

Optimasi *Optical Density* (OD) Dan Dosis Kanamisin Dalam Transformasi Gen *Sucrose Phosphate Synthase* (SoSPS1) Pada Anggrek *Dendrobium* sp.

Optimization of Optical Density (OD) and Kanamycin Dosage for Sucrose Phosphate Synthase (SoSPS1) Gene Transformation in Orchid Dendrobium sp.

Arsy Chairiyah¹⁾, Bambang Sugiharto^{2,3)}, Purnama Okviandari²⁾, Parawita Dewanti^{1,2*)},
Khiar Ayatina Hasbi¹⁾

¹⁾Program studi Magister Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember, Jember, Indonesia

²⁾UPA Pengelolaan Limbah dan Laboratorium Terpadu (PL2T), Universitas Jember, Jember, Indonesia

³⁾Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember, Jember, Indonesia

*)E-mail korespondensi: parawita.faperta@unej.ac.id

Diajukan: 02 Mei 2025 **Diterima:** 25 Oktober 2025 **Dipublikasi:** 28 November 2025

ABSTRACT

Genetic transformation in plants involves the insertion of isolated foreign genes into the plant genome. *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) is a key enzyme in sucrose biosynthesis, the primary sugar serving as an energy source and carbon transport molecule in most plants. *Dendrobium* orchids, which utilize *Crassulacean Acid Metabolism* (CAM), often exhibit a slow growth rate, thereby limiting their commercial potential. The insertion of the SPS gene into the orchid genome is expected to optimize the sucrose metabolic pathway, potentially influencing the rate of photosynthesis, carbon allocation, and growth characteristics of the orchid. Optimizing the optical density (OD) of the *Agrobacterium* suspension and the dosage of kanamycin is crucial for enhancing the success rate of the gene transformation process. This study aimed to determine the optimal concentrations of OD and kanamycin to achieve efficient SoSPS1 gene transformation in orchids. Three-month-old *Protocorm-Like Bodies* (PLBs) of *Dendrobium* *Glory White* were used as the explant source. The transformed explants were subsequently evaluated for the effectiveness of the kanamycin dosage, the percentage of explant shoots, the number of shoots per explant, the transformation efficiency, and phenotypic changes in the transformed plants. The results showed that a transformation efficiency of up to 40% was achieved using an *Agrobacterium* suspension at an OD_{600nm} of 0.4. A lethal dose (LD_{50}) of 100 mgL^{-1} kanamycin resulted in 34% of plantlets surviving post-selection. Transformation with the SoSPS1 gene in *Dendrobium* sp. induced distinct phenotypic plants including split leaves, swollen stems (pseudobulb), and increased shoot multiplication.

Keywords: gene insertion; orchid PLB; SoSPS1 gene; sucrose

ABSTRAK

Transformasi genetik pada tanaman melibatkan penyisipan gen asing yang terisolasi ke dalam genom tanaman. *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) adalah enzim kunci dalam biosintesis sukrosa, gula utama yang menjadi sumber energi dan transport karbon pada sebagian besar tanaman. Anggrek *Dendrobium* dengan metabolisme CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*), seringkali memiliki laju pertumbuhan yang lambat, sehingga dalam hal ini

dapat membatasi potensi komersialnya. Inseri gen *SPS* ke dalam genom anggrek diharapkan dapat mengoptimalkan jalur metabolisme sukrosa, berpotensi memengaruhi laju fotosintesis, alokasi karbon serta karakteristik pertumbuhan tanaman anggrek. Tahap awal dalam proses transformasi adalah optimasi *Optical Density* (OD) *Agrobacterium* dan dosis kanamisin. Tahap ini sangat penting dalam meningkatkan peluang keberhasilan proses transformasi gen. Oleh karena itu, penelitian ini perlu dilakukan dengan tujuan untuk menentukan konsentrasi optimal OD dan dosis kanamisin dalam efisiensi metode transformasi gen *SoSPS1* pada tanaman anggrek. Sumber eksplan yang digunakan untuk inisiasi adalah plb (*protocorm-like bodies*) anggrek *Dendrobium Glory White* berumur 3 bulan. Eksplan yang telah dilakukan transformasi kemudian diamati efektivitas pada dosis kanamisin, persentase eksplan bertunas, jumlah tunas per eksplan, persentase efisiensi transformasi dan perubahan fenotipe tanaman transforman. Hasil menunjukkan efisiensi transformasi yang diperoleh hingga mencapai 40% yaitu dengan menggunakan OD_{600nm}: 0,4. Letal Dosis (LD₅₀) 100 mgL⁻¹ kanamisin dapat menghasilkan 34% planlet hidup pasca seleksi. Transformasi gen *SoSPS1* pada anggrek *Dendrobium sp.* menyebabkan perubahan fenotipe tanaman seperti daun yang membelah, batang yang membengkak serta multiplikasi tunas.

Kata kunci: Plb anggrek; gen *SoSPS1*; inseri gen; sukrosa

PENDAHULUAN

Anggrek dengan keindahan bunga dan keanekaragaman spesiesnya, telah lama menjadi komoditas florikultura bernilai tinggi. Upaya dalam menciptakan kultivar baru pada tanaman anggrek merupakan fokus utama bagi para pemulia, untuk mengkombinasikan dan memperkuat sifat-sifat yang diinginkan baik dari aspek estetika maupun agronomi. Dari sisi estetika, sering menghasilkan varietas dengan warna bunga, bentuk kelopak, ukuran bunga serta aroma yang lebih harum atau intens. Sementara itu dari sisi agronomi, pengembangan kultivar baru difokuskan pada peningkatan laju pertumbuhan, daya tahan terhadap penyakit dan hama, toleransi terhadap kondisi lingkungan ekstrem (seperti suhu atau kelembaban), serta masa mekar yang lebih panjang. Berbagai upaya telah banyak dilakukan untuk menghasilkan kultivar baru, mulai dari persilangan konvensional (Indraloka *et al.*, 2019), penggunaan teknologi mutasi genetik (Martha *et al.*, 2023), hingga pemanfaatan teknik rekayasa genetika.

Teknik rekayasa genetika pada tanaman telah banyak dilakukan dengan menggunakan metode transformasi. Transformasi genetik adalah teknik untuk memasukkan gen asing yang telah diisolasi dari suatu organisme seperti hewan, tanaman ataupun bakteri kedalam gen target dengan tujuan untuk mendapatkan sifat atau karakter yang diinginkan Andayani *et al.*,

(2023) Penggunaan *Agrobacterium tumefaciens* sebagai mediasi untuk mentransfer gen memiliki beberapa keunggulan diantaranya, *Agrobacterium* memiliki efisiensi tinggi dalam memasukkan gen ke genom tanaman, dapat menghasilkan salinan gen tunggal, dengan biaya yang lebih murah dan mudah dalam pelaksanaannya dibandingkan dengan teknik langsung seperti penembakan DNA atau elektroporasi dan dapat mengintegrasikan gen secara stabil ke dalam genom tanaman (Satria dkk., 2015; Singh and Prasad, 2016). *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) merupakan enzim yang memiliki peran penting dalam biosintesis sukrosa terutama dalam proses metabolisme dan perkembangan tumbuh tanaman. Enzim SPS ini akan mengkatalis *fructose-6-phosphate* (F6P) dan *uridine diphosphate glucose* (UDP-Glucose) sehingga dihasilkan sukrosa (Bilska-Kos *et al.*, 2020). Selama proses fotosintesis, daun tanaman menghasilkan sukrosa bersama dengan senyawa karbohidrat lainnya. Senyawa organik ini, merupakan jenis karbohidrat terlarut yang paling banyak disimpan, dapat digunakan secara langsung melalui glikolisis atau ditransfer melalui floem dari jaringan fotosintesis ke jaringan non-fotosintesis. SPS juga berperan dalam mengatur pembagian karbon antara produksi pati dan akumulasi karbohidrat (sukrosa) selama berbagai proses fisiologis dan perkembangan, serta memainkan peran

penting dalam metabolisme karbohidrat (Ma *et al.*, 2020).

Anggrek merupakan tanaman yang umumnya banyak ditemukan di habitat yang minim nutrisi. Tanaman anggrek memiliki kapasitas yang rendah untuk melakukan proses fotosintesis sebagai bentuk adaptasi terhadap lingkungan tempat tumbuhnya. Beberapa jenis anggrek seperti anggrek *Dendrobium sp.* memiliki tipe fotosintesis CAM (*Crassulacean Acid Metabolism*), yang memungkinkan untuk membuka stomata di malam hari. Namun hal ini berdampak pada pengurangan penyerapan CO₂ di siang hari. Kondisi tersebut dapat dipengaruhi oleh rendahnya konduktansi mesofil pada tanaman, sehingga berdampak pada terbatasnya asimilasi CO₂ dan mengakibatkan pada proses fotosintesis menjadi tidak optimal dan menyebabkan karakter pertumbuhannya menjadi lambat (Yang *et al.*, 2018). Dalam pengembangan kultivar baru pada tanaman anggrek, tidak banyak pemulia yang melakukan upaya dalam meningkatkan sifat agronominya terutama yang memiliki metabolisme CAM. Transformasi dengan gen *SoSPS1* (*Saccharum officinarum sucrose phosphate synthase 1*) yang berasal dari tanaman tebu, diketahui dapat meningkatkan pertumbuhan dan produktivitas tanaman padi (Mulyatama *et al.*, 2022) serta dapat meningkatkan pada tinggi dan jumlah batang tebu (Anur *et al.*, 2020). Maka dalam hal ini, insersi gen *SoSPS1* pada tanaman anggrek perlu dilakukan untuk mendapatkan kultivar baru yang memiliki sifat agronomi yang lebih baik pada pertumbuhannya.

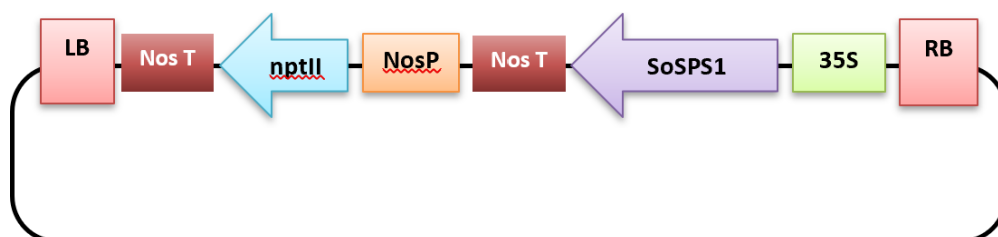
Faktor yang mempengaruhi keberhasilan transformasi gen diantaranya penggunaan konsentrasi *Agrobacterium* saat inisiasi gen target ke dalam genom tanaman dan konsentrasi antibiotik kanamisin dalam

media seleksi. Kanamisin memainkan peran penting dalam proses transformasi genetik, dimana antibiotik ini digunakan sebagai *selectable marker* yang terdapat pada plasmid dalam *Agrobacterium* yang membawa gen replikasi dan gen resistensi terhadap kanamisin. Selain itu kanamisin digunakan dalam media seleksi untuk mengetahui tanaman transforman yang mana akan tumbuh dan resisten terhadap kanamisin (Utami *et al.*, 2018). Konsentrasi atau *Optical Density* (OD) pada bakteri *Agrobacterium* juga berpengaruh dalam transformasi, jika konsentrasi terlalu tinggi akan menyebabkan tanaman mengalami *overgrowth*, kondisi dimana bakteri berkembang secara berlebihan pada eksplan tanaman (Ramadhan *et al.*, 2022). Hal ini secara signifikan dapat mengurangi efisiensi seluruh proses transformasi.

Oleh karena itu, optimasi faktor-faktor pendukung dalam transformasi perlu dilakukan untuk meningkatkan efisiensi dan keberhasilan transformasi genetik. Penelitian ini bertujuan untuk mengoptimalkan faktor pendukung dalam transformasi gen meliputi pengukuran konsentrasi OD *Agrobacterium* dan dosis kanamisin, serta mengevaluasi efisiensi transformasi dan perubahan morfologi pada tanaman anggrek *Dendrobium sp.*

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di UPA Pengolahan Limbah dan Laboratorium Terpadu, Universitas Jember. Eksplan yang digunakan dalam penelitian ini adalah PLB anggrek *Dendrobium sp.* berumur 3 bulan. Vektor yang digunakan untuk transformasi adalah *A. tumefaciens* strain GV1301 sebagai pembawa konstruk gen *SoSPS1* (Gambar 1).



Gambar 1. Peta konstruksi PRI101AN-*SoSPS1* dengan promotor P-35S dan gen resistensi kanamisin *nptII* (Fibriani *et al.*, 2019).

Perbanyak *Agrobacterium* dan infeksi pada eksplan

Perbanyak *A.tumefaciens* yang digunakan mengandung gen *SoSPS1-GV1301* yang telah disimpan dalam stok gliserol. Bakteri dari stok gliserol sebanyak 1 ml dinokulasikan ke media *Yeast Extract Peptone* (YEP) cair 2 ml dalam tabung reaksi yang telah ditambahkan antibiotik rifampisin 100 mgL⁻¹, gentamisin 12,5 mgL⁻¹, dan kanamisin 50 mgL⁻¹. Hasil inokulasi diinkubasi *shaker* 150 rpm selama 24 jam pada suhu 28°C. Untuk mencapai OD yang diinginkan (0,6 ; 0,5 dan 0,4), *starter* sebanyak 2 ml disubkultur dalam media YEP cair 50 ml yang mengandung antibiotik yang sama dan diinkubasi *shaker* 150 rpm dengan suhu 28 °C. Media YEP 50 ml yang telah *dishaker* dalam beberapa jam dicek berkala menggunakan *Spectrophotometer* (UV-Vis/NIR) tipe U-2900 dengan panjang gelombang 600 nm. Bila ukurannya menunjukkan OD pada 0,6 maka media dapat digunakan sesuai OD yang ingin diinfeksi pada eksplan. Proses yang sama juga dilakukan untuk membuat larutan dengan ukuran OD: 0,5 dan 0,4.

Infeksi *Agrobacterium* pada tanaman dilakukan melalui pelukaan pada eksplan yang ditusuk pada pangkal batang. Setiap proses infeksi dengan ukuran OD: 0,6; 0,5 dan 0,4, masing-masing tiap media YEP 50 ml membutuhkan 100 eksplan plb anggrek dengan penambahan 100 mgL⁻¹ asetosiringon. Eksplan dalam media *dishaker* dengan kecepatan 70 rpm selama 25 menit dan ditiriskan di atas kertas saring steril sampai kering. Hasil uji optimasi OD digunakan sebagai dasar untuk transformasi yang mengacu pada (Mii and Chin, 2018).

Ko-kultivasi dan eliminasi

Eksplan ditumbuhkan pada media ko-kultivasi dan eliminasi dengan komposisi yang terdiri dari media *Murashige and Skoog* (MS) menggunakan MS basal, vitamin, 30 gL⁻¹ sukrosa dan 3 gL⁻¹ pythagell. Untuk media kokultivasi ditambahkan 100 mgL⁻¹ asetosiringon, lalu eksplan diinkubasi dalam kondisi gelap pada suhu 28°C selama dua hari (Phlaetita *et al.*, 2015). Setelah itu, eksplan dicuci dua kali dengan akuades steril yang mengandung 500 mgL⁻¹ cefotaxime, diikuti dengan pembilasan menggunakan

akuades steril. Eksplan dikeringkan sebelum dipindahkan ke media eliminasi yang telah ditambahkan 500 mgL⁻¹ cefotaxime. Eksplan kemudian diinkubasi selama tujuh hari di bawah kondisi terang.

Seleksi tanaman putative transforman

Untuk memperoleh tanaman putatif transforman, eksplan dikultur pada media seleksi yang mengandung antibiotik kanamisin. Guna mengoptimalkan dosis efektif kanamisin, maka pengujian dilakukan dengan konsentrasi bertingkat, yaitu 0, 25, 50, 75, dan 100 mgL⁻¹. Desain eksperimen terdiri dari empat ulangan untuk setiap konsentrasi, di mana setiap ulangan menggunakan lima eksplan. Pengamatan dilakukan setiap seminggu sekali untuk melihat persentase kematian eksplan dengan letal dosis yang mencapai 50%, hasil optimasi kanamisin digunakan sebagai dasar untuk transformasi. Komposisi pembuatan media seleksi terdiri dari MS basal, vitamin, 30 gL⁻¹ sukrosa, BAP 2 mgL⁻¹, NAA 1 mgL⁻¹, 3 gL⁻¹ pythagell dengan penambahan 500 mgL⁻¹ cefotaxime dan kanamisin mgL⁻¹ (Anur *et al.*, 2020). Setelah inkubasi pada media eliminasi, eksplan dipindah pada media seleksi dengan 5 kali tahapan seleksi, setiap tahapan seleksi membutuhkan waktu 4 minggu.

Parameter pengamatan

Pengamatan pada penelitian ini meliputi efektivitas pada optimasi kanamisin, persentase eksplan bertunas, jumlah tunas per eksplan, persentase efisiensi transformasi dan fenotipe tanaman transforman. Hasil terhadap efektivitas kanamisin, eksplan terseleksi, jumlah eksplan bertunas dan efisiensi transformasi, di presentasikan dalam bentuk (%) dengan rumus sebagai berikut.

$$\frac{\text{jumlah eksplan akhir}}{\text{jumlah eksplan awal}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Efektivitas agen penyeleksi kanamisin

Kanamisin yang digunakan dalam transformasi merupakan antibiotik yang berperan sebagai agen penyeleksi pada eksplan yang telah diinfeksi dengan *Agrobacterium*. Hasil pengamatan

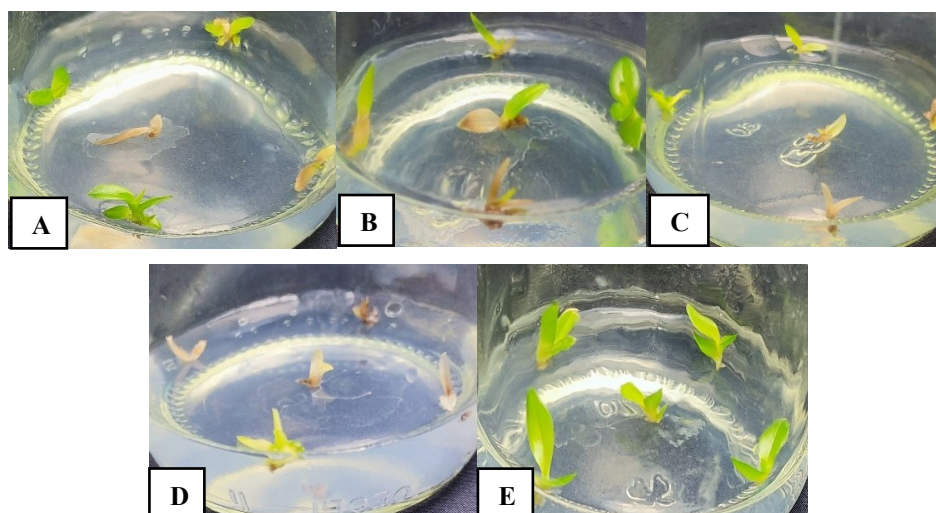
menunjukkan bahwa eksplan tanaman anggrek yang ditumbuhkan dalam media MS yang ditambahkan kanamisin, mengalami nekrosis yang menandakan kematian sel dan jaringan. Nekrosis sering terjadi pada bagian tanaman yang pertama kali terpapar konsentrasi tinggi kanamisin, seperti pada bagian yang dilukai atau dipotong (Lian *et al.*, 2020). Munculnya gejala nekrosis dimulai pada minggu ke 3, dengan konsentrasi 25 mgL⁻¹ dan 50 mgL⁻¹ yang mengalami persentase kematian lebih lambat dan sepenuhnya mati hingga 100% setelah minggu ke 7. Pada konsentrasi 75 mgL⁻¹ dan 100 mgL⁻¹ menunjukkan persentase kematian yang cepat, terlihat dari minggu ke 3 persentase kematian eksplan lebih tinggi hingga mencapai 100% pada minggu ke 6. Sedangkan eksplan yang tidak di tambahkan perlakuan kanamisin tetap dapat hidup. Pada penelitian ini titik tengah efektivitas antibiotik kanamisin yang diambil yaitu LD₅₀ (Lethal Dose 50) atau dosis mematikan 50%. Konsentrasi kanamisin berdasarkan LD₅₀ adalah dosis yang cukup tinggi untuk secara efektif mematikan sebagian besar sel non-transforman dalam populasi, namun tidak terlalu tinggi pada sel transforman yang memiliki mekanisme pertahanan seperti gen ketahanan terhadap antibiotik kanamisin yaitu *neomycin phosphotransferase II (nptII)*. tanaman transforman memiliki kemampuan

untuk memfosforilasi molekul kanamisin, dan secara efektif akan menonaktifkan kanamisin dalam sel tanaman transforman (Utami *et al.*, 2018). Pada konsentrasi ini, sel-sel non-transforman tidak memiliki mekanisme untuk mengatasi efek toksik kanamisin, sehingga tanamannya akan mati secara selektif. Maka hasil uji optimasi yang menunjukkan bahwa konsentrasi kanamisin sebesar 100 mgL⁻¹, merupakan dosis yang optimal untuk seleksi transformasi (Tabel 1).

Salah satu tahapan yang penting dalam menentukan keberhasilan transformasi adalah tahap seleksi. Pemilihan kanamisin digunakan sebagai agen penyeleksi dikarenakan terdapat gen ketahanan terhadap kanamisin *nptII* dalam konstruk plasmid pada gen target. Kanamisin akan bekerja pada eksplan yang tidak memiliki gen ketahanan didalamnya sehingga eksplan yang tidak terinsersi gen target akan mati perlahan secara otomatis. Hasil pengamatan pada optimasi kanamisin menunjukkan bahwa eksplan yang tidak terseleksi akan mengalami etiolasi, efek kanamisin mengganggu sintesis kloroplas dan mitokondria pada sel tanaman sehingga terjadi penurunan kandungan klorofil dan aktivitas fotosintesis yang menyebabkan menguningnya eksplan hingga memutih (Verma *et al.*, 2023) (Gambar 2).

Tabel 1. Presentase kematian eksplan anggrek yang ditumbuhkan dalam media MS yang mengandung kanamisin

Konsentrasi kanamisin (mgL ⁻¹)	Presentase eksplan mati pada minggu ke- (%)						
	1	2	3	4	5	6	7
0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	20	40	70	85	100
50	0	0	25	40	70	90	100
75	0	0	35	45	75	100	-
100	0	0	35	50	80	100	-



Gambar 2. Kondisi eksplan pada media optimasi kanamisin setelah minggu ke 4. A) 25 mgL⁻¹. B) 50 mgL⁻¹. C) 75 mgL⁻¹. D) 100 mgL⁻¹. E) 0 mgL⁻¹

Tabel 2. Pengaruh OD *Agrobacterium* terhadap efisiensi transformasi anggrek *Dendrobium sp.*

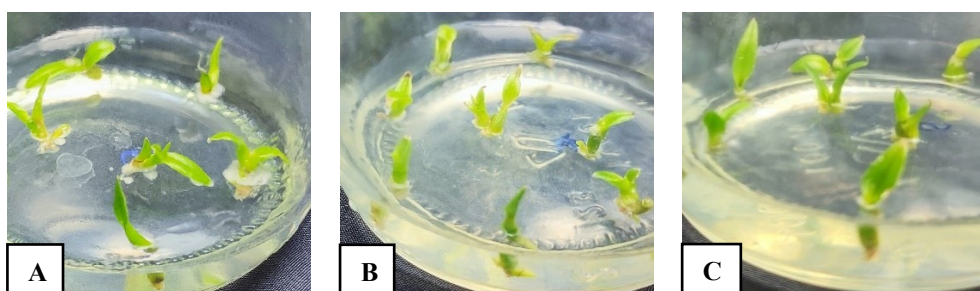
Optical Density (OD)	Jumlah eksplan awal	Ko-kultivasi	Eliminasi	Efisiensi transformasi pada setiap seleksi (%)				Jumlah eksplan bertunas pada setiap seleksi (%)			
				S1	S2	S3	S4	S1	S2	S3	S4
0,6	100	85	70	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	100	100	75	50	33	30	26	0	8	15	20
0,4	100	100	100	90	63	55	40	0	10	20	34

Tingkat OD terhadap efisiensi transformasi anggrek *Dendrobium sp.*

Salah satu faktor penting yang mempengaruhi efisiensi proses transformasi adalah kepadatan bakteri *Agrobacterium* berdasarkan *Optical Density* (OD). OD banyak digunakan dalam berbagai konteks, terutama dalam hal ini yaitu untuk mengukur kepadatan atau konsentrasi dari bakteri *Agrobacterium*. Konsentrasi yang digunakan dalam pengukuran diantaranya adalah OD: 0,6; 0,5 dan 0,4. Hasil menunjukkan bahwa efisiensi transformasi tertinggi (40%) diperoleh pada OD: 0,4 sedangkan pada OD: 0,6 eksplan mengalami *overgrowth* *Agrobacterium* di tahapan seleksi pertama (Tabel 2).

Selama tahap seleksi eksplan mengalami proses pertumbuhan dan regenerasi, eksplan memunculkan perakaran setelah melewati tahap seleksi ke 3 dan terus mengalami proses regenerasi hingga fase tahap seleksi ke 4. Adapun terjadinya *overgrowth* pada eksplan terlihat sejak tahap seleksi ke 1, *overgrowth* merupakan kendala

yang terjadi saat memasuki fase seleksi, hal ini dapat terjadi karena kepadatan populasi bakteri yang tinggi sehingga menyebabkan *Agrobacterium* mengalami *overgrowth* (Ramadhan *et al.*, 2022). Konsentrasi *Agrobacterium* pada OD: 0,4 dapat menghasilkan efisiensi transformasi hingga 40% dan jumlah eksplan bertunas lebih banyak 34% dibandingkan OD: 0,5. Hal ini diduga karena dengan OD: 0,4 dapat memberikan keseimbangan ideal antara efisiensi infeksi dan viabilitas eksplan, yang pada akhirnya mencegah kerusakan sel yang berlebihan dan memastikan keberhasilan transformasi genetik secara keseluruhan. Sebaliknya pada OD: 0,5 peningkatan jumlah bakteri tidak meningkatkan efisiensi transformasi, melainkan lebih banyak berkontribusi pada stres dan kematian sel, sehingga persentase hasil seleksi (26%) menjadi lebih rendah. Oleh karena itu, OD: 0,4 merupakan konsentrasi *Agrobacterium* yang optimal digunakan untuk transformasi tanaman anggrek *Dendrobium sp.* (Gambar 3).



Gambar 3. Kondisi eksplan pada fase seleksi 1. A) eksplan mengalami *overgrowth* *Agrobacterium* pada minggu pertama (OD: 0,6). B) dan C) tidak terjadi *overgrowth* (OD: 0,5 dan 0,4).

Tabel 3. Efisiensi transformasi terhadap persentase eksplan terseleksi, jumlah eksplan bertunas dan jumlah tunas per eksplan

Transformasi	Jumlah eksplan	Ko-kultivasi	eliminasi	Persentase eksplan terseleksi (%)				Jumlah eksplan bertunas (%)	Jumlah tunas per eksplan	Rata-rata efisiensi transformasi
				S 1	S 2	S 3	S 4			
1	100	100	100	90	70	65	34	29	6	
2	100	100	92	76	63	50	24	18	4,5	24%
3	100	90	78	50	33	24	15	12	6	

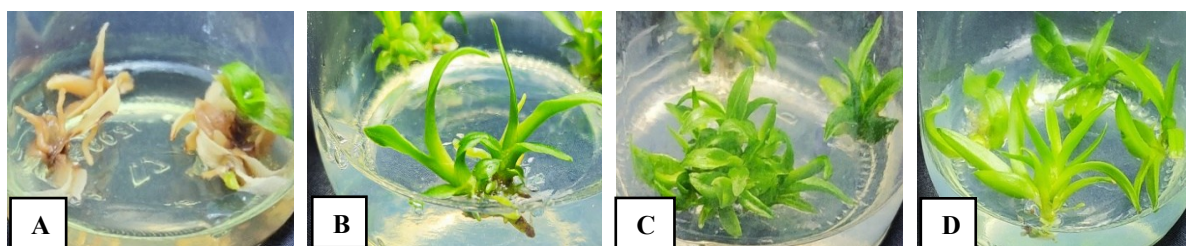
Efisiensi transformasi

Studi ini dilakukan hingga tahap pembentukan tanaman putatif transforman, dimana eksplan diseleksi dalam media antibiotik. Hasil efisiensi transformasi yang dicapai menunjukkan nilai rata-rata sebesar 24% dari tiga kali proses transformasi (34%, 24% dan 15%). Dengan eksplan yang dapat bertunas hingga mencapai 29% dan menghasilkan jumlah tunas per eksplan sebanyak 6 tunas. Nilai efisiensi transformasi ini merepresentasikan keberhasilan transformasi yang memadai pada tanaman anggrek *Dendrobium*. (Tabel 3).

Tiap tahapan seleksi dilakukan selama 4 minggu dengan 4 kali seleksi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa hingga seleksi ke 4, eksplan mengalami kematian secara bertahap, hal ini ditandai dengan eksplan yang berubah menjadi *browning* dan memutih. Fenomena *browning* pada eksplan terjadi karena stres yang disebabkan oleh kegiatan selama proses transformasi dan perlakuan antibiotik. Stres memicu berbagai respons fisiologis, termasuk ROS (*Reactive Oxygen Species*). ROS yang berlebihan dapat menyebabkan kerusakan pada lipid, protein dan DNA, yang dapat mengakibatkan

kematian sel tanaman (Chen *et al.*, 2020; Huang *et al.*, 2019). Selain itu, adanya senyawa fenolik juga dapat menyebabkan stres oksidatif yang parah, hingga pada akhirnya memicu kematian sel dan jaringan. Faktor-faktor ini dapat menyebabkan perubahan warna jaringan, mempengaruhi kandungan klorofil dan kesehatan tanaman secara keseluruhan. Disisi lain, konsentrasi kanamisin yang tinggi dan paparan yang terlalu lama juga dapat merusak jaringan tanaman dan menyebabkan *browning*. (Yang *et al.*, 2023).

Sel-sel pada tanaman yang berubah (membawa gen resistensi) terus tumbuh dan membelah, membentuk jaringan resisten. Namun prosesnya tidak selalu sempurna, pada beberapa sel yang tidak mengalami transformasi mungkin bertahan atau mengekspresikan sebagian gen resistensi. Selain itu beberapa eksplan yang dapat bertahan pada media seleksi menunjukkan regenerasi yang baik dengan munculnya tunas dan perakaran yang tumbuh. Sedangkan pada tanaman kontrol yaitu eksplan yang tidak ditumbuhkan dalam media dengan penambahan kanamisin dapat beregenerasi dengan optimal (Gambar 4).



Gambar 4. Kondisi tanaman anggrek putatif transforman dalam media seleksi. A) tanaman tidak transforman. B) tanaman tranforman membentuk akar. C) tanaman transforman bermultiplikasi tunas. D) tanaman anggrek *wild type*

Kemampuan eksplan membentuk tunas dalam media seleksi tidak terhambat oleh perlakuan antibiotik. Dari hasil pengamatan menunjukkan bahwa terbentuknya tunas baru pada eksplan yang diberi perlakuan kanamisin memiliki pertumbuhan yang sama dengan tanaman kontrol. Namun beberapa eksplan menunjukkan adanya efek kanamisin pada konsentrasi yang tinggi (100 mgL^{-1}), hal ini memberikan dampak terhadap pembentukan akar yang menyebabkan akar berkembang menjadi lambat selama fase seleksi (gambar 5A,C) (Chen *et al.*, 2020). Sedangkan beberapa eksplan yang dapat bertahan dalam media kanamisin selama tahap seleksi menunjukkan adanya perubahan fenotipe pada tanaman.

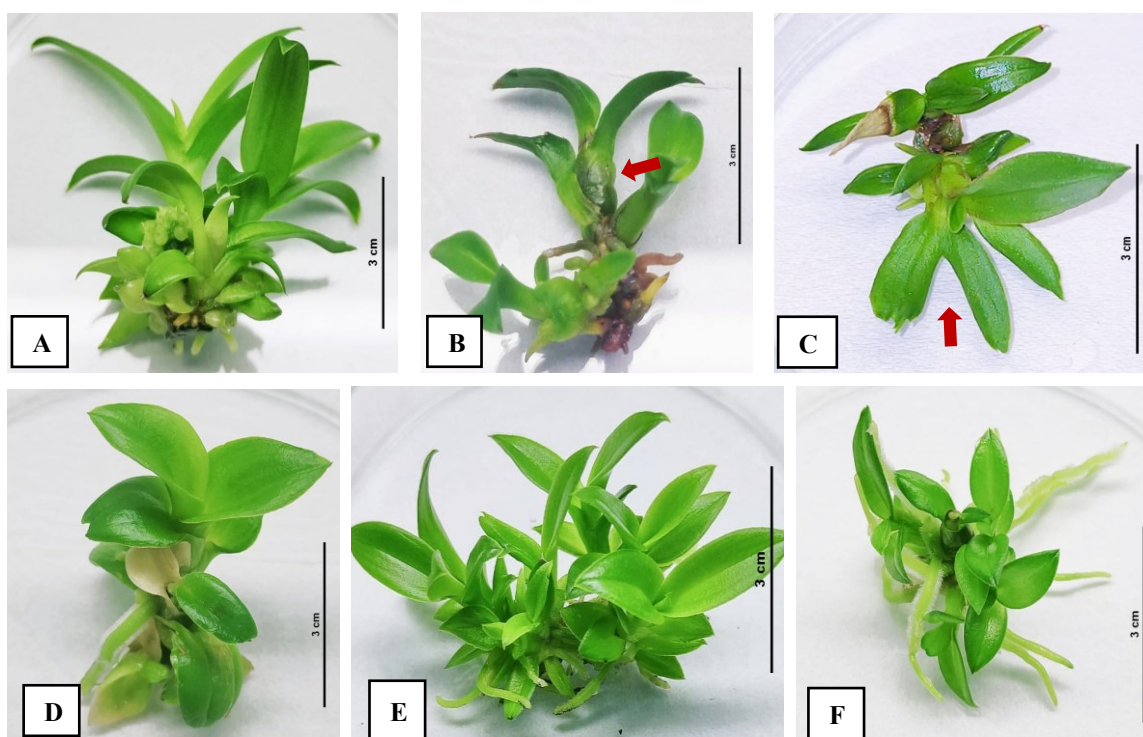
Transformasi pada tanaman yang dimediasi oleh *Agrobacterium* dapat menyebabkan mutasi pada tanaman melalui integrasi DNA asing. T-DNA yang terintegrasi dapat mengganggu gen tanaman atau elemen pengatur yang ada, yang berpotensi menyebabkan mutasi pada gen penting dan perubahan pada fenotipe (Krispil *et al.*, 2020). Adapun penelitian sebelumnya menyatakan bahwa integrasi T-DNA terjadi secara acak pada tingkat kromosom (Ambros *et al.*, 1986; Gelvin, 2021). Terintegrasinya T-DNA juga dapat mengaktifkan atau menonaktifkan gen tanaman tertentu. Ekspresi gen yang berubah ini dapat mengakibatkan perubahan fenotipe tanaman (Kirchhoff *et al.*, 2020), seperti pada gambar 5C,D yang menunjukkan adanya perubahan terhadap bentuk daun tanaman yang membelah dan membulat. Transformasi genetik pada tanaman sering kali menunjukkan variabilitas yang signifikan. Perbedaan kondisi selular pada sel-sel tanaman memungkinkan integrasi T-DNA ke dalam genom terjadi pada lokasi yang

berbeda-beda. Variasi ini mengakibatkan ekspresi transgen menjadi tidak konsisten, suatu fenomena yang dikenal sebagai efek posisi (*position effect*). Meskipun jumlah salinan transgen dapat bervariasi, Seringkali jumlah salinan transgen tidak berkorelasi dengan tingkat ekspresi transgen yang bervariasi (Peach and Velten, 1991). Seperti yang dijelaskan oleh Gelvin (2021) bahwa posisi integrasi T-DNA dan struktur kromatin dapat memengaruhi ekspresi transgen yang dikodekan T-DNA.

Selama proses regenerasi pada fase seleksi, tanaman menunjukkan perkembangan organ vegetatif seperti pembentukan batang, daun, dan tunas. Sebuah karakteristik unik yang diamati pada beberapa tanaman adalah perkembangan *pseudobulb*, yaitu batang yang mengalami modifikasi untuk menyimpan cadangan nutrisi dan air (Gambar 5B). Pembentukan struktur membengkak dan membulat ini menandakan adanya akumulasi karbohidrat berlebih dari jaringan source. Fenomena ini menunjukkan kemampuan tanaman untuk mengelola sumber daya dan beradaptasi terhadap lingkungan, yang merupakan bagian dari proses perkembangan menuju kematangan (W. Zhang *et al.*, 2023). Disisi lain, multiplikasi tunas pada tanaman anggrek transforman terlihat lebih baik dibandingkan dengan tanaman *wild type* (Gambar 5E). Fenomena ini diduga disebabkan oleh peningkatan pasokan sukrosa di dalam sel, yang berperan penting sebagai substrat energi untuk metabolisme seluler. Ketersediaan sukrosa yang melimpah ini mendukung laju pembelahan dan diferensiasi sel secara optimal, sehingga memicu proliferasi tunas. Diduga, peran ini dimediasi oleh gen *SoSPS1* yang telah disisipkan, yang bertanggung jawab dalam meningkatkan sintesis sukrosa dan

memastikan ketersediaan energi yang memadai untuk pertumbuhan vegetatif. Gen *SoSPS1* memastikan sintesis sukrosa yang stabil sebagai sumber karbon selama proses pertumbuhan. Selama fase regenerasi, ekspresi gen *SoSPS1* terus memainkan peran penting dalam metabolisme tanaman. Sukrosa yang disintesis oleh enzim SPS berfungsi sebagai sumber energi untuk pertumbuhan jaringan, berdasarkan penelitian sebelumnya terkait dengan gen *SPS* yang ditransformasikan seperti pada tanaman tomat (*Solanum lycopersicum*),

dimana ekspresi gen *S/SPS* yang berlebihan menyebabkan peningkatan pertumbuhan dan biomassa pada tanaman transgenik. Faktor-faktor seperti tinggi tanaman, berat buah, panjang akar, berat segar, dan berat kering dipengaruhi secara positif oleh ekspresi *S/SPS* yang berlebihan (Y. Zhang *et al.*, 2022). Selain itu, pada tanaman tebu menunjukkan bahwa aktivitas SPS dapat berkorelasi dengan laju perkembangan daun, tinggi, dan hasil bahan kering (Ma *et al.*, 2020).



Gambar 5. Fenotipe tanaman anggrek putatif transforman gen *SoSPS1*. A) Tanaman yang dapat bertunas dengan berdaun lonjong. B) Bentuk batang yang membulat (*pseudobulb*). C) Tanaman dengan daun yang membelah. D) Bentuk daun yang membulat. E) Tanaman yang dapat bermultiplikasi tunas. F) Tanaman *wild type*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa penelitian ini menunjukkan keberhasilan optimalisasi transformasi gen *SoSPS1* pada anggrek *Dendrobium sp.* diantaranya yaitu: 1) Kondisi optimal untuk transformasi tercapai pada OD_{600nm} 0,4 yang menghasilkan efisiensi hingga 40%. 2) Dosis letal kanamisin (LD50) pada 100 mgL^{-1} berhasil menyeleksi 34%

eksplan dan memastikan keberhasilan proses regenerasi yang memungkinkan eksplan untuk bertahan hidup. 3) Transformasi gen *SoSPS1* juga menginduksi perubahan fenotipe yang jelas pada tanaman, ditandai dengan bentuk daun yang membelah dan membulat, pembengkakan batang (*pseudobulb*) serta peningkatan multiplikasi tunas.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Sains, dan Teknologi (BIMA) atas pendanaan penelitian terapan tahun 2025 dengan nomor kontrak: 4282/ UN25.3.1/ LT/ 2025. Dukungan ini sangat membantu bagi keberhasilan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambros, P. F., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. A. 1986. Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromosomes by in situ hybridization. *The EMBO Journal*, 5(9): 2073–2077. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1986.tb04468.x
- Andayani, R., Rahmatika, W., dan Fitriyah, N. 2023. Transfomasi genetik: Peluang dan tantangan. *Jurnal Ilmiah Agrineca*, 23(1): 80–91. DOI: org/10.36728/afp.v23i1.2350
- Anur, R. M., Mufithah, N., Sawitri, W. D., Sakakibara, H., & Sugiharto, B. 2020. Overexpression of sucrose phosphate synthase enhanced sucrose content and biomass production in transgenic sugarcane. *Plants*, 9(2): 200. DOI: 10.3390/plants9020200
- Bilska-Kos, A., Mytych, J., Suski, S., Magoń, J., Ochodzki, P., & Zebrowski, J. 2020. Sucrose phosphate synthase (SPS), sucrose synthase (SUS) and their products in the leaves of *Miscanthus × giganteus* and *Zea mays* at low temperature. *Planta*, 252(2): 23. DOI: 10.1007/s00425-020-03421-2
- Chen, C., Fu, X., Peng, R., Tian, Y., & Yao, Q. 2020. Detoxifying processes during kanamycin-induced stress to *Arabidopsis thaliana* seedling growth. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34(1): 673–679. DOI: 10.1080/13102818.2020.1798811
- Gelvin, S. B. 2021. Plant DNA repair and *Agrobacterium* T-DNA Integration. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16): 8458. DOI: 10.3390/ijms22168458
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., & Zhao, Y. 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10. DOI: 10.3389/fpls.2019.00800
- Indraloka, A. B., Dewanti, P., & Restanto, D. P. 2019. Morphological Characteristics and Pollinia Observation of 10 Indonesia Native *Dendrobium* Orchids. In *BIOVALENTIA: BIOLOGICAL RESEARCH JOURNAL*, 5(2).
- Kirchhoff, J., Schiermeyer, A., Schneider, K., Fischer, R., Ainley, W. M., Webb, S. R., Schinkel, H., & Schillberg, S. 2020. Gene expression variability between randomly and targeted transgene integration events in tobacco suspension cell lines. *Plant Biotechnology Reports*, 14(4): 451–458. DOI: 10.1007/s11816-020-00624-7
- Krispil, R., Tannenbaum, M., Sarusi-Portuguez, A., Loza, O., Raskina, O., & Hakim, O. 2020. The position and complex genomic architecture of plant T-DNA insertions revealed by 4SEE. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7): 2373. DOI: 10.3390/ijms21072373
- Lian, Z., Nguyen, C. D., Wilson, S., Chen, J., Gong, H., & Huo, H. 2020. An efficient protocol for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Antirrhinum majus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(3): 527–536. DOI: 10.1007/s11240-020-01877-4
- Ma, P., Zhang, X., Chen, L., Zhao, Q., Zhang, Q., Hua, X., Wang, Z., Tang, H., Yu, Q., Zhang, M., Ming, R., & Zhang, J. 2020. Comparative analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) gene family between *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum*. *BMC Plant Biology*, 20(1): 422. DOI: 10.1186/s12870-020-02599-7
- Martha, K. M., Dewanti, P., Restanto, D. P., Ratnasari, T., & Alfian, F. N. 2023. In Vitro Mutagenesis of *Dendrobium Gabriella* Suryajaya Using Ethyl Methane Sulfonate (EMS) and Plantlet Regeneration. *Biosaintifika*, 15(1): 87–

96. DOI: 10.15294/biosaintifika.v15i1.40997
- Mulyatama, R. A., Neliana, I. R., Sawitri, W. D., Sakakibara, H., Kim, K.-M., & Sugiharto, B. 2022. Increasing the Activity of Sugarcane Sucrose Phosphate Synthase Enhanced Growth and Grain Yields in Transgenic Indica Rice. *Agronomy*, 12(12): 2949. DOI: 10.3390/agronomy12122949
- Peach, C., and Velten, J. 1991. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Molecular Biology*, 17(1): 49–60. DOI: 10.1007/BF00036805
- Satria, D. B. R., Sugiharto, B., dan Restanto, D. P. 2015. *Transformasi gen SoSPS1 menggunakan vektor Agrobacterium tumefaciens dan eksplan tunas apikal padi Indica cv. Inpari 14 SS*. Universitas Jember, Jember
- Singh, R. K., and Prasad, M. 2016. Advances in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of graminaceous crops. *Protoplasma*, 253(3): 691–707. DOI: 10.1007/s00709-015-0905-3
- Utami, E. S. W., Hariyanto, S., & Manuhara, Y. S. W. 2018. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Dendrobium lasianthera* J.J.Sm: An important medicinal orchid. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(2): 703–709. DOI: 10.1016/j.jgeb.2018.02.002
- Verma, S., Kumar, A., & Modgil, M. 2023. Impact of cefotaxime and kanamycin on in vitro regeneration via *Agrobacterium* mediated transformation in apple cv. Red Chief. *Plant Physiology Reports*, 28(1): 34–42. DOI: 10.1007/s40502-023-00708-w
- Yang, C., Liu, J., Qin, X., Liu, Y., Sui, M., Zhang, Y., Hu, Y., Mao, Y., & Shen, X. 2023. Effect of nitric oxide on browning of stem tip explants of malus sieversii. *Horticulturae*, 9(11): 1246. DOI: 10.3390/horticulturae9111246
- Yang, Z.-H., Huang, W., Yang, Q.-Y., Chang, W., & Zhang, S.-B. 2018. Anatomical and diffusional determinants inside leaves explain the difference in photosynthetic capacity between *Cypripedium* and *Paphiopedilum*, *Orchidaceae*. *Photosynthesis Research*, 136(3): 315–328. DOI: 10.1007/s11120-017-0466-8
- Zhang, W., Dong, X.-M., Zhang, Y.-W., Fan, Z.-X., & Zhang, S.-B. 2023. Age-related differences in physiological and metabolic responses of *Pleione aurita* (Orchidaceae) pseudobulbs to drought stress and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry*, 197: 107655. DOI: 10.1016/j.plaphy.2023.107655
- Zhang, Y., Zeng, D., Liu, Y., & Zhu, W. 2022. *SISPS*, a Sucrose Phosphate Synthase gene, mediates plant growth and thermotolerance in tomato. *Horticulturae*, 8(6): 491. DOI: 10.3390/horticulturae8060491