Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ISOLASI DAN KARAKTERISASI GEN *Vanda Orchid Homeobox 1 (VOH1)* DARI *Vanda tricolor* Var. Suavis Lindl. Forma Merapi

Oleh
Viantius Ruben
(17/411748/BI/09888)

INTISARI

Vanda tricolor var. Suavis Lindl. forma Merapi merupakan salah satu spesies anggrek penting di Indonesia. Namun, populasi anggrek ini terus menurun dan terancam punah akibat bencana alam dan penggundulan hutan di habitat aslinya. Oleh karena itu, diperlukan strategi dalam perbanyakan massal tanaman ini sebagai upaya konservasi, baik secara *in situ* maupun *ex situ*. Perbanyakan massal melalui metode kultur *in vitro* dapat mendukung konservasi *ex situ*. Kultur *in vitro* selain meningkatkan efektivitas propagasi, juga dapat membuka peluang bagi transformasi genetik untuk diterapkan pada tanaman. Untuk dapat dilakukan transformasi genetik, perlu adanya penelitian tentang gen kunci yang akan di transformasi. Gen homeobox merupakan gen kunci untuk pertumbuhan tunas pada meristem ujung batang (MUB) tanaman. Pertumbuhan pucuk pada tanaman dimulai dengan aktivasi gen homeobox pada MUB, yang kemudian akan menginduksi aktivasi gen terkait untuk mengatur pertumbuhan organ tanaman. Oleh karena itu, informasi tentang sekuen gen homeobox pada *V. tricol*or sangat diperlukan untuk menginduksi pertumbuhan tunas yang optimal pada kondisi kultur i*n vitro*. Pada tanaman anggrek, dari studi sebelumnya, telah diisolasi dan dikarakterisasi gen homeobox yaitu *Dendrobium Orchid Homeobox1 (DOH1)* dari Dendrobium dan *Phalaenopsis Orchid Homeobox1* (*POH1)* dari *Phalaenopsis*. Dengan menggunakan informasi sekuen gen *DOH1* dan *POH1* tersebut diharapkan dapat diisolasi gen homolognya pada *V. tricolor*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menganalisis gen homeobox homolog pada *V. tricolor* dengan primer yang didesain dari sekuens gen *DOH1* dan *POH1*. Metode penelitian meliputi: 1) Isolasi genom DNA *V.tricolor*; 2) Amplifikasi gDNA *V.tricolor* dengan primer degeneratif Deg *DOH1* dan Deg *POH1*; 3) Analisis fragmen DNA hasil PCR pada Gel Elektroforesis; 4) Analisis sekuen fragmen DNA hasil PCR. Dari penelitian ini ditemukan bahwa menemukan kesamaan dalam panjang produk amplifikasi gen homeobox *Vanda* menggunakan primer *DOH1* yang menunjukkan bahwa fragmen PCR terletak pada terminal-N *DOH1*. Ini menunjukan bagian tersebut tekonservasi dan menjanjikan kemiripan struktur dan fungsi yang tinggi antara kedua gen. Amplifikasi menggunakan primer *POH1* menunjukkan kemiripan yang tinggi pada panjang produk PCR seperti akumulasi transkrip *POH1* yang ditemukan pada *P. amabilis* dari penelitian sebelumnya, hal ini menunjukkan bahwa itu adalah daerah yang diekspresikan. Analisis sekuens pada kandidat gen homolog *DOH1* dan *POH1* pada *V. tricolor* menunjukkan bahwa gen tersebut memiliki kemiripan 77,27% dengan *DOH1* sehingga dapat berperan sebagai gen kunci pertumbuhan tunas pada anggrek *V. tricolor*. Gen homolog *POH1* di *V. tricolor* tidak menunjukkan kesamaan dengan gen-gen

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

dalam database, namun ini menunjukkan bahwa gen ini merupakan urutan baru yang perlu dipelajari lebih lanjut.
Kata kunci: *Gen Homolog, Gen Homeobox, Vanda tricolor, Vanda Orchid Homeobox*

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF VANDA ORCHID HOMEOBOX GENE FROM *Vanda tricolor* var. Suavis Lindl. form Merapi

By
Viantius Ruben
(17/411748/BI/09888)

ABSTRACT

Vanda tricolor var. Suavis Lindl. form Merapi is one of important Indonesian orchid species. Due to natural disaster or deforestation of their natural habitat, the population of this orchid continues to decline and is threatened to be extinct. Therefore, a strategy for mass propagation of this plant as a conservation effort is needed, both *in situ* and *ex situ.* Mass propagation using *in vitro* culture will greatly support *ex situ* conservation. It is well known that shoot growth in plants begins with the activation of the homeobox gene in the shoot apical meristem (SAM), which in turn induces the activation of related genes to regulate the growth of plant organs. Therefore, the information about homeobox gene in *V. tricolor* is necessary, to support the knowledge about induction of shoot growth in *in vitro* culture condition of *V. tricolor*. Previous studies have discovered *Dendrobium Orchid Homeobox1* (*DOH1)* gene in Dendrobium and *Phalaenopsis Orchid Homeobox1 (POH1)* gene in Phalaenopsis. We assumed that *Vanda* has a homologous gene to *DOH1* and *POH1*. The objective of this study is to isolate and analyze *Vanda Orchid Homeobox (VOH)* gene with degenerate primers designed from *DOH1* and *POH1* cDNA sequences. Leaf from a mature *V. tricolor* was used as samples for DNA analysis. The PCR product resulted from amplification of genomic DNA using primers from *DOH1* and *POH1* were analyzed by agarose gel electrophoresis. We found a similarity in the length of amplified product of *VOH1* gene using *DOH1* primer and in particular showed alignment of PCR product with the N-terminal region of *DOH1*. The data confirmed the conserved area and promises high similarity in structure and functions between both genes. Amplification with *POH1* primer showed high similarity in the length of PCR product as accumulated *POH1* transcript found in *P. amabilis* from previous study, which showed that it was the coding region. The subsequent sequence analysis on the candidate of *DOH1* and *POH1* homologous gene in *V. tricolor* showed that the gene has 77.27% similarity with *DOH1,* indicating that *VOH1* might act as the key gene for shoot growth in *V. tricolor* orchids. The *POH1* homologous gene in *V. tricolor* showed no significance similarity with any sequence in database, suggesting it might be a new sequence that need to be studied further.

Keyword: *Homologous Gene, Homeobox Gene, Vanda tricolor, Vanda Orchid Homeobox1*

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Anggrek adalah salah satu komoditas tanaman hias utama yang memiliki potensi yang besar dalam pasar internasional pada era globalisasi ini. Anggrek memiliki posisi penting dalam industri tanaman hias karena daya tariknya yang tinggi, bunga tidak mudah layu, umur yang panjang, produktivitas tinggi, musim bunga yang tepat, kemudahan pengemasan dan transportasi (Gardiner, 2007). Pada tahun 2012, anggrek telah diekspor oleh 40 negara dan diimpor oleh 60 negara di seluruh dunia (De *et al.*, 2019). Indonesia memiliki diversitas anggrek yang tinggi sehingga memiliki potensi yang besar dalam pasar anggrek dunia. Namun, kinerja perdagangan bibit anggrek Indonesia mengalami defisit perdagangan untuk bibit anggrek (Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, 2015). Oleh karena itu diperlukan metode baru dalam meningkatkan produktivitas bibit anggrek di Indonesia.

Salah satu anggrek yang memiliki potensi perdagangan yang baik adalah *Vanda tricolor*. *V. tricolor* Lindl. varietas *Suavis*, adalah anggrek yang tumbuh di beberapa daerah di Indonesia yaitu Jawa Timur, Jawa Barat, D.I. Yogyakarta, Sulawesi dan Bali (Gardiner, 2007). *V. tricolor* Lindl. varietas *Suavis* forma Merapi adalah salah satu variasi dari *V. tricolor* yang tersebar di DIY terutama di lereng G. Merapi. Gunung Merapi adalah salah satu gunung berapi yang paling aktif di Indonesia, erupsi dari gunung ini menyebabkan keberadaan anggrek ini akan terancam apabila tidak dilakukan usaha konservasi, baik secara *in situ*

UNIVERSITAS GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

maupun *ex situ*. Selain itu, populasi anggrek *V. tricolor* mulai langka ditemui di habitat asalnya karena adanya exploitasi secara berlebihan oleh manusia untuk diperdagangkan (Dwiyani, 2014). Konservasi *ex situ* anggrek *V. tricolor* asal Merapi dapat dilakukan dengan pembibitan secara *in vitro* di laboratorium, kemudian dilepasliarkan ke habitat aslinya pada saat bibit telah siap ditanam di alam sebagai usaha konservasi *in situ*.

Kultur *in vitro* adalah salah satu metode yang sangat efektif dalam perbanyakan bibit anggrek. Teknik ini menyediakan banyak keunggulan dibandingkan perbanyakan vegetatif secara konvensional, seperti perbanyakan sejumlah besar tanaman bebas patogen dalam waktu singkat dengan keseragaman tinggi dan tidak memerlukan mikorhiza dalam perkecambahan biji (Kumar dan Reddy, 2011). Kultur secara *in vitro* juga membuka peluang dalam transfomasi genetik yang telah terbukti meningkatkan efisiensi dalam mikropropagasi anggrek (Dwiyani *et al*., 2015). Namun sebelum dapat menerapkan transformasi genetik pada tanaman, gen yang akan digunakan perlu dipelajari terlebih dahulu. Gen yang bertanggung jawab bagi pertumbuhan khususnya adalah gen yang penting untuk dipleajari dalam usaha konservasi.

Pada tanaman, perkembangan dan pertumbuhan diregulasi oleh sekelompok gen yang bekerja sama dalam membentuk protein spesifik yang berperan dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman serta pada saat yang sama menginduksi kelompok gen kunci pada fase pertumbuhan selanjutnya. Produk dari kelompok gen di fase selanjutnya akan menekan aktivitas kumpulan gen fase dari sebelumnya (Howell, 1998). Oleh karena

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

itu, gen-gen yang bertanggung jawab terhadap pertumbuhan tanaman perlu dianalisis lebih lanjut untuk memanipulasi sel-sel tanaman dalam kondisi *in vitro*.

Gen homeobox merupakan faktor transkripsi yang berperan dalam regulasi pembentukan pola, spesifikasi sel, atau keduanya (Mukherjee *et al.* 2009). Gen homeobox pada *Dendrobium* dan *Phalaenopsis* telah ditemukan pada penelitian sebelumnya. *Dendrobium Orchid Homeobox 1 (DOH1)* adalah gen homeobox dalam kelas *KNOTTED1-like* homeobox pada anggrek yang diisolasi dari *Dendrobium Madame Thong-In* (Hao *et al.* 2000). Gen homolog *DOH1* juga telah diisolasi dari anggrek *P. amabilis* dan ditentukan sebagai *Phalaenopsis Orchid Homeobox1 (POH1)* (Semiarti *et al.,* 2008). Oleh karena itu, untuk memahami regulasi genetik dalam perkembangan tunas anggrek, diperlukan studi lebih lanjut untuk mengkarakterisasi gen homolog ini pada anggrek lain. Dalam penelitian ini, akan diisolasi gen homeobox pada *V. tricolor* dengan asumsi adanya homologi antara *DOH1* dan *POH1* dengan gen homeobox pada *V.tricolor*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan menganalisis gen *Vanda Orchid Homeobox (VOH1)* menggunakan primer degenerasi dari sekuens *POH1* dan *DOH1* untuk membantu upaya konservasi spesies *V. tricolor*.

Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

B. Permasalahan

Permasalahan yang diangkat dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah terdeteksi adanya gen homeobox homolog *DOH1* dan *POH1* di *V. tricolor* var. Suavis Lindl. forma Merapi?
2. Bagaimanakah similaritas gen homeobox *V. tricolor* var. Suavis Lindl. forma Merapi dengan gen homeobox homolog lain*?*

C. Tujuan +

Tujuan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengkonfirmasi adanya gen homeobox homolog *DOH1* dan *POH1* di *V. tricolor* var. Suavis Lindl. forma Merapi
2. Mengetahui similaritas gen homeobox *V. tricolor* var. Suavis Lindl. forma Merapi dengan gen homeobox homolog lain.

D.Manfaat

Dari penelitian ini diharapkan diperoleh manfaat sebagai berikut:

1. Dapat memberikan informasi bagi peneliti tentang gen homeobox *V. tricolor* untuk penelitian lebih lanjut akan transfomasi gen guna meningkatkan efektivitas propagasi massal

Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

A. Tinjauan Pustaka

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

Penyebaran *Vanda tricolor* Lindl. varietas *suavis,* pada beberapa daerah di Indonesia mencangkup 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 indeterinate 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 rompang 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

UNIVERSITAS GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

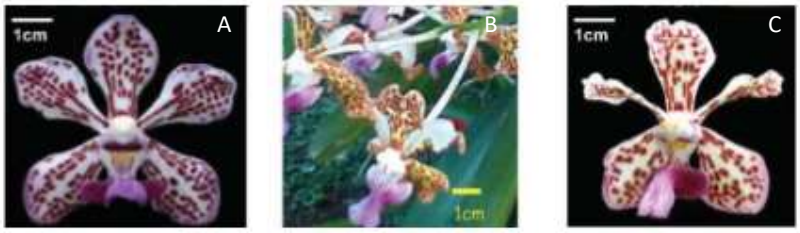
samping, f) Labellum tampak depan, g) Sepal dorsal, h) Petal, i) Sepal, j) Labelum tampak atas, k) Daun, l) Buah.

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	:	Vandeae
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 *gymnostenum*, yang letaknya dalam suatu lekukan pada tugu. (Dwiyani, 2014).

Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/



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

UNIVERSITAS GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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 pengecambahan. (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 kualtias pertumbuhan in vitro (Erfa *et al.*, 2019).

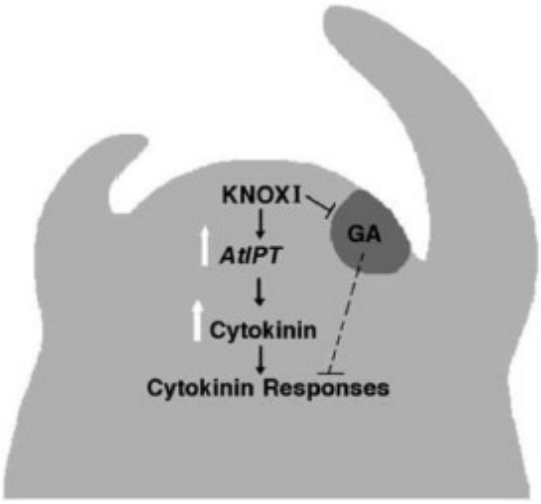
3. Gen Homeobox

Peranan gen *homeobox* pada tanaman pada regulasi dalam proses perkembangan memiliki analogi dengan gen homeobox pada hewan. (Mukherjee *et al.*, 2010). Bedasarkan dari kemiripan sekuens konservatif, gen *homeobox* tanaman dikelompokan menjadi beberapa kelompok, Chen *et al.* (1998) mengelompokan 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 menunjukan 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 giberelin, *GA20ox.* Hasil interaksi tersebut mempertahankan tingkat sitokinin yang tinggi dan disaat yang sama menjaga tingkat giberrelin tetap rendah, yang pada gilirannya

Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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/KNAT1* 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/KNAT1* 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/KNAT1* dalam menjaga *SAM* dalam tahap meristematik dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Dwiyani *et al.* (2015) yang menunjukan tanaman anggrek *P. amabilis* dan *V. tricolor* transforman gen *BP/KNAT1* dapat menumbuhkan tunas lebih banyak dibandingkan dengan tanaman *Wild Type.* Peningkatan jumlah tunas dari organ tanaman transforman menunjukan peran gen *BP/KNAT1* dalam menjaga tahap meristematik bekerja secara fungsional bahkan di tanaman transforman (Dwiyani *et al.,* 2015). Gen *BP/KNAT1* terdeteksi di expresikan pada organ/jaringan reproduksi, sehingga kehilangan fungsi dari *BP/KNAT1* menyebabkan berkurangnya pertumbuhan ruas bunga,

UNIVERSITAS GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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 disolasi 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 yangs sering digunakan dalam extraksi DNA dari jaringan

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

tanaman yang mengandung banyak polisakarida. Buffer ini terdiri dari: Tris-HCI pH 8, NaCI, 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 terahkir dari isolasi DNA adalah presipitasi molekul DNA menggunakan isopropanol atau alkohol absolut untuk mencuci DNA dari extraksi buffer (Puchooa, 2004). DNA lebih sulit larut dalam larutan isopropanol dibandingkan di dalam larutan etanol sehingga pengendapan DAN 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).

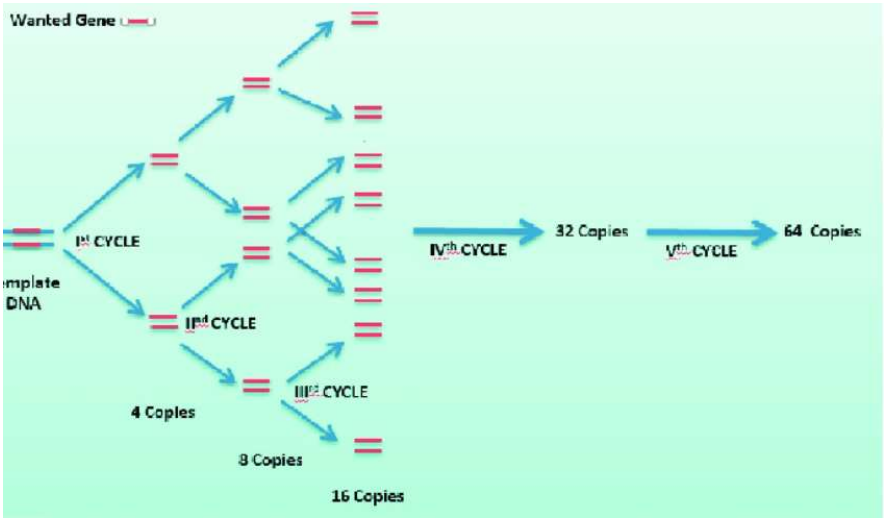
6. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Reaksi berantai polymerase (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) adalah metode enzimatis untuk mengamplifikasi fragment DNA secara *in vitro*. Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen: DNA *template* yang dapat berasal dari total DNAgenom maupun mRNA; Oligonukleotida primer; Deoksiribonukelotida 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 ºC. Digunakan suhu 94-95 ºC karena suhu tersebut merupaka 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*

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

Schantz, 2007). Suhu yang diperlukan pada tahap annealing berkisar 55-65ºC, 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 72-78ºC, *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*.

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi**
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

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

Isolasi Dan Karakterisasi Gen VANDA ORCHID HOMEOBOX 1 (VOH1) Dari Vanda tricolor var. suavis Lindl.
forma Merapi
VIANTIUS RUBEN, Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Universitas Gadjah Mada, 2021 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

BAB III
METODE PELAKSANAAN

A. Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta selama bulan April hingga Oktober 2021.

B. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah anggrek *Vanda tricolor* varietas *suavis* Lindl. forma Merapi yang sudah masak dan daun dari tanaman *V. tricolor* yang sudah dewasa.

Bahan kimia yang digunakan meliputi: 1) Bahan medium kultur *in vitro*; dan 2) Bahan untuk analisis molekular. Bahan untuk medium kultur *in vitro* berupa medium Vacin & Went (VW) dengan komponen penyusun pada (Lampiran 1), alumunium foil, kertas saring, kertas label, dan plastic seal.

Bahan yang digunakan dalam analisis molekuler antara lain reagen untuk isolasi DNA genom terdiri dari: CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) 3%, kloroform, isopropanol, EtOH 70% dan 100%, dan Buffer TE (10T-0,1E) pH 8. Bahan kimia untuk elektroforesis DNA genom adalah agarose tipe II (Sigma) dan buffer TAE (Tris-acetate-EDTA) 1X. Bahan yang digunakan dalam amplifikasi gen homeobox *Vanda* antara lain: HS red Mix (Bioline), primer *ACT4* (Yuan *et al*., 2014), primer degenerasi yang didesain dari *DOH1* (Tabel 1), dan NFW (Nuclease Free Water).