

Transformasi Gen Pembungaan melalui *Agrobacterium tumefaciens* Secara *In-Vitro* pada Tanaman Anggrek *Vanda tricolor*

RINDANG DWIYANI^{1*}, HESTIN YUSWANTI¹, IXORA SARTIKA MERCURIANI²,
DAN ENDANG SEMIARTI³

¹ Fakultas Pertanian, Universitas Udayana, Denpasar, Bali

² Fakultas Biologi Universitas Yogyakarta, Yogyakarta

³ Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

*) Email: rindangdwiyani@yahoo.co.id

ABSTRACT

***In Vitro* Transformation of Flowering Gene through *Agrobacterium tumefaciens* on *Vanda tricolor* Orchid.** Research concerning of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Vanda tricolor* orchid had been done during March to August 2014. Objectives of this research was to investigate the effects of period of inoculation with *Agrobacterium* suspension and application of *Acetosyringone* (AS) on the percentage of transformant candidates. The T-DNA harbored the *PaFT* gene under the control of promoter of Ubiquitin and the *hpt* gene, a hygromycine resistant gene as a selectable marker for transformant selection. This T-DNA was constructed in the PGAS vector and transferred to the plant genome mediated by *A. tumefaciens*. The period of inoculation with *Agrobacterium* and application of *Acetosyringone* (AS) were trialed in this research. The result showed that a period of one hour inoculation with *Agrobacterium* suspension added with 25 ppm AS resulted in the highest number of transformant candidates. i.e. 7.04% compared to 4.10% (one hour inoculation without AS), 3.76% (two hours inoculation without AS), and 4.48% (two hours inoculation with 25 ppm AS).

Keywords: Agrobacterium tumefaciens, acetosyringone, PaFT gene, period of inoculation, Vanda tricolor orchid

PENDAHULUAN

Bali merupakan salah satu daerah di Indonesia dimana usaha tanaman hias berkembang pesat. Pengembangan florikultura di Bali diperlukan tidak hanya untuk menunjang Bali sebagai daerah tujuan wisata, namun hal ini juga akan berdampak terhadap peningkatan ilmu pengetahuan dan income para petani, khususnya petani tanaman hias.

Vanda tricolor Lindl. var. *suavis* forma Bali adalah anggrek alam pulau Bali, salah satu sumber kekayaan hayati pulau Bali yang perlu mendapat perhatian kita semua. Spesies ini merupakan induk persilangan dari anggrek *Vanda* hibrida yang yang diperjualbelikan secara komersial saat ini dan dengan harga yang relatif tinggi.

Dwiyani (2012) menndapatkan bahwa forma Bali memiliki karakter spesifik dibandingkan forma Merapi dan forma Jawa

Barat, yakni ukuran bunga dan buah yang lebih besar serta totol-totol dan labelum yang berwarna ungu kemerahan, sementara forma Merapi berwarna ungu dan forma Jawa Barat berwarna coklat. Lestari (2010) melaporkan bahwa forma Bali memiliki tingkat keharuman bunga yang lebih tinggi dibanding forma Merapi.

Salah satu permasalahan dalam budidaya anggrek, khususnya genus *Vanda*, adalah masa vegetatif yang panjang, sehingga saat (waktu) pembungaan (flowering) membutuhkan waktu yang relatif lama. *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* membutuhkan waktu kurang lebih 5 (lima) tahun setelah disemai untuk menghasilkan bunga pertama kali, padahal sebagai tanaman hias, bunga merupakan organ tanaman penting yang dinikmati nilai estetikanya.

Perbaikan sifat-sifat (karakter) tanaman dapat dilakukan secara konvensional melalui *plant breeding* maupun secara lebih modern dengan rekayasa genetika. Hasil yang diperoleh dari kedua cara ini sama, yakni individu tanaman baru dengan struktur gen yang baru. Perbedaan yang paling menyolok dari kedua cara tersebut adalah dari segi waktu, dimana melalui cara konvensional diperlukan waktu yang lebih panjang untuk mendapatkan individu baru tersebut sedangkan melalui rekayasa genetika diperlukan waktu yang lebih singkat.

Penelitian ini menggunakan rekayasa genetika untuk memperbaiki karakter pembungaan dari anggrek *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* forma Bali. Pada penelitian ini dilakukan overekspresi gen pembungaan yaitu gen *PaFT* dengan 'strong promoter' Ubiquitin. Gen *PaFT* adalah gen ortholog

dari *FLOWERING LOCUS T (FT)* yang diisolasi dari tanaman anggrek *Phalaenopsis amabilis* oleh Dr. Seonghoe Jang dari Academia Sinica, Biotechnology Center in Southern Taiwan pada tahun 2010 (Mercuriani *et al.* 2015). Gen ini sudah berhasil ditransformasi melalui *Agrobacterium tumefaciens* pada anggrek *P. amabilis* dari Indonesia (Mercuriani *et al.* 2015), namun belum ada yang melaporkan untuk tanaman anggrek genus *Vanda* yang memiliki masa juvenil sangat panjang, lebih panjang dari anggrek *P. amabilis*. Sementara itu, promoter Ubiquitin dilaporkan memiliki tingkat ekspresi gen yang tinggi pada tanaman monokotil (Christensen & Quail 1996), sehingga diharapkan tanaman anggrek *V. tricolor* yang sudah disisipi gen *PaFT* ini nantinya akan memiliki masa juvenil yang lebih pendek sehingga berbunga lebih cepat. Kultivar baru anggrek *V. tricolor* Lidl. forma Bali yang dihasilkan melalui penelitian ini dapat dijadikan tanaman induk untuk menghasilkan hibrida-hibrida baru genus *Vanda* yang berbunga lebih cepat. Aldemita and Hodges (1996) menyatakan bahwa gen asing yang ada pada tanaman transforman yang dihasilkan melalui transformasi dengan *Agrobacterium* diturunkan pada progeninya. Mengingat *Vanda* hibrid memiliki nilai tinggi secara ekonomis, maka hasil penelitian ini akan sangat bermanfaat bagi pengembangan agribisnis anggrek khususnya di Indonesia.

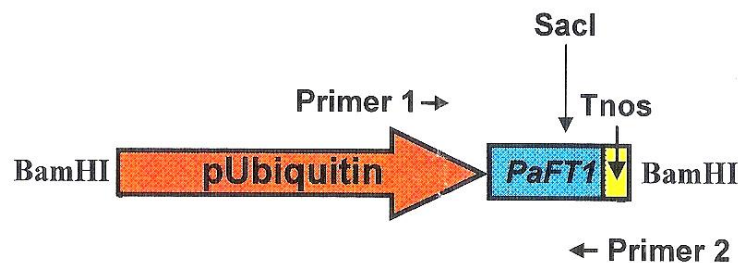
Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan periode inokulasi yang paling sesuai serta pengaruh asetosiringon pada transfer gen *PaFT* melalui *A. tumefaciens* pada anggrek *V. tricolor*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian berlangsung dari bulan Maret hingga Agustus 2014 bertempat di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Udayana, jalan Pulau Moyo Denpasar.

Gen pembungaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *PaFT* (*Phalaenopsis amabilis Flowering locus T*). Promoter yang digunakan adalah Ubiquitin, yang merupakan ‘strong promoter’ untuk overekspresi suatu gen. Gen ketahanan

terhadap higromisin yaitu *Higromisin Phosphotransferase (hpt)* digunakan sebagai gen penyeleksi transforman dan disertakan dalam konstruksi gen. Konstruksi gen diperoleh dari Dr. Seonghoe Jang (Academia Sinica, Biotechnology Center in Southern Taiwan) melalui Dr. Endang Semiarti (Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada). Konstruksi gen dapat dilihat pada Gambar 1 (Sumber: Komunikasi pribadi Mercuriani, 2014).



Gambar 1. Konstruksi Gen yang digunakan dalam penelitian (Sumber: Komunikasi pribadi Mercuriani, 2014)

Transformasi dilakukan secara *in vitro* dengan target berupa irisan pangkal batang dari seedling yang berusia 12 bulan setelah semai. Eksplan irisan batang diprekultur pada media New Phalaenopsis/NP (Islam *et al.* 1998) yang ditambah 2 ppm Benzyl adenin (BA) tiga hari sebelum inokulasi. Eksplan direndam selama 1 atau 2 jam (perlakuan) pada suspensi *A.tumefaciens* yang sudah membawa gen tersebut. Pada larutan suspensi bakteri ditambahkan 2 tetes tween serta asetosiringon (AS) dengan konsentrasi 0 ppm dan 25 ppm sebagai perlakuan, sehingga ada 2 x 2 perlakuan kombinasi. Selanjutnya, eksplan di ko-kultivasi selama 3 hari pada media NP dengan 2 ppm BA. Setelah ko-kultivasi, eksplan dicuci dengan

larutan cefotaxime 300 ppm, dibilas hingga bersih dan ditanam kembali pada media NP + 2 ppm BA+ 50 ppm cefotaxime. Tahap ini disebut tahap eliminasi. Eliminasi diulang 3-5 kali hingga eksplan benar-benar terbebas dari *Agrobacterium*. Selanjutnya eksplan dipelihara hingga tumbuh tunas dan akar (membentuk plantlet). Plantlet kemudian diseleksi dengan jalan menanamnya pada media NP yang ditambah 10 ppm higromisin. Plantlet yang bertahan hidup sampai 6 minggu pada media higromisin disebut kandidat transforman. Kandidat transforman dihitung dan dipersentase dari jumlah eksplan yang diinokulasi untuk setiap perlakuan.

Genom dari kandidat transforman (dari daunnya) diisolasi menggunakan metode Doyle & Doyle (1990), selanjutnya dianalisis secara molekuler menggunakan metode PCR dengan primer Ubiquitin(forward: 5'-TTGTCGATGCTCACCCTG-3') and TNos (reverse: 5'-GATCTAGTAACATAGATGACACCGCG-3') yang akan mengamplifikasi fragmen sepanjang 1,1 kb (Mercuriani *et al.*, 2015). Reaksi PCR dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: 94°C selama 5 menit (denaturasi awal), kemudian dilakukan 30 siklus yang terdiri dari 94°C selama 45 detik (denaturasi), 59 °C selama 1 menit (annealing), dan 72°C selama

1 menit 30 detik (elongation). Pemanjangan waktu selama 5 menit dilakukan pada suhu 72°C, dan terakhir suhu dijaga pada 4°C. DNA hasil amplifikasi selanjutnya dicek dengan elektroforesis dengan gel agarose 1%, kemudian divisualisasi dengan UV transluminator .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa lama perendaman 2 jam pada 25 ppm asetosiringon (AS) memberikan hasil terbaik dibandingkan perlakuan lainnya (Tabel 1).

Tabel 1. Pengaruh Lama Perendaman dan Asetosiringon terhadap Persentase Kandidat Transforman

PERLAKUAN	Jumlah Eksplan yang ditransformasi	Eksplan Hidup Pasca Kokultivasi		Jumlah plantlet yang dihasilkan		Plantlet Hidup Pasca Seleksi	
		Jumlah	%	Jumlah	%	Jumlah	%
Perendaman 1 jam dengan 0 ppm AS	122	122	100	75	61.48	1	1,33
Perendaman 1 jam dengan 25 ppm AS	124	124	100	54	43.55	1	1,85
Perendaman 2 jam dengan 0 ppm AS	133	133	100	72	54.14	1	1,39
Perendaman 2 jam dengan 25 ppm AS	142	142	100	67	47.18	3	4,48

Pemberian 25 ppm AS secara umum meningkatkan jumlah kandidat transforman yang dihasilkan. Asetosiringon berperan sebagai signal kemotaktik dari sel tanaman untuk *Agrobacterium* (Opabode 2006), sehingga proses transfer transgen dari sel

bakteria ke sel tanaman dapat terjadi. Efektivitas penggunaan AS pada transformasi genetik melalui *Agrobacterium tumefaciens* pernah dilaporkan oleh Dwiyani (2012) untuk mentransfer gen *KNAT1* pada anggrek *Vanda tricolor* namun menggunakan

target transformasi berupa protokorm (biji anggrek yang sudah berkecambah). Asetosiringon menginduksi gen gen *Vir* (*Vir* genes) pada Ti plasmid. Aktivasi gen *Vir* menghasilkan protein *Vir* yang selanjutnya memfasilitasi proses transfer gen ke genom tanaman (Opabode, 2016).

Periode inokulasi merupakan faktor penting dalam transformasi genetik pada tanaman melalui *Agrobacterium tumefaciens*. Periode inokulasi selama 15-30 menit diperlukan untuk tanaman *Withania*

somnifera (Pandey *et al.* 2010) dan *Oryza sativa* (Nazim Ud-Dowla *et al.* 2008), namun untuk tanaman palm oil, periode inokulasi selama 6 jam memberikan hasil terbaik dan jumlah kandidat transforman menurun ketika periode inokulasi ditingkatkan menjadi 12 jam (Yenchon & Te-Chato 2012). Pada penelitian ini, periode inokulasi selama 2 jam memberikan hasil lebih baik dibandingkan periode inokulasi 1 jam. Kandidat tanaman transforman yang didapat dari penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Beberapa kandidat tanaman transforman *V. tricolor* yang berhasil tumbuh pada media seleksi ; Skala = 10 mm

Tanaman ini merupakan tanaman yang tetap hijau setelah enam minggu berada di media seleksi, yaitu media MS yang ditambah 10 ppm antibiotik higromisin. Seleksi tanaman transforman dengan antibiotik higromisin (dibandingkan antibiotik kanamisin) memberikan hasil yang lebih akurat (tidak bias) terhadap jumlah tanaman transforman yang nantinya didapat jika dilakukan analisis molekuler. Hal ini karena hampir semua tanaman tidak memiliki gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin (*hpt*) sehingga

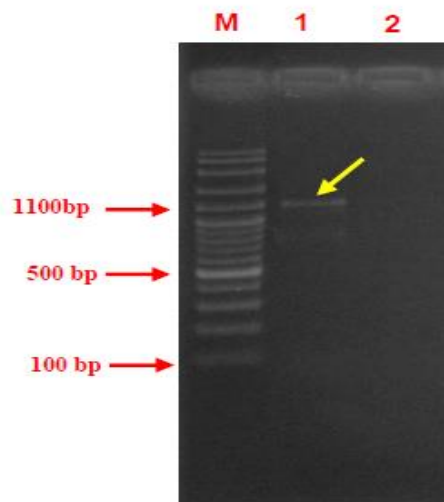
kandidat transforman yang diperoleh melalui media seleksi dapat dipastikan akan lolos dalam uji molekuler yang dilakukan melalui PCR.

Dalam penelitian ini, setelah dua bulan dalam pemeliharaan, banyak kandidat transforman yang mati karena kontaminasi, menyisakan hanya empat kandidat. Dari empat tersebut, dua diantaranya dianalisis PCR dengan prosedur seperti tersebut di atas, dan hasil elektroforesis menunjukkan hanya satu dari dua kandidat yang positif membawa

RINDANG DWIYANI. *et al.* Transformasi Gen Pembungaan melalui *Agrobacterium tumefaciens*...

gen *PaFT* (Gambar 3). Terlepas dari rendahnya transformasi yang dihasilkan, namun hasil penelitian ini menunjukkan bahwa transformasi genetik melalui *A. tumefaciens* pada tanaman anggrek *V.*

tricolor dapat dilakukan secara *in vitro* melalui target berupa irisan pangkal batang, hal mana belum pernah dilaporkan sebelumnya.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis. M= marka; 1 dan 2 = kandidat transforman. tanda panah menunjukkan fragmen sepanjang 1100 bp yang teramplifikasi

SIMPULAN

Periode inokulasi serta pemberian asetosiringon merupakan faktor penting yang mempengaruhi transformasi melalui *A. tumefaciens* pada anggrek *V. tricolor* secara *in vitro* dengan target berupa eksplan irisan pangkal batang. Adanya tanaman yang positif PCR menunjukkan bahwa gen *PaFT* berhasil terintegrasi ke genom tanaman melalui metode yang dilakukan dalam penelitian ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia atas

pembiayaan penelitian ini melalui Skim penelitian Hibah Bersaing, Desentralisasi Dikti 2014 serta kepada LPPM Universitas Udayana yang telah memfasilitasi pendanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aldemita, R.R. & Hodges, T.K. 1996. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* Vol. 199 (Issue 4): 612–617
- Christensen, A.H. & Quai, P.H. 1996, 'Ubiquitin promoter based-vector for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants', *Transgenic Res.*, vol. 5, pp. 213-218

- Doyle, J.J. , Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Dwiyani, R. 2012, 'Mikropropagasi Tanaman Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var *suavis* forma Bali yang membawa gen *KNOTTED1-LIKE Arabidopsis thaliana (KNAT1)*', Disertasi, Program Studi Bioteknologi, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Islam, M.O., Ichihasi,S., Matsui, S. 1998. Control of growth and development of protokorm like body derived from callus by carbon sources in *Phalaenopsis*. *Plant Biotechnol* 15:183-187.
- Lestari, E.S. 2010, Karakterisasi Morfologis dan Molekuler Anggrek *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis* Asal Merapi dan Bali'. Skripsi, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Mercuriani, I.S, Purwantoro, A. , Moeljopawiro, S. & Semiarti, E. 2015. Insertion of a Flowering gene, *PaFT*, into *Phalaenopsis amabilis* orchid using *Agrobacterium tumefaciens*. <http://staff.uny.ac.id/sites/default/files/penelitian/ixora-sartika-marcuriani-dr-msi/insertion-flowering-gene-paft-phalaenopsis-amabilis-orchid-using.pdf> (Download 3 Januari 2015)
- Nazim-Ud-Dowla, M.A.N, Ahmed, N.U. & Hasan, L. 2008, 'Optimization of *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation in *Indica Rice*', *Thai Journal of Agric.Sci.*, vol. 41, pp. 127-133
- Opabode, J.T. 2006, 'Agrobacterium-mediated transformation of plants : emerging factors that influence efficiency', *Biotechnol. and Mol. Biol.*, vol. 1, pp. 12-20.
- Pandey, V., Misra, P., Chaturvedi, P., Misra, M.K., Trivedi, P.K. & Tull, R. 2010. *Agrobacterium*-mediated Transformation of *Whithania somnifera* (L.) Dunul: An Important Medical Plant', *Plant Cell Rep.*, vol. 29, pp. 133-141
- Yenchon, S. & Te-Cato, S. 2012, 'Effect of bacteria density, inoculation and co-cultivation period of *Agrobacterium*-mediated transformation of oil palm embryogenic callus', *J. Agric. Technol.*, vol. 8, no. 4, pp. 1485-1496