

**HOMOLOGI FUNGSI GEN *KNAT1* ( *Knotted 1– like Arabidopsis thaliana*) PADA  
ANGGREK BULAN *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. DENGAN MEDIATOR *Agrobacterium*  
*tumefaciens***

***Agrobacterium*-Mediated Transformation for  
Homolog Function of *KNAT1* Gene (*Knotted 1- like Arabidopsis thaliana*) in *Phalaenopsis*  
*amabilis* (L.) Bl.**

Sulastris Isminingsih<sup>1</sup>, Endang Semiarti<sup>2</sup> Aziz Purwantoro<sup>3</sup>

1. Agricultural Faculty of Sultan Ageng Tirtayasa , Serang Banten

2. Biology Faculty of Gadjah Mada University, Yogyakarta

3. Agriculture Faculty of Gadjah Mada University, Yogyakarta

Email: lastri\_untirta@yahoo.com

**ABSTRACT**

To understand the function of *KNAT1* gene *Arabidopsis* in the forming and developing of Indonesian origin orchid shoot *Phalaenopsis amabilis* through transform p35S::*KNAT1* and pGreen to *protocorm like bodies* (plb) of the orchid mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The plb transformants were grown on *New Phalaenopsis* selection medium containing 5 mg/l BAP, 0.15 mg/l NAA, 15 mg.l Kanamycin and addition of 300 mg/l Cefotaxim to eliminate the overgrowth of *Agrobacterium*. The analysis of positive transformant use *Polimerase Chain Reaction* (PCR) with the specific oligonucleotide primers for *KNAT1* gene: *KNAT1F1R1* and universal primers for pGreen: 35SO and Tnos. The result shows that 3 shoots of 1850 transformants positively carry out the 35S::*KNAT1* construct (frequency of transformation was 0.16 %) while 5 shoot of 1850 transformants also positively carry out the pGreen vector, with the frequency of transformation was 0.27 %. The phenotype analysis of 35S::*KNAT1* transformants show multiplication on forming of the leaf from a plb to  $\pm$  10 shoots and forming of the leaf shape which has terompet like shapes and rectangular shape.

Key words: *Arabidopsis*, *KNAT1* gene, *Phalaenopsis amabilis*, shoot

**PENDAHULUAN**

*Phalaenopsis amabilis* adalah anggrek alam Indonesia yang mampu berbunga sepanjang tahun dengan keistimewaan memiliki bunga yang tahan lama, habitus kuat, dan mudah dipelihara. Dalam genus *Phalaenopsis*, *Ph. amabilis* berperan penting sebagai induk silangan dan telah menghasilkan beraneka ragam hibrida unggulan. Dengan keunggulan yang dimiliki tersebut maka pemerintah Indonesia menobatkan anggrek ini sebagai “Puspa Pesona” (Djaafarer, 2006).

Sebagai tanaman komersial, pemuliaan tanaman anggrek sangat diperlukan. Metode pemuliaan

konvensional dengan hibridisasi dan diikuti penggunaan teknik kultur in-vitro serta fusi protoplas belum dapat diprediksi hasilnya mengingat siklus hidup tanaman anggrek yang lama serta sifat unggul tanaman adalah poligenik, sehingga diperlukan metode rekayasa genetik dengan cara memasukkan gen spesifik ke dalam sistem biologi tanaman dengan tujuan tertentu misalnya untuk ketahanan terhadap hama, penyakit, gulma dan stress lingkungan; modifikasi sistem metabolisme untuk industri obat dan yang tidak kalah pentingnya bahwa dengan rekayasa gen tanaman, bermanfaat sebagai sumber informatif untuk mempelajari fungsi gen dan regulasi dari proses perkembangan dan fisiologi tanaman (Watson *et al.*, 1992).

Metode transformasi gen pada tanaman dapat dilakukan dengan berbagai cara yaitu secara langsung (*Direct Mediated Gene Transfer*) menggunakan *microprojectile bombardment* (*particle-mediated*), *microinjection*, perlakuan kimiawi pada protoplas (*PEG-mediated*), *vesicle fusion* dan elektroporasi maupun tidak langsung dengan mediator *Agrobacterium* (Draper *et al.*, 1988; Glick dan Pasternak, 1994; Yu *et al.*, 2000).

Gen *KNAT1* (*Knotted1-like Arabidopsis thaliana*) adalah kelompok gen *KNOX* kelas 1 yang berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari tanaman *Arabidopsis thaliana* dan diketahui berfungsi mengatur pembentukan, perkembangan dan pemeliharaan meristem ujung batang agar sel-selnya tetap meristematik. Overekspresi gen *KNAT1* pada *Arabidopsis* diketahui menyebabkan terbentuknya tunas-tunas adventif baru pada permukaan atas dan bawah daun serta bentuk daun menjadi berlobi (Lincoln *et al.*, 1994; Chuck *et al.*, 1996). Berdasarkan asumsi bahwa gen-gen yang berperan dalam proses pertumbuhan dan perkembangan tanaman *Arabidopsis* memiliki kesamaan dengan tanaman anggrek maka studi homologi pada tanaman anggrek dengan menggunakan gen *KNAT1 Arabidopsis* akan sangat membantu dalam identifikasi gen penentu yang berperan dalam proses pertumbuhan tunas yang selanjutnya akan mempengaruhi daur hidup tanaman *Ph. amabilis* (Nadeau *et al.*, 1996; Yu *et al.*, 2001; Semiarti, 2006).

Pada penelitian ini peneliti ingin mengetahui apakah transformasi gen *KNAT1* pada *Ph. amabilis* dapat dilakukan menggunakan mediator *Agrobacterium tumefaciens* dan mengetahui fungsi gen *KNAT1* pada tanaman *Ph. amabilis*. Peneliti mengharapkan bahwa gen *KNAT1* berhasil ditransformasi dengan mediator *A. tumefaciens* LBA4404 dan gen *KNAT1* dapat berfungsi memacu pertumbuhan tunas seperti fungsi yang ditunjukkan pada *Arabidopsis*.

## METODE PENELITIAN

### Transformasi pGreen dan p35S::KNAT1 ke dalam E. coli DH5α dan Agrobacterium. tumefaciens LBA4404

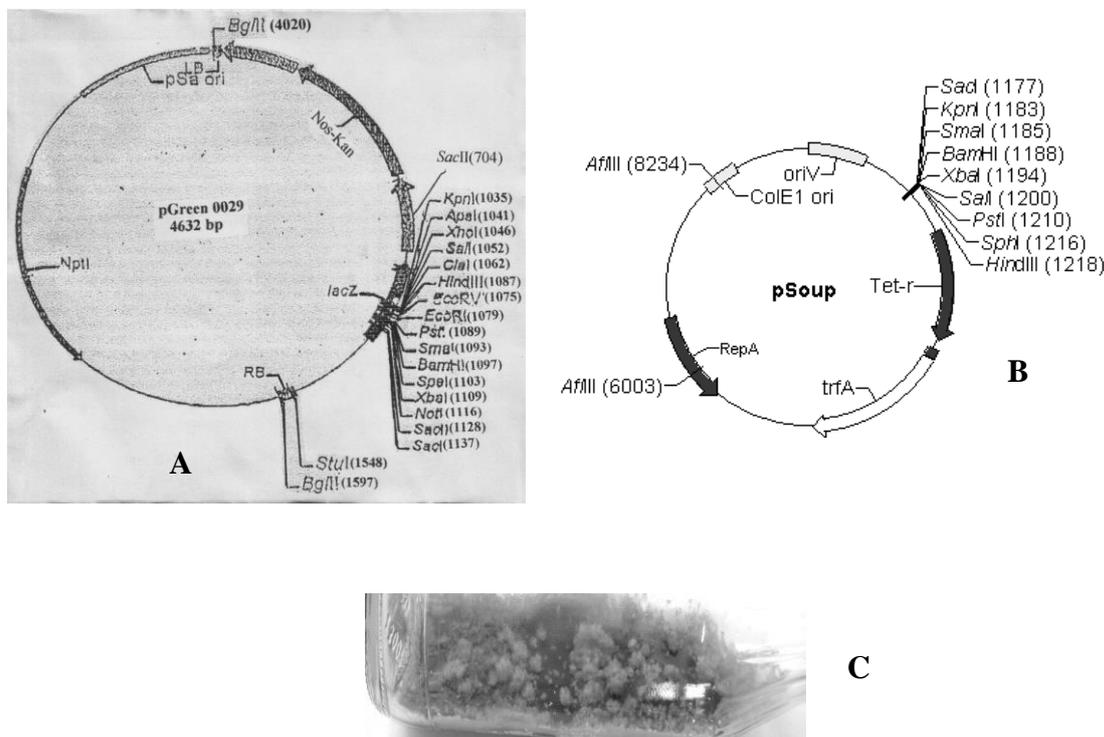
pGreen sebagai vektor biner dan pGreen yang membawa konstruksi 35S::KNAT1 serta pSoup sebagai *helper plasmid* untuk pGreen (Gambar 1A dan B) yang diperoleh dari Iwakawa dan Semiarti, 2002 (Lab of Plant Molecular Science, Nagoya University, Japan) ditransformasikan ke dalam *E. coli* strain DH5α dan *A. tumefaciens* strain LBA4404 dengan metode elektroporasi (Sambrook *et al.*, 1989), selanjutnya hasil transformasi ditumbuhkan pada media seleksi *Luria-Bertani* (LB) dengan penambahan antibiotik Kanamycin 100mg/l dan Streptomycin 30mg/l. Seleksi koloni menggunakan isolasi plasmid dan PCR koloni (Sambrook *et al.*, 1989) dengan *spesifik oligonukleutida primer* untuk gen *KNAT1*: *F1KNAT1* dengan *sekuen* 5'-CTTATGGTCTGACTGTTGTCG-3' dan *R1KNAT1* dengan *sekuen* 5'-TGACCATCCATGTACAGAGC-3' serta *universal oligonukleutida primer* untuk pGreen yaitu 35SO dan Tnos

### Transformasi pGreen/LBA4404 dan p35S::KNAT1/LBA4404 ke dalam plb Ph. amabilis (Valvekens *et al.*, 1988).

Koloni pGreen/LBA4404 dan p35S::KNAT1/LBA4404 ditumbuhkan pada 5ml media LB cair yang mengandung 100 mg/l Kanamycin dan Streptomycin 30mg/l, diinkubasi 30<sup>0</sup> C selama 48 jam. Kultur bakteri didilusi 1: 4 dengan media ½ *New Phalaenopsis* (NP) cair (Islam *et al.*, 1998), ditambahkan 0,1% Triton X-100. Selanjutnya plb anggrek umur 1,5-2 bulan (gambar 1C) yang sebelumnya telah disubkultur ke dalam medium CIM (*Callus Induction Media*, yaitu media NP dengan penambahan 0,05 mg/l BAP serta 0,5 mg/l NAA) dan diinkubasi 25<sup>0</sup> C, 3000 lux selama 6 hari selanjutnya dikokultivasi dengan larutan *Agrobacterium* kira-kira 5 menit, plb ditiriskan dan ditanam pada media SIM (*Shoot Induction Media* yaitu media NP dengan penambahan 5 mg/l BAP serta 0,15

mg/l NAA ) selama 24 jam, selanjutnya plb dipindahkan ke dalam media SIM yang mengandung Cefotaxim 300 µg/ml dan diinkubasi selama 2 hari. Plb disubkultur ke dalam media SIM dengan penambahan Cefotaxim 300 mg/l dan Kanamicyn 15 mg/l (penambahan antibiotik sesuai penelitian Semiarti *et al.*, 2001) selama 7 hari dan

selanjutnya setiap 7 hari plb dipindah pada media yang sama sampai terlihat adanya pertumbuhan tunas. Setelah tunas tumbuh dengan baik (kandidat transgenik), tanaman dipindah pada media RIM (*Root Induction Media*) untuk memacu pertumbuhan akar.



**Gambar 1.** (A) pGreen vector, (B) pSoup. (C) plb *Ph. amabilis* umur 1,5-2 bulan

### Analisis tanaman transforman

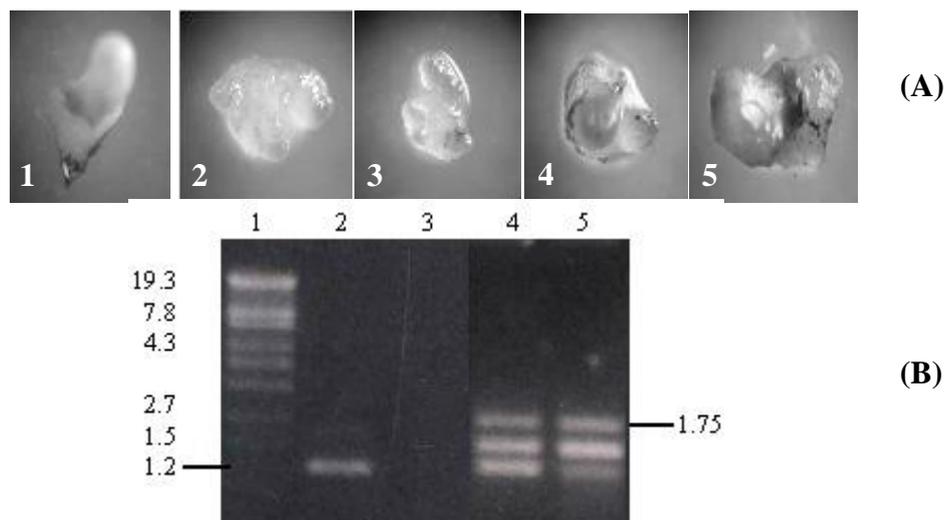
Analisis tanaman transforman dilakukan dengan cara menumbuhkan pada media seleksi antibiotik dan dilanjutkan amplifikasi genom tanaman yang mampu tumbuh pada media seleksi dengan metode PCR dari Yu *et al.* (2001) yang telah dimodifikasi dengan program denaturasi 95<sup>0</sup> C 5 menit; *annealing* 55<sup>0</sup> C selama 1 menit dan *elongation* pada suhu 72<sup>0</sup> C selama 1 menit 30 detik. Program diulang 30 siklus dan diakhiri ekstensi pada suhu 72<sup>0</sup> C selama 5 menit. Analisis fenotipik dilakukan pada tanaman kandidat transgenik dengan melihat perubahan arsitektur tanaman yang terjadi.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kokultivasi p35S::KNAT1/LBA4404 pada 1850 plb anggrek mendapatkan 74 tunas (4%) berhasil tumbuh pada media seleksi NP dengan penambahan BAP 5 mg/l, NAA 0,15 mg/l NAA, Kanamicyn 15 mg/l dan cefotaxim 300 mg/l, sedangkan kokultivasi pGreen/LBA4404 pada 1850 plb menghasilkan 26 tunas (1,4%) resisten terhadap Kanamicyn, seperti ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Persentase dan efisiensi transformasi plb transforman yang tumbuh pada media seleksi antibiotik

| No. | Genotip                      | Total plb | Jumlah Tunas | Persentase Tunas (%) | PCR (+) | Efisiensi (%) |
|-----|------------------------------|-----------|--------------|----------------------|---------|---------------|
| 1   | p35S:: <i>KNAT1</i> /LBA4404 | 1850      | 74           | 4%                   | 3       | 0.16 %        |
| 2   | pGreen/LBA4404               | 1850      | 26           | 1.4%                 | 5       | 0,27 %        |



**Gambar 2.** Plb yang tidak dikultivasi sebagai kontrol (A1); Plb hasil transformasi 35S::*KNAT1*/LBA4404 (A2 dan A3) dan pGreen/LBA4404 (A4 dan A5) umur 2 minggu setelah kokultivasi yang ditanam pada media seleksi; Analisis elektroforetik hasil amplifikasi DNA genom plb anggrek *Ph. Amabilis* kandidat transgenic dengan PCR (B). Lajur 1) marka *Lambda/Sty1*; 2) fragmen berukuran 1,2 kb hasil amplifikasi plb kandidat transgenik (A2) dengan primer spesifik *KNAT1/F1R1*; 3). plb kandidat transgenik *KNAT1* (gambar 3A) tidak teramplifikasi; 4) dan 5) fragmen berukuran 1,75 kb hasil amplifikasi plb yang ditransformasi pGreen dengan *universal primer 35S0* dan *Tnos*

Berdasarkan Tabel 1 di atas diketahui bahwa jumlah tunas yang tumbuh pada media seleksi Kanamycin dan diduga membawa konstruksi 35S::*KNAT1* adalah lebih banyak dibandingkan jumlah tunas yang tumbuh dari hasil kokultivasi pGreen vector. Jumlah tunas dihitung berdasarkan banyaknya tunas yang muncul dari 1 plb yang ditransformasi. Untuk mengetahui lebih dini apakah plb hasil transformasi telah berhasil membawa konstruksi 35S::*KNAT1* atau konstruksi pGreen maka dilakukan analisis PCR pada beberapa plb umur 2 minggu setelah transformasi

(gambar 2, A1-5) dan dari analisis elektroforetik ternyata hanya plb A2 (gambar 2) yang positif membawa konstruksi 35S::*KNAT1* yaitu ditunjukkan adanya fragmen DNA hasil amplifikasi dengan ukuran 1,2 kb (Gambar 2B lajur 2) sedangkan plb A4 dan A5 positif membawa konstruksi pGreen yang ditunjukkan fragmen hasil amplifikasi dengan ukuran 1,75 kb (Gambar 2B lajur 4 dan 5).

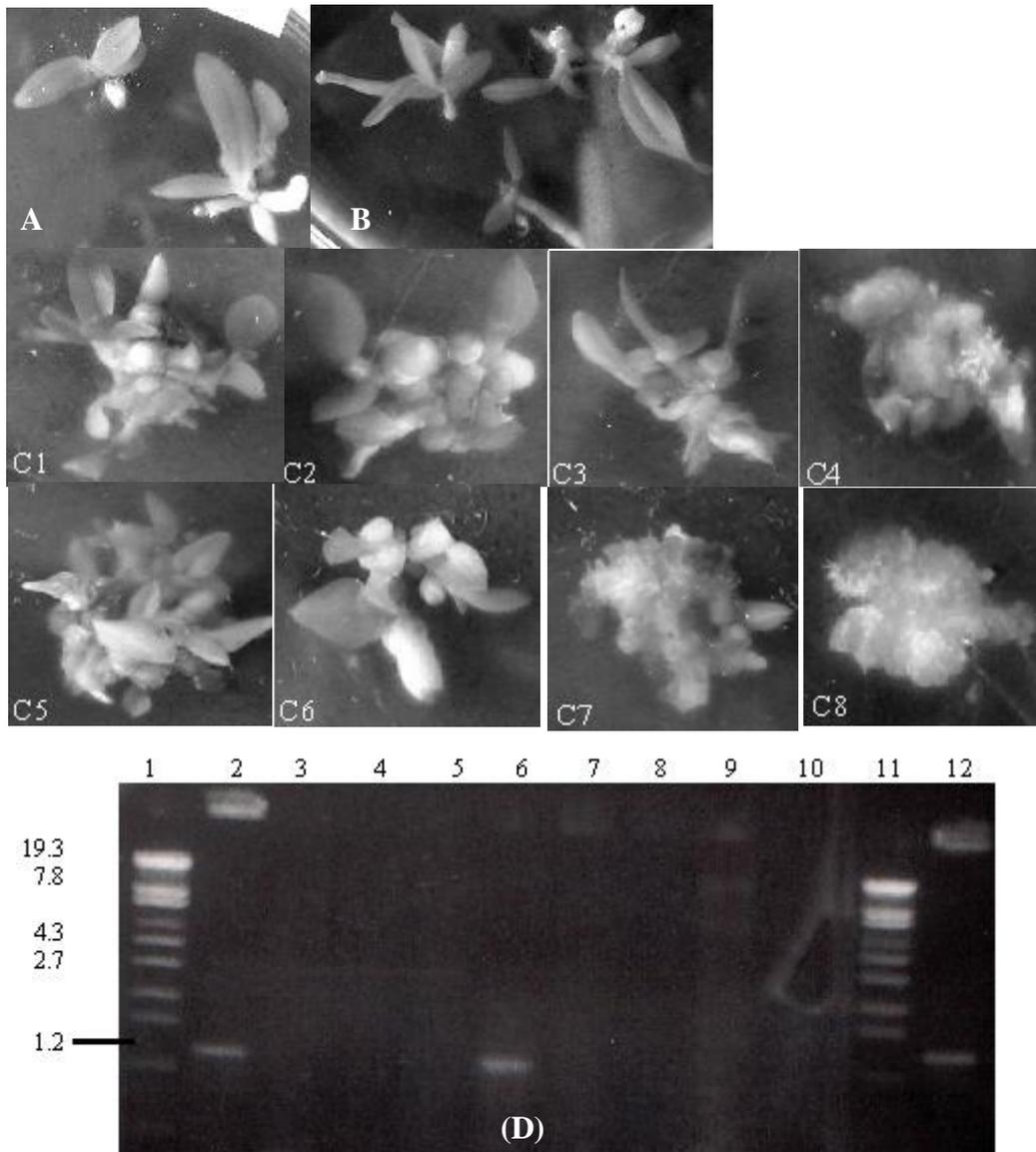
Setelah plb ditumbuhkan selama 6 bulan, mulai terlihat adanya tunas dan akar. Untuk 1 plb anggrek yang ditransformasi gen *KNAT1* diperoleh pertumbuhan tunas

bervariasi antara 2-14 tunas (multiplikasi shoots), ditunjukkan pada gambar 3C (1-8) sedangkan dari 1 plb anggrek yang ditransformasi dengan pGreen rata-rata hanya menghasilkan 1 tunas sama dengan pertumbuhan tunas tanaman kontrol (Gambar 3A dan 3B).

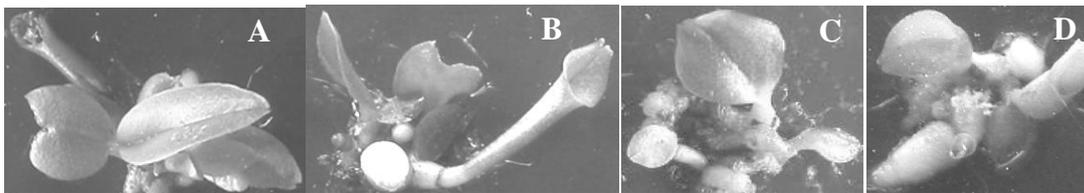
Analisis elektroforetik hasil PCR genom anggrek kandidat transgenik (Gambar 2B dan 3D) menunjukkan hanya 3 tanaman anggrek membawa konstruksi 35S::KNATI dengan efisiensi 0.16% dan 5 tanaman adalah kandidat transgenik yang membawa konstruksi pGreen vektor (efisiensi 0,27%). Efisiensi transformasi ini relatif masih sangat rendah jika dibandingkan penelitian Belarmimo dan Mii (2000), kemungkinan karena anggrek adalah tanaman monokotil, yang berbeda sistem biologi dan molekulernya dengan tanaman dikotil sehingga berbeda mekanisme transformasinya dengan mediator *Agrobacterium tumefaciens*. Menurut Venkatachalam *et al.* (1998), keberhasilan memperoleh tanaman transgenik berarti keberhasilan dalam melakukan proses transformasi gen sesuai metode yang cocok, proses kokultivasi serta seleksi dan regenerasi tanaman transforman. Dari ketiga faktor tersebut berkaitan dengan sumber tanaman yang meliputi tipe eksplant, durasi kokultivasi serta banyaknya *A. tumefaciens* (kondisi dilusi) yang sesuai saat kokultivasi, periode prekultur eksplant sebelum kokultivasi maupun faktor luar yang meliputi strain *Agrobacterium*, tipe plasmid vektor dan kesesuaian komposisi media.

Pertumbuhan tunas yang berbeda antara tanaman kontrol, tanaman transforman pGreen, dengan tanaman transforman *KNATI* dimungkinkan karena gen *KNATI* berfungsi memacu pertumbuhan tunas, seperti halnya penelitian Chuck *et al.* (1996) bahwa overekspresi gen *KNATI* pada *Arabidopsis* menghasilkan pertumbuhan tunas-tunas adventif baru pada permukaan atas dan bawah daun sedangkan pada penelitian Yu *et al.* (2001) menunjukkan bahwa hasil transformasi gen *DOHI* (heterolog gen *KNATI* pada *Dendrobium*) pada 1 plb anggrek diperoleh pertumbuhan 2-3 tunas secara simultan dari satu daerah meristem yang berarti juga terjadi multiplikasi shoots. Secara komersial, terjadinya multiplikasi shoot ini berarti dapat digunakan untuk tujuan mikropropagasi sehingga lebih banyak dihasilkan bibit anggrek serta mempercepat fase vegetatif sehingga akan mempersingkat daur hidup anggrek yang selama ini masih menjadi kendala.

Analisis fenotipik dilakukan pada kandidat transgenik yang diduga membawa konstruksi 35S::KNATI yang mampu tumbuh pada media seleksi antibiotik Kanamycin 15 mg/l. Seleksi lanjut dengan metode PCR menunjukkan tidak semua DNA genom anggrek tersebut teramplifikasi menghasilkan fragmen *KNATI* berukuran 1,2 kb dengan ditemukan adanya perubahan bentuk daun yang berbeda dari bentuk daun normal *Ph amabilis* yang umumnya lanset memanjang (Gambar 4A) menjadi bentuk daun seperti terompet atau pipa dan bentuk daun seperti belah ketupat (*rectangular*) seperti ditunjukkan Gambar 4 (B,C dan D)



**Gambar 3.** A. Pertumbuhan Tunas *Ph. amabilis* yang tidak ditransformasi; B. pertumbuhan tunas hasil transformasi pGreen/LBA4404; C (1-8). Pertumbuhan tunas hasil transformasi p35S::KNATI/LBA4404; D. Analisis elektroforetik hasil PCR tunas anggrek transforman. Lajur 1 dan 11. marka lambda/Sty1; lajur 2 dan 6, fragmen berukuran 1,2 kb sebagai hasil amplifikasi kandidat anggrek transgenic *KNATI* (Gambar 3, C1 dan C5) dengan fragmen spesifik *KNATI* F1R1; lajur 3,4,5,6,7,8,dan 9 adalah hasil amplifikasi tunas anggrek kandidat transgenic *KNATI* (Gambar 3, C2,C3,C4,C6,C7 dan C8) yang mampu tumbuh pada media seleksi antibiotik namun tidak teramplifikasi; lajur 12, hasil amplifikasi p35S::*KNATI* sebagai kontrol positif dengan panjang fragmen DNA 1,2 kb.



**Gambar 4.** Analisis fenotipik *Ph. amabilis* kandidat transgenik 35S::*KNAT1*. **A. Daun normal *Ph amabilis* bentuk lanset memanjang; B. bentuk daun pipa; C. bentuk daun *rectangular* (belah ketupat); D. bentuk daun seperti terompet**

Fenomena perubahan bentuk daun pada tanaman kandidat transgenik yang membawa konstruksi 35S::*KNAT1* ini belum dapat dikatakan disebabkan oleh fungsi dari gen *KNAT1* yang berhasil ditransformasikan, masih diperlukan analisis PCR pada daun dan *southern blot* maupun *in situ hybridization* untuk mengetahui kebenaran ekspresi gen *KNAT1*. Namun demikian, penelitian Lincoln *et al.* (1994) dan Chuck *et al.* (1996) menunjukkan terjadinya perubahan bentuk daun *Arabidopsis* menjadi berlobi karena *overekspresi* gen *KNAT1*. Sedangkan hasil transformasi gen *DOH1* (*KNOX* gen kelas 1) pada anggrek *Dendrobium* dengan mediator *A. tumefaciens* yang dilakukan Yu *et al.* (2001) tidak menunjukkan perubahan bentuk daun, tetapi terjadi multiplikasi pertumbuhan tunas yang mengindikasikan gen *DOH1* turut memelihara arsitektur anggrek *Dendrobium*.

### SIMPULAN

Transformasi 35S::*KNAT1*/LBA4404 pada plb anggrek *Ph. amabilis* dengan mediator *A. tumefaciens* telah berhasil mendapatkan 3 tunas yang positif membawa gen *KNAT1* dengan frekuensi 0,16%. *Ph. amabilis* hasil transformasi p35S::*KNAT1*/LBA4404 menunjukkan homologi fungsi gen *KNAT1* secara fenotip terjadi multiplikasi pertumbuhan tunas dan perubahan bentuk daun seperti terompet dan belah ketupat (*rectangular*).

### DAFTAR PUSTAKA

- Belarmino, M.M., Mii, M. 2000. *Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Phalaenopsis Orchid*. *Plant Cell Reports* 19: 435-442.
- Chuck, G., Lincoln, C., dan Hake, S. 1996. *KNAT1 Induced Lobed Leaves with Ectopic Meristem when Overexpressed in Arabidopsis*. *Plant Cell* 8: 1277-1289
- Djaafarar, R. 2006. *Trend dan Pasar Anggrek Phalaenopsis di Indonesia*. Prosiding Seminar Nasional Anggrek (Kiat Pengembangan Anggrek Indonesia di era Globalisasi) p.10-12
- Draper, J., R.Scott, P. Armitage and R. Walden. 1988. *Plant Gene Transformation and Gene Expression : A Laboratory Manual*. Blackwell Scientific publication. Oxford. 355p.
- Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K., dan Hake, S. 1994. *A Knotted1-like Homeobox Gene in Arabidopsis is Expressed in the Vegetative Meristem and Dramatically Alters Leaf Morphology when Overexpressed in Transgenic Plants*. *Plant Cell Reports* 6: 1859-1876.
- Nadeau, J. A., Zhang, X. S., Li, J., O'Neill, S.D. 1996. *Ovule Development: Identification of Stage-Specific and Tissue Specific cDNAs*. *Plant cell* 8: 213-239
- Sambrook, J., E.F. Fritsch dan T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, A*

- Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Semiarti, E., 2006. *Perkembangan Bioteknologi Anggrek. Prosiding Seminar Nasional Aangrek (Kiat Pengembangan Anggrek Indonesia di era Globalisasi)* p38-42
- Semiarti, E., Y. Ueno, H. Tsukaya, C. Machida, & Y. Machida. 2001. *The Asymmetric Leaves2 gene of Arabidopsis thaliana Regulates Formation of Asymmetric Lamina, Establishment of Venation and Epression of Meristem-Related Homeobox Genes in Leaves. Plant Development* 128. p. 1771-1783
- Valvekens D., M.V. Montagu and M.V. Lusebettens 1988. *Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of Arabidopsis thaliana Root Explants by using Kanamycin Selection*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 5536-5540.
- Venkatachalam, P., Geetha, N., Jayabalan, N., Saravanababu, and Sita, L. 1998. *Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation of Groundnut (Arachis hypogaea L): An Assessment of Factors Affecting Regeneration of Transgenic Plants.*, *J. Plant Research*. 111: 565-572
- Watson, J.D., M. Gilman, J. Witkowski, M. Zoller. 1992. W.H. Freeman and Company. New York