

## INTISARI

### INDUKSI EMBRIOGENESIS SOMATIK PADA ANGGREK *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. DENGAN PENYISIPAN GEN *AtRKD4*

Nintya Setiari  
12/338361/SBI/00111

Anggrek *D. phalaenopsis* Fitzg. adalah salah satu anggrek spesies asli Indonesia yang termasuk anggrek langka. Usaha perbanyak tanaman anggrek tersebut perlu dilakukan untuk konservasi maupun pemenuhan kebutuhan komersial, baik secara konvensional maupun moderen, antara lain dengan teknik embriogenesis *in vitro* baik secara zigotik maupun somatik. Embriogenesis zigotik dilakukan dengan perkecambahan biji anggrek pada medium yang sesuai dan embriogenesis somatik dengan transformasi genetik pada protokorm dengan gen embrio *AtRKD4*. Tujuan penelitian ini adalah 1. Mempelajari pertumbuhan dan perkembangan embrio biji anggrek *D. phalaenopsis* pada medium kultur *in vitro* yang ditambah pepton sebagai suplemen organik. 2. Menganalisis kecepatan pertumbuhan dan perkembangan embrio biji anggrek *D. phalaenopsis* pada kultur *in vitro*, 3. Mendapatkan persentase frekuensi transformasi genetik protokorm dengan gen *35S::GR::AtRKD4*, 4. Mengetahui ekspresi transgen *35S::GR::AtRKD4* dan menganalisis fungsi gen tersebut terhadap karakter fenotip anggrek *D. phalaenopsis* dan 5. Menentukan konsentrasi Dexamethasone (DEX) yang optimum untuk menginduksi pembentukan embrio somatik pada protokorm transforman anggrek *D. phalaenopsis* pembawa *35S::GR::AtRKD4*. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah perkecambahan biji anggrek pada media dasar (VW) dan media VW ditambah pepton (0, 1, 2, 3 gr/L), transformasi genetik protokorm dengan gen *35S::GR::AtRKD4* melalui *A. tumefaciens* EHA 105 dan induksi pembentukan embrio somatik pada protokorm transforman anggrek *D. phalaenopsis* pembawa *35S::GR::AtRKD4* dengan DEX (0, 10, 15, 20  $\mu$ M) pada media VW atau NP selama 1 atau 2 minggu.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pertumbuhan dan perkembangan embrio biji anggrek *D. phalaenopsis* mencapai optimal (93,93%) pada medium VW ditambah pepton 2 gr/L (VWP2) dibandingkan perkecambahan pada medium dasar VW (87,26%). Pada medium VWP2, embrio mencapai fase 6 pada minggu ke-8 setelah tanam, warna embrio hijau dan embrio berukuran lebih besar dibanding perlakuan lain. Hasil transformasi genetik protokorm dengan gen *35S::GR::AtRKD4* menunjukkan frekuensi transformasi genetik 12,10%. Deteksi integrasi gen *AtRKD4* pada genom kandidat transforman pembawa gen *AtRKD4* membuktikan bahwa terdapat integrasi gen *AtRKD4* pada genom anggrek dengan teramplifikasinya fragmen DNA dengan ukuran 382 bp dengan teknik *Polymerase Chain Reaction*

(PCR) menggunakan primer *AtRKD4*. Induksi pembentukan embrio somatik pada protokorm pembawa gen *35S::GR::AtRKD4* dengan DEX menghasilkan pembentukan tunas terbanyak ( $27 \pm 6$ ) buah pada tiap protokorm yang diinduksi dengan DEX  $15 \mu\text{M}$  selama 2 minggu pada media NP. Pada media VW, tunas terbanyak ( $17 \pm 6$ ) buah pada tiap protokorm yang diinduksi dengan DEX  $20 \mu\text{M}$  selama satu minggu. Hasil pengamatan anatomi embrio somatik yang terbentuk pada protokorm pembawa gen *35S::GR::AtRKD4* menunjukkan bahwa embrio somatik tersusun dari sel yang berukuran lebih kecil daripada sel protokorm induk dan mempunyai nukleus besar. Hasil RT-PCR pada uji ekspresi gen *AtRKD4* pada protokorm yang membentuk embrio somatik menunjukkan pita cDNA hasil transkripsi gen *AtRKD4* yang berukuran 382 bp. Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa perbanyak tanaman anggrek *D. phalaenopsis* dapat dioptimalkan dengan transformasi genetik protokorm anggrek dengan gen embrio *AtRKD4* yang menghasilkan rata-rata 15 tanaman dari 1 protokorm dan total tanaman yang dihasilkan dari penelitian ini adalah 1840 tanaman dari 126 protokorm.

Keywords: embriogenesis, *AtRKD4*, *Dendrobium phalaenopsis*, pepton, dexamethasone.

## ABSTRACT

### THE INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS ON *Dendrobium phalaenopsis* Fitzg. ORCHID WITH *AtRKD4* GENE

Nintya Setiari  
12/338361/SBI/00111

*D. phalaenopsis* Fitzg. orchid is one of the native orchid species of Indonesia that decided as rare orchids. For the conservation as well as the compliance of commercial requirement, it is needed to do effort of both conventionally and modern orchid plant propagation, among others by *in vitro* technique either zygotic and somatic embryogenesis. Zygotic embryogenesis was performed by germination of orchid seed on a suitable medium and somatic embryogenesis through genetic transformation of protocorm by using *AtRKD4* embryonic genes. The objectives of this research are: 1) To study the growth and development of *D. phalaenopsis* orchid seed embryos in an *in vitro* culture medium supplemented with peptone as an organic supplement; 2) To analyzing the growth rate and development of *D. phalaenopsis* embryo in *in vitro* culture; 3) To obtain the frequency of genetic transformation of protocorm by using *35S::GR::AtRKD4* genes; 4) To clarify the function of *35S::GR::AtRKD4* on *D. phalaenopsis* transgenic and 5) To determine the optimum concentration of Dexamethasone (DEX) for inducing somatic embryo formation in *35S::GR::AtRKD4* containing *D. phalaenopsis* orchid protocorms. The experiment were conducted in 2 steps: germination of orchid seed on VW basic media and VW media plus pepton (0, 1, 2, 3 gr/L), genetic transformation of protocorm with *35S::GR::AtRKD4* gene via *A. tumefaciens* strain EHA 105 and induction of somatic embryo formation in protocorm of *35S::GR::AtRKD4* containing *D. phalaenopsis* by using DEX (0, 10, 15, 20  $\mu$ M) on VW or NP medium for 1 or 2 weeks.

The results showed that the optimum growth and development of *D. phalaenopsis* orchid embryo (93,93%) reached on VW medium plus 2 grL<sup>-1</sup> pepton (VWP2) compared to that of germination on VW basic medium which only reached 87,26%. In VWP2 medium, the phase 6 embryo was achieved at 8<sup>th</sup> week after plantation, the colors of embryo were green and the size was larger than other treatments. The result of genetic transformation on protocorm by using the *35S::GR::AtRKD4* gene showed the genetic transformation frequency of 12.10%. The detection of *AtRKD4* gene integration in the *AtRKD4* gene containing transformant candidate genom proved that there is integration of *AtRKD4* gene in the orchid genome with the amplification of 382 bp DNA fragment with *AtRKD4* primers. Induction of somatic embryo formation in *35S::GR::AtRKD4* gene containing protocorm by using DEX resulted in the formation of ( $27 \pm 6$ ) buds in each protocorm after its being induced by 15  $\mu$ M DEX for 2 weeks on NP medium. In VW

medium, ( $17 \pm 6$ ) buds were formed on each protocorm after being induced by 20  $\mu$ M DEX for one week. Anatomic observations of somatic embryo derived from *35S::GR::AtRKD4* gene containing protocorms showed that somatic embryos were composed of cells that smaller than that in the parent protocorm cells on size with larger nuclei. The results of RT-PCR the expression transgene *AtRKD4* test on protocorm that forms a somatic embryo can be detected that a cDNA band of *AtRKD4* gene with 382 bp in size. Taken together, it can be concluded that the propagation of *D. phalaenopsis* orchid plants can be optimized improved by using genetic transformation of orchid protocorm with embryonic gene *AtRKD4*, that finally can be produced 15 intact plants from one protocorm and totally can be produced 1840 plants from this research.

Keywords: embryogenesis, *AtRKD4*, *Dendrobium phalaenopsis*, pepton, dexamethasone