PROPOSAL SEMINAR

UJI PERBANDINGAN JENIS DAN KONSENTRASI ZPT UNTUK INDUKSI TRANSISI FASE GENERATIF ANGGREK

Phalaenopsis amabilis (L.) Blume SECARA IN VITRO

Seminar



Disusun Oleh:

Luthfin Azzahra Tandyana Prabowo 19/438651/BI/10189

FAKULTAS BIOLOGI UNIVERSITAS GADJAH MADA YOGYAKARTA

2022

PROPOSAL SEMINAR

UJI PERBANDINGAN JENIS DAN KONSENTRASI ZPT UNTUK INDUKSI TRANSISI FASE GENERATIF ANGGREK

Phalaenopsis amabilis (L.) Blume SECARA IN VITRO

Seminar



Disusun Oleh:

Luthfin Azzahra Tandyana Prabowo 19/438651/BI/10189

FAKULTAS BIOLOGI UNIVERSITAS GADJAH MADA YOGYAKARTA

2022

PROPOSAL SEMINAR

UJI PERBANDINGAN JENIS DAN KONSENTRASI ZPT UNTUK INDUKSI TRANSISI FASE GENERATIF ANGGREK

Phalaenopsis amabilis (L.) Blume SECARA IN VITRO

Disusun sebagai perlengkapan prasyarat Mata Kuliah Seminar di Fakultas Biologi UGM



Disusun Oleh:

Luthfin Azzahra Tandyana Prabowo 19/438651/BI/10189

Pembimbing: Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.

FAKULTAS BIOLOGI UNIVERSITAS GADJAH MADA YOGYAKARTA 2022

HALAMAN PENGESAHAN

PROPOSAL SEMINAR

UJI PERBANDINGAN JENIS DAN KONSENTRASI ZPT UNTUK INDUKSI TRANSISI FASE GENERATIF ANGGREK *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume SECARA *IN VITRO*

Disusun Oleh:

Luthfin Azzahra Tandyana Prabowo

19/43<mark>8651/BI/101</mark>89

Telah diperiksa, disetujua dan dinyatakan memenuhi syarat untuk melaksanakan

Seminar

Yogyakarta, 5 April 2022 Fakultas Biologi

Universitas Gadjah Mada

Mengesahkan Plt. Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan

Rina Sri Kasiamdari, S.Si., Ph.D.

NIP. 196712101994032001 (plane)

Menyetujui Pembimbing Seminar

Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc. NIP. 196211231988032001

PRAKATA

Puji Syukur kehadirat Allah SWT atas rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan proposal skripsi.

Naskah proposal seminar dengan judul "UJI PERBANDINGAN JENIS DAN KONSENTRASI ZPT UNTUK INDUKSI TRANSISI FASE GENERATIF ANGGREK *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume SECARA *IN VITRO*" ini disusun guna memenuhi persyaratan untuk melakukan seminar proposal di Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Penulis menyadari bahwa selesainya naskah seminar proposal skripsi ini tidak luput dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- 1. Prof. Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc., selaku Dekan Fakultas Biologi UGM.
- 2. Ibu Rina Sri Kasiamdari, S.Si., Ph.D., selaku Plt. Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kemahasiswaan Fakultas Biologi UGM.
- 3. Dra. Siti Susanti, S.U., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu membimbing dan memberikan arahan perkuliahan.
- 4. Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc., selaku Dosen Pembimbing Seminar yang telah membimbing, memberikan arahan, masukan, nasihat dan motivasi hingga penyelesaian naskah proposal seminar ini.
- 5. Beasiswa Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) yang akan membiayai penelitian ini melalui Hibah Penelitian.
- 6. Ni Putu Ayu Erninda Oktaviani Suputri, S.P., selaku kakak tingkat dan peneliti Hibah PDMSU yang telah membantu dan memberikan banyak arahan dalam penyusunan naskah proposal ini.
- 7. Orang tua tercinta R. Agoeng Prabowo dan Ibu Dyah Purwanti Retnaningsih, saudaraku Luthfi Tandyana Prabowo, serta segenap keluarga yang senantiasa selalu memberikan do'a, semangat, motivasi, dukungan moral dan spiritual hingga saat ini.

8. Teman-teman seperjuangan, serta pihak-pihak yang secara langsung maupun tak langsung membantu proses penulisan proposal skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dalam penyusunan naskah seminar proposal skripsi ini. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun dari pembaca sangat penulis harapkan. Penulis berharap semoga naskah ini dapat bermanfaat bagi berbagai pihak kedepannya.

Yogyakarta, 5 April 2022

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDULi
HALAMAN PENGESAHANii
PRAKATAiv
DAFTAR ISIvi
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATANviii
DAFTAR TABELix
DAFTAR GAMBARx
DAFTAR LAMPIRANxi
INTISARIxii
ABSTRACTxiii
I. PENDAHULUAN1
A. Latar Belakang1
B. Rumusan Masalah2
C. Tujuan Penelitian2
D. Manfaat Penelitian3
II. TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS4
A. Tinjauan Pustaka4
1. Tanaman Anggrek <i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Blume4
2. Teknik Kultur <i>In Vitro</i> Tanaman Anggrek6
3. Subkultur/Overplanting6
4. Induksi Pembungaan dengan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)7
5. Medium Kultur <i>In Vitro</i> 8
6. Regulasi Pembungaan Anggrek <i>P. amabilis</i>
7. Polymerase Chain Reaction (PCR)10
B. Hipotesis
III.METODE PENELITIAN
A. Tempat dan Waktu Penelitian12
B. Bahan dan Alat12
1. Bahan Penelitian
2. Alat Penelitian
C. Cara Kerja13
1. Pembuatan Medium
2. Perlakuan Stress14
3. Subkultur14
4. Analisis Fenotip15
5. Isolasi DNA Genom15
6. Isolasi RNA16
7. Deteksi Gen Pembungaan17
8. Elektroforesis DNA18
D. Analisis Data19
E. Jadwal Penelitian19

DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	24

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

Sim	bol dan Singkatan		Halaman
1.	ANOVA	: Analysis of Variance	xi, xii, 19
2.	AP1	: APETALA1	9
3.	BA	: Benziladenin	xi, xii, 1, 2, 3, 8, 12,
			13, 14, 15, 16
4.	cDNA	: complementary DNA	xi, xii, 11, 12, 18, 10
5.	CITES	: the Convention on	5
		International Trade in	_
		Endangeres Species	
6.	CTAB	: Cetyl Trimethyl Amonium	12, 15
٠.	CILID	Bromide	12, 10
7.	CIAA	: chloroform, Isoamyl,	12
<i>,</i> .	CHIII	alcohol	12
8.	DNA	: Deoxyribonucleic Acid	10, 11, 12, 13, 15, 16,
0.	DIVI	. Deoxymboliuciele Acid	18, 19, 20
9.	DMRT	· Dungan Multiple Dange	
9.	DIVIKI	: Duncan Multiple Range	xi, xii, 19
10	ANITO	Test	10 12 17 10
10.	dNTP	: Deoksinukleotida Trifosfat	10, 12, 17, 18
11.	EDTA	: Ethylene Diamine Tetra-	12, 19, 24
10	E/E	acetic Acid	2 10
12.	FT	: Flowering Locus T	2, 10
13.	GA	: Giberelin	xi, xii, 1, 2, 3, 8, 12,
	T.C	T 1 G	13, 14, 15, 16
14.	KC	: Knudson C	9, 22
15.	LAF	: Laminar Air Flow	13, 14
16.	LFY	: LEAFY	10
17.	LS	: Linsmaier and Skoog	9, 21
18.	MS	: Murashige and Skoog's	8, 9
19.	NP	: New Phalaenopsis	xi, xii, 9, 12, 13, 14
21.	PaFT	: Phalaenopsis amabilis	xi, xii, 1, 2, 9, 12, 13,
		Flowering Locus T	17, 18, 20, 21, 22
21.	PCR	: Polymerase Chain	xii, 10, 11, 12, 13, 17,
		Reaction	18, 20, 21
22.	PGR	Plant Growth Regulator	xii
23.	POH1	: Phalaenopsis Orchid	xi, xii, 1, 2, 3, 9, 12,
		Homeobox 1	17, 20, 21
24.	POWO	: Plant of the World Online	5, 22
25.	SAM	: Shoot Apical Meristem	2, 9
26.	SOC1	: Suppressor of	9
		Overexpression of CO1	
27.	TBE	: Tris Boric acid EDTA	12, 19
28.	UV	: Ultraviolet	1, 13, 19
29.	VW	: Vacin and Went	9, 22
30.	WPM	: Woody Plant Medium	9
31.	ZPT	: Zat Pengatur Tumbuh	i, ii, iii, iv, xi, xii, 1, 2,
			3, 7, 8, 11, 12, 13, 14,
			15, 16
			, -

DAFTAR TABEL

Tal	pel	Halaman
1.	Komposisi ZPT pada medium NP modifikasi	14
2.	Komposisi Bio-Academia Kit untuk reaksi PCR	17
3.	Komponen PCR Mix Sintesis cDNA	18
4.	Jadwal Penelitian	19

DAFTAR GAMBAR

Gai	mbar	Halaman
1.	Habitus Anggrek Phalaenopsis amabilis (L.) Blume	4
2.	Distribusi Anggrek Phalaenopsis amabilis	5
3.	Fungsi Gen FT pada Mekanisme Pembungaan	10

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Komposisi Medium New Phalaenopsis (NP)	24
2. Borang Proposal Seminar	25

UJI PERBANDINGAN JENIS DAN KONSENTRASI ZPT UNTUK INDUKSI TRANSISI FASE GENERATIF ANGGREK *Phalaenopsis* amabilis (L.) Blume SECARA *IN VITRO*

Luthfin Azzahra Tandyana Prabowo

19/438651/BI/10189

Dosen Pembimbing Skripsi: Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.

INTISARI

Anggrek merupakan salah satu tanaman hias yang memiliki nilai estetika yang tinggi pada bunganya. Salah satu upaya untuk meningkatkan kualitas anggrek guna meningkatkan nilai ekonomi dan menjaga status konservasi adalah dengan menginduksi proses pembungaan dengan mempercepat transisi fase generatif pada anggrek. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis dan konsentrasi ZPT berupa benziladenin (BA) dan giberelin (GA) yang terbaik untuk menginduksi pembungaan anggrek Phalaenopsis amabilis (L.) Blume secara in vitro. Induksi pembungaan dilakukan dengan penambahan ZPT BA, GA dan kombinasi keduanya pada konsentrasi (1, 5, dan 9) ppm. Planlet anggrek berumur 7 bulan pada medium New Phalaenopsis (NP) diberi perlakuan stress dengan pemotongan akar dan disubkultur ke dalam medium NP baru dengan perlakuan ZPT BA dan GA. Perlakuan dilakukan selama 3 bulan dengan mengamati fenotip anggrek. Data pengamatan dan pengukuran fenotip dianalisis dengan uji ANOVA (Analysis of Variance) dan dilanjutkan dengan uji DMRT (Duncan Multiple Range Test). Pada planlet anggrek umur 10 bulan, dilakukan deteksi gen pembungaan dengan analisis RNA dan cDNA menggunakan sintesis kit untuk RNA dan cDNA. Gen yang dideteksi berupa gen POH1 yang berperan dalam fase vegetatif dan PaFT yang berperan dalam fase generatif anggrek.

Kata kunci : Benziladenin, Giberelin, Gen induksi pembungaan, Kultur *in vitro*, *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume

COMPARATIVE TEST AND ZPT CONCENTRATIONS TO INDUCE THE GENERATIVE PHASE TRANSITION OF *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume ON *IN VITRO* CONDITION

Luthfin Azzahra Tandyana Prabowo

19/438651/BI/10189

Supervisor: Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.

ABSTRACT

Orchid is one of the ornamental plants that has a high aesthetic value in its flowers. One of the efforts to improve the quality of orchids to increase economic value and maintain conservation status is to induce the flowering process by accelerating the transition of the generative phase in orchids. The aim of this study was to determine the most optimal types and concentrations of PGR in the form of benzyladenine (BA) and gibberellins (GA) in stimulating the flowering of *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume orchids in vitro. Flowering induction was carried out by adding BA, GA or a combination of both at concentrations (1, 5, and 9) ppm. Orchid Planlets aged 7 months on New Phalaenopsis (NP) medium were given stress treatment by cutting roots and transferred into new NP medium with PGR (BA and GA) treatments. The treatment was carried out for 3 months by observing the phenotype of the orchid. Data from observation and measurement of phenotypes were analysed by ANOVA (Analysis of Variance) and followed by DMRT (Duncan Multiple Range Test). After the orchid Planlets become 10 months old, the flowering gene will be detected by cDNA isolation, PCR and sequence analysis. The detected genes are POH1 genes which played a role in the vegetative phase and PaFT which played a role in the generative phase of orchids.

Keywords: Benzyladenine, Gibberellins, Shoot inducing gene, *In vitro* culture, *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume.

BABI

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang kaya akan biodiversitas flora dan fauna. Salah satu flora yang kaya dimiliki oleh Indonesia adalah tanaman anggrek dari famili *Orchidaceae*. Indonesia memiliki kurang lebih 5000 spesies anggrek dari 30.000 spesies di seluruh dunia. Hal ini didukung dengan iklim tropis di Indonesia yang mana sangat cocok sebagai tempat hidup banyak spesies anggrek (Semiarti et al. 2015). Salah satu anggrek yang menjadi puspa pesona negara Indonesia adalah anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume atau yang biasa disebut sebagai anggrek bulan. *P. amabilis* sangat banyak diminati oleh masyarakat di Indonesia karena memiliki nilai estetik yang tinggi (Yasmin et al. 2018).

Anggrek *P. amabilis* banyak dibudidayakan karena memiliki nilai ekonomi yang tinggi (Yasmin et al. 2018). Namun, permasalahan utama pada budidaya anggrek adalah masa pertumbuhan fase *juvenile* anggrek yang lama sehingga pembungaan tidak bisa dengan cepat terjadi. Dari fase biji hingga mencapai fase reproduktif, anggrek membutuhkan 2-3 tahun hingga akhirnya berbunga. Hal ini mampu memicu adanya perdagangan ilegal yang mana anggrek didapatkan dari hasil eksploitasi di alam. Eksploitasi anggrek secara terus-menerus mampu meningkatkan resiko adanya kepunahan pada anggrek alam (Semiarti et al. 2015).

Peningkatan kualitas anggrek *P. amabilis* dapat dilakukan dengan cara mempercepat pembungaan. Induksi pembungaan dapat dilakukan melalui pertumbuhan secara *in vitro* dengan melakukan penambahan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) berupa Benziladenin (BA) dan Giberelin (GA) pada medium kultur. Kedua ZPT ini dilaporkan mampu menginduksi pembungaan pada beberapa anggrek, seperti anggrek *Cymbidium*, *Dendrobium*, maupun *Paphiopedilum* (Slamet 2014).

Proses pembungaan pada anggrek dipengaruhi oleh gen *POH1* dan *PaFT* yang ada pada anggrek. Gen *POH1* merupakan gen *Homeobox* 1 yang

menginisiasi pertumbuhan fase vegetatif pada anggrek *P. amabilis*. Gen ini mampu mempertahankan arsitektur dasar anggrek *P. amabilis* dan memelihara status SAM menjadi daerah yang terus aktif membelah. *POH1* mampu memicu peningkatan kadar sitokinin pada daerah SAM dan memicu terjadinya pembelahan sel. Sebaliknya, *POH1* akan menekan biosintesis giberelin sehingga proses diferensiasi sel menjadi terhambat. Ketika anggrek memasuki fase dewasa, dimana pertumbuhan dirasa telah cukup, aktivitas gen *POH1* akan menurun sehingga gen *PaFT* menjadi aktif. Gen *PaFT* merupakan gen pembungaan yang merupakan gen homolog dari gen *FLOWERING LOCUS T* (FT) pada tanaman model *Arabidopsis thaliana*. Fae transisi antara fase vegetatif dan reproduktif dapat dideteksi dengan terekspresinya gen FT pada meristem ujung batang yang menginisiasi proses pembunggan pada *P. amabilis* (Kurniawati 2015; Slamet 2014).

Induksi pembungaan pada anggrek *P. amabilis* mampu meningkatkan kualitas anggrek sehingga nilai ekonomi menjadi semakin meningkat. Selain itu, induksi pembungaan juga menjadi salah satu langkah untuk terus menjaga anggrek dari eksploitasi berlebih di alam. Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut mengenai induksi pembungaan pada anggrek *P. amabilis* menggunakan BA dan GA diperlukan guna mengetahui jenis dan konsentrasi yang paling optimum.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, permasalahan yang dapat diangkat untuk diteliti meliputi :

- 1. Bagaimanakah pengaruh jenis dan konsentrasi ZPT BA, GA dan kombinasi keduanya dalam menginduksi pembungaan pada anggrek *P. amabilis*?
- 2. Bagaimanakah terjadinya transisi fase vegetatif ke fase generatif pada anggrek *P. amabilis* terkait dengan ekspresi gen homeobox dan gen pembungaan setelah perlakuan ZPT?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk:

- 1. Mengetahui jenis dan konsentrasi ZPT BA, GA dan kombinasi keduanya dalam menginduksi pembungaan pada anggrek *P. amabilis*
- 2. Mendeteksi adanya ekspresi gen homeobox *POH1* dan gen pembungaan *PaFT* dalam proses transisi fase vegetatif ke fase generatif pada anggrek *P. amabilis* setelah perlakuan ZPT.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah diketahui jenis dan konsentrasi ZPT yang paling tepat untuk induksi pembungaan pada tanaman anggrek *P. amabilis* yang memiliki fase pembungaan cepat. Tanaman anggrek *P. amabilis* yang cepat berbunga akan memiliki nilai jual yang lebih tinggi. Disamping itu, adanya fase generatif yang cepat dapat mendukung usaha konservasi tanaman anggrek *P. amabilis* khususnya yang tumbuh di habitat aslinya di alam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA DAN HIPOTESIS

A. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Anggrek Phalaenopsis amabilis (L.) Blume

Phalaenopsis amabilis merupakan tanaman anggrek yang berasal dari famili Orchidaceae. Anggrek ini memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Subkingdom: Viridiplantae

Infrakingdom: Streptophyta

Superdivision: Embryophyta

Division : Tracheophyta

Subdivision : Spermatophytina

Class : Liliopsida

Superorder : Lilianae

Order : Asparagales

Family : Orchidaceae

Genus : *Phalaenopsis* Blume

Species : Phalaenopsis amabilis (L.) Blume

(ITIS 2022)



Gambar 1. Habitus Anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume (Plant Illustration 2022; Nparks 2022).

Anggrek ini pertama kali dikenal dengan nama *Angraecum albus* majus dari pulau Ambon, Indonesia yang ditemukan oleh botanis dari belanda Bernama Georg Eberhard Rumphius pada tahun 1750. Pada tahun 1753, oleh Linnaeus nama tersebut diganti menjadi *Epidendrum amabile* hingga akhirnya pada tahun 1825 diganti ke dalam genus baru, yaitu *Phalaenopsis*. Spesies ini tersebar luas di beberapa daerah, seperti Pilipina, Borneo, Indonesia, Papua New Guinea, dan Australia (Queensland) (POWO 2022). Anggrek *P. amabilis* termasuk ke dalam golongan appendiks II dalam CITES yang artinya bahwa anggrek tersebut tidak terancam punah, namun mungkin akan terancam punah apabila perdagangan terus dilakukan tanpa adanya aturan (Kridsianto et al. 2020).



Gambar 2. Distribusi Anggrek *Phalaenopsis amabilis* (POWO 2022).

Phalaenopsis amabilis merupakan anggrek yang memiliki nilai ekonomi tinggai sebagai tanaman hias maupun bunga potong, dan memiliki masa berbunga yang lama. Anggrek ini memiliki bentuk epifit monopodial dan tidak bercabang. Spesies ini memiliki kelopak yang berwarna putih dengan bentuk yang menyerupai kupu-kupu (Phalaenos) dan memiliki labellum yang khas seperti antena. Di Indonesia, P. amabilis menjadi salah satu bunga nasional dan dikenal sebagai simbol anggrek Puspa Pesona Indonesia melalui Keputusan Presiden Nomor 4 Tahun 1993. P. amabilis telah banyak dibudidayakan dan digunakan oleh para pemulia sebagai tanaman induk silangan untuk menghasilkan

anggrek hibrida dan kultivar baru. Hal ini yang mendasar tingginya peminatan anggrek *P. amabilis* di masyarakat (Puspitaningtyas dan Handini 2021; Ningrum et al. 2017).

2. Teknik Kultur In Vitro Tanaman Anggrek

Kultur jaringan tumbuhan merupakan salah satu teknik perbanyakan tumbuhan dengan menggunakan sel, jaringan, maupun organ dari suatu tumbuhan dalam kondisi aseptis pada suatu medium dan dalam lingkungan yang terkontrol secara *in vitro* (Anitasari et al. 2018; Rahmah et al. 2018). Dasar teori dari teknik kultur jaringan adalah adanya totipotensi sel. Totipotensi sel merupakan kemampuan suatu sel yang bersifat autonomi untuk melakukan regenerasi menjadi tanaman baru yang utuh, aik kemampuan dari sel somatik maupun sel zigotik. Kultur jaringan tanaman terdiri dari beberapa jenis, seperti kultur embrio, organ, kalus, protoplasma, dan haploid (Anitasari et al. 2018; Baday 2018).

Teknik ini sering dimanfaatkan untuk memperbanyak tanaman hortikultura, seperti tanaman hias, buah dan sayuran. Teknik ini memiliki beberapa kelebihan, seperti menghasilkan tanaman yang seragam dan memiliki gen yang identik dengan induknya. Selain itu, teknik ini juga bermanfaat untuk menghasilkan tanaman dalam jumlah besar dan waktu yang singkat. Tanaman baru yang dihasilkan pun bebas hama, penyakit dan patogen (Anitasari et al. 2018).

3. Subkultur/Overplanting

Subkultur/overplanting merupakan salah satu tahapan dalam kultur jaringan tanaman secara in vitro, dimana pada tahap ini dilakukan pemindahan planlet tanaman kultur yang berukuran masih kecil dari media yang lama ke dalam media yang baru dengan komposisi yang sama. Subkultur/overplanting dapat dilakukan beberapa kali jika dibutuhkan, namun frekuensi subkultur haruslah diperhatikan karena Subkultur/overplanting yang dilakukan secara berlebihan dapat mengganggu metabolisme dan kestabilan genetik pada planlet (Aisyah 2020; Indriani et al. 2020).

Proses subkultur/overplanting dilakukan dengan tujuan untuk memberikan ruang yang lebih kepada planlet yang telah berdesakan di botol kultur sebelumnya sehingga dapat tumbuh lebih leluasa dan tidak terjadi adanya kompetisi dalam menyerap Subkultur/overplanting juga dilakukan untuk mengganti medium yang telah mengering dan telah kehilangan banyak unsur hara sehingga kebutuhan unsur hara untuk pertumbuhan Planlet tetap terpenuhi dengan baik (Indriani et al. 2020; Nakasha et al. 2016). Selain itu, subkultur dapat digunakan untuk memenuhi tujuan tertentu dalam kultur jaringan, seperti untuk mengganti medium dengan zat pengatur tumbuh yang berbeda sehingga dapat digunakan untuk menginduksi terbentuknya akar atau tunas pada kalus (Nurwahyuni et al. 2020).

Planlet akan di subkultur apabila telah tumbuh berdesakan di dalam botol kultur. Selain itu, subkultur dilakukan jika medium dalam botol telah mengering dan medium menjadi keras, kandungan nutrisi dalam botol telah menyusut, dan adanya senyawa toksik yang telah terakumulasi. Planlet yang telah tumbuh menjadi semakin banyak lama kelamaan akan semakin berdesakan sehingga pertumbuhannya menjadi terhambat karena saling memperebutkan nutrien dan tempat untuk tumbuh. Medium yang telah mengering dan menjadi keras akan menghambat terjadinya difusi nutrien. Sedangkan adanya akumulasi senyawa toksik hasil dari metabolisme planlet mampu menghambat pertumbuhan planlet (Suaib dan Sadimantara 2014).

Keberhasilan subkultur/overplanting dapat dilihat dari kondisi planlet yang tumbuh. Apabila tidak ada tanda-tanda planlet menjadi layu atau daun yang berubah warna menjadi kuning, maka planlet tersebut tumbuh dengan baik. Selain itu, jika tidak ada peristiwa *browning* ataupun kontaminasi, menandakan bahwa subkultur telah berhasil dilakukan (Nurwahyuni et al. 2020).

4. Induksi Pembungaan dengan Zat Pengatur Tumbuh (ZPT)

Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) adalah senyawa yang biasanya diberikan ke tanaman sebagai suplemen tambahan guna meningkatkan

proses pembelahan sel sehingga menjadi lebih aktif. Konsentrasi penambahan ZPT kepada tanaman perlu diperhatikan dan disesuaikan, hal ini dikarenakan masing-masing jenis tanaman memiliki konsentrasi yang optimal untuk membantu pertumbuhannya. Pemberian ZPT yang terlalu sedikit atau terlalu banyak dapat menghambat pertumbuhan tanaman. ZPT hormonik terdiri dari beberapa jenis, seperti auksin, sitokinin dan giberelin. Penambahan zat hormon ini biasanya diformulasikan dari bahan alami yang dibutuhkan oleh semua tanaman sehingga tidak membahayakan tanaman (Mutryarny dan Lidar 2018).

Salah satu hormon dari golongan sitokinin adalah Benziladenin (BA) yang sering digunakan dalam kultur jaringan. Sitokinin merupakan derivat dari adenin, kinetin dan zeatin. Hormon ini disintesis dari modifikasi biokimia adenin pada ujung akar dan biji yang akan tumbuh. Kebalikan dari auksin, distribusi hormon sitokinin melalui pembuluh xylem dari akar ke pucuk. Kerja sitokinin sendiri hanya akan bekerja jika bersama auksin, yang mana hormon ini mampu memacu pembelahan sel dan morfogenesis. Hormon ini dapat berperan dalam merangsang pembelahan sel, pembesaran sel, mempercepat pertumbuhan tunas, dan sintesis klorofil (Hariadi et al. 2019; Suaib dan Sadimantara 2014).

Giberelin (GA) merupakan zat tumbuh yang termasuk ke dalam golongan fitohormon dan terpenoid yang terbentuk dari unit isoprena 5 atom karbon. GA terdapat di dalam akar, batang, daun, tunas, dan buah muda. Hormon ini mampu meningkatkan aktivitas pembelahan dan pemanjangan sel (Mutryarny dan Lidar 2018). Selain itu, GA juga dapat menstimulasi pembungaan. Menurut Mutryarny dan Lidar (2018), giberelin mampu mempercepat fase vegetatif pada tanaman.

5. Medium Kultur In Vitro

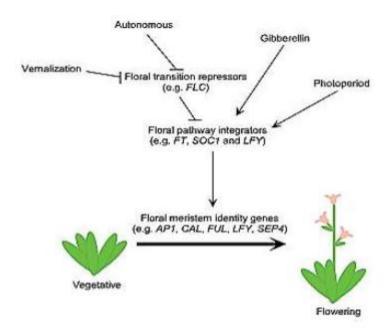
Pada kultur jaringan tanaman, eksplan yang diambil dari suatu tanaman akan dikulturkan dalam media kultur. Media ini mengandung banyak unsur hara dan mineral, seperti makronutrien dan mikronutrien. Medium kultur jaringan memiliki banyak jenis. Beberapa contoh medium kultur adalah medium *Murashige and Skoog's* (MS), *Knudson*

C (KC), Vacin and Went (VW), dan New Phalaenopsis (NP). Mediummedium ini memiliki komposisi yang berbeda-beda dan cocok untuk tumbuhan tertentu. Ketika medium ini memiliki perbedaan yang paling mencolok pada bagian komposisi ammonium, dimana kandungan ammonium dan potassium nitrat pada medium MS lebih tinggi dibandingkan dengan medium KC maupun VW (Sidek et al. 2018). Menurut Islam et al. (1998), medium NP menjadi medium yang baik bagi pertumbuhan kalus anggrek Phalaenopsis. Selain itu, terdapat juga medium yang lain, seperti medium Linsmaier and Skoog (LS), White, N6, Shchenk and Hildebrandt, dan Woody Plant Medium (WPM) (Habibah et al. 2021).

6. Regulasi Pembungaan Anggrek P. amabilis

Pembungaan merupakan suatu proses pembentukan alat reproduksi pada tumbuhan yang biasanya tumbuh pada bagian ujung meristem. Proses ini akan merubah apeks vegetatif menjadi generatif. Proses pembungaan terjadi melalui beberapa tahapan, yaitu inisiasi bunga, pembentukan bunga dan perkembangan bunga (Annisa et al. 2018).

Proses pembungaan pada anggrek *P. amabilis* sangat dipengaruhi oleh gen *POH1* (*Phalaenopsis Orchid Homeobox 1*) dan gen *PaFT* (*Phalaenopsis amabilis Flowering Locus T*). Gen *POH1* berperan dalam mempertahankan arsitektur dasar anggrek *Phalaenopsis* melalui kontrol pembentukan SAM (*Shoot Apical Meristem*) yang bertanggung jawab terhadap pembentukan primordia organ, termasuk produksi primordia karpela yang berfungsi sebagai meristem pembungaan (Semiarti et al. 2008). Bersama dengan faktor endogen seperti adanya hormon giberelin dan autonomous, serta faktor eksogen seperti fotoperiodisasi mampu menurunkan aktivitas gen *POH1* dan mengaktifkan gen *PaFT* dan gen *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1*) yang dikenal sebagai *floral integrator*. Kedua gen yang telah aktif ini akan bekerja sama untuk mendorong adanya ekspresi gen *AP1* (*APETALA1*) dan *LFY* (*LEAFY*) yang berperan dalam pembentukan primordia bunga (Slamet 2014).



Gambar 3. Fungsi Gen FT pada Mekanisme Pembungaan (Utami 2016)

7. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu metode untuk mendapatkan salinan DNA dengan jumlah yang banyak dari sampel yang terbatas. Adanya PCR memungkinkan untuk menyalin dan/atau memodifikasi sekuens DNA yang ditargetkan dengan spesifik secara *in vitro*. Hasil yang didapat bisa mencapai 1 miliar molekul dalam waktu kurang dari 2 jam (Kusnadi dan Arumingtyas 2020).

Prinsip kerja PCR adalah amplifikasi DNA yang mana perlu dilakukan pendesainan primer oligonukleotida supaya mampu berkomplemen dengan ujung-ujung sekuens yang akan diamplifikasi. Primer ini digunakan adalah DNA untai tunggal yang memiliki urutan komplemen dengan DNA templat sebagai pembatas daerah yang akan diperbanyak. Pada proses ini dibutuhkan DNA untai ganda sebagai cetakan yang mengandung DNA yang akan diamplifikasi untuk membentuk DNA baru. Selain itu, dibutuhkan juga enzim DNA polimerase yang merupakan produk alami dari makhluk hidup yang berfungsi untuk menduplikasi DNA ketika terjadi pembelahan sel pada proses mitosis dan meiosis, serta dibutuhkan juga deoksinukleosida trifosfat (dNTP). Teknik PCR terdiri dari beberapa tahapan, seperti

denaturasi DNA template, *annealing* pasangan primer pada DNA target, dan *extension* primer (Kusnadi dan Arumingtyas 2020; Utami 2014).

Teknik RT-PCR merupakan suatu pengembangan dari teknik PCR yang berguna untuk melakukan analisis RNA hasil dari transkripsi, dimana hanya terdapat dalam jumlah yang sangat sedikit di dalam sel. RT-PCR biasa digunakan untuk mendekteksi ekpresi gen suatu organisme. Teknik ini dikembangkan dengan sangat spesifik, sehingga dapat digunakan meskipun jumlah RNA dengan menggunakan RNA cetakan harus lebih dahulu dilakukan transkripsi balik (reverse transcription) terhadap molekul RNA. Hasil dari transkripsi balik adalah didapatkan cDNA (complementary DNA) dengan enzim transcriptase balik. Adanya molekul cDNA dapat digunakan sebagai cetakan untuk melakukan proses PCR lanjutan (Utami 2014).

B. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

- 1. Benziladenin dan giberelin menginduksi fase generatif tanaman anggrek *P. amabilis* secara *in vitro*.
- 2. Konsentrasi benziladenin dan giberelin yang tepat berpengaruh terhadap induksi pembungaan anggrek *P. amabilis* secara *in vitro*.
- 3. Ekspresi gen pembungaan dapat terdeteksi pada anggrek *P. amabilis* setelah diberi perlakuan dengan ZPT benziladenin dan giberelin.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada pada bulan Agustus 2022 – Desember 2022.

B. Bahan dan Alat

1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : bahan tanaman, bahan kimia untuk pembuatan medium New Phalaenopsis (NP), bahan untuk subkultur, bahan untuk isolasi DNA, dan bahan untuk PCR. Bahan tanaman yang digunakan adalah planlet anggrek Phalaenopsis amabilis (L.) Blume umur 7 bulan yang telah dikultur pada medium New Phalaenopsis (NP). Bahan untuk pembuatan medium NP meliputi makronutrien, mikronutrien, gula, myo-inositol, vitamin, agar, dan ZPT berupa benziladenin (BA) dan giberelin (GA) (komposisi medium Lampiran 1). Bahan lain berupa akuades dan alkohol 70%. Bahan untuk subkultur berupa media kultur, plastic seal dan alkohol 70%. Bahan untuk isolasi DNA berupa Cetyl Trimethyl Amonium Bromide (CTAB), larutan CIAA (24 chloroform: 1 Isoamyl Alcohol), isopropanol, ethanol 70%, buffer TE (10mM Tris Cl, 0,1 mM EDTA pH 8). Bahan untuk isolasi RNA adalah Total RNA Mini Kit Plant (Geneaid), dan bahan untuk sintesis cDNA adalah SupercriptTM Recerse Transcriotase II (Invitrogen). Sedangkan bahan untuk PCR meliputi akuades bebas nuclease, buffer 10x Ex-Taq, dNTPs, enzim Ex-Taq Polimerase, TBE 0,5 x, primer untuk deteksi gen *POH1* 1 berupa primer POH F1 (5'-GAAGAGCTCACGAGGCCAGT-3') dan POH R1 (5'- CAAATAGCACCCAACCTTTC-3'), Fragmen intergenic TrnL F, F1 (c) (5'spacer kloroplas genom CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'), **R**1 (f) (5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'), dan primer untuk deteksi gen *PaFT* berupa primer **DEG PaFT** F1 (5'-

TTGTCGATGCTCACCCTG-3') dan DEG PaFT R1 : (5'-ATCTAGTAACATAGATGACACCGCG-3').

2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: alat untuk pembuatan medium New Phalaenopsis, subkultur, isolasi DNA, isolasi RNA, PCR, dan analisis fenotip. Alat-alat tersebut berupa timbangan analitik, magnetic strirer, hot plate, autoclave, alat gelas berupa gelas beker, gelas ukur, erlenmeyer, botol kultur, dan petridish. Alat dissecting kit berupa (pinset, spatula, skalpel dan mata pisau), lampu spiritus, Laminar Air Flow Cabinet (LAF), Shaker incubator, kertas indikator pH, kertas saring, kertas label, dan aluminium foil. Alat untuk isolasi DNA berupa eppendorf 1,5 ml, Centrifuge, isolasi RNA tube (kolom ungu (*lilac*) dan pink), pipet mikro, tip biru (100 – 1000 μl) dan tip kuning $(1 - 100 \mu l)$, alat *PCR*, pipet mikro, tip kuning waterbath, spektrofotometer, spindown timbangan analitik, sentrifus, mortal dan pestel porselen, termos untuk nitrogen cair, alat elektroforesis, termos untuk nitrogen cair, Freezer -80°C dan refrigerator freezer -20°C dan -4°C, UV transilluminator, kamera digital, mikroskop ESCHENBACH, Optilab. Sedangkan alat untuk analisis fenotip berupa penggaris dan alat tulis.

C. Cara Kerja

1. Pembuatan Medium

Medium kultur yang dibuat adalah medium *New Phalaenopsis* (NP). Pembuatan medium NP memiliki beberapa tahapan meliputi penimbangan makronutrien dengan komposisi seperti pada lampiran 1, ditambah dengan mikronutrien yang telah dibuat menjadi stok. Stok yang dibuat terdiri dari bahan yang sulit ditimbang hingga dibuat dalam konsentrasi 100 ml/L seperti vitamin dan zat besi. Medium ini dimodifikasi pada total N (0,23 mM), total P (2,31 mM), dan sukrosa 4%.

Medium cair untuk subkultur planlet anggrek *P. amabilis* berumur 7 bulan ditambahkan ZPT berupa BA dengan variasi

konsentrasi (1, 5 dan 9) ppm, GA dengan variasi konsentrasi (1, 5, dan 9) ppm, dan kombinasi keduanya dengan variasi konsentrasi (1, 5, dan 9) ppm.

2. Perlakuan Stress

Planlet anggrek *P. amabilis* umur 7 bulan sebelum disubkultur akan diberi perlakuan stress. Pemberian perlakuan stress dilakukan di dalam LAF dalam kondisi aseptis. Pertama-tama planlet dikeluarkan dari botol kultur dengan hari-hati dan diletakkan di atas petridish, kemudian tiap planlet yang telah memenuhi syarat untuk disubkultur diberi perlakuan stress berupa pemotongan akar hingga menyisakan satu akar. Planlet yang dipilih adalah Planlet yang telah memiliki lebih dari 4 daun yang panjang dan banyak akar. Di dalam botol planlet berukuran besar hingga panjang daun telah mendesak bagian atas botol.

3. Subkultur

Planlet nggrek *P. amabilis* setelah diberi perlakuan stress di subkultur pada medium *New Phalaenopsis* (NP) dengan berbagai modifikasi ZPT yang telah dibuat. Subkultur dilakukan di dalam LAF dengan langkah-langkah meliputi, planlet yang telah diberi perlakuan stress ditanam satu persatu secara teratur dalam botol berisi medium NP dengan berbagai perlakuan ZPT. Botol diberi seal dan disimpan dalam inkubator dengan pencahayaan 8 jam terang – 16 jam gelap.

Tabel 1. Komposisi ZPT pada medium NP modifikasi

Kode Perlakuan	Komposisi ZPT									
	BA (ppm)	GA (ppm)								
A0	0	0								
B1	1	0								
B5	5	0								
B9	9	0								
C1	0	1								
C5	0	5								
C9	0	9								
D1	1	1								

D5	5	5
D9	9	9

4. Analisis Fenotip

Analisis fenotip dilakukan dengan mengamati morfologi planlet anggrek *P. amabilis* setelah di subkultur dalam media kultur. Pengamatan dan dokumentasi dilakukan pada masing-masing perlakuan dan ulangan dari minggu ke-0 hingga minggu ke-12. Data morfologi yang diamati adalah perhitungan jumlah daun, panjang daun, diameter daun, warna daun, dan jumlah akar. Analisis dilakukan hingga planlet anggrek *P. amabilis* berumur 10 bulan.

5. Isolasi DNA Genom

Metode yang digunakan untuk isolasi DNA adalah metode modifikasi Murray-Thompson (1980). Daun tanaman anggrek P. amabilis umur 10 bulan setelah diberi perlakuan ZPT berupa BA dan GA maupun kontrol sebanyak 0.3 - 0.5 gr lalu dimasukkan ke dalam tabung 1,5 µl yang telah berisi 500 µl larutan CTAB 3% dan digerus dengan pestel dingin. Sampel diinkubasi dalam waterbath pada suhu 55-60°C selama 30 menit. Sampel ditambahkan dengan kloroform sebanyak 500 µl dan digoyang dengan shaker dengan kecepatan 150 rpm selama 30 pada suhu ruangan. Tutup tabung dibuka sebentar untuk mengeluarkan gas, lalu disentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Setelah terbentuk tiga lapisan, lapisan bening atau supernatan pada bagian atas ditransfer ke dalam tabung baru secara hati-hati supaya debris tidak ikut. Jika larutan belum bening atau nampak kehijauan, kloroform ekstraksi diulang. Larutan isopropanol kemudian ditambahkan dengan perbandingan 1:1 dengan volume supernatan, dihomogenkan dengan cara dibolak-balik (inversi) dan disimpan dalam kulkas pada suhu 4^oC selama 30 menit. Disentrifus kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang hingga pelet DNA terlihat berada di dasar tabung. Pelet DNA dibilas dengan etanol dingin 70% sebanyak 200 µl dan disentrifus dengan kecepatan

12.000 rpm selama 2 menit. Supernatan dibuang dan pelet dikeringkan semalaman pada kondisi terbuka. Setelah kering, DNA diresuspensi dengan 50 μ l larutan TE (10 T – 0,1 E) untuk mempermudah kelarutan. DNA dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Sampel DNA diambil sebanyak 5 μ l untuk pengecekan.

6. Isolasi RNA

Isolasi RNA dilakukan sebagai tahap awal untuk mendapatkan RNA murni tanpa adanya kontaminasi nukleotida lain seperti DNA dan protein. RNA tanaman anggrek P. amabillis yang digunakan adalah tanaman berumur 10 bulan dengan medium perlakuan BA (1, 5, dan 9) ppm, GA (1, 5, dan 9) ppm, dan kombinasi keduanya (1, 5, dan 9) ppm. Terdapat 5 tahapan isolasi RNA, yaitu: 1) Tissue dissociation, 2) Lysis, 3) RNA Binding, 4) Wash, dan 5) RNA Elution. Tahapan Tissue dissociation dilakukan dengan cara sampel daun tanaman P. amabilis baik control maupun yang diberi perlakuan ZPT masing-masing ditimbang sebanyak 100 mg dan digerus dengan nitrogen cair hingga menjadi serbuk, lalu dipindakan ke microtube 1,5 ml (RNAse free). Tahapan *lysis* dilakukan dengan cara pada microtube tadi ditambahkan dengan 500 μl RB Buffer (PRB Buffer) dan 5 μl β-mercaptoethanol, kemudian dihomogonasi dengan vortex dan diinkubasi pada suhu 65⁰C selama 5 menit. Sampel dipindahkan pada filter coloumn yang telah digabung dengan collection tube 2 ml, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1.000 xg selama 1 menit. Filter coloumn dibuang. Tahapan ketiga, yaitu RNA Binding dilakukan dengan cara pada collection tube ditambahkan ½ volume ethanol absolute, lakukan resuspensi, kemudian dipindah ke RB coloumn yang telah dipasangkan dengan collection tube baru, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 xg selama 4 menit, lalu RB coloumn dipindah ke collection tube baru. Tahapan keempat, yaitu wash dilakukan dengan cara pada bagian tengah RB coloumn ditambahkan 400 µl W1 buffer, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 xg selama 1 menit. RB coloumn ditambahkan dengan 600 µl wash buffer (+ etanol), lalu disentrifgasi dengan kecepatan 10.000 xg selama 2 menit. *RB coloumn dipindahken ke collection tube* baru dan pada bagian tengah *RB coloumn* ditambahkan 400 µl wash buffer kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 xg selama 3 menit. Tahapan terakhir, yaitu *RNA elution* dilakukan dengan cara *RB coloumn dipindahkan ke microtube* 1,5 ml (RNAse free) kemudian ditambahkan dengan 50 µl RNAse free water ke tengah matriks dan didiamkan selama 2 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 10,000 xg selama 4 menit untuk elusi RNA total.

7. Deteksi Gen Pembungaan

Deteksi gen pembungaan berupa gen *POH1* dan *PaFT*1 pada anggrek *P. amabilis* dilakukan dengan metode PCR. Primer oligonukleotida yang digunakan terdiri dari dua macam primer spesifik untuk gen *POH1* dan gen *PaFT*1. Primer gen *POH1* berupa POH F1 dan POH R1. Sedangkan primer gen *PaFT* adalah deg PaFT F1 dan deg PaFT R1. Reaksi PCR 25 µl dibuat dengan campuran Bio-Academia Kit (Tabel 1).

Tabel 2. Komposisi Bio-Academia Kit untuk reaksi PCR

Komponen	Volume (µl)
DW	36,75
dNTP mix	4,00
10 x standar buffer	5,00
Primer deg POH1 F1	1,00
Primer deg POH1 R1	1,00
Enzim Taq Polymerase	0,25
Template	2,00
Total	50

Sedangkan untuk deteksi gen *PaFT* digunakan komponen reaksi yang sama kecuali untuk primer yang digunakan, yaitu primer PaFT F1 (1 µl) dan PaFT R1 (1 µl). Semua komponen dihomogenisasi, lalu tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin *thermocycler* PCR dan alat diatur sebagai berikut:

Pradenaturasi : 94°C (5 menit)

Denaturasi $: 94^{\circ}C (30 \text{ detik})$ Annealing $: 52^{\circ}C (30 \text{ detik})$ = 30 siklus

Elongation : 72° C (3 menit)

Extention : 72° C (15 menit)

Hold : $4^{\circ}C$

Untuk amplifikasi gen *PaFT* digunakan kondisi yang sama kecuali pada kondisi *annealing* diubah menjadi 56⁰C.

Sintesis cDNA dilakukan melalui RT-PCR (*Reverse Transcriptase*-PCR). Template yang digunakan berupa *Superscript ii* (*Invitrogen*) dan mRNA. Larutan mix disiapkan untuk sintesis cDNA (Tabel 2).

Tabel 3. Komponen PCR Mix Sintesis cDNA

Komponen	Volume (μl)
ddH2O	0,80
5x Buffer	4,00
dNTP mix	2,00
DTT	2,00
Primer (oligo DT)	1,00
Superscript II (Enzyme for RT-	0,20
PCR)	
Sampel mRNA	10,00
Total	20,00

Semua komponen dihomogenasi, lalu tabung PCR dimasukkan ke dalam mesin *thermocycler* PCR dan alat diatur sebagai berikut:

Denaturasi : 30^{0} C (10 menit)

Annealing : 42^{0} C (50 menit)

Elongation : 95^{0} C (5 menit)

Hold : 10^{0} C

8. Elektroforesis DNA

Hasil PCR dari DNA genom yang telah diisolasi divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis. Visualisasi dilakukan dengan gel agaros 1%. Pertama-tama agaros sebanyak 0,25 gr ditimbang dan dilarutkan dalam 25 ml TBE (*Tris Boric acid EDTA*) 0,5 x dengan cara dipanaskan hingga larut, kemudian dituang ke dalam cetakan (tray) yang telah dipasang sisir untuk membuat sumuran, lalu ditunggu hingga mengeras selama kurang lebih 30 menit. Setelah mengeras, sisir diangkat dan dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis yang berisi larutan TBE 0,5 x. Lubang sumuran dicuci dengan mikropipet. Campuran DNA sampel dengan loading dye dibuat di atas parafilm dengan cara DNA (1 µl loading dye dicampur dengan 5 µl sampel DNA) dan larutan marka (1 µl loading dye, 2 µl marka (DNA ladder 1 kb), dan 3 µl Distillate Water). Campuran DNA dimasukkan ke dalam sumuran dengan mikropipet eppendorf. Elektroforesis dihubungkan arus listrik dengan tegangan 50 volt selama 50 menit. Gel diangkat dan direndam dalam 0,01 larutan Ethidium bromide selama 20 menit. Gel diletakkan di atas UV transilluminator yang telah diberi alas plastic wrap, lalu lampu UV dinyalakan. Pita-pita DNA yang terlihat didokumentasi dengan kamera digital.

D. Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengamatan dan pengukuran *P. amabilis* dianalisis dengan uji ANOVA (*Analysis of* Variance) dan dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) untuk mengetahui perbedaan diantara perlakuan yang ada.

E. Jadwal Penelitian

Tabel 4. Jadwal Penelitian

	TIMETABLE PENELITIAN																				
No	Nama Kegiatan	1	_	istu 122	S	September 2022				Oktober 2022				N	ove 20	mb 22	er	Desember 2022			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
	Persiapan																				
1.	Alat dan	X	X	X	X																
	Bahan																				

2.	Pembuatan Medium			X															
3.	Perlakuan Stress			X															
4.	Subkultur			X															
5.	Analisis Fenotip			X	x	X	Х	X	X	X	X	X	X	X	X				
6.	Deteksi Gen Pembungaan (PCR)														X	X			
7.	Sintesis dan Analisis cDNA gen POH1 dan PaFT															х	х		
8.	Elektroforesis DNA																X		
9.	Analisis Data																X	X	X

DAFTAR PUSTAKA

- Aisyah, I. 2020. Kultur Jaringan Pisang Kepok Tanjung (Tidak Berjantung) yang tahan terhadap penyakit darah (Rallstonua syzygii subsp. Celebesensis). Deepublish Publisher. Yogyakarta, pp. 23.
- Anitasari, S.D., Sari, D.N.R., Astarini, I.A. dan Defiani, M.R. 2018. *Dasar Teknik Kultur Jaringan Tanaman*. Yogyakarta: Deepublish, pp. 9-13.
- Annisa, R., Fakhrurrozi, Y. dan Rahayu, S. 2018. Proses pembungaan beberapa varietas *Hoya coronaria* dari Kawasan hutan kerangas air anyir, bangka. *Jurnal Penelitian Biologi, Botani Zoologi dan Mikrobiologi,* 2(1): 1-10.
- Baday, S.J. 2018. Plant tissue culture. *International Journal of Agriculture and Environmental Research*, 4(4), pp. 977-990.
- Habibah, N.A., Rahayu, E.S. dan Anggraito, Y.U. 2012. *Buku Ajar Kultur Jaringan Tumbuhan*. Yogyakarta: Deepublish, pp. 21.
- Hariadi, H., Yusnita, Riniarti, M. dan Hapsoro, D. 2019. Pengaruh arang aktif, benziladenin, dan kinetin terhadap pertumbuhan tunas jati Solomon (*Tectona grandis* Linn. F) *in vitro. Jurnal Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati*, 5(2), pp. 21-30.
- Indriani, R., Prihastanti, E., Budihastuti, R. dan Nurchayati, Y. 2020. Effect of subculture frequency toward growth and carotenoid content from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) callus. *Jurnal Biodjati*, 5(2), pp. 303-315
- Islam, M.O., Ichihahashi, S. and Matsui, S. 1998. Control of growth and development of protocorm like body derived from callus by caraun source in *Phalaenopsis. Plant Biotechnology*, 15(4): 183-187.
- [ITIS] Integrated Taxonomic Information System. 2022. *Taxonomy Hierarchy:* Phalaenopsis amabilis (L.) Blume. https://www.itis.gov. [30 Maret 2022].
- Krisdianto, A., Septiningsih, E., Nurchayati, Y. dan Setiari, N. 2020. Pertumbuhan Planlet anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume pada tahap subkultur dengan perlakuan jenis media dan konsentrasi pepton berbeda. *Journal of Biological Sciences*, 7(2): 182-190.
- Kurniawati, Yuli. 2015. Perananan Gen POH1 dan PaFT1 pada Pertumbuhan In Vitro Tanaman Anggrek Phalaenopsis "Sogo Vivien". Tesis. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Kusnadi, J. dan Arumingtyas, E.L. 2020. *POLYMERASE CHAIN REACTION* (*PCR*): *Teknik dan Fungsi*. UB Press. Malang, pp. 1-8.

- Mutryarny, E. dan Lidar, S. 2018. Respon tanaman pakcoy (*Brassica rapa* L) akibat pemberian zat pengatur tumbuh hormonik. *Jurnal Ilmu Pertanian*, 14(2): 34.
- Nakasha, J.J., Sinniah, U.R., Kemat, N. and Mallappa, K.S. 2016. Induction, subculture cycle, and regeneration of callus in safed musli (*Chlrophytum borivilianum*) using different types of phytohormones. *Journal of Pharmacognosy and Natural Products*, 12(47), pp. 460-464.
- National Parks. 2022. *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume. https://www.nparks.gov.sg [30 Maret 2022].
- Ningrum, E.F.C., Rosyidi, I.N., Puspitasari, R.R. dan Semiarti, E. 2017. Perkembangan awal protocorm anggrek *Phalanopsis amabilis* secara *in vitro* setelah penambahan zat pengatur tumbuh α-naphtaleneacetic acid dan thidiazuron. *Biosfera*, 34(1): 9-14.
- Nurwahyuni, I., Situmorang, M. & Sinaga, R. 2020. Plant regeneration through callus cultures from leaf esplant of Sumatra benzoin (*Styrax benzoin*). *International Journal of Forestry Research*, 1 October, pp. 1-7.
- Plant Illustration. 2022. *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume. http://www.plantillustrations.org. [30 Maret 2022].
- Puspitaningtyas, D.M. dan Handini, E. 2021. Seed germination evaluation of *Phalaenopsis amabilis* in various media for long-term conservation. *BIODIVERSITAS*, 22(11): 5231-5238.
- [POWO] Plant of the World Online. 2022. *Backbone Distributions and Taxonomy* : *Phalaenopsis amabilis*. https://powo.science.kew.org. [30 Maret 2022].
- Rahmah, S., Rahayu, T. dan Hayati, A. 2018. Kajian penambahan bahan oranik pada media tanam VW pada organogenesis anggrek *Dendrobium* secara *in vitro*. *Jurnal Ilmiah Sains Alami*, 1(1), pp. 93-103.
- Semiarti, E., Mercuriani, I.S., Rizal, R., Slamet, A., Utami, B.S., Bestari, I.A., Purwantoro, A., Moeljopariwo, S., Jang, S., Machida, Y. and Machida, C. 2015. Overexpression of *PaFT* gene in the wild orchid *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume. *AIP Conference Proceedings* 1677: 1-6. doi: 10.1063/1.4930750.
- Semiarti, E., Mercuriani, I.S., Slamet, A., Sulistyaningsih, B., Bestari, I.A.P., S., Jang, S., Machida, Y. and Machida, C. 2015. Induction of *in vitro* flowering of indonesian wild orchid, *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume. *KnE Life Sciences*, 2: 398-404.
- Sidek, N., Aniar, N.S.M., Naher, L. and Rahman, A.M.A. 2018. The effect of different nutrien media on *in vitro* shoot and root proliferation of

- Vanilla planifolia Jacks. Ex Andrews. African Journal of Biotechnology, 17(39), pp. 1241-1246.
- Slamet, Agus. 2014. Induksi Pembungaan Anggrek Bulan (Phalaenopsis amabilis (L.) Blume) dengan Pemberian Kombinasi Benziladenin dan Giberelin secara In Vitro. Tesis. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Suaib dan Sadimantara, I.G.R. 2014. *Kultur Jaringan Tanaman*. Kendari: Sulo Printing, 4-6, 35-37, 47-49, 84-92.
- Utami, B.S. 2014. Induksi pembungaan tanaman anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume dengan perlakuan benziladenin secara *in vitro*. Tesis. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Utami, B.S. 2016. Efek benziladenin mempercepat transisi fase vegetatif ke reproduktif tumbuhan berbunga secara kultur *in vitro*. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Entrepreneurship III*, 448-455.
- Yasmin, Z.F., Aisyah, S.I. dan Sukma, D. 2018. Pembibitan (kultur jaringan hingga pembesaran) anggrek *Phalaenopsis* di hasanudin orchids, jawa timur. *Bul. Agrohorti*, 6(3): 430-439.

LAMPIRAN

1. Komposisi Medium New Phalaenopsis (NP) (Islam et al. 1998)

Makronutrient (mg/L)	Rumus Kimia	Berat (mg)
Ammonium sulfate	(NH ₄) ₂ SO ₄	303,9
Monopotassium phosphate	(KH ₂ PO ₄)	426,7
Ammonium nitrate	NH ₄ NO ₃	32,0
Potassium nitrate	KNO ₃	424,6
Calcium nitrate	Ca(NO ₃) _{2.} 4H ₂ O	637,6
Magnesium nitrate	$Mg(NO_3)_{2.}6H_2O$	256,4
Mikronutrient (mg/L)		
Manganese sulfate	MnSO ₄ . 4H ₂ O	11,5
Zinc sulfate	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	4,3
Boric acid	H ₃ BO ₃	3,1
Pottasium iodide	KI	0,4150
Sodium molybdate	Na ₂ Mo ₄ . 2H ₂ O	0,125
Copper sulfate	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,0125
Cobalt chloride	CoCl.6H2O	0,0125
Besi (mg/L)		
Chelating agent	Na ₂ EDTA	37,3
Ferrous sulfate	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Vitamin (mg/L)		
Nicotinic acid		0,5
Thiamine HCl		0,1
Pyridoxine HCl		0,5
Glycine		2,0
Myoinositol (mg/L)		100
Sukrosa (mg/L)		20000
Agar		8000
Aquadest		Hingga 1 L
pН		5,3-6,3

2. Borang Proposal Seminar

BORANG	No. Dokumen Berlaku sejak	FO-UGM- BI004-13 03 Maret 2008
USULAN SEMINAR	Revisi	00
USULANSEMINAK	Halaman	1 dari 2

Semester Gasal/Genap *) Tahun Akademik 2021/2022

1. Nama Mahasiswa : Luthfin Azzahra Tandyana Prabowo

2. Nomor Induk Mahasiswa : 19/438651/BI/10189

3. Jumlah sks yang telah dicapai : 100 4. IPK sampai saat ini : 3,58

5. Tanda tangan :

6. Pembimbing Akademik

Nama : Dra. Siti Susanti S.U.

Tanda tangan:

7. Cabang ilmu yang dipilih

8. Dosen yang ditunjuk sebagai Pembimbing

oleh Pengelola Seminar

: Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.

9. Pengelola Seminar:

Nama : Dr. Dra. Rr. Upiek Ngesti W.A., DAP, M.Kes.

Tanda tangan:

Tanggal :6 April 2022

10. Bersedia menjadi Pembimbing Seminar dengan judul:

Uji Perbandingan Jenis dan Konsentrasi ZPT untuk Induksi Transisi Fase Generatif Anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume secara *In Vitro*

11. Dosen Pembimbing Seminar:

Nama : Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.
Tanda tangan :

Tanggal: 6 April 2022

CATATAN:

- 1. Bimbingan sudah dapat dimulai sebelum surat tugas Dekan disampaikan
- Mahasiswa membawa Borang Usulan Seminar untuk minta persetujuan Pembimbing Seminar, dibuat rangkap 3 (untuk dosen, pengelolan dan mahasiswa ybs.)
- 3. Setiap konsultasi mahasiswa wajib membawa lembar konsultasi seminar
- Setelah ringkasan seminar disetujui Pembimbing Seminar, mahasiswa mendaftarkan diri ke Penyelenggara seminar untuk penentuan waktu seminar.
- *) Coret yang tidak perlu



BORANG

No. Dokumen FO-UGM-BI004-13 Berlaku sejak 03 Maret 2008 Revisi 00 Halaman 2 dari 2

PEMANTAUAN SEMINAR

Semester Gasal/Genap *) Tahun Akademik 2021/2022

Nama Mahasiswa Nomor Induk Mahasiswa

: 19/438651/BI/10189

Dosen Pembimbing

: Prof. Dr. Endang Semiarti, M.S., M.Sc.

Luthfin Azzahra Tandyana Prabowo

Seminar Judul Seminar

eminar

Uji Perbandingan Jenis dan Konsentrasi ZPT untuk Induksi Transisi Fase Generatif Anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.)

Blume secara In Vitro

TAHAP KEGIATAN	Tanggal	Uraian	Tanda tangan Pembimbing
PERSIAPAN (Konsultasi dengan	17 Januari 2022	Pembagian hibah dan peminatan topik skripsi (morfologi dan molekuler anggrek)	Emmel-
pembimbing, penentuan judul, penentuan metode, dll.)	2 Februari 2022	Konsultasi pemantapan topik skripsi dan pemberian masukan dan saran oleh DPS (morfologi dan molekuler anggrek)	James L.
	10 Maret 2022	Konsultasi judul dan metode skripsi (Tranformasi gen PaFT pada anggrek)	James -
	14 Maret 2022	Perubahan judul dan metode skripsi (Uji ZPT untuk induksi pembungaan dan ekspresi gen PaFT secara in vitro)	Emme)
	24 Maret 2022	Persetujuan dan ACC judul dan metode skripsi	James -
PELAKSANAAN (Penulisan proposal,	25 Maret 2022	Penulisan Proposal Seminar	James -
konsultasi terkait proposal yang sudah dibuat, revisi proposal	31 Maret 2022	Konsultasi Proposal Seminar	James -
)	5 April 2022	Revisi Proposal Seminar dan Pengesahan Proposal Seminar oleh DPS	James -
PENYELESAIAN (Penyelesaian makalah seminar dll)			

^{*)} Coret yang tidak perlu



TRANSKRIP SEMENTARA

Semester Genap 2021/2022

Nama : LUTHFIN AZZAHRA T P NIM : 19/438651/BI/10189

Prodi : S1 BIOLOGI

DPA : Dra. Siti Susanti, S.U.

No	Kode	Mata Kuliah	SKS	Kelompok	Jenis	Ke	Nilai
1	BIA10001	BAHASA INGGRIS Kelas: A	2.00	MPK	Wajib	1	Α
2	BIB10003	BIOLOGI UMUM Kelas: C	4.00	MKK	Wajib	1	A/B
3	GEF1120	GEOMORFOLOGI Kelas: Ganjil	2.00	MKB	Wajib	1	Α
4	MKS1105	KIMIA Kelas: Ganjil	4.00	MKK	Wajib	1	B/C
5	MMS1107	MATEMATIKA Kelas: C	2.00	MKK	Wajib	1	C+
6	MSF1107	FISIKA Kelas: C	3.00	MKK	Wajib	1	Α-
7	UNU1110	PENDIDIKAN PANCASILA Kelas: PPS(36)	2.00	MPK	Wajib	1	А
8	BIB10601	STRUKTUR PERKEMBANGAN TUMBUHAN Kelas: C	4.00	MBB	Wajib	1	А
9	BID40012	BIOENTERPRENEURSHIP Kelas: Ganjil	2.00	MKB	Wajib	1	Α-
10	BIB10101	BIOKIMIA Kelas: A	4.00	MKK	Wajib	1	В
11	BIB10701	STRUKTUR PERKEMBANGAN HEWAN Kelas: C	4.00	MKK	Wajib	1	A/B
12	BID10009	BIOSTATISTIKA Kelas: C	2.00	MKK	Wajib	1	А
13	UNU1240	PENDIDIKAN KEWARGANEGARAAN Kelas: PKN(02)	2.00	MPK	Wajib	1	А
14	UNU1100	PENDIDIKAN AGAMA Kelas: PAI(02)	2.00	MPK	Wajib	1	Α
15	BIB20301	ILMU LINGKUNGAN Kelas: A	2.00	MKK	Wajib	1	Α
16	BIB20401	GENETIKA Kelas: B	4.00	MKB	Wajib	1	А
17	BIB21001	SISTEMATIKA TUMBUHAN Kelas: B	4.00	MKB	Wajib	1	B+
18	BIB21101	SISTEMATIKA HEWAN Kelas: B	4.00	MKB	Wajib	1	B+
19	BID20010	METODE ILMIAH DAN RANCANGAN PERCOBAAN Kelas: B	2.00	MKK	Wajib	1	A-
20	BID20102	TEKNIK BIOKIMIA Kelas: B	2.00	MKK	Wajib	1	Α-



TRANSKRIP SEMENTARA

Semester Genap 2021/2022

Nama : LUTHFIN AZZAHRA T P NIM : 19/438651/BI/10189

Prodi : S1 BIOLOGI

DPA : Dra. Siti Susanti, S.U.

No	Kode	Mata Kuliah	SKS	Kelompok	Jenis	Ke	Nilai
21	BID20602	ANATOMI TUMBUHAN Kelas: ATUMB	3.00	MKK	Pilihan	1	Α
22	BID20707	BIOMATERIAL Kelas: BIOMA	3.00	MKK	Pilihan	1	Α-
23	BIB20302	EKOLOGI Kelas: B	4.00	MKK	Wajib	1	Α
24	BID21005	ETNOBOTANI Kelas: ETNOB	2.00	MKK	Pilihan	1	A/B
25	BIB20501	MIKROBIOLOGI Kelas: B	4.00	MKK	Wajib	1	A/B
26	BIB20801	FISIOLOGI HEWAN Kelas: A	4.00	MKK	Wajib	1	C-
27	BID20011	PENULISAN KARYA ILMIAH Kelas: A	2.00	MKK	Wajib	1	Α
28	BIB20901	FISIOLOGI TUMBUHAN Kelas: D	4.00	MKK	Wajib	1	A/B
29	BIB30004	BIOLOGI SEL DAN MOLEKULER Kelas: GJL	3.00	MKK	Wajib	1	Α-
30	BIB30502	SISTEMATIKA MIKROBIA Kelas: B	4.00	MKK	Wajib	1	Α-
31	BIE30097	KERJA PRAKTEK Kelas: KPA	2.00	MPB	Wajib	1	А
32	BID21006	ORKHIDOLOGI Kelas: ORCHI	3.00	MKK	Pilihan	1	А
33	BID30202	TEKNIK KULTUR JARINGAN TUMBUHAN Kelas: TKJT	3.00	МКВ	Pilihan	1	Α
34	BIC30402	GENETIKA POPULASI Kelas: A	2.00	MKK	Wajib	1	Α
35	BID20403	GENETIKA SEL Kelas: GESEL	3.00	MKK	Pilihan	1	
36	BID20603	MIKROTEKNIK TUMBUHAN Kelas: MITUM	2.00	MKK	Pilihan	1	
37	BIE30098	SEMINAR Kelas: A	2.00	MPB	Wajib	1	
38	BIC30008	BIOTEKNOLOGI Kelas: A	2.00	MKB	Wajib	1	
39	BIC30007	BIOINFORMATIKA Kelas: B	2.00	МКВ	Wajib	1	
40	BID30405	GENETIKA MOLEKULER Kelas: GEMOL	2.00		Pilihan	1	



TRANSKRIP SEMENTARA

Semester Genap 2021/2022

Nama : LUTHFIN AZZAHRA T P NIM : 19/438651/BI/10189

Prodi : S1 BIOLOGI

DPA : Dra. Siti Susanti, S.U.

No	Kode	Mata Kuliah	SKS	Kelompok	Jenis	Ke	Nilai
41	BIB30005	PALEONTOLOGI Kelas: A	3.00	MKB	Wajib	1	
	-	Jumlah SKS	116				

Indeks Prestasi Sementara (IPS) : / =

Indeks Prestasi Kumulatif (IPK): 357.75/100 = 3.58

Yogyakarta, 06 April 2022 Dosen Pembimbing Akademik

Dra. Siti Susanti, S.U. 195712161984032002