

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

A. Tinjauan Pustaka

1. *Vanda tricolor* Lindl. varietas *Suavis* forma Merapi

Penyebaran *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis*, pada beberapa daerah di Indonesia mencakup Jawa Timur, Jawa Barat, D.I. Yogyakarta, Sulawesi dan Bali (Gardiner, 2007). *V. tricolor* Lindl. var. *suavis* adalah anggrek monopodial karena anggrek ini memiliki batang yang tumbuh secara indeterminate ke arah vertikal. Tinggi tanaman *V. Tricolor* memiliki ukuran 0,5 hingga 1,5 m dan umumnya daun pada bagian bawah akan gugur dan digantikan dengan akar aerial. Susunan daun *V. tricolor* var. *suavis* adalah berseling berhadapan dengan daun berbentuk pita, ujung daun rombang dan bertepi rata. Lebar daun rata-rata 3-4 cm dan panjang daun 20-30 cm (Dwiyani, 2014).



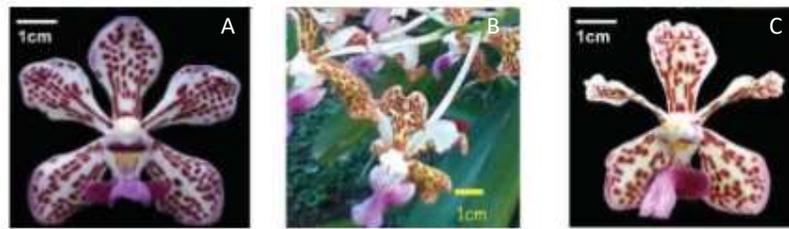
Gambar 1. Morfologi anggrek *V. tricolor*. a) Bunga tampak depan, b) Bunga tampak samping, c) Habitus, d) Column dan Labellum tampak samping, e) Labellum tampak

samping, f) Labellum tampak depan, g) Sepal dorsal, h) Petal, i) Sepal, j) Labelum tampak atas, k) Daun, l) Buah.

Dari segi taksonomi, anggrek *V. tricolor* var. *suavis* diklasifikasikan sebagai berikut (ITIS, 2012):

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida
Ordo : Aspargales
Famili : Orchidaceae
Subfamili : Epidendroideae
Tribe : Vandaeae
Subtribe : Sarcanthinae
Alliance : Vanda
Genus : *Vanda*
Spesies : *V. tricolor*
varietas : *suavis*

V. tricolor var. *suavis* memiliki pembungaan majemuk berbentuk tandan dengan jumlah bunga 5-15 kuntum per tandan. Bunga majemuk dai *V. Tricolor* muncul dari ketiak daun tanaman tersebut. Bunga dari *V. Tricolor* memiliki 3 warna yang berbeda tergantung dari daerah asal tanaman atau formanya. Perhiasan bunga berwarna dasar putih dengan totol-totol berwarna coklat (forma Jawa Barat), merah (forma Bali) atau merah keunguan (forma Merapi) serta labelum yang berwarna merah (forma Merapi), ungu (forma Jawa Barat) atau merah keunguan (forma Bali). Mahkota bunga forma Jawa barat memiliki ukuran yang lebih kecil, yakni diameter 3-4 cm, sedangkan mahkota bunga forma Merapi berdiameter 4-5 cm dan forma Bali memiliki diameter mahkota bunga paling besar, yakni 5-6 cm. Bunga anggrek mengandung serbuk sari (pollen) yang merupakan kelamin jantan; dan putik sebagai kelamin betina. Kedua alat reproduksi pada anggrek ini berada pada suatu struktur yang disebut *column* (tugu). Butir-butir serbuk sari anggrek menggumpal membentuk suatu agregat disebut *polinia*. Putiknya disebut *gynostenum*, yang letaknya dalam suatu lekukan pada tugu. (Dwiyani, 2014).



Gambar 2. Bunga *Vanda tricolor* Lindl. (A) *V. tricolor* var. *Suavis* Forma Merapi(B); Jawa barat dan (C) Bali (Dwiyani, 2014).

Buah anggrek *V. tricolor* mengandung berjuta-juta biji yang ukurannya sangat kecil. Biji anggrek berukuran sangat kecil dan tidak memiliki endosperm (Dwiyani, 2014).

2. Kultur *in vitro* tanaman

Kultur *in vitro* adalah teknik menumbuhkan jaringan atau sel tanaman secara aseptis sehingga dapat menjadi suatu tanaman yang baru. Jaringan atau organ tanaman yang ditanam secara *in vitro* memerlukan media untuk menyediakan nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan kultur (Fauzy *et al.*, 2016). Ada beberapa medium yang umum digunakan dalam melakukan kultur *in vitro* antara lain medium Murashige dan Skoog (MS), medium Gamborg (B5), medium White (W63), medium Vacin dan Went (VW), medium WPM, medium Ichihashi New Phalaenopsis (NP), dan medium Knudson C (Saad dan Elshahed, 2012). Medium Vacin dan Went adalah media dasar yang sering digunakan dalam kultur jaringan tanaman anggrek. Media ini terdiri dari senyawa-senyawa yang mengandung campuran karbohidrat, nutrisi makro dan mikro, garam anorganik, dan vitamin (Sucandra *et al.* 2015). Unsur mikro seperti mangan dan besi memainkan peran kunci dalam metabolisme dan meningkatkan proliferasi di tanaman tisu. Tiamin hidroklorida bertindak sebagai kofaktor enzimatik dalam proses primer dan sekunder seperti glikolisis dan siklus TCA (HiMedia, 2017).

Teknik perkecambahan *in vitro* adalah metode perkecambahan yang dikembangkan pada awal 1900-an dan telah menghasilkan perkecambahan dan perbanyakan anggrek yang lebih efektif pada berbagai macam taksa anggrek. Pada tahun 1922 Lewis Knudson berhasil

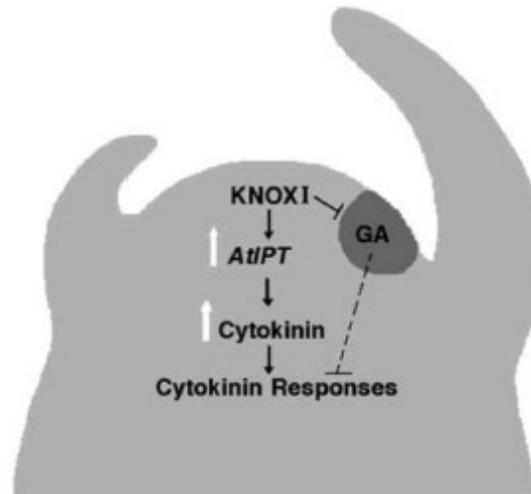
mengecambahkan benih anggrek secara *in vitro* dengan menabur benih pada media nutrisi steril yang diperkaya dengan sukrosa. Teknik ini dikenal sebagai perkecambahan biji asimbiotik karena tidak ada mikorhiza yang digunakan untuk menginisiasi perkecambahan. (Steward *et al.*, 2008). Respon dari tanaman yang dibudidayakan secara *in vitro* dipengaruhi oleh media kultur yang digunakan. Jenis dari media kultur, konsentrasi nutrisi, dan zat tambahan dapat berpengaruh terhadap kecepatan dan kualitas pertumbuhan *in vitro* (Erfan *et al.*, 2019).

3. Gen Homeobox

Peranan gen *homeobox* pada tanaman pada regulasi dalam proses perkembangan memiliki analogi dengan gen *homeobox* pada hewan. (Mukherjee *et al.*, 2010). Berdasarkan dari kemiripan sekuens konservatif, gen *homeobox* tanaman dikelompokkan menjadi beberapa kelompok, Chen *et al.* (1998) mengelompokkan gen *homeobox* tanaman menjadi 5 famili : *HD-ZIP*, *GLABRA 2*, *KNOTTED 1*, *PHD finger*, dan *Bell1*. Salah satu dari kelompok *homeobox* tersebut, *KNOTTED1-like homeobox (KNOX)*, merupakan kelompok gen yang mengkode faktor transkripsi *homeodomain*. Gen ini ditemukan di tanaman tingkat tinggi dan berperan dalam perkembangan dan pemeliharaan *Shoot Apical Meristem (SAM)* dan *carpel*. Pada *Arabidopsis*, gen *KNOX* terdiri dari *SHOOT MERISTEMLESS (STM)*, *BREVIPEDICELLUS/KNAT1/ (BP/KNAT1)*, *KNAT2*, dan *KNAT6*.

Gen *KNOX* berperan sebagai regulator (homeostasis) hormon endogen seperti sitokinin dan gibberellin. Gambar 3 menunjukkan interaksi gen *KNOX* dengan gen-gen yang berperan dalam menjaga fase meristematik pada SAM. Pada shoot apical meristem (SAM), *KNOX* diekspresikan untuk meningkatkan biosintesis sitokinin dengan mengaktifkan gen *isopentenil transferase7 (AtIPT7)* dan menurunkan regulasi ekspresi gen biosintesis gibberelin, *GA20ox*. Hasil interaksi tersebut mempertahankan tingkat sitokinin yang tinggi dan disaat yang sama menjaga tingkat gibberelin tetap rendah, yang pada gilirannya

mencegah diferensiasi sel dan mendorong pembelahan sel di SAM (Yanai et al., 2005).



Gambar 3. Interaksi antara gen *KNOX*, sitokinin, dan gibberellin dalam menjaga fase meristem pada SAM. (Yanai et al., 2005).

Gen *BP/KNATI* merupakan salah satu gen dalam kelompok gen *KNOX* yang tidak hanya berpengaruh dalam perkembangan *SAM*, namun juga dalam perkembangan organ reproduktif. Scofield *et al.* (2008), melaporkan bahwa overekspresi dari gen *BP/KNATI* dapat mengaktivasi pembentukan *SAM* baru dan dapat menggantikan gen *STM* dalam pengembangan *SAM* jika ditekan atau diinduksi secara artifisial ketika fungsi *STM* terganggu. Fungsi gen *BP/KNATI* dalam menjaga *SAM* dalam tahap meristematik dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Dwiyani *et al.* (2015) yang menunjukkan tanaman anggrek *P. amabilis* dan *V. tricolor* transforman gen *BP/KNATI* dapat menumbuhkan tunas lebih banyak dibandingkan dengan tanaman *Wild Type*. Peningkatan jumlah tunas dari organ tanaman transforman menunjukkan peran gen *BP/KNATI* dalam menjaga tahap meristematik bekerja secara fungsional bahkan di tanaman transforman (Dwiyani *et al.*, 2015). Gen *BP/KNATI* terdeteksi di ekspresikan pada organ/jaringan reproduksi, sehingga kehilangan fungsi dari *BP/KNATI* menyebabkan berkurangnya pertumbuhan ruas bunga,

tangkai bunga dan tankai putik selama pertumbuhan reproduktif (Scofield *et al.*, 2008).

4. *Dendrobium Orchid Homeobox (DOH1)*

Dendrobium Orchid Homeobox 1 (DOH1) merupakan gen *homeobox* dalam kelas *KNOTTED1-like homeobox* pada anggrek yang diisolasi dari *Dendrobium Madame Thong-In* (Yu *et al.*, 2000). *DOH1* memiliki fungsi yang penting dalam menjaga arsitektur dasar tanaman anggrek melalui pengendalian pembentukan dan perkembangan *Shoot Apical Meristem* dan struktur pucuk tanaman, hal ini terlihat dari terakumulasinya mRNA hasil transkripsi *DOH1* pada jaringan yang kaya akan meristem. Regulasi penurunan dari aktivitas *DOH1* di SAM juga diperlukan untuk transisi bunga pada anggrek (Hao *et al.*, 2000). Gen yang homolog dengan *DOH1* juga berhasil diisolasi dari anggrek *Phalaenopsis amabilis* dan ditentukan sebagai *Phalaenopsis Orchid Homeobox1 (POH1)*. Gen *POH1* menunjukkan 91% tingkat homologi dengan *DOH1* dan 80% dengan *KNAT1* di dalam region terkonservasi pada homeodomain *Arabidopsis* (Semiarti *et al.*, 2008).

5. Isolasi DNA

Asam deoksiribonukleat atau DNA adalah molekul yang mengandung informasi dan instruksi yang diperlukan suatu organisme untuk berkembang, hidup, dan bereproduksi. Instruksi ini disimpan dalam bentuk urutan nukleotida yang terdiri dari gugus fosfat, gugus gula dan basa nitrogen. Empat jenis basa nitrogen adalah adenin (A), timin (T), guanin (G) dan sitosin (C), urutan dari 4 basa nitrogen inilah yang bertanggung jawab dalam menyimpan informasi yang dibutuhkan sel (Travers & Muskhelishvili, 2015).

Proses ekstraksi DNA melibatkan pemecahan atau pencernaan dinding sel untuk melepaskan isi sel. Proses ini kemudian diikuti dengan perusakan membran sel untuk melepaskan molekul DNA ke dalam buffer ekstraksi. Buffer CTAB (*Cetyl trimethylammonium bromide*) adalah salah satu buffer yang sering digunakan dalam ekstraksi DNA dari jaringan

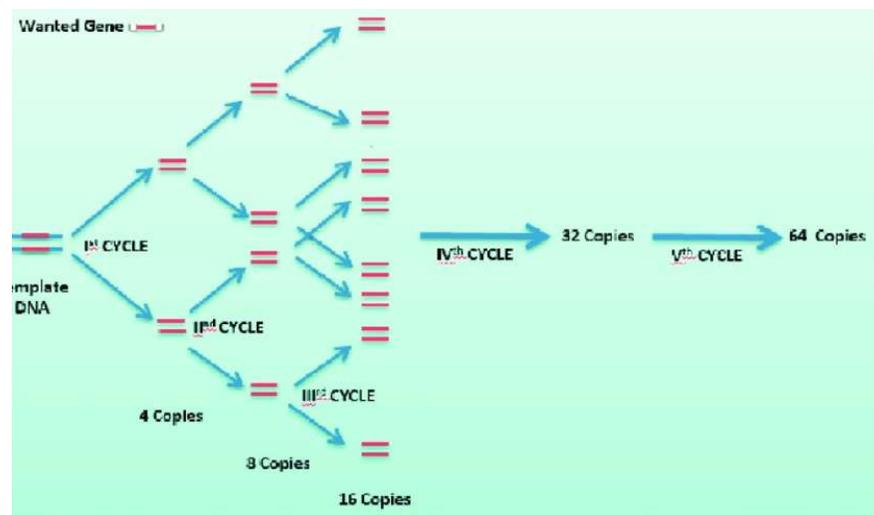
tanaman yang mengandung banyak polisakarida. Buffer ini terdiri dari: Tris-HCl pH 8, NaCl, EDTA pH 8, CTAB, dan 2-mercaptoethanol. CTAB adalah deterjen kationik yang memfasilitasi pemisahan polisakarida selama pemurnian. Buffer CTAB juga mengandung PVP (polivinil pirolidon) yang membantu menonaktifkan polifenol. EDTA juga ditambahkan ke dalam buffer untuk melindungi DNA dari nuklease endogen (Clark., 2013). RNase juga dapat digunakan untuk mendegradasi RNA kontaminan dari ekstrak DNA. Tahap terakhir dari isolasi DNA adalah presipitasi molekul DNA menggunakan isopropanol atau alkohol absolut untuk mencuci DNA dari ekstraksi buffer (Puchooa, 2004). DNA lebih sulit larut dalam larutan isopropanol dibandingkan di dalam larutan etanol sehingga pengendapan DNA menggunakan isopropanol menggunakan volume yang lebih sedikit dibandingkan dengan etanol. Isopropanol lebih baik digunakan ketika mengendapkan DNA dari volume larutan yang besar (Green dan Sambrook, 2017).

6. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) adalah metode enzimatik untuk mengamplifikasi fragment DNA secara *in vitro*. Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen: DNA *template* yang dapat berasal dari total DNA genom maupun mRNA; Oligonukleotida primer; Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP); *Taq DNA polymerase*, yang berasal dari bakteri thermophilic *Thermus aquaticus* yang tahan terhadap suhu tinggi; dan senyawa buffer (Atawodi *et al.*, 2011).

Reaksi PCR didasari oleh siklus termal yang berulang pada suhu panas dan pada suhu dingin. Siklus ini terdiri dari 3 tahap yang dimulai dari tahap denaturasi. Denaturasi merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal dengan memanasi suhu hingga 94-95 °C. Digunakan suhu 94-95 °C karena suhu tersebut merupakan suhu tertinggi dimana *Taq DNA polymerase* dapat bertahan sebelum terdenaturasi. Tahap berikutnya merupakan tahap *annealing* dimana mulai terjadi penempelan primer dan dNTP pada *DNA template* (Dale and

Schantz, 2007). Suhu yang diperlukan pada tahap *annealing* berkisar 55-65°C, tergantung pada panjang dan *GC content* dari primer yang digunakan. Suhu yang digunakan pada saat *annealing* adalah faktor penting untuk keberhasilan amplifikasi DNA. Jika suhu *annealing* terlalu tinggi, primer oligonukleotida tidak dapat menempel dengan baik dan DNA yang diamplifikasi terlalu rendah. Sebaliknya, jika suhu *annealing* terlalu rendah, penempelan *primer* nonspesifik dapat terjadi dan menghasilkan amplifikasi segmen DNA yang tidak diinginkan. Tahap berikutnya merupakan *extension* atau pemanjangan DNA, pada tahap ini *Taq polymerase* memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Suhu ideal bagi *Taq polymerase* untuk melakukan sintesis adalah 72-78°C, *Taq polimerase* dapat memasukkan sekitar 2000 nukleotida setiap menit pada suhu ini (Ehtisham *et al.*, 2016).



Gambar 4. Proses amplifikasi DNA menggunakan metode PCR (Ehtisham *et al.*, 2016).

B. Hipotesis

Berdasarkan hasil tinjauan pustaka yang sudah dilakukan maka Hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. *V. tricolor* var. *Suavis* Lindl. forma Merapi memiliki gen homeobox yang homolog dengan gen *DOH1* dan *POH1*.

2. Ada similaritas yang tinggi dari gen homeobox *V. tricolor* var. *Suavis* Lindl. forma Merapi dengan homolog gen homeobox lainnya seperti gen *DOH1*.