang paling optimal adalah 0,8 (OD₆₀₀:0,8) dengan persentase ekspresi GUS sebesar 91,6% dibandingkan 0,4 (51,6%); 0,6 (60%); 1,0 (33,3%) dan 1,2 (31,6%), begitu

juga pada anggrek *Vanda*, *Cattleya* dan *D. nobile* (Men *et al.*, 2003). *Agrobacterium* yang digunakan telah dikonstruksi menggunakan vektor pG35S dengan gen *nptII* sebagai gen penanda seleksi dan *kna1* sebagai gen interes. Promoter yang digunakan 35S dari CAMV (*Cauliflower mosaic virus*).

Gambar 2. 5 merupakan konstruksi dari gen dalam vektor biner pG35S, gen interes *BP/kna1*, RB (Right border); LB (left border); P_{nos} (promoter dari gen nopaline sintetase); T_{nos} (sisi polyadenylation, gen nopaline sintetase); *nptII* (gen neomycin phosphotransferase) seleksi kanamisin; P35S promoter dari CaMV (Semiarti *et al.*, 2007).



Gambar 2. 5. Struktur T-DNA dari plasmid pG35S dan pG35SKNAT1 (Semiarti *et al.*, 2007)

2.6.2 Lama waktu infeksi

Selain optikal densitas, lama waktu infeksi *Agrobacterium* juga menentukan keberhasilan transformasi. Lama waktu infeksi sangat beragam mulai dari beberapa detik sampai beberapa jam. Infeksi merupakan proses perendaman eksplan dalam media cair yang mengandung *Agrobacterium* agar bakteri menempel pada eksplan dan selanjutnya terjadi transfer T-DNA ke genom tanaman selama ko-kultivasi. Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa waktu yang paling efisien pada *D. nobile* adalah 30 menit dengan efisiensi 18% dibandingkan 45 menit (8%) dan 60 menit (4%) (Men *et al.* 2003). Pada *Vanda kasem* waktu infeksi paling optimal adalah 30 menit (80%) dibandingkan 10 menit (23,3%) dan 20 menit (33,6%) (Gnasekaran *et al.*, 2014), begitu juga pada *P. amabilis* menggunakan waktu infeksi selama 30

menit (Semiarti *et al.*, 2007). Dari studi literatur tersebut maka pada penelitian ini digunakan waktu infeksi selama 30 menit.

2.6.3. Ko-kultivasi

Ko-kultivasi merupakan tahapan dalam transformasi genetik yang dilakukan setelah eksplan diinfeksi dengan *Agrobacterium* dan sebelum eksplan dipindahkan pada media seleksi yang mengandung antibiotik. Ko-kultivasi merupakan faktor yang menentukan keberhasilan dan efisiensi transformasi genetik, karena pada saat ko-kultivasi *Agrobacterium* akan mentransfer T-DNA dalam genom tanaman setelah itu eksplan akan melakukan pengaturan fungsi fisiologi dan perkembangan untuk diferensiasi menjadi tunas atau akar .

Ko-kultivasi merupakan waktu yang diperlukan oleh *Agrobacterium* untuk menginfeksi dan mentransfer gen (T-DNA plasmid) ke tanaman, yang dilakukan setelah eksplan diinfeksi dan sebelum eksplan diseleksi pada media seleksi yang mengandung antibiotik. Lama ko-kultivasi yang paling efisien untuk anggrek *D. nobile*, *Vanda* sp. dan *Cattleya* adalah 2-3 hari (Men *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010) sedangkan pada spesies lain *Vanda kasem* dan *Phalaenopsis amabilis* lama ko-kultivasi yang efisien yaitu 4 hari (Gnasekaran *et al.*, 2014; Semiarti *et al.*, 2007). Lama ko-kultivasi akan menentukan efisiensi transfer T-DNA dari plasmid *Agrobacterium* ke tanaman. Bila ko-kultivasi terlalu cepat maka hasil transformasi tidak akan optimal, hal ini mungkin disebabkan *Agrobacterium* belum mentransfer T-DNA dan hanya menempel pada sel tanaman. Jika ko-kultivasi terlalu lama dapat menyebabkan sel tanaman mengalami necrosis dan akhirnya mati karena *Agrobacterium* mengalami *overgrowth* sehingga jumlah *Agrobacterium* menjadi sangat banyak. Selain itu semakin lama ko-kultivasi yang dilakukan akan semakin memacu perkembangan populasi *Agrobacterium* semakin tinggi, sehingga hal ini akan mengganggu proses mematikan bakteri dalam transformasi tersebut.

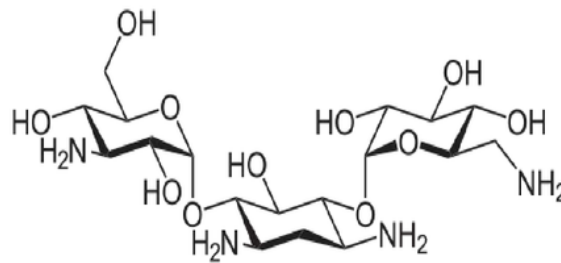
Lama ko-kultivasi berbeda-beda pada setiap spesies dan eksplan yang digunakan, hasil beberapa jurnal menunjukkan bahwa proses ko-kultivasi *protocorm like bodies* beberapa spesies anggrek dalam proses transformasi genetik melalui *Agrobacterium*, ko-kultivasi yang efisien cukup dilaksanakan 2-4 hari. Dalam media ko-kultivasi juga ditambahkan Asetosyiringone dengan konsentrasi 100-200 μ M sebagai *inducer* proses transfer T-DNA dari plasmid Ti dengan mengaktifkan gen *vir*. Asetosyiringone adalah senyawa fenol yang dapat menginduksi pergerakan *Agrobacterium* secara kemotaksis mendekati sel tanaman dan akan mengaktifkan gen-gen virulen pada plasmid Ti yang akan memicu transfer T-DNA ke genom tanaman. Secara alami fenol hanya bisa dihasilkan oleh tanaman dikotil sedangkan tanaman monokotil tidak bisa atau sulit untuk memproduksi senyawa fenol sehingga dalam media ko-kultivasi ditambahkan asetosyiringone untuk membantu transfer T-DNA. Setelah ko-kultivasi selanjutnya digunakan antibiotik untuk menghilangkan dan menghindari pertumbuhan berlebihan dari *Agrobacterium* dengan menggunakan antibiotik carbenisilin dan cefotaxim, kedua antibiotik tersebut dapat menghambat pembentukan dinding sel bakteri. Cefotaxim memiliki efektivitas lebih tinggi untuk menghambat pembentukan dinding sel dari pada carbenicilin (Rachmawati, 2006). Belarmino and Mii (2000) dan Semiarti *et al.* (2011) melaporkan antibiotik cefotaxim pada konsentrasi 300 mg/L mampu menghambat pertumbuhan dan membunuh *A. tumefaciens* pada transformasi anggrek *Coelogyne pandurata* dan *Phalaenopsis*.

2.7. Identifikasi Keberhasilan Transformasi

2.7.1. Gen Penanda Seleksi (Kanamisin/npt II)

Gen penanda seleksi merupakan metode yang digunakan untuk menentukan efisiensi transformasi genetik dengan cara menyeleksi eksplan transforman yang telah tersisipi gen

seleksi (*nptII*). Gen penanda seleksi yang disisipkan dapat menghasilkan enzim yang akan menghambat aktifitas antibiotik terhadap eksplan sehingga eksplan akan tahan (resisten) terhadap antibiotik tersebut. Bahan penyeleksi secara umum bersifat racun/toksin akan tetapi senyawa toksin dari penanda seleksi tidak mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan tanaman hasil transforman (Teixeria da Silva *et al.*, 2011). Penggunaan antibiotik sebagai penyeleksi pada media regenerasi dalam proses transformasi dilakukan setelah ko-kultivasi.



Gambar 2. 6. Struktur kimia kanamisin (Garrod, 1981)

Jenis penanda seleksi antibiotik yang banyak digunakan untuk seleksi tanaman transformasi adalah kanamisin. Kanamisin merupakan jenis antibiotik yang memiliki senyawa penyusun dari kanamisin sulfat (Gambar 2. 6.) yang disandi oleh gen *nptII*. Gen *nptII* menyandi enzim neomycin phosphotransferase yang memiliki sifat resisten terhadap neomycin/kanamisin. Pemakaian antibiotik kanamisin sebagai agen penyeleksi pada kultur *Agrobacterium* digunakan dalam proses transformasi dengan pertimbangan bahwa gen penyandi ketahanan terhadap antibiotik kanamisin tersebut ada pada plasmid vektor yang nantinya akan ditransfer pada tanaman.

Dalam penelitian Gnasekaran *et al.* (2014) digunakan gen *nptII* sebagai gen penyeleksi yang menyandi kanamisin, pada penelitian tersebut menggunakan konsentrasi 5-50 mg/L dan hasil menunjukkan bahwa PLB Anggrek *Vanda kasem* tersebut dapat menghasilkan senyawa yang bersifat resisten pada antibiotik kanamisin sehingga semua PLB tidak terseleksi dan tetap

hidup pada semua konsentrasi yang diberikan. Sedangkan pada penelitian Semiarti *et al.* (2007) penggunaan kanamisin sebagai gen penyeleksi diberikan pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 100-200 mg/L. Dari hasil penggunaan perbedaan konsentrasi tersebut dapat diketahui bahwa kanamisin sebagai penanda seleksi dibutuhkan dalam konsentrasi yang tinggi. Dibutuhkannya konsentrasi yang tinggi dari kanamisin dapat disebabkan adanya antibiotik resistensi endogen yang dihasilkan pada pemberian konsentrasi tertentu (rendah) sehingga seleksi transformasi akan menjadi lebih sulit bila digunakan antibiotik sebagai penanda seleksi (Chin *et al.*, 2007). Hasil penelitian pada beberapa species tanaman monokotil seperti *Triticum aestivum* (Supartana *et al.*, 2006) serta anggrek *Vanda tricolor* (Semiarti *et al.*, 2011), *Phalaenopsis amabilis* (Semiarti *et al.*, 2007) dan *Dendrobium* Madame Thong-In (Yu *et al.* 2001) melaporkan bahwa konsentrasi kanamicin yang efisien digunakan untuk seleksi adalah 200 mg/L.

2.7.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction merupakan teknik amplifikasi atau penggandaan fragmen DNA melalui proses pemanjangan nukleotida dari primer yang komplemen dengan untai DNA secara simultan. Secara keseluruhan PCR terdiri dari tiga tahap yaitu:

1. Denaturasi, dilakukan dengan pemanasan agar untai ganda DNA membuka dan menjadi untai tunggal, dimana masing-masing untai dapat bertindak sebagai template (cetakan). Denaturasi berlangsung pada suhu 90-95°C.
2. Anneling, tahap pendinginan (penurunan suhu) untuk penempelan primer pada untai DNA cetakan. Secara umum penempelan terjadi pada suhu 55-57 °C untuk primer 20 mer dan 34-40°C untuk primer 10 mer. Suhu penempelan yang ideal adalah 5°C dibawah suhu leleh dari setiap primer.

3. Elongasi, proses polimerasi atau pemanjangan oleh DNA polymerase setelah primer menempel pada untai DNA cetakan. DNA polymerase mulai mensintesis deoksinukleotida pada ujung 3'-OH dari primer. Sintesis DNA ini dilakukan pada suhu 72°C dimana enzim taq DNA polymerase dapat bekerja secara optimal (Sambrook *et al.*, 1989).

Ketiga tahap pada PCR tersebut merupakan satu siklus, pada proses ini siklus dilakukan secara berulang-ulang sehingga diperoleh banyak fragmen DNA yang mengandung susunan basa nukleotida. Untuk mengetahui ukuran pita-pita DNA maka dilanjutkan dengan proses elektroforesis. Elektroforesis merupakan teknik mengukur laju perpindahan atau pergerakan partikel bermuatan negatif/anion (DNA) menuju kutub positif (anode) dalam suatu medan listrik. Elektroforesis digunakan untuk mengamati hasil amplifikasi DNA. Hasil elektroforesis yang terlihat adalah terbentuknya *band* yang merupakan fragmen DNA hasil amplifikasi dan menunjukkan fragmen jumlah pasangan basanya. Elektroforesis menggunakan sumber arus listrik searah (DC), alat elektroforesis (*Comb, Well, platform, cetakan gel, buffer* (ionic dan *loading*), matriks elektroforesis, *marker* dan gel agarose).

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.**3.1 Tujuan**

Tujuan penelitian adalah:

1. Mendapatkan konsentrasi kanamicin yang tepat untuk seleksi transforman dan non transforman tanaman anggrek *D. lasianthera*.
2. Mengetahui lama waktu ko-kultivasi terhadap hasil efisiensi transformasi.

3.2 Manfaat Penelitian

Keberhasilan teknologi tanaman transgenik pada anggrek *D. lasianthera* dimasa depan dapat diaplikasikan untuk mikropropagasi jenis tanaman obat yang lain yang dibutuhkan secara massal sebagai bahan baku obat sekaligus untuk mikropropagasi tanaman hias, tanaman hutan, tanaman industri, dan jenis tanaman lain, karena luaran teknologi ini adalah strain tanaman anggrek *D. lasianthera* dengan totipotensi tinggi untuk mikropropagasi dan pertumbuhan vegetatif cepat.

25 BAB IV. METODE PENELITIAN

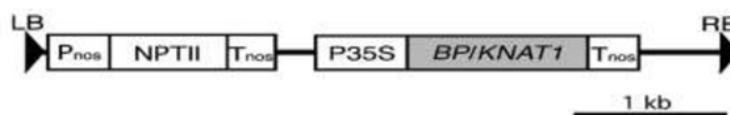
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-November 2016, bertempat di laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Genetika Molekuler program studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga (UNAIR) Surabaya.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan adalah *plantlet* anggrek *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm dari pusat anggrek DD Orchid, Batu, Jawa Timur. *Protocorm-like bodies* sebagai target transformasi. Strain *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 dengan konstruksi gen BP/KNAT1 dengan promoter 35S dari Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) dan *nptII* dikonstruksi dalam vektor biner pGreen (pG35S) (Gambar 4.1). Konstruksi gen didapat dari Dr. Endang Semiarti, Fakultas Biologi UGM.



Gambar 4.1 Konstruksi gen pada *Agrobacterium tumefaciens*

Media LB (Trypton, yeast extract, NaCl) digunakan untuk inokulasi bakteri *A. tumefaciens*. pepton, gula (sukrosa), agar-agar, akuades steril, sabun cair, spiritus, KOH 1 N, HCl 1 N, asetosyringone, kanamisin, cefotaxim dan aquades steril.

Bahan isolasi DNA 0,3 gram sampel tanaman dan isolasi DNA bakteri, nitrogen cair, cetyl trimetyl ammonium bromide (CTAB), isopropanol, etanol 70%, etanol absolute, trisEDTA (E), fenol, kloroform, isoamyl alkohol, natrium asetat, NaOH, SDA 1%, glukosa, tris-HCl (T) dan Na-EDTA. Bahan PCR yaitu dNTPmix (Takara), primer (SIGMA Genosys)

35S0 dengan se5uens 5'-TATCCTTCGCAAGACCCTTC-3' dan NOS dengan seuens 5'-GTATAATTGCGGGACTCTAATCA-3', sequen KNAT1F1 5'-CTTCCTAAAGAAGCACGGCAG-3' dan 5'-CCAGTGACGCTTTCTTTGGTT-3' untuk KNAT1R1, Taq DNA polymerase 10x reaksi buffer (bioacademia) dan Aquades steril. Bahan elektroforesis gel agarosa 0,7%; Tris-boric acid EDTA (TBE), bromphenol blue, ethidium bromida dan air destilasi.

1

3.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi autoklaf, *laminar air flow*, *shaker*, *centrifuge*, *thermocycler*, PCR tube 0,2 mL; mikropipet 20 μ L, 100 μ L dan 1000 μ L serta pipet tip kuning dan biru, tangki elektroforesis, spektrofotometer dan kuvet, waterbath, neraca analitik, magnetic stirrer, vortex, oven, inkubator, rotary shaker, kompor listrik, gelas ukur, gelas beaker, botol kultur, cawan petri, jarum ose, scalpel, pinset, pipet tetes, bunsen, spatula, pH indikator strips 4,0-7,0 (Merck), kertas saring, aluminium foil, sprayer, sarung tangan dan masker.

29

3.3 Cara Kerja

40

3.3.1 Tahap Persiapan

Pada tahap ini dilakukan sterilisasi alat dan media yang akan digunakan. Sterilisasi alat dilakukan selama 20 menit dan sterilisasi media dilakukan selama 15 menit dengan autoklaf pada tekanan 1,2 atm temperatur 121°C, kemudian alat disimpan dalam oven dan media disimpan di ruang inkubasi.

18

3.3.2 Tahap pelaksanaan

Tahap pelaksanaan terdiri atas beberapa bagian yang dilakukan di *Laminar Air Flow* (LAF). Tahap ini terdiri dari:

1. Pembuatan media Vacin and Went (VW) dan media Luria Bertani (LB)

Erlenmeyer 1000 mL diisi dengan 500 mL aquades steril kemudian komposisi media VW yang terdiri atas mikronutrien, makronutrien, vitamin, zat besi, myo-inositol, sukrosa (lampiran 1) dan pepton 3 g/L ditimbang dengan timbangan analitik kemudian dimasukkan satu per satu ke dalam erlenmeyer sambil ¹ diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setelah semua bahan tercampur, pH diukur menggunakan pH indikator strip pada pH 5,8 kemudian ditambahkan aquades sampai volume 1000 mL dan agar 8 g sambil diaduk dan dipanaskan diatas kompor listrik hingga homogen. Selanjutnya media dimasukkan dalam botol kultur dengan volume \pm 20 mL, kemudian di sterilkan ¹ dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1,2 atm selama 15 menit.

Untuk pembuatan ¹ media LB, disiapkan 50 mL aquades steril dalam Erlenmeyer 250 mL kemudian ditimbang Trypton 1 g dilarutkan hingga homogen, ditambahkan yeast extract 0,5 g kemudian NaCl 1 g dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Setelah semua bahan tercampur, pH diukur menggunakan pH indikator strip pada pH 7. Kemudian ditambah aquades sampai volume menjadi 100 mL. Untuk media padat ditambahkan dengan agar dan untuk media cair tanpa agar kemudian ⁵⁰ disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 1,2 atm selama 15 menit.

2. Persiapan eksplan (*protocorm-like bodies*) untuk transformasi

Daun nomor 2 dari pucuk *plantlet* dipotong menjadi 2 bagian (\pm 1-2 cm) secara aseptis ²¹ selanjutnya digunakan sebagai bahan eksplan. Eksplan tersebut ditanam dalam botol kultur berisi medium VW yang diberi perlakuan NAA dan thidiazuron berbagai konsentrasi. Kultur ²¹ diinkubasi di dalam ruang pada suhu 23 \pm 1°C dengan intensitas cahaya 3000 lux. Setiap 2 minggu, eksplan dipindah pada medium yang sama, dan diamati perkembangannya. *Protocorm-like bodies* selanjutnya digunakan sebagai target untuk transformasi.

3. Kultur *A. tumefaciens* pada media LB

Agrobacterium tumefaciens strain LBA4404 yang digunakan merupakan biakan murni yang telah terinsersi dengan gen *kna1* dan *nptII*. *Agrobacterium* ditumbuhkan pada media LB padat dengan cara streak dan diinkubasi selama 2 hari pada suhu 28°C. Selanjutnya satu koloni biakan *Agrobacterium* pembawa plasmid PG35S:KNAT1 diinokulasikan ke dalam 100 mL media LB cair dan diinkubasi dalam rotary shaker dengan kecepatan 150 rpm selama ± 24 jam pada suhu 30°C. Kemudian diukur kerapatan optiknya (optikal densitas/OD) menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang 600 nm = 0,6. Suspensi bakteri *A. tumefaciens* pada OD₆₀₀ nm= 0,6 siap digunakan untuk transformasi.

4. Uji ketahanan terhadap antibiotik.

Untuk menentukan konsentrasi minimum antibiotik kanamisin yang dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan PLB non-transforman yang telah ditransformasi, diperlukan uji ketahanan terhadap kanamisin. Uji efektifitas konsentrasi kanamisin menggunakan PLB non-trnasforman yang ditanam pada media inisiasi tunas (1/2MS + 30 g/L sukrosa + 2 g/L pepton + 0,5 BA + 1 TDZ) yang mengandung kadar kanamisin 25, 50, 75, 100 mg/L untuk mengetahui efektivitas kanamisin sebagai agen seleksi. *Protocorm-leke bodies* non transforman ditumbuhkan pada kondisi terang pada suhu 23±2⁰C. *Protocorm-leke bodies* disubkultur setiap 3 minggu sekali. Pengamatan dilakukan selama 6 minggu untuk melihat sensitivitas jaringan terhadap agen penyeleksi kanamisin. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah kalus yang mati akibat pengaruh kanamisin.

5. Transformasi genetik *protocorm-like bodies D. lasianthera* dan kokultivasi

Protocorm-like bodies diinfeksi dengan 2 mL suspensi *A. tumefaciens* ($OD_{600} = 0,6$) dalam 20 mL media VW cair yang mengandung 100 μM asetosiringon kemudian dishaker pada kecepatan 110 rpm suhu 28°C selama 30 menit. Selanjutnya PLB dikering anginkan diatas cawan petri yang sebelumnya diletakkan kertas saring steril diatasnya untuk mengurangi cairan suspensi bakteri. Selanjutnya PLB dipindahkan dalam media ko-kultivasi yaitu media VW padat yang mengandung 100 μM asetosyringone. Ko-kultivasi dilakukan selama 0, 1, 2 dan 3 hari dan di inkubasi pada kondisi gelap.

6. Eliminasi *A. tumefaciens* dan seleksi terhadap ketahanan terhadap antibiotik.

Setelah ko-kultivasi, PLB yang telah diinfeksi dicuci dengan aquades steril sebanyak 3 kali, lalu dikering anginkan pada kertas saring steril dan plb kemudian dipindahkan pada media VW cair yang mengandung cefotaxim 300 mg/L dan di shaker 100 rpm selama 24 jam pada kondisi gelap. Selanjutnya PLB yang telah bebas *Agrobacterium* ditanam pada media seleksi (1/2MS padat + 30 g/L sukrosa + 2 g/L pepton + 0,5 BA + 1 TDZ + 100 mg/L kanamisin) kemudian diinkubasi dengan penyinaran photoperiodik (16 jam penyinaran dan 8 jam gelap) sampai beberapa bagian PLB tampak muncul tonjolan-tonjolan berwarna hijau yang mengindikasikan adanya calon tunas.

Protocorm-like bodies yang hidup dan mampu beregenerasi membentuk tunas pada media seleksi kanamisin diasumsikan sebagai putatif transforman, selanjutnya dilakukan subkultur pada media regenerasi setiap 2 minggu selama 8 minggu. Setelah 8 minggu dilakukan pengamatan untuk mengetahui efisiensi transformasi. Tunas dan atau plantlet putatif transforman ini siap untuk di isolasi DNA nya.

3.4. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

3.4.1. Isolasi DNA genom anggrek putatif transforman

DNA genom anggrek *D. lasianthera* diisolasi dari tanaman putatif transforman dan non transforman menurut metode Murray dan Thompson (1980) dengan beberapa modifikasi. Bahan tanaman (PLB yang telah muncul tunas/daun/akar) 0,3 g dimasukkan ke dalam mortar dan disiram dengan nitrogen cair, kemudian digerus hingga menjadi serbuk. Serbuk dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 mL yang sudah diisi dengan 400 µL cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), lalu di vorteks. Kemudian ditambah 4 µL RNase, lalu divorteks sampai homogen. Selanjutnya diinkubasi pada waterbath suhu 55-65°C selama 30 menit dengan setiap 10 menit dibolak balik agar homogen. Diekstraksi dengan menambahkan 500 µL kloroform (1:1) dan dirotary shaker selama 30 menit pada suhu kamar. Tutup tabung dibuka sesaat untuk menghilangkan gas yang terbentuk selama penggojogan.

Sampel disentrifugasi 5000 rpm selama 5 menit, kemudian larutan jernih di bagian atas (supernatan) diambil 300-400 µL dan dimasukkan ke tabung eppendorf baru, ditambahkan 300-400 µL larutan isopropanol (1:1) dicampur secara inversi kemudian didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar. Selanjutnya sampel disentrifugasi 5000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, pellet berwarna putih pada bagian dasar tabung dibilas dengan 100 µL larutan etanol 70 % dan disentrifugasi 10.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang, pellet DNA dikeringanginkan kemudian diresuspensi dengan larutan 10 T- 0,1 E (10 bagian Tris: 0,1 EDTA hingga larut dan disimpan pada suhu 4°C).

Purifikasi : DNA yang telah diresuspensikan dengan 10 bagian tris (T) dan 0,1 EDTA (E) ditambahkan 50 µL larutan fenol : kloroform : isoamyl alcohol (25:24:1), dishaker 100-200 rpm selama 15 menit, selanjutnya disentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan

dipindahkan ke tabung ependorf baru dan dilakukan presipitasi ethanol dengan ditambah natrium asetat 3 M (pH 5,2) sebanyak 10% dari volume supernatan dan ethanol absolute dingin sebanyak 2 kali total volume, kemudian disimpan dalam freezer selama 15 menit dan selanjutnya dilakukan sentrifugasi 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet DNA dicuci dengan ethanol 70 % kemudian ethanol dibuang dan dikeringkan. Pellet DNA diresuspensi dengan 50 μ L larutan 10 mM tris HCl-0,1 EDTA (TE).

3.4.2 Isolasi DNA plasmid

Disiapkan 50 μ L reaksi PCR (5 μ L 10x Ex Taq buffer PCR; 4 μ L dNTP (mix 2,5 μ M); 1 μ L primer Fw *KNAT1* 100 μ M; 1 μ L primer Rev *KNAT1* 100 μ M; 0,5 μ L enzim Taq polymerase), 4 μ L sampel (DNA cetakan hasil isolasi). Ditambahkan aquades terdestilasi sampai volume total 50 μ L (35 μ L). dilakukan sentrifugasi selama 2 detik untuk menghomogenkan campuran reaksi, tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR yang suhunya diseting yaitu, tahap 1: Denaturasi awal 94°C 5 menit; tahap 2: Denaturasi 94°C 45 detik; Anneling 55°C 1 menit; Elongation 72°C 1 menit (kemudian diulangi tahap 2 sebanyak 30 kali). Tahap 3: Extention 72°C 5 menit dan Hold 4°C. Stop rekasi PCR, ambil PCR sampel simpan direfrigator 4°C, kemudian keluar dari program dan kembali ke setting menu utama mesin PCR baru dimatikan. Hasil PCR selanjutnya dielektroforesis dengan gel agarosa 0,7% untuk mengetahui hasil amplifikasinya.

3.4.3 Elektroforesis

Gel agarosa dibuat dengan cara melarutkan 0,7 gram agarose dalam 100 mL larutan Tris-boric acid EDTA (TBE), kemudian dipanaskan sampai larutan benar-benar larut, dipasang sisir untuk membentuk sumuran (*well*) kemudian tuang agarose ke dalam cetakan elektroforesis (jangan sampai terbentuk gelembung udara). Running dilakukan dengan cara, gel agarose yang

telah padat dimasukkan dalam tangki elektroforesis yang sudah diisi dengan buffer TBE 1x, sebelumnya sumuran pada gel dicuci menggunakan larutan TBE dengan syring.

Buat campuran larutan DNA 5 μL : 2 μL sampel DNA + 2 μL DNA loading buffer (bromophenol blue) + 1 μL air destilasi dicampur diatas kertas paraffin dan dimasukkan ke dalam sumuran gel (*loading well*) dan dicatat urutan sampel dalam sumuran. Hidupkan tombol sumber tenaga listrik dengan arah muatan (-) kearah (+), kemudian DNA dibiarkan bermigrasi selama 30 menit. Ambil gel, rendam dengan larutan 0,01% etidium bromide dalam TBE 1x selama 15 menit kemudian gel diamati dibawah lampu UV.

3.5. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lama kokultivasi 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Parameter yang diamati adalah persentase plb yang lolos pada medium seleksi kanamisin (putatif transgenik), efisiensi transformasi dan uji konfirmasi keberadaan gen *Knat1* dengan metode PCR.

3.6 Analisis data

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah data efisiensi transformasi yang dianalisis secara deskriptif. Penghitungan efisiensi transformasi menggunakan rumus sebagai berikut.

Efisiensi transformasi :

Σ kalus yang dapat hidup dalam medium seleksi kanamisin (beregenerasi)

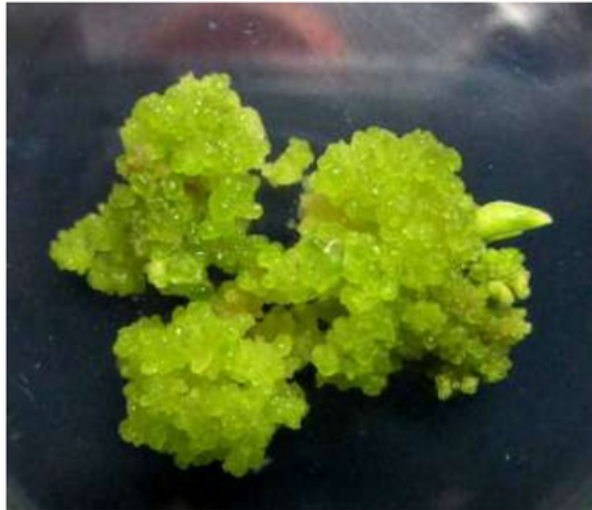
Σ kalus yang ditransformasi

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu: (1) Induksi *protocorm-like bodies* (PLB) sebagai target transformasi, (2) uji ketahanan PLB dalam medium seleksi yang diberi antibiotik kanamisin, (3) transformasi gen *Knat1* dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens*. Strain LBA4404 yang membawa plasmid PG35S: *Knat1*, (4) konfirmasi gen *Knat1* terhadap tanaman putatif transgenik dengan PCR.

5.1. Induksi *protocorm-like bodies* sebagai target transformasi

Protocorm-like bodies adalah istilah pada anggrek yaitu badan atau bentukan yang menyerupai *protocorm* yang belum mengalami diferensiasi. *Protocorm-like bodies* biasanya muncul ketika terjadi pelukaan pada jaringan atau organ tanaman anggrek. *Protocorm-like bodies* yang diinduksi dari potongan daun dan digunakan sebagai target untuk transformasi ditanam pada medium VW yang diberi NAA 0,5 mg/L + thidiazuron 1 mg/L + pepton 2g/L. *Protocorm-like bodies* mulai terbentuk pada minggu ke-3 setelah dikultur, tampak berwarna bening dan terus berkembang dan berproliferasi nampak remah (friabel) dan berwarna kuning (Gambar 5.1).



Gambar 5.1. *Protocorm-like bodies* anggrek *D. lasianthera* digunakan sebagai target untuk transformasi.

5.2. Uji ketahanan *PLB* dalam medium seleksi yang diberi antibiotik kanamisin

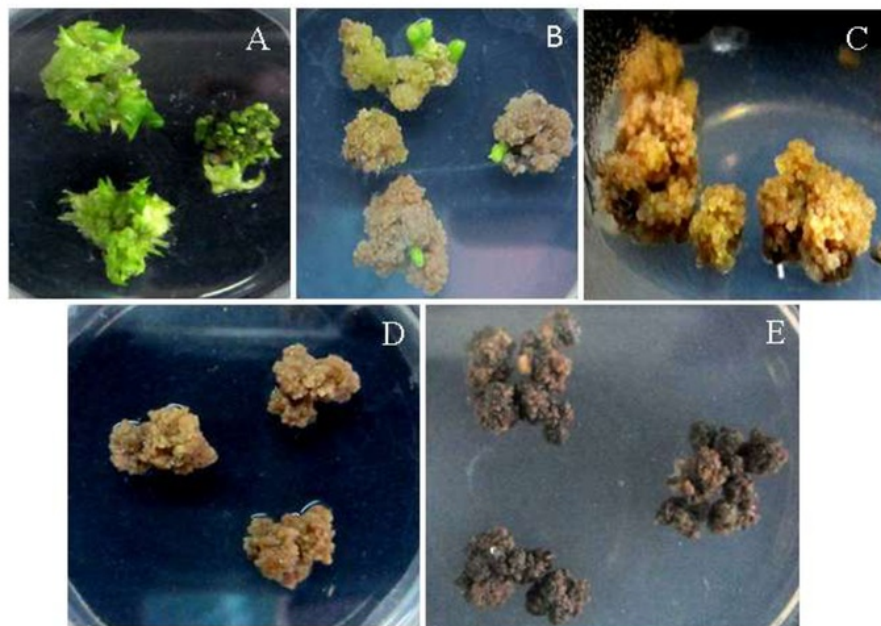
Seleksi tanaman hasil transformasi merupakan tahapan penting dalam transformasi tanaman. Sensitifitas *PLB* anggrek non transforman terhadap antibiotik dilakukan terlebih dahulu pada media regenerasi yang mengandung berbagai konsentrasi kanamisin. Konsentrasi minimum antibiotik yang dapat menghambat regenerasi *PLB* anggrek non transforman atau dapat mematikan jaringan eksplan dapat digunakan sebagai konsentrasi pada media regenerasi untuk menyeleksi *PLB* transforman. Konsentrasi kanamisin harus cukup untuk mendeteksi jaringan agar dapat memperkecil eksplan yang terhindar (*escape*) dari seleksi (Damayanti *et al.*, 2009).

Pemberian kanamisin sebagai penanda seleksi pada kegiatan transformasi anggrek *D. lasianthera* telah dilakukan dengan pemberian 25, 50, 75, dan 100 mg/L kanamisin (Tabel

5.1). Hal ini dikarenakan gen *nptII* yang membawa sifat resistensi terhadap antibiotik kanamisin juga disisipkan ke dalam vektor yang digunakan sebagai marker seleksi.

Tabel 5.1. Persentase PLB anggrek *D. lasianthera* yang bertahan hidup dalam media VW yang mengandung kanamisin berbagai konsentrasi pada minggu ke 3, 6 dan 9.

Konsentrasi Kanamisin (mg/L)	Persentase (%) PLB hidup pada minggu ke...		
	3	6	9
0	100	100	90
25	70	70	60
50	40	20	0
75	20	0	0
100	0	0	0



Gambar 5.2. *Protocorm-like bodies Dendrobium lasianthera* umur 9 minggu pada media VW diberi kanamisin dengan berbagai konsentrasi. A. Medium tanpa kanamisin; B.

Medium VW diberi kanamicin 25 mg/L; C. Medium VW diberi kanamicin 50 mg/L; D. Medium VW diberi kanamicin 75 mg/L; E. Medium VW diberi kanamicin 100 mg/L.

Konsentrasi kanamisin dalam media seleksi akan mempengaruhi lama PLB yang dapat bertahan hidup pada medium seleksi. Pada konsentrasi kanamisin 25 mg/L, PLB dapat bertahan hidup sebanyak 90% pada minggu ke-9. Sedangkan pada konsentrasi 50 mg/L, 75 mg/L dan 100 mg/L pada minggu ke-9 seluruh PLB mati. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut kanamicin mampu menghambat pertumbuhan PLB, yang tampak dari penurunan jumlah PLB yang hidup sampai minggu ke-9. Kematian PLB teramati dari warna PLB yang berubah warna dari hijau menjadi coklat dan berlanjut menjadi hitam. Morfologi PLB pada berbagai konsentrasi kanamicin disajikan pada Gambar 5.2.

Kalus berwarna hitam mengindikasikan adanya kematian kalus akibat kalus tidak mengandung gen npt II. Hal ini disebabkan karena antibiotik kanamisin akan mengikat 30S sub unit ribosom, dengan demikian akan menghalangi inisiasi pada proses translasi (Moazed and Noller, 1987). Gen npt II menyandi neomocin phosphotransferase II yang dapat melindungi sel inang terhadap antibiotik aminoglikosidase seperti kanamisin (Wilmink and Dons, 1993).

Konsentrasi optimum kanamisin sebagai agen penyeleksi adalah menggunakan konsentrasi paling rendah yang mampu membunuh jaringan nontransforman (Webb and Morris, 1992), sehingga pada penelitian ini digunakan konsentrasi 50 mg/L dalam medium seleksi, karena mampu mematikan PLB 100% setelah 9 minggu. Pada medium seleksi antibiotik, PLB yang berhasil ditransformasi, sel dan jaringannya akan mengandung gen ketahanan kanamisin sehingga mampu tumbuh pada medium sleksi, sehingga PLB akan tumbuh menjadi tunas yang berwarna hijau (Gambar 5.2.B) dan mampu beregenerasi menjadi *plantlet*, sedangkan PLB

yang tidak tersisipi gen ketahanan kanamisin akan terhambat pertumbuhannya, sehingga PLB berwarna coklat dan hitam.

5.3. Optimalisasi lama waktu kokultivasi pada transformasi plb

Keberhasilan transformasi melalui *A. tumefaciens* dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu densitas bakteri, jenis dan kondisi eksplan, dan lama waktu ko-kultivasi (Hinchee *et al.*, 1998). Tahap ko-kultivasi merupakan tahap penting dalam transformasi, karena selama proses ko-kultivasi terjadi interaksi antara *A. tumefaciens* dengan aktivitas gen vir dari Ti plasmid sehingga terjadi proses pemotongan dan penggabungan Ti plasmid ke dalam genom tanaman (Stachel *et al.*, 1986).

Penelitian ini menggunakan lama ko-kultivasi untuk transformasi 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Pada proses ko-kultivasi ditambahkan asetosiringone 100 μ M yang bertujuan untuk menginduksi kerja gen-gen virulen dan gen *chv* (genchromosomal) dari bakteri *A. tumefaciens* sehingga terjadi infeksi dan transfer gen (T-DNA) (Zambryski *et al.*, 1989). Protocorm-like bodies beregenerasi membentuk plantlet pada medium seleksi disajikan pada Gambar 5.3.

Lama ko-kultivasi (inkubasi) antara bakteri dan PLB sangat penting dan berpengaruh terhadap efektifitas infeksi bakteri *A. tumefaciens*. Ko-kultivasi yang terlalu cepat menyebabkan bakteri belum mampu menginfeksi sel-sel PLB dengan sempurna, sebaliknya ko-kultivasi yang terlalu lama akan terjadi pertumbuhan bakteri yang berlebihan sehingga akan menghambat pertumbuhan bahkan akan mematikan eksplan (Pardal *et al.*, 2004).

Tabel 5. 2. Pengaruh lama kokultivasi terhadap efisiensi transformasi anggrek *D. lasianthera*.

Lama ko kultivasi (jam)	Jumlah kalus yang ditransformasi	Jumlah tunas yang hidup pada medium seleksi kanamisin 50 mg/L	Jumlah tunas yang mampu beregenerasi menjadi plantlet	Efisiensi transformasi (%)
0	18	0	0	0
24	18	0	0	0
48	18	6	2	11
72	18	8	3	16

Pada penelitian ini kokultivasi selama 72 jam memberikan hasil jumlah tunas yang lolos pada medium seleksi kanamisin lebih banyak yaitu 3 tunas dibanding perlakuan yang. Pada lama kokultivasi 48 jam menghasilkan jumlah tunas 2 dan pada perlakuan 0 jam dan 24 jam tidak ada tunas yang lolos dalam medium seleksi (Tabel 2.).

Perlakuan kokultivasi dengan lama waktu 72 jam juga pernah dilakukan pada transformasi berbagai tanaman lain yaitu pada *Vigna radiate* (Tazeen and Mirza, 2004), padi (Arockiasamy and Ignacimuthu, 2007), nenas (Gangopadhyay et al., 2009).

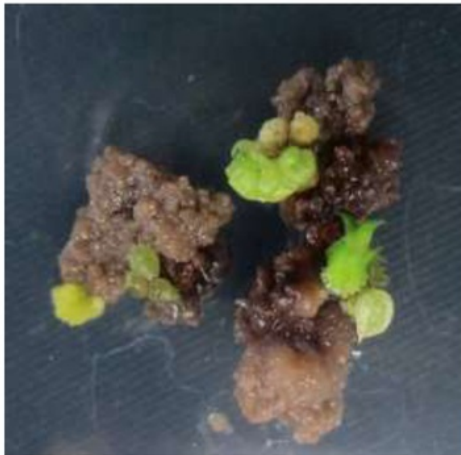
5.4. Penentuan efisiensi transformasi pada plb *D. lasianthera*

Keberhasilan transformasi pada penelitian ini diamati dari kemampuan kalus yang dapat bertahan hidup pada medium seleksi dan mampu beregenerasi membentuk *plantlet*. Secara alami tumbuhan anggrek tidak toleran terhadap kanamisin, karena tidak memiliki gen resisten kanamisin. Seleksi tahap awal yang dilakukan untuk membedakan transforman dan nontransforman adalah dengan menumbuhkan eksplan hasil transformasi pada medium seleksi yang mengandung antibiotik kanamisin 50 mg/L.

Efisiensi transformasi memiliki beberapa pengertian dalam literatur. Menurut Madhulatha (2007) efisiensi transformasi adalah persen eksplan yang dapat beregenerasi pada media seleksi dibandingkan dengan jumlah kalus yang ditransformasi. Kalus yang lolos dalam medium seleksi dan mampu beregenerasi menjadi *plantlet* selanjutnya disebut sebagai *plantlet* putatif transgenik.

Pada penelitian ini diperoleh efisiensi transformasi 16% dengan lama kokultivasi 72 jam, 11% dengan lama kokultivasi 48 jam, dan 0% pada lama kokultivasi 24 jam dan 0 jam. Hasil yang mirip dilaporkan Susiyanti *et al.*, (2007) bahwa pada transformasi tebu diperoleh hasil efisiensi transformasi 15% pada kokultivasi 72 jam.

Data Tabel 2 nampak bahwa kalus yang lolos dalam medium seleksi tidak semuanya dapat beregenerasi. Hal ini disebabkan ketidakmampuan kalus tumbuh dalam media regenerasi. *Plantlet D. lasianthera* putatif transgenik diduga telah tersisipi oleh gen KNAT1 dengan kemampuannya dapat tumbuh dalam medium seleksi kannamisin, namun untuk memperkuat hasil tersebut perlu dilakukan analisis PCR.



Gambar 5.3. *Protocorm-like bodies* beregenerasi membentuk *plantlet* pada medium seleksi

BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Tahap berikutnya adalah:

Tahap 1. Uji konfirmasi integrasi gen *Knat1* hasil transformasi dengan menggunakan PCR

Tahap 2. Pengamatan hasil transformasi: analisis morfologi meliputi morfologi daun dan tanaman secara keseluruhan dan dibandingkan dengan tanaman non transforman.

Tahap 3. Mikropropagasi tanaman transgenik dan non transgenik.

DAFTAR PUSTAKA

- Adelheid, R.K. and Sugii, N. 1992. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. *Plant Cell Reports*. 11(9) : 484-488.
- Arditti, J. 1991. Fundamental of Orchid Biology. John Wiley & Sons. Amerika
- Arockiasamy, S and Ignacimuthu, S. 2007. Regeneration of transgenic plant from two indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars using shoot apex explants. *Plant Cell Reports*. 26: 1745-1753.
- Barton, M.K. 2001. Leaving the meristem behind: regulation of *KNOX* genes. *Genome Biology*. 2 (1) reviews: 10021-10023
- Belarmino, M.M and Mii, M. 2000. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Reports*. 19: 435-442.
- Binns, A.N. and Thomashow, M.F. 1988. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Annual Review of Microbiol.* 42: 575-606
- Bulpitt, C.J. 2005. The uses and misuses of orchids in medicine. *QJM: An International Journal of Medicine*. 98: 625-631.
- Bulpitt, C.J., Yan Li., Pauline F.Bulpitt., Juguang Wang. 2007. The use of orchids in chinese medicine. *J. R. Soc Med.* 100: 558-563.
- Byrne, M.E., Simorowski, J and R.A. Martienssen. 2002. Asymmetric leaves I reveals *knx* gene redundancy in *Arabidopsis*. *Development*. 129: 1957-1965.
- Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, W., and Wan, Y.C. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115: 971-980
- Chuck, G., Lincoln, C., and Hake, S. 1996. *KNATI* induces lobbed leaves with ectopic meristem when overexpressed in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 8: 1227-1289
- CITES, 2011, *Checklist of CITES species*, CITES Secretariat, Geneva
- Damayanti, D., Sudarsono., Mariska, I., and Herman, M. 2009. Transformasi Gen Antisens ACC Oksidase pada Pepaya dengan teknik penembakan partikel. *Jurnal AgroBiogen*. 5: 32-38.
- De la Riva, G.A., Gonzalez-Cabrera, J., Vazquez-Padron, R., Ayra-Pardo, C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Mol. Biol. And*

- 2 Enriquez-Obregon, G.A., Vasquez-Padron, R.I., Prieto-Samsonov, D.I., Perez, M., and Selman-Housein, G. 1997. Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidants compounds. *Biotechnologia aplicada* 14: 169-174
- 17 Frame, B.R., Shou, H., Chickwamba, R.K., Zhang, Z., Xiang, C., Fonger, T.M., Pegg, S.E.K., Li, B., Nettleton, D.S., Pei, D., Wang, K. 2002. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of maize embryo using a standart binary vector system. *Plant Physiol* 129: 13-22
- 15 Frugis, G., Giannino, D., Mele, G., Nicolodi, C., Chiappeto, A., Bitonti, M.B., Innocenti, A.M., Dewitte, W., Van Oncklen, H., and Mariotti, D. 2001. Overexpression of *KNAT1* in lettuce shifts determinate growth to a shoot-like indeterminate growth associated with accumulation of isopentenyl-type cytokinins. *Plant Physiol* 126: 1370-1380.
- 7 Gangopadhyay, G., Roy, S.K., Gangopadhyay, S.B and Mukherjee, K.K. 2009. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of pineapple var. Queen using a novel encapsulation-based on antibiotic seletion technique. *Electric Jurnal Biotechnology*. 1: 3.
- 37 Gnasekaran, P., Antony, J. J. J., Uddain, J., Subramaniam, S., 2014. *Agrobacterium*-mediated transformation of recalcitrant *Vanda kase*m's delight Orchid with higher efficiency. *The Scientific World Journal*. 583934:1-10
- 2 Hamilton, C.M. 1997. A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *Gene* 200: 107-116
- Hartanto, N., Elvi, R.P.W., Olganda, M., Sri Handayani. 2011. Potensi ekstrak kloroform *Dendrobium lasianthera*, *Vanda teres*, *Arachnis flos-acris* sebagai kandidat anti kanker payudara T47D. Fak Biologi UGM. Yogyakarta.
- 12 Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6: 271-282.
- Hinchee, M.A., Consor, W., Newell, C.A., Donell, MC., Sato, S.J., Gasser, C.S., Fischhoff, D.A., Fraley, D.B, and R.B. Horsch. 1998. Production of transgenic soybean plant using

- 20 *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *Biotechnology*. 6: 915-922.
- Kumar, N.; Ananda, K.G.V.; Pamidimarria, D.V.N.S; Sarkara, T.; Reddya, M.P.; Radhakrishnanb, T; Kaulc, T.; Reddyc, M.K.; Soporik, S.K. 2010. Stable genetic transformation of *Jatropha curcas* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using leaf explants. *Industrial Crops and Products*. 32 (1): 41-47..
- 41 Liau, C.H., You, S.J., Prasad, V., Hsiau, H.H., Lu, J.C., Yang, N.S., and Chan, M.T. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of an *Oncidium* orchid. *Plant Cell Rep* 21: 993-998
- Lincoln, C., Long, C., Yamaguchi, J., Serikawa, K., and Hake, S. 1994. A knotted1-like homeobox gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* 6: 1859-1878.
- 27 Madhulatha, P., Pandey, R., Hazarika, P, and M. Rajam. 2007. High transformation frequency in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of tomato by using polyamines and maltose in shoot regeneration medium. *Physiology and Molecular Biology Plants*. 13: 191-198.
- 30 May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J., and Amttzen, C.J. 1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Journal of Biotechnol* 13: 486-492.
- 60 Moazed D, and H.F. Noller. 1987. Interaction of antibiotics with functional sites 16S ribosomal RNA. *Nature*. 327: 389-394.
- 32 Mursidawati, S. 2007. Asosiasi Mikoriza dalam Konservasi Anggrek Alam. *Buletin Kebun Raya Indonesia*. 10 (1): 24-30.
- 2 Nester, E.W., Gordon, M.P., Amasino, R.M., and Yanofsky, M.F. 1984. Crown gall: a molecular and physiological analysis. *Annual Review of plant Physiol*. 35: 387-413.
- 9 Pardal, S.J., Wattimena, G.A., Aswidinnoor, H., Herman, M., Listanto, E, and Slamet. 2004. Transfer *gen proteinase inhibitor II* pada kedelai melalui vektor *Agrobacterium tumefaciens* untuk ketahanan terhadap hama penggerek polong (*Etiella zinckenella*). *Jurnal Biologi Pertanian*. 9: 339-343.

- Rachmawati, S. 2000. Gen penyeleksi alternatif untuk transformasi tanaman. *Buletin Agronomi Biologi*. 6: 26-33.
- 14 Rafat, A.; Aziz, M.A.; Rashid, A.A.; Abdullah, S.N.A.; Kamaladini, H.; Sirchi, M.H.T. and Javadi, M.B. 2010. Optimization of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and shoot regeneration after co-cultivation of cabbage (*Brassica oleracea* subsp. capitata) cv. KY Cross with AtHSP101 gene. *Scientia Horticulturae*. 124 (1): 1-8.
- 3 Rosa, MPG. 2010. Orchids. A review of uses in traditional medicine, its phytochemistry and pharmacology. *J Med Plant Res*. 4(8): 592-638.
- 48 Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, I. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- 36 Semiarti, E., Indrianto, A., Purwanto, A., Isminingsih, S., Suseno, N., Ishikawa, T., Yoshiaka, Y., Machida, Y., Machida, C. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis* 24: 265-272
- 4 Semiarti, E., Indrianto, A., Purwanto, A., Martiwi, I.N.A., Feroniasanti, Y.M.L., Nadifah, E., Mercuriana, I.S., Dwiyani, R., Iwakawa, H., Yoshioka, Y., Machida Y and C. Machida. 2010. High-frequency genetic transformation of *Phalaenopsis amabilis* orchid using tomato extract-enriched medium for the pre-culture of protocorms. *Journal of Horticultural Sciences & Biotechnology* 85(3): 205-210.
- 61 Shrestha, B. R., Chin, D. P., Tokuhara, K., Mii, M. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Vanda* using protocorm-like bodies. *AsPac Journal Mol. Biol. Biotechnol.* 18 (1): 225-228.
- Simpson, M.G. 2006. *Plant Systematics*. British Library Cataloguing in Publication Data, Canada.
- 52 Smith R.H., and E.E. Hood. 1995. Review and interpretation: *Agrobacterium tumefaciens* transformation of monocotyledons. *Crop Science*. 35: 301-309.
- 10 Smith, E.F and Townsend, C.O. 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science*. 25: 671-673.
- 90 Stachel, S.E., Nester, E.W and Zambryski, P. 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 379-383.
- 77 Susiyanti., Wattimena, G.A., Surahman, M., Purwito, A dan Santoso, D.A. 2007.

- 57 Transformasi tanaman tebu (cv. Psjt 94-41) dengan gen *fitase* menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* gv 2260 (pbinpi-iiec). *Buletin Agronomi*. 35: 205-211.
- 28 Tazeen, S and Mirza, B. 2004. Factors affecting *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of *Vigna radiate* (L.) Wilczek. *Pakistan Journal of Botany*. 36: 887-896.
- 61 Teixeira da silva J.A., Chin, D.P., Van, P.T and M. Mii. 2011. Transgenik orchids. *Scientia Horticulturae*. 130: 673-680.
- 59 Uma M.S., Sreemanan, S., Vikneswaran, M. 2004. New perspective of *Dendrobium crumenatum* orchid for antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria. *P.J.Bot* 46 (2): 717-724
- 56 Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., and Zoller, M. 1992. Recombinan DNA 2nd ed. Scientific American Book, New York. p 626.
- 45 Wilmink, A and Dons, J.J.M. 1993. Selective agents and mark genes for use in transformation of monocotyledonous plant. *Plant Molocular Biology Reports*. 11: 165-185.
- 3 Ye, Q., G. Qin. and W. Zhao. 2012. Immunomodulatory sesquiterpene glucoside from *Dendrobium nobile*. *Phytochemistry*. 61: 885-890.
- 10 Yu, H., Yang, S.H and C.J. Goh. 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Dendrobium* orchid with the class 1 *knox* gene *DOH1*. *Plant Cell Reports*. 20: 301-3015.
- 35 Zambryski, H., Joost, C., Genetellol, J., Leemans, M.V., Montagu, J and J. Schell. 1989. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alternation of their normal regeneration capacity. *Embryology Journal*. 12: 2143-2150.
- 44 Zhang, L., Chin, D.P., Mii, M. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Cattleya*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 103: 41-47
- 3 Zhang, W.G., R. Zhao., J. Ren., L.X. Ren., J.G. Lin., D.L. Liu., Y.L. Wu., X.S. Yao. 2007. Synthesis and antiproliferative in vitro activity of two natural dihydrostilbenes and their analogues. *Archiv der Pharmazie*. 340: 244-250
- 47 Zupan, J.R., and Zambryski, P.C. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol*. 107: 1041-104

LAMPIRAN

Lampiran 1. Komposisi media Vacin Went (VW)

Komposisi	g/L
a. Makronutrien	
1. Amonium sulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	0.5
2. Calsium fospat (Ca ₃ (PO ₄) ₂)	0.2
3. Kalium nitrat (KNO ₃)	0.525
4. Kalium fospat (KH ₂ PO ₄)	0.25
5. Magnesium sulfatl (MgSO ₄ .4H ₂ O)	0.25
b. Mikronutrient	
Mangan sulfat (MnSO ₄ .4H ₂ O)	0.0075
c. Zat besi	
1. Chelating agent (Na ₂ DTA.2H ₂ O)	0.0375
2. Ferro sulfat (FeSO ₄ .7H ₂ O)	0.0278
d. Vitamin	
1. Piridoxin HCl	0.0005
2. Thiamin HCl	0.0001
e. Asam amino	
1. Glisin	0.002
2. Asam nicotinat	0.0005
f. Zat Organik	
1. Mio-inositol	0.1
2. Sukrosa	30

Ket : Calsium fospat dilarutkan dengan HCl 1 N
Chelating agent dilarutkan dengan NaOH 1 N

Lampiran 2. Komposisi media Luria bertani (LB)

Komposisi	g/200 mL
1. Trypton	1
2. Yeast extract	0,5
3. NaCl	1

Lampiran 3. Personalia peneliti dan kualifikasinya.

No	Nama peneliti	Kualifikasi
1	Inayah Mahmudah	Menyiapkan bahan dan alat, Penyediaan eksplan (buah)
2	Paramitha	Menyiapkan media induksi PLB dan media regenerasi.
3	Sri Lestari	Menyiapkan media regenerasi. Subkultur tunas embrio untuk regenerasi.
4	Umi Atiqoh	Pengambilan data dan analisis data.

TRANSFORMASI GEN KNAT1 KE DALAM PROTOCORM ANGGREK *Dendrobium lasianthera* J. J. Sm.: UPAYA MENINGKATKAN PRODUKSI BIBIT

ORIGINALITY REPORT

27%

SIMILARITY INDEX

26%

INTERNET SOURCES

15%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

repository.unair.ac.id

Internet Source

2%

2

user.dankook.ac.kr

Internet Source

1%

3

www.pakbs.org

Internet Source

1%

4

staff.uny.ac.id

Internet Source

1%

5

journal.unpad.ac.id

Internet Source

1%

6

biology.fst.unair.ac.id

Internet Source

1%

7

ijat-aatsea.com

Internet Source

1%

8

alamendah.org

Internet Source

1%

9	media.neliti.com Internet Source	1%
10	www.slideshare.net Internet Source	1%
11	www.jspcmb.jp Internet Source	1%
12	Huw Jones. "Advances in Transformation Technologies", Plant Biotechnology, 01/01/2006 Publication	1%
13	aguskrisnoblog.wordpress.com Internet Source	1%
14	211.155.251.135:81 Internet Source	<1%
15	onlinelibrary.wiley.com Internet Source	<1%
16	repository.ipb.ac.id Internet Source	<1%
17	www.faqs.org Internet Source	<1%
18	eprints.uny.ac.id Internet Source	<1%
19	www.farmako.uns.ac.id Internet Source	<1%

20	www.elibrary.icrisat.org Internet Source	<1%
21	biodiversitas.mipa.uns.ac.id Internet Source	<1%
22	aliyaseed.blogspot.com Internet Source	<1%
23	fkip.ummetro.ac.id Internet Source	<1%
24	www.fedoa.unina.it Internet Source	<1%
25	etheses.uin-malang.ac.id Internet Source	<1%
26	scholarbank.nus.edu.sg Internet Source	<1%
27	shodhganga.inflibnet.ac.in Internet Source	<1%
28	kb.psu.ac.th Internet Source	<1%
29	biologi.fst.unair.ac.id Internet Source	<1%
30	Forestry Sciences, 2000. Publication	<1%
31	bionatura.unpad.ac.id Internet Source	<1%

<1%

32

101.203.168.85

Internet Source

<1%

33

d-nb.info

Internet Source

<1%

34

id.scribd.com

Internet Source

<1%

35

Twyman, Richard, Paul Christou, and Eva Stoger. "Genetic Transformation of Plants and Their Cells", Plant Biotechnology and Transgenic Plants, 2002.

Publication

<1%

36

www.ajebs.com

Internet Source

<1%

37

eprints.utm.my

Internet Source

<1%

38

destirumapea24.blogspot.com

Internet Source

<1%

39

Edy Setiti Wida Utami, Sucipto Hariyanto, Yosephine Sri Wulan Manuhara. "Agrobacterium tumefaciens -mediated transformation of Dendrobium lasianthera J.J.Sm: An important medicinal orchid", Journal of Genetic Engineering and Biotechnology,

<1%

2018

Publication

40	eprints.undip.ac.id Internet Source	<1%
41	K.M. Davies, D.H. Lewis, M.R. Boase, H. Zhang, S.C. Deroles, K.E. Schwinn. "BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES FOR MODIFYING FLOWER COLOUR IN CYMBIDIUM ORCHID", Acta Horticulturae, 2007 Publication	<1%
42	mediatum.ub.tum.de Internet Source	<1%
43	lemlit.unj.ac.id Internet Source	<1%
44	www.frontiersin.org Internet Source	<1%
45	www.oocities.org Internet Source	<1%
46	es.scribd.com Internet Source	<1%
47	www.plantcell.org Internet Source	<1%
48	www.scielo.br Internet Source	<1%

49	file.scirp.org Internet Source	<1%
50	repository.uinjkt.ac.id Internet Source	<1%
51	www.ijat-aatsea.com Internet Source	<1%
52	124.81.86.182 Internet Source	<1%
53	repository.ung.ac.id Internet Source	<1%
54	eprints.nottingham.ac.uk Internet Source	<1%
55	tirmaputri.blogspot.com Internet Source	<1%
56	docslide.com.br Internet Source	<1%
57	journal.ipb.ac.id Internet Source	<1%
58	S. P. Venglat. "OBPC Symposium: Maize 2004 & beyond-developmental and molecular genetics of embryogenesis in plants", In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 07/2005 Publication	<1%

59	journal.uinjkt.ac.id Internet Source	<1%
60	Thomas-Peter Hausner. "Proteinbiosynthese und ihre Hemmung Durch Antibiotika", Biologie in unserer Zeit, 10/1988 Publication	<1%
61	www.pomics.com Internet Source	<1%
62	scialert.net Internet Source	<1%
63	www.scribd.com Internet Source	<1%
64	ejournalofsciences.org Internet Source	<1%
65	M. Koné. "Factors affecting regeneration of bambara groundnut [Vigna subterranea (L.) Verdc.] from mature embryo axes", In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 09/17/2009 Publication	<1%
66	repository.unib.ac.id Internet Source	<1%
67	elib.suub.uni-bremen.de Internet Source	<1%

68 ejurnal.litbang.pertanian.go.id <1 %
Internet Source

69 Shafiullah, MD, and Christian R. Lacroix. <1 %
"Extended expression of MaKN1 contributes to
the leaf morphology in aquatic forms of
Myriophyllum aquaticum", Botany, 2015.
Publication

70 berryjerryberry.blogspot.com <1 %
Internet Source

71 lib.unnes.ac.id <1 %
Internet Source

72 media.unpad.ac.id <1 %
Internet Source

73 sidoarjo88.blogspot.com <1 %
Internet Source

74 documents.mx <1 %
Internet Source

75 a-research.upi.edu <1 %
Internet Source

76 repository.unhas.ac.id <1 %
Internet Source

77 www.neliti.com <1 %
Internet Source

edocs.fu-berlin.de

78

Internet Source

<1%

79

annarishofaa.blogspot.com

Internet Source

<1%

80

repositorium.sdum.uminho.pt

Internet Source

<1%

81

Saleha Sungkar, Rawina Winita, Agnes Kurniawan. "The Effect of Health Education to Community Knowledge and Aedes aegypti Density in Bayah Subdistrict, Banten Province", Makara Journal of Health Research, 2011

Publication

<1%

82

docslide.us

Internet Source

<1%

83

cdn.intechweb.org

Internet Source

<1%

84

195.130.72.98

Internet Source

<1%

85

km.ristek.go.id

Internet Source

<1%

86

biozoojournals.ro

Internet Source

<1%

87

mbiologi.fst.unair.ac.id

Internet Source

<1%

88

repository.unpad.ac.id

Internet Source

<1%

89

Wang, H.-M., K.-Y. To, H.-M. Lai, and S.-T. Jeng. "Modification of flower colour by suppressing β -ring carotene hydroxylase genes in *Oncidium*", *Plant Biology*, 2015.

Publication

<1%

90

Atsuhiko Oka. "Signal structure for transcriptional activation in the upstream regions of virulence genes on the hairy-root-inducing plasmid A4", *Nucleic Acids Research*, 1989

Publication

<1%

91

Semiarti, Endang, Ari Indrianto, Aziz Purwantoro, Yasunori Machida, and Chiyoko Machi. "Agrobacterium-Mediated Transformation of Indonesian Orchids for Micropropagation", *Genetic Transformation*, 2011.

Publication

<1%

Exclude quotes

Off

Exclude matches

Off

Exclude bibliography

On

TRANSFORMASI GEN KNAT1 KE DALAM PROTOCORM ANGGREK *Dendrobium lasianthera* J. J. Sm.: UPAYA MENINGKATKAN PRODUKSI BIBIT

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

/0

GENERAL COMMENTS

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8

PAGE 9

PAGE 10

PAGE 11

PAGE 12

PAGE 13

PAGE 14

PAGE 15

PAGE 16

PAGE 17

PAGE 18

PAGE 19

PAGE 20

PAGE 21

PAGE 22

PAGE 23

PAGE 24

PAGE 25

PAGE 26

PAGE 27

PAGE 28

PAGE 29

PAGE 30

PAGE 31

PAGE 32

PAGE 33

PAGE 34

PAGE 35

PAGE 36

PAGE 37

PAGE 38

PAGE 39

PAGE 40

PAGE 41

PAGE 42

PAGE 43

PAGE 44

PAGE 45

PAGE 46

PAGE 47

PAGE 48

PAGE 49

PAGE 50

PAGE 51
