

# PENGARUH CAHAYA DAN TEMPERATUR TERHADAP PERTUMBUHAN TUNAS DAN PROFIL PROTEIN TANAMAN ANGGREK *Phalaenopsis amabilis* TRANSGENIK PEMBAWA GEN *Ubipro::PaFT*

*Effect of Light and Temperature on Shoot Growth and Protein Profile of Transgenic  
PhalaenopsisamabilisOrchid Carrying Ubipro::PaFT Gene*

Rinaldi Rizal Putra<sup>1)</sup>, Ixora Sartika Mercuriani<sup>2)</sup>, Endang Semiarti<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Jurusan Pendidikan Biologi FKIP Universitas Siliwangi,

Jl. Siliwangi No. 24 Kota Tasikmalaya46115

<sup>2)</sup>Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Yogyakarta

Kampus Karangmalang, Jl. Colombo No. 1 Yogyakarta 55281

<sup>3)</sup>Laboratorium Bioteknologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada,

Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta 55281

rinaldi.rizalputra@gmail.com, endsemi@ugm.ac.id

**Abstract**—This research aimed to analyze the influence of light and temperature on morphology growth, to analyze protein profiles, and to determine the right condition of flowering acceleration of trasgenic *Phalaenopsisamabilis* withdeterminant gene of flowering time, *Ubipro::PaFT*, inserted. The method used was transgenic plants carrying the *Ubipro::PaFT* gene aged of 18 months after sowing. Plants were grown in incubators with certain lighting conditions using white LED light and combination of white and blue LED lights with an intensity mean of 1780 lm, photoperiod of 8-hour light phase and 16-hour dark phase, and temperature of 25°C (light phase) and 20°C (dark phase) for 20 weeks. After 20 weeks of plant growth, protein profiles of transgenic plants were analyzed by SDS-PAGE method to determine protein product in each of observed growth phase. The results showed that a combination of white and blue light increases the number of leaves by 60.00% and leaf length by 70.58%, respectively, but there was no significant effect on the increase of number of roots, and appearances of inflorescence observed. Analysis resultson protein profiles suggestedthe establishment of proteins with sizes of108.57; 71.30; 56.16; 40.85; 26.79; 13.27;and 13.12 kDa in transgenic plants. The presence of 19,65-kDa proteinmatched to the molecular weight of PaFT protein was not detected, while protein with a molecular weight approximately 56,16 kDa suited to POH1 (*Phalaenopsis Orchid Homeobox1*) protein was found. It could be explained that the POH1 vegetative gene can be inhibit the activation of PaFT gene in *P. amabilis* transgenic plants age of 20 weeks, until the plant are still in juvenile phase and can't be inducible to flowering activities.

**Keywords:***Phalaenopsis amabilis*, light and temperature, PaFT, POH1, protein profile

**Abstrak**—Penelitian ini bertujuan untuk mencari kondisi yang tepat dalam percepatan pembungaan tanaman *Phalaenopsis amabilis* transgenik yang telah disisipi gen penentu waktu pembungaan *Ubipro::PaFT*. Metode penelitian ini menggunakan tanaman transgenik pembawa gen *Ubipro::PaFT* umur 18 bulan setelah penanaman. Tanaman ditumbuhkan pada inkubator dengan pencahayaan menggunakan lampu LED putih dan kombinasi LED putih biru, dengan fotoperiodisitas 8 jam terang 16 jam gelap, suhu 25°C pada fase terang dan 20°C pada fase gelap selama 20 minggu. Setelah 20 minggu pertumbuhan tanaman, dilakukan analisis profil protein dengan metode SDS-PAGE untuk mengetahui protein yang diproduksi pada setiap fase pertumbuhan yang diamati. Hasil penelitian menunjukkan kombinasi cahaya LED putih dan biru meningkatkan pembentukan daun sebesar 60%, panjang daun 70,58%, tetapi belum diperoleh kemunculan infloresen. Analisis profil protein menunjukkan terbentuknya protein dengan ukuran 108,57; 71,30; 56,16; 40,85; 26,79; 13,27; dan 13,12 kilodalton pada

tanaman transgenik, tetapi tidak terdeteksi protein dengan ukuran 19,65 kDa yang sesuai dengan berat molekul protein PaFT, sementara protein dengan ukuran sekitar 56,16 kDa sesuai dengan berat molekul protein POH1 (*Phalaenopsis* Orchid Homeobox1). Hal ini menunjukkan bahwa gen vegetatif POH1 mampu menghambat aktivasi gen PaFT pada tanaman *P. amabilis* transgenik umur 20 minggu, sehingga tanaman masih dalam fase juvenil dan belum mampu diinduksi untuk berbunga.

**Kata kunci:** *Phalaenopsis amabilis*, cahaya dan temperatur, PaFT, POH1, profil protein

## PENDAHULUAN

Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* merupakan salah satu dari sekian banyak jenis anggrek alam yang menjadi kebanggaan Indonesia (Indrianto, 2002) dan terpilih sebagai salah satu Puspa Pesona Indonesia pada tahun 1990 (Sulistianingsih *et al.*, 2006) karena memiliki keindahan dan nilai kultural yang tinggi (Badriah dan Sutater, 1996). Bentuk dan warna bunga yang sangat indah menjadi daya tarik tersendiri bagi para pecinta anggrek yang membuat nilai jualnya tinggi di pasaran, sehingga diperlukan suatu usaha memuliakan tanaman ini seperti frekuensi berbunga yang tinggi (Sulistianingsih *et al.*, 2006) dan proses pembungaan yang cepat (Jumani, 2010).

Pertumbuhan anggrek yang optimal akan berdampak positif pada proses pembungaannya. Hal tersebut didukung oleh dua faktor utama, yaitu faktor intrinsik dan faktor ekstrinsik. Faktor intrinsik yang berpengaruh pada proses pembungaan antara lain: gen, hormon endogen, dan umur tanaman. Sedangkan faktor ekstrinsik yang berpengaruh pada proses pembungaan antara lain: cahaya, temperatur, kelembaban, ketersediaan nutrisi, dan induksi fitohormon secara eksternal (Hew and Yong, 2004). Semua faktor tersebut saling berhubungan untuk mendukung pertumbuhan tanaman secara optimal.

Penelitian dengan anggrek *P. amabilis* telah dilakukan sebelumnya oleh Mercuriani *et al.* (2014) berkaitan dengan

pembungaan anggrek melalui penyisipan gen *Ubipro::PaFT*, induksi hormon Benziladenin (BA), dan perlakuan fisik dengan cara pemotongan akar. Gen *Ubipro::PaFT* telah berhasil disisipkan pada genom tanaman anggrek *P. amabilis* yang dibuktikan dengan munculnya fragmen DNA pada ukuran 531 bp. Namun, anggrek transgenik yang disisipi gen *Ubipro::PaFT* ini belum berbunga baik secara *in vitro* maupun *ex vitro*. Teknik induksi pembungaan dengan menggunakan hormon bensiladenin (BA) konsentrasi 22,2  $\mu\text{M}$  dan pemotongan akar pada medium *New Phalaenopsis* (NP – *half strength*) yang telah dimodifikasi berhasil memunculkan infloresen pada tanaman *P. amabilis* non-transgenik. Berdasarkan hasil tersebut, Mercuriani *et al.* (2014), menyimpulkan kombinasi perlakuan dengan pemberian hormon BA 22,2  $\mu\text{M}$ , kandungan unsur P tinggi (3  $\mu\text{M}$ ), dan pemotongan akar mampu mempercepat pembungaan *in vitro* anggrek *P. amabilis* asli Indonesia pada umur 18 bulan setelah tanam. Hal ini karena perlakuan pemotongan akar dapat meningkatkan penyerapan BA oleh tanaman yang kemudian menginduksi pembentukan tunas. Selain itu, pemotongan akar sangat berpengaruh terhadap peningkatan diameter batang yang berhubungan dengan akumulasi cadangan makanan sebagai sumber energi untuk pembentukan tunas daun dan bunga (Mercuriani *et al.*, 2014).

Keberhasilan pembungaan *in vitro* yang telah dilakukan oleh Mercuriani

*et al.*, (2014) pada tanaman anggrek *P. amabilis* non-transgenik ingin dibuktikan juga pada tanaman anggrek *P. amabilis* transgenik pembawa gen *Ubipro::PaFT* dengan pemberian perlakuan lainnya, yaitu dengan perlakuan warna cahaya dan temperatur terkontrol secara terus menerus. Warna cahaya yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cahaya putih dan kombinasi cahaya putih dan cahaya biru dengan jenis lampu *light-emitting diodes* (LED). Penggunaan sistem pencahayaan LED pada penelitian ini karena didasarkan berbagai faktor, yaitu menghasilkan spektrum cahaya yang spesifik, massa dan volume yang kecil, daya tahan yang relatif lama, *lifetime* operasi yang relatif panjang, kekhususan panjang gelombang, suhu pancaran permukaan relatif dingin, pemanasan minimum, dan *output* foton yang linier dengan arus *input* listrik (Lin *et al.*, 2013; Johkan *et al.* 2010; Hew and Yong, 2004). Sedangkan temperatur yang digunakan dalam penelitian ini meliputi 25°C secara terus menerus dan 20°C (fase gelap), 25°C (fase terang).

Tujuan penelitian adalah menganalisis pengaruh cahaya dan temperatur terhadap pertumbuhan morfologi dan profil protein yang terbentuk pada tanaman anggrek *P. amabilis* non-transforman dan transforman yang membawa gen *Ubipro::PaFT*.

## METODE PENELITIAN

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman anggrek *P. amabilis* transgenik pembawa gen *Ubipro::PaFT* dan non-transgenik umur 18 bulan. Tanaman anggrek diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya yang ditanam pada medium NP+150 mL.L-1 air kelapa (Islam *et al.*, 1998). Medium dasar

yang digunakan adalah medium  $\frac{1}{2}$  NP, yaitu medium NP dengan kandungan N konsentrasi rendah ( $\frac{1}{2}$  dari konsentrasi N pada medium NP).

Tanaman anggrek transgenik pembawa gen *Ubipro::PaFT* dan non-transgenik diinkubasi sesuai dengan variasi perlakuan pada Tabel 1. Fotoperiodisasi pada cahaya menggunakan sistem *Short-day plant*, dengan panjang periode terang selama 8 jam dan periode gelap selama 16 jam.

Analisis molekular meliputi analisis DNA dan analisis profil protein. Isolasi DNA genom menggunakan metode CTAB 3% berdasarkan metode Doyle and Doyle (1987; 1990) yang telah dimodifikasi (Paquet *et al.*, 2005). Deteksi keberadaan T-DNA pembawa transgen di dalam genom tanaman dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik untuk gen *PaFT* dengan kombinasi sebagai berikut: DegPaFT F1 (5'-GAK ATG AAT AGA GAG ASR GAC-3') dan Tnos-R yang menghasilkan fragmen DNA sepanjang 1030 bp, dan kombinasi primer DegPaFT F1 (5'-GAK ATG AAT AGA GAG ASR GAC-3') dan DegPaFT R1 (5'-TCA ATC YTG CAT YCT TCT TCC-3') yang menghasilkan fragmen DNA sepanjang 531 bp. Reaksi PCR yang berlangsung terdiri dari 30 siklus.

Analisis profil protein didahului dengan isolasi protein dari sampel daun tanaman anggrek, kemudian pada tahapan berikutnya sampel siap di elektroforesis dengan SDS-PAGE.

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Bioteknologi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada pada bulan Mei 2014 sampai dengan Januari 2015.

Tabel 1. Variasi Perlakuan

Kode Perlakuan	Warna Cahaya LED	Suhu Inkubator	
		Terang	Gelap
T1	Putih	25°C	20°C
T2	Putih + Biru	25°C	20°C
T3	Putih	25°C	25°C
T4	Putih + Biru	25°C	25°C

Tabel 2. Pertumbuhan tanaman anggrek *P. amabilis* transgenik (Tr) dibandingkan dengan non-transgenik (NT)

Parameter	Umur (Minggu)	Perlakuan							
		T1		T2		T3		T4	
		NT	Tr	NT	Tr	NT	Tr	NT	Tr
Jumlah Daun (helai)	0	4 ± 0	5 ± 1	4 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	4 ± 0	5 ± 1
	6	5 ± 0	6 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	5 ± 0	6 ± 1
	12	5 ± 0	7 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	5 ± 0	7 ± 1
	18	6 ± 0	7 ± 1	7 ± 0	7 ± 1	7 ± 1	8 ± 1	6 ± 1	7 ± 1
	20	6 ± 0	7 ± 1	7 ± 0	8 ± 0	7 ± 1	8 ± 1	6 ± 1	8 ± 1
Panjang Daun (cm)	0	3,1 ± 0,9	2,7 ± 1,0	5,2 ± 0,6	3,4 ± 0,4	2,5 ± 0,5	1,6 ± 0,5	3,7 ± 0,8	3,3 ± 1,5
	6	3,9 ± 1,2	3,7 ± 1,0	5,5 ± 0,4	3,8 ± 0,5	3,0 ± 0,5	2,3 ± 0,5	4,4 ± 1,1	4,2 ± 1,3
	12	4,3 ± 1,0	3,7 ± 0,9	6,3 ± 0,1	4,4 ± 0,6	3,4 ± 0,6	3,1 ± 0,1	5,1 ± 1,2	5,1 ± 1,7
	18	4,8 ± 1,1	4,0 ± 1,0	7,1 ± 0,3	5,3 ± 0,9	3,8 ± 0,4	4,0 ± 0,3	5,2 ± 1,4	5,4 ± 1,8
	20	5,0 ± 1,1	4,1 ± 1,1	7,4 ± 0,6	5,8 ± 1,1	3,9 ± 0,3	4,1 ± 0,4	5,2 ± 1,4	5,5 ± 1,8
Jumlah Akar (buah)	0	11 ± 1	4 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	5 ± 0	6 ± 1	5 ± 0	5 ± 1
	6	13 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	5 ± 0	7 ± 2	5 ± 0	6 ± 2
	12	15 ± 1	5 ± 1	7 ± 1	6 ± 1	5 ± 0	7 ± 2	6 ± 1	6 ± 2
	18	17 ± 1	5 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 0	8 ± 2	7 ± 1	7 ± 2
	20	17 ± 1	6 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	8 ± 2	7 ± 1	7 ± 3

Keterangan: **T1** (Cahaya LED Putih dengan fase terang: 8 jam pada temperatur 25°C dan fase gelap: 16 jam pada temperatur 20°C); **T2** (Cahaya kombinasi LED Putih + LED Biru dengan fase terang: 8 jam pada temperatur 25°C dan fase gelap: 16 jam pada temperatur 20°C); **T3** (Cahaya LED Putih dengan fase terang 8 jam dan fase gelap 16 jam pada temperatur 25°C secara terus menerus); **T4** (Cahaya kombinasi LED Putih dan LED Biru dengan fase terang 8 jam dan fase gelap 16 jam pada temperatur 25°C secara terus menerus). Standar deviasi tanaman transgenik dan non-transgenik masing-masing dihitung dari 5 sampel dan 2 sampel

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Peningkatan Jumlah dan Ukuran Daun

Peningkatan jumlah daun pada tanaman *Phalaeopsis amabilis* transgenik yang diberi perlakuan T2 dan T4 menunjukkan penambahan jumlah daun yang lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman yang diberi perlakuan lainnya (Tabel 2). Penambahan jumlah daun pada tanaman transgenik dibandingkan dengan tanaman non-

transgenik pada perlakuan T2 tidak memiliki perbedaan. Namun, bila dibandingkan dengan perlakuan lainnya (T1, T3, dan T4), perlakuan T2 memberikan pengaruh terbaik dalam penambahan jumlah daun baik untuk tanaman transgenik maupun non-transgenik (Tabel 2). Hal tersebut mengindikasikan bahwa kombinasi cahaya putih dan biru dengan pemaparan temperatur 25°C pada fase terang dan 20°C dapat meningkatkan jumlah daun pada tanaman. Hal ini

menunjukkan bahwa kondisi semua tanaman yang diberikan perlakuan apapun tetap menunjukkan kenaikan dalam jumlah daun, ukuran daun, dan jumlah akar walaupun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Peningkatan ukuran panjang daun terbesar secara berturut terdapat pada perlakuan T3, T2, dan T4, sedangkan pertambahan panjang daun terkecil terdapat pada perlakuan T1. Pada perlakuan T3, tanaman transgenik menunjukkan pertumbuhan panjang daun yang lebih besar dibandingkan dengan tanaman non-transgenik. Kemudian, pada perlakuan T2, tanaman transgenik tidak memiliki perbedaan yang signifikan dengan tanaman non-transgenik. Namun, apabila dibandingkan dengan perlakuan lainnya tanaman non-transgenik pada perlakuan T2 memiliki panjang daun yang lebih besar.

Berdasarkan uji statistik menggunakan uji Anova menunjukkan bahwa perlakuan cahaya dan temperatur memengaruhi jumlah daun pada minggu ke-6 dan minggu ke-18, tetapi tidak berpengaruh pada minggu ke-12 dan ke-20. Setelah diuji lanjut dengan uji DMRT dengan taraf 5 % menunjukkan bahwa pada minggu ke-6 perlakuan T1 menunjukkan jumlah daun tertinggi dan berbeda nyata dengan perlakuan yang lainnya. Daun *P. amabilis* pada minggu ke-12 menunjukkan bahwa perlakuan T3 menunjukkan jumlah daun tertinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Setelah diuji lanjut dengan DMRT 5% menunjukkan bahwa perlakuan T3 tidak berbeda nyata dengan perlakuan T2 dan T1 tetapi berbeda nyata dengan perlakuan T4.

Adanya hal tersebut menunjukkan bahwa cahaya dan temperatur mempengaruhi jumlah daun *P. amabilis*. Perlakuan cahaya dan temperatur pada tanaman *P. amabilis* ternyata tidak berpengaruh pada jumlah akar dan pertambahan ukuran daun tanaman *P. amabilis* setelah diuji dengan anova dengan taraf 5% baik pada minggu ke-6, ke-12, ke-18, dan ke-20.

Kombinasi cahaya putih dan biru dalam meningkatkan jumlah daun pada tanaman berkaitan dengan fungsi induksi morfogenesis dan organogenesis pada cahaya biru. Penambahan cahaya biru menginduksi percepatan pembelahan sel di daerah SAM sehingga menginisiasi munculnya primordia daun. Hasil penelitian ini didukung oleh Muleo *et al.* (2001) yang menyatakan proliferasi pucuk tanaman Plum melibatkan dua proses berbeda, yaitu diferensiasi tunas aksiler dan perkembangan tunas aksiler, serta kualitas cahaya memengaruhi diferensiasi tunas dan interaksinya dengan dominansi apikal. Cahaya merah meregulasi dominansi apikal melalui reseptor fitokrom, sedangkan cahaya biru meregulasi jumlah tunas aksiler melalui reseptor kriptokrom.

Hasil penelitian ini mendukung penelitian yang telah ada sebelumnya, yang dilakukan oleh Hunter dan Burritt (2004) pada kultur eksplan daun tanaman selada. Hasil penelitian Hunter dan Burritt (2004) membuktikan eksplan daun tanaman selada yang terpapar sinar merah dan sebelumnya terpapar sinar biru memproduksi lebih sedikit tunas dibandingkan dengan eksplan daun yang sebelumnya terpapar sinar merah kemudian ditransfer pada

kultur dengan cahaya biru. Dengan demikian, dapat diambil kesimpulan sementara bahwa cahaya biru menginisiasi pembelahan sel pada daerah meristem, yang selanjutnya menginisiasi pembentukan primordia daun baru.

Peningkatan jumlah daun adalah salah satu indikator tanaman mencapai tahap dewasa. Dalam pendewasaan tanaman, faktor umur merupakan salah satu faktor yang memengaruhi transisi tanaman menuju tahap reproduktif secara umum, selain kesehatan tanaman. Dengan meningkatkan jumlah daun, tanaman mampu melakukan fotosintesis secara maksimal untuk mendukung proses transisinya menuju fase reproduktif (Glover, 2007), dan peningkatan nilai bersih fotosintesis bergantung pada kandungan klorofil yang terdapat pada daun (Xiaoying *et al.*, 2012). Penambahan cahaya biru dapat meningkatkan hasil bersih fotosintesis melalui peningkatan kandungan klorofil a, dikarenakan klorofil a terlibat langsung dalam penentuan aktivitas fotosintesis. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tanaman anggrek *P. amabilis* pembawa gen *Ubipro::PaFT* telah mencapai umur 23 bulan/92 minggu dan telah mencapai tahap dewasa/berbunga. Namun, secara morfologis belum terlihat adanya indikator terjadinya transisi dari fase vegetatif ke fase pembungaan, seperti munculnya infloresens, walaupun telah diinduksi dengan perlakuan cahaya biru. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh Semiarti *et al.* (2007), bahwa anggrek *P. amabilis* memasuki fase reproduktif pada umur 53 minggu setelah penanaman yang ditandai dengan munculnya infloresens, kemudian

muncul bunga pada umur 130 minggu setelah tanam.

## 2. Analisis DNA Tanaman Anggrek Pembawa Gen *Ubipro::PaFT*

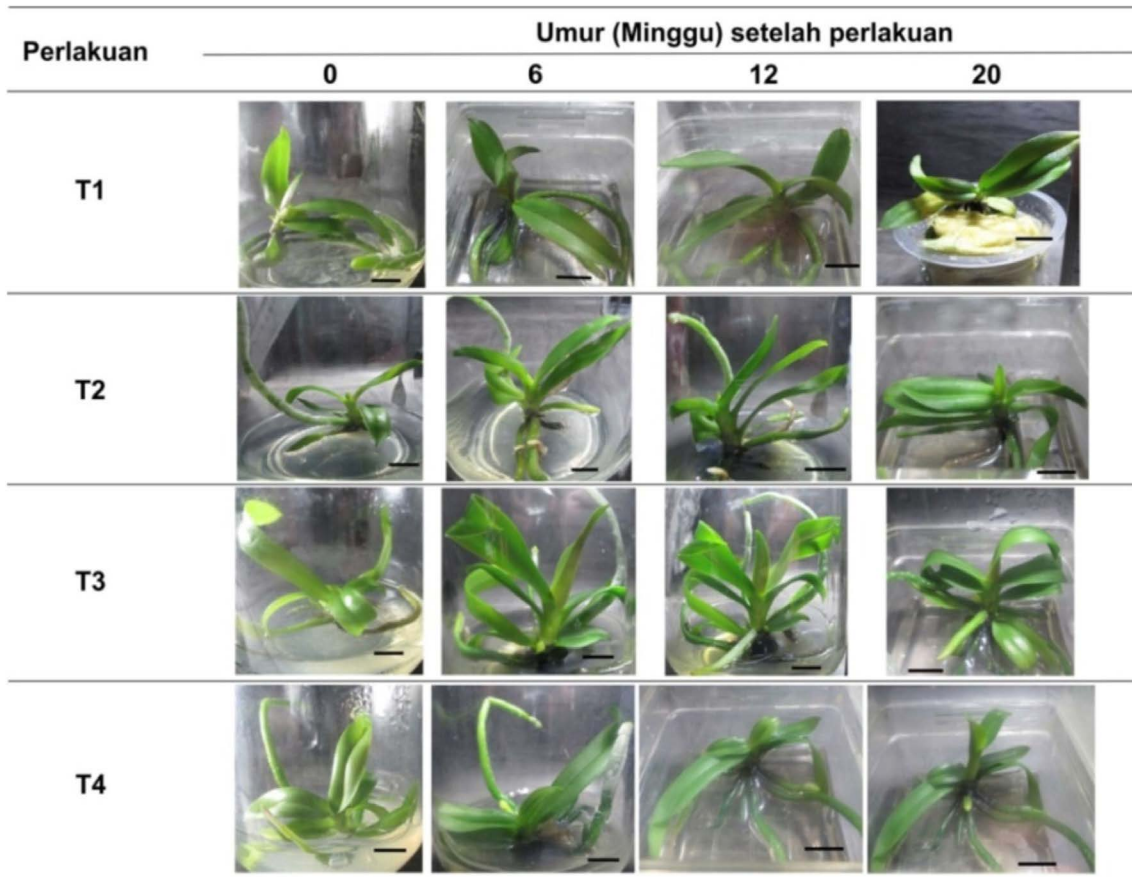
Analisis DNA pada penelitian ini dilakukan untuk mengkonfirmasi apakah transgen *Ubipro::PaFT* telah terintegrasi ke dalam genom tanaman anggrek *P. amabilis* transgenik. Amplifikasi fragmen DNA dan plasmid yang membawa gen *Ubipro::PaFT* dengan menggunakan primer DegPaFT F1R1 menghasilkan fragmen DNA berukuran 531 *base pair* (bp) (Gambar 1a) sesuai dengan ukuran gen *PaFT* yang disisipkan.

Keberadaan fragmen DNA berukuran 531 bp dari hasil amplifikasi dengan primer DegPaFT F1R1 (Gambar 1b) tersebut menunjukkan stabilitas integrasi transgen *PaFT* di dalam genom tanaman selama pertumbuhan dan perkembangan tanaman transgenik. Tanaman-tanaman transgenik yang digunakan dalam penelitian ini telah dinyatakan positif sebagai transgen pada penelitian Mercuriani (2014) sebelumnya pada medium seleksi antibiotik Hygromisin.

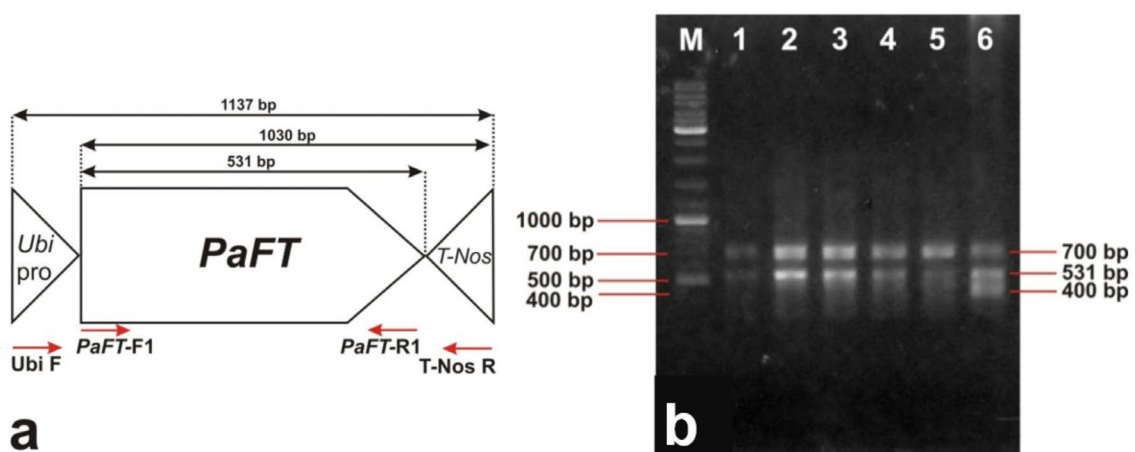
Munculnya fragmen DNA berukuran 700 bp pada genom tanaman anggrek *P. amabilis* (Gambar 1b) baik transgenik maupun non-transgenik hasil amplifikasi dengan menggunakan primer DegPaFT F1R1 disebabkan beberapa kemungkinan, antara lain adanya gen homolog pada genom anggrek *P. amabilis* Indonesia yang berukuran 700 bp terhadap *PaFT* pada anggrek *P. amabilis* Taiwan asal transgen tersebut diisolasi, dengan ukuran 531 bp. Pembuatan primer DegPaFT F1R1 didasarkan pada sekuen gen *FT-Like* tanaman

anggrek *P. amabilis* asal Taiwan yang telah diklon dalam plasmid pGA3426 dalam bakteri *Agrobacterium*

*tumefaciens* strain LBA4404 (Semiarti *et al.*, 2007).



Gambar 1. Pertumbuhan tanaman *P. amabilis* transgenik dimulai pada umur 18 bulan pada semua perlakuan (Bar = 1cm).



Gambar 2. Elektroforegram hasil re-konfirmasi keberadaan transgen *PaFT* pada tanaman anggrek *P. amabilis* transgenik. (a) Konstruksi fragmen *Ubipro::PaFT*. (b) Hasil amplifikasi DNA menggunakan primer DegPaFT F1R1. M: Marka 1 kb DNA Ladder, lajur 1 – 5: Tanaman transgenik, lajur 6: Tanaman non-transgenik.

### 3. Analisis Profil Protein Tanaman Anggrek Pembawa Gen *Ubipro::PaFT*

Analisis profil protein dilakukan untuk mengetahui apakah telah terjadi ekspresi transgen *Ubipro::PaFT* di level translasi dengan pembentukan protein pada tanaman anggrek *Phalaenopsis amabilis* pembawa gen *Ubipro::PaFT* setelah pemberian perlakuan.

Profil protein pada Gambar 3 berasal dari supernatan hasil isolasi daun. Ukuran berat molekul pita protein yang dihasilkan pada elektroforegram tersebut disajikan pada Tabel 3.

Elektroforegram pada Gambar 3 dan perhitungan berat molekul (kDa) sampel yang disajikan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa terdapat protein yang terdeteksi pada semua tanaman, baik tanaman transgenik maupun non-transgenik, dan ada beberapa protein yang terdeteksi hanya pada tanaman tertentu. Protein dengan berat molekul 108,57 kDa merupakan protein dengan berat molekul terbesar yang terdeteksi pada sebagian besar tanaman, kecuali pada sampel tanaman di lajur G dan L. Kemudian, protein dengan berat molekul 71,30 kDa terdeteksi hampir diseluruh tanaman, kecuali pada sampel tanaman di lajur K. Selanjutnya, protein dengan berat molekul 56,16 kDa terdeteksi pada sebagian besar tanaman kecuali pada sampel tanaman di lajur G dan L. Protein dengan berat molekul 40,85 kDa terdeteksi pada semua tanaman dan protein dengan berat molekul 26,79 kDa hanya terdeteksi pada sampel tanaman di lajur J dan K saja. Kemudian, protein dengan berat molekul 13,27 kDa hanya terdeteksi

pada beberapa tanaman, kecuali sampel tanaman di lajur G, J, K, dan L, serta protein dengan berat molekul 13,12 kDa merupakan protein dengan berat molekul terkecil yang hanya terdeteksi pada sampel tanaman di lajur C, D, dan I.

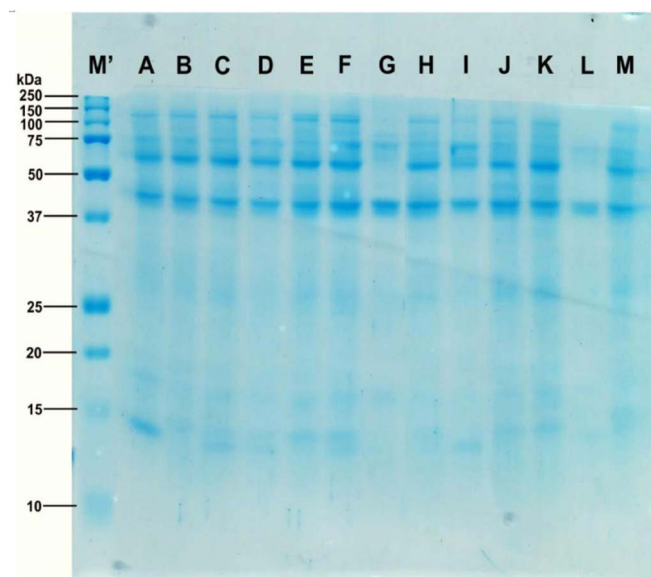
Elektroforegram profil protein tanaman *P. amabilis* menunjukkan bahwa pita protein yang terbentuk cenderung memiliki keseragaman, walau terdapat beberapa protein dengan berat molekul yang kecil terdeteksi hanya di beberapa tanaman. Hal tersebut diindikasikan bahwa tanaman mengekspresikan beberapa protein yang sejenis dalam waktu yang bersamaan (ketika sampel tanaman diisolasi). Berdasarkan hasil elektroforegram yang dikaitkan dengan bukti morfologis, diduga bahwa protein yang dihasilkan adalah untuk pertumbuhan vegetatif, mengingat protein *PaFT* yang dikehendaki terdapat pada ukuran 19,647 kDa belum juga muncul.

Beberapa protein yang berperan dalam proses transisi dari fase vegetatif ke fase generatif pada tanaman *Phalaenopsis* yaitu CONSTANS-Like (CO-Like), yang memiliki berat molekul 28,514 kDa, SUPPRESSION OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1) yang memiliki berat molekul 25,522 kDa, AGAMOUS-Like (AGL) yang memiliki berat molekul 27,731 kDa, dan FLOWERING LOCUS T-Like (FT-Like) yang memiliki berat molekul 19,809 kDa. Berdasarkan profil protein dalam SDS-PAGE pada Gambar 3, protein-protein tersebut belum terdeteksi pada semua tanaman perlakuan, sehingga diduga tanaman masih dalam fase vegetatif dan belum terjadi transisi ke generatif.



Pada penelitian ini, perlakuan berupa fotoperiode dan fluktuasi temperatur masih belum mampu menginduksi terjadinya proses transisi dari fase vegetatif ke fase generatif pada tanaman anggrek *P. amabilis* pembawa gen *Ubipro::PaFT* hingga umur 20 minggu setelah perlakuan, walaupun didukung dengan penambahan hormon benziladenin (BA) dengan konsentrasi 5 ppm. Fase pertumbuhan generatif

masih belum terlihat dengan indikator belum munculnya infloresen pada semua tanaman. Hal tersebut diduga disebabkan beberapa faktor, antara lain gen-gen vegetatif masih aktif dan faktor mikroklimat yang belum sesuai untuk tanaman melakukan proses transisi ke fase generatif, sehingga protein yang dihasilkan diduga masih diperlukan untuk pertumbuhan vegetatif.



Gambar 3. Profil protein tanaman *P. amabilis* umur 23 bulan setelah 20 minggu perlakuan. A, C: tanaman transforman; dan B: tanaman non-transforman, dengan perlakuan T1. D, F: tanaman transforman; dan E: tanaman non-transforman, dengan perlakuan T2. G: kontrol/tanaman anggrek yang telah berbunga. H, J: tanaman transforman; dan I: tanaman non-transforman, dengan perlakuan T3. K, M: tanaman transforman; dan L: tanaman non-transforman, dengan perlakuan T4.

Tabel 3. Hasil pengukuran berat molekul protein

No. Pita	Berat Molekul Protein (kDa) Tanaman												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1.	108,57	108,57	108,57	108,57	108,57	108,57	71,30	108,57	108,57	108,57	108,57	71,30	108,57
2.	71,30	71,30	71,30	71,30	71,30	71,30	40,85	71,30	71,30	71,30	56,16	40,85	71,30
3.	56,16	56,16	56,16	56,16	56,16	56,16	16,09	56,16	56,16	56,16	40,85		56,16
4.	40,85	40,85	40,85	40,85	40,85	40,85		40,85	40,85	40,85	26,79		40,85
5.	13,27	13,27	13,27	13,27	13,27	13,27		13,27	13,27	26,79			13,27
6.			13,12	13,12						13,12			

Keterangan: A, C: tanaman transforman; dan B: tanaman non-transforman, dengan perlakuan T1. D, F: tanaman transforman; dan E: tanaman non-transforman, dengan perlakuan T2. G: kontrol/tanaman anggrek yang telah berbunga. H, J: tanaman transforman; dan I: tanaman non-transforman, dengan perlakuan T3. K, M: tanaman transforman; dan L: tanaman non-transforman, dengan perlakuan T4. Warna yang sama menunjukkan kesamaan ukuran berat molekul protein.

Berbagai macam faktor yang memungkinkan untuk terjadinya proses transisi dari fase vegetatif ke fase generatif antara lain temperatur, fotoperiodisitas, vernalisasi, dan kualitas cahaya. Sinyal-sinyal lingkungan tersebut akan direspons oleh tanaman, dan apabila kondisinya menguntungkan untuk terjadinya proses pembungaan maka gen-gen yang berperan dalam inisiasi pembungaan akan segera diaktivasi. Salah satu gen yang berperan dalam menginduksi pembungaan tanaman yaitu gen *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) yang berhasil diidentifikasi dari tanaman *Arabidopsis thaliana*.

Eksresi gen *FT* pada tanaman terjadi di dalam daun yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti temperatur, fotoperiodisitas, vernalisasi, dan kualitas cahaya yang spesifik untuk masing-masing tanaman. Faktor lingkungan tersebut memiliki jalur tersendiri dalam menginduksi terjadinya proses aktivasi gen-gen pembungaan. Secara molekular, pada jalur pembungaan yang diinduksi oleh cahaya/fotoperiodisitas, terdapat gen kunci yang teraktivasi melalui jalur ini, yaitu gen *CONSTANS* (*CO*) dan *FT*. Kedua gen ini merupakan elemen kunci yang memediasi efek panjang hari dalam pembungaan dan diekspresikan dalam sel-sel pendamping floem pada daun. Pada kondisi hari-panjang, ekspresi gen *CO* mengalami peningkatan regulasi kemudian proteinnya distabilkan. Setelah protein dari gen *CO* diproduksi, maka akan menginduksi ekspresi gen *FT*. Ekspresi ektopik dari *CO* menyebabkan pembungaan lebih awal, tetapi tidak ketika diekspresikan dari promoter spesifik pada meristem

pucuk. Sebaliknya, overekspresi gen *FT* pada pucuk apeks saja dapat menginduksi pembungaan lebih awal, seperti halnya ekspresi gen *CO* dari promoter spesifik pendamping sel (Zeevart, 2008).

Eksresi gen *CO* terjadi pada floem daun yang meregulasi sintesis *mobile signal* untuk menginduksi pembungaan. Hal ini kemungkinan diperkuat oleh hasil percobaan *grafting* dengan tanaman yang mengekspresikan *CO* di bawah kontrol *GALACTINOL SYNTHASE 1* (*GAS1*). Tanaman donor yang membawa gen *GAS1::CO* ini menginduksi pembungaan awal pada tunas reseptor tanaman mutan *co-1*. Meski diproduksi di floem daun, *FT* bertindak di daerah apeks pucuk, di mana ia akan membentuk kompleks dengan faktor transkripsi *bZIP FLOWERING LOCUS D* (*FD*). Kompleks *FT/FD* heterodimer akan mendorong transisi tanaman ke pembungaan dengan mengaktifkan gen *SUPPRESSION OF OVEREXPRESSION OF CO1* (*SOC1*) dan gen identitas meristem pembungaan *APETALA1* (*AP1*). Hal ini menjelaskan bahwa lokasi produksi mRNA *FT* di dalam daun jauh dari lokasi aksi *FT* yaitu di daerah apeks pucuk. Dengan demikian, produk *FT* (mRNA atau protein) adalah kandidat utama untuk sinyal florigen yang ditranslokasikan melalui floem (Zeevart, 2008).

Ketidakhadiran protein *PaFT* pada elektroferogram hasil isolasi dari daun tanaman anggrek *P. amabilis* di atas dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: tidak terekspresinya gen *CO* pada daun yang disebabkan kualitas cahaya yang tidak sesuai dan ekspresi

protein *PaFT* pada daun bersifat sementara yang kemudian langsung ditranslokasikan ke meristem apikal pucuk melalui floem. Walaupun berdasarkan hasil amplifikasi DNA menggunakan primer DegPaFT F1R1, tanaman anggrek *P. amabilis* tersebut positif membawa gen *Ubipro::PaFT*. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mendeteksi protein-protein yang telah diekspresikan oleh tanaman dan mengoptimalkan kembali faktor lingkungan seperti kualitas cahaya, iradiasi dengan cahaya tambahan lainnya, serta pemberian nutrisi dan zat pengatur tumbuh yang optimal sehingga dapat terjadi transisi dari fase vegetatif ke fase reproduktif

#### SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

Simpulan yang dapat diambil dari hasil penelitian ini antara lain cahaya dan temperatur berpengaruh terhadap peningkatan tunas dan jumlah daun tanaman anggrek *Phalaenopsis amabilis* pembawa gen *Ubipro::PaFT*. Kombinasi cahaya putih dan cahaya biru merupakan kombinasi cahaya yang paling baik dalam meningkatkan jumlah daun. Kemudian, profil protein yang dihasilkan oleh tanaman anggrek *P. amabilis* pembawa gen *Ubipro::PaFT* setelah diberi perlakuan diduga masih mengekspresikan protein-protein untuk pertumbuhan vegetatif. Hal itu dikarenakan protein transgen *PaFT* tidak terdeteksi pada profil tanaman transgenik umur 23 bulan, sementara protein yang diduga *POH1* terdeteksi. Hal ini menunjukkan bahwa gen vegetatif *POH1* mampu menghambat aktivasi gen *PaFT* pada tanaman *P. amabilis* transgenik umur 20 minggu, sehingga tanaman masih dalam fase juvenil dan belum mampu diinduksi untuk berbunga.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan mendeteksi protein yang spesifik untuk memastikan protein-protein yang terekspresi pada tanaman anggrek *P. amabilis* pembawa gen *Ubipro::PaFT*, serta mengoptimalkan faktor lingkungan seperti kualitas cahaya, fluktuasi temperatur yang lebih tepat, dan pemberian zat pengatur tumbuh yang tepat untuk terjadinya proses transisi dari fase vegetatif ke fase generatif.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Badriah, D.S dan Sutater, T. 1996. Keragaman *Phalaenopsis amabilis* L. di Koleksi Sub Balihorti Cipanas. *Prosiding Seminar Nasional Tanaman Hias* 1996.
- Glover, B. 2007. *Understanding Flower and Flowering: An Integrated Approach*. Oxford University Press Inc., New York.
- Hew, C.S., and Yong, J.W.H. 2004. *The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry 2<sup>nd</sup> edition*. World Scientific Publishing. Singapore. Pp. 1 – 161.
- Hunter, D.C. and Burritt, D.J. 2004. Light Quality Influences Adventitious Shoot Production from Cotyledon Explants of Lettuce (*Lactuca sativa* (L.)). *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant*, 40:215 – 220.
- Indrianto, A. 2002. Peningkatan Mutu Anggrek dengan Kultur Jaringan: Teknik Embriogenesis Mikrospora. *Prosiding Seminar Nasional Anggrek, Universitas Gadjah Mada*. Nomor 2: 35 – 43.
- Islam, M.O., Ichihashi and S. Matsui. 1998. Control of Growth and Development of Protocorm Like-Body Derived from Callus by Carbon Source in *Phalaenopsis*. *Plant Biotechnology* 15 (4): 183 – 187.

- Jumani, M. 2010. *Minat Anggrek Semakin Tinggi*. (<http://indonesianorchids.wordpress.com/2010/10/03/minat-anggrek-semakin-tinggi/>). Diakses tanggal 10 Juli 2014.
- Lin, K-Hung., Huang, M-Yuan., Huang, W-Dar., Hsu, M-Huang., Yang, Z-Wei., and Yang, C-Ming. 2013. The Effect of Red, Blue, and White Light-Emitting Diodes on The Growth, Development, and Edible Quality of Hydroponically Grown Lettuce (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*). *Scientia Horticulturae*, 150: 86 – 91.
- Mercuriani, I., S., Slamet, A., Utami, B. S., Sasongko, A. B., Purwantoro, A., Moeljopawiro, S., dan Semiarti, E. 2014. Induksi Pembungaan In Vitro pada Tanaman Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume Asli Indonesia. *Jurnal Agros*, 16(2): 273 – 277.
- Muleo, R., Morini, S., and Casano, S. 2001. Photoregulation of Growth and Branching of Plum Shoots: Physiological Action of Two Photosystems. *In Vitro Cell. Dev. Bio. – Plant*, 37:609 – 617.
- Paquet, N., Bernadet, M., Morin, H., Traas, J., Dron, M., and Charon, C. 2005. Expression Patterns of TEL Genes in *Poaceae* Suggest a Conserved Association with Cell Differentiation. *Journal Experimental Botany*, 56(416): 1605 – 1614.
- Semiarti, E., Indrianto, A., Purwantoro, A., Isminingsih, S., Suseno, N., Ishikawa, T., Yushioka, Y., Machida, Y., and Machida, C. 2007. *Agrobacterium*-Mediated Transformation of The Wild Orchid Species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Biotechnology*, 24: 265-272.
- Sulistianingsih, R., Mangoendidjojo, W., Purwantoro, A., dan Semiarti, E. 2006. Pengaruh Irradiasi Sinar Gamma pada Pertumbuhan Plantlet Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. *Risalah Seminar Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*. pp: 121 – 125.
- Xiaoying, L., Shirong, G., Taotao, C., Zhigang, X., and Tezuka, T. 2012. Regulation of The Growth and Photosynthesis of Cherry Tomato Seedlings by Different Light Irradiations of Light Emitting Diodes (LED). *African Journal of Biotechnology*, Vol. 11(22), pp. 6169-6177.
- Zeevaart, J.A.D. 2008. Leaf-Produced Floral Signals. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 541 – 547.