

ANALISIS FUNGSIONAL GEN EMBRIO *AtRKD4* PADA TANAMAN *Dendrobium lineale* Rolfe PEMBAWA 35S::GR::*AtRKD4*

Ni Luh Putu Kayika Febryanti
18/432404/PBI/01562

INTISARI

Dendrobium lineale Rolfe adalah anggrek endemik Papua yang terancam punah karena adanya eksploitasi dan bencana alam. Oleh karena itu diperlukan upaya untuk perbanyak tanaman, baik secara *in situ* maupun *ex situ* untuk menjaga anggrek ini dari ancaman kepunahan. Perbanyak tanaman secara massal untuk konservasi dapat dilakukan dengan teknik kultur *in vitro*. Salah satu metode teknik kultur *in vitro* yaitu melalui pembentukan embrio somatik (SEs). Embrio somatik dapat diproduksi dengan penyisipan gen embrio *AtRKD4* ke protokorm anggrek *D. lineale* menggunakan *Agrobacterium-mediated transformation* dengan plasmid pTA7002 yang membawa T-DNA pembawa 35S::GR::*AtRKD4*. Penelitian ini bertujuan untuk: 1) mendeteksi integrasi gen *AtRKD4* dalam genom transforman, 2) menganalisis dinamika ekspresi gen *AtRKD4* selama diinduksi dengan dexamethasone (DEX) atau thidiazuron (TDZ), 3) mendeteksi terbentuk/tidaknya protein *AtRKD4* dengan menganalisis profil protein setelah dilakukan inisiasi pembentukan embrio somatik, 4) mengetahui pengaruh pemberian DEX dan TDZ terhadap pembentukan embrio somatik pada berbagai tipe eksplan tanaman transforman *D. lineale*. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah subkultur tanaman kandidat transforman pada medium NP0, konfirmasi integrasi gen *AtRKD4* pada genom transforman dengan PCR, induksi ekspresi gen *AtRKD4* dengan DEX 15 μM atau TDZ 3 mg.L^{-1} , deteksi protein *AtRKD4* setelah diinduksi dengan DEX 15 μM atau TDZ 3 mg.L^{-1} menggunakan SDS-PAGE dan induksi pembentukan embrio somatik pada eksplan batang, daun dan akar anggrek *D. lineale* dengan penambahan DEX (0, 5, 10, 15 μM) dan TDZ (0, 1, 3 mg.L^{-1}) pada medium NP selama 5 hari kemudian dipindahkan ke medium NP0. Hasil penelitian menunjukkan bahwa stabilitas T-DNA yang membawa gen *AtRKD4* masih terjaga pada 10 tanaman transforman *D. lineale* berumur 1 tahun 6 bulan. Pemberian DEX atau TDZ dapat menginduksi ekspresi transgen *AtRKD4* pada tanaman transforman anggrek *D. lineale* paling tinggi pada 5 hari induksi. Protein *AtRKD4* dengan berat molekul 28,53 kDa dihasilkan pada tanaman transforman anggrek *D. lineale*. Kombinasi DEX 15 μM + TDZ 1 mg.L^{-1} mampu menginduksi pembentukan embrio somatik terbaik pada eksplan batang tanaman transforman anggrek *D. lineale* dengan pembentukan embrio sebesar 60% dan rerata embrio sebesar $35,67 \pm 2,08$.

Kata kunci: *AtRKD4*, *D. lineale*, dexamethasone-thidiazuron, embriogenesis somatik, protein

FUNCTIONAL ANALYSIS OF EMBRYO GENE *AtRKD4* IN *Dendrobium lineale* Rolfe CARRYING 35S::GR::*AtRKD4*

Ni Luh Putu Kayika Febryanti
18/432404/PBI/01562

ABSTRACT

Dendrobium lineale Rolfe is an endemic orchid of Papua that is threatened to be extinct due to over-exploitation and natural disasters. It takes effort to multiply both *in situ* and *ex situ* to keep these orchids from the threat of extinction. Mass propagation of plant can be done by tissue culture. One of the method is mass propagation by using production of somatic embryos (SEs) for the conservation of the orchid. SEs can be produced by using *Agrobacterium*-mediated transformation of embryo gene *AtRKD4* into orchid protocorms using pTA7002 plasmid that carrying 35S::GR::*AtRKD4*. The objectives of this study were to: 1) detect the integration of the *AtRKD4* gene in the transformant genome, 2) analyze the dynamics expression of the *AtRKD4* gene during induction with DEX or TDZ, 3) detect the *AtRKD4* protein by using a protein profile on the initiation of somatic embryo formation, 4) determine the effect of dexamethasone and thidiazuron for the formation of somatic embryos in various explants of *D. lineale* transformant plants. The experiment were conducted in 5 steps: subcultures of transformant candidate plants in NP0 medium, confirmation of integration of the *AtRKD4* gene in transformant genome with PCR, induction of *AtRKD4* transgene expression with DEX 15 μM or TDZ 3 mg.L^{-1} , detection of *AtRKD4* protein after induced by DEX 15 μM or TDZ 3 mg.L^{-1} using SDS-PAGE and induction of somatic embryo formation in stem, leaf and root explant of *D. lineale* orchid with addition of DEX (0, 5, 10, 15 μM) and TDZ (0, 1, 3 mg.L^{-1}) on NP medium for 5 days and then transferred into NP0 medium. The results showed that the stability of T-DNA carrying *AtRKD4* gene was maintained in 10 *D. lineale* transformant plants aged 1 year and 6 months. Induction of DEX or TDZ can induce *AtRKD4* transgene expression in *D. lineale* orchid transformants with the highest was at 5 days induction. *AtRKD4* protein with a molecular weight of 28.53 kDa was produced in *D. lineale* orchid transformant plants. The combination of DEX 15 μM + TDZ 1 mg.L^{-1} was able to induce the best somatic embryo formation in stem explants of *D. lineale* orchid transformants with 60% embryo formation and the average formed was 35.67 ± 2.08 embryos.

Keywords: *AtRKD4*, *D. lineale*, dexamethasone-thidiazuron, protein, somatic embryogenesis