

APLIKASI METODE AGROINFILTRASI TRANSFORMASI GENETIK PADA TANAMAN ANGGREK DENGAN MENGGUNAKAN CRISPR/Cas9 GENOME EDITING SYSTEM

INTISARI

Anggrek (*Orchidaceae*) adalah tanaman ornamental yang umumnya memiliki bunga yang indah. Salah satu jenis anggrek yang paling banyak diminati dan dibudidayakan sebagai anggrek lokal adalah *Dendrobium macrophyllum*. Namun fase pertumbuhan anggrek tergolong lama, sehingga diperlukan metode inovatif untuk meningkatkan karakter dari anggrek salah satunya dengan penambahan karakter varigata. Usaha untuk meningkatkan karakter fenotip dapat dilakukan dengan metode penyuntingan genom (*genome editing*) menggunakan CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Protein Cas 9*) melalui teknik agroinfiltrasi dengan menyuntikkan gen asing pada jaringan tanaman. CRISPR/Cas9 merupakan metode *genome editing* terkini yang dapat menyebabkan terjadinya mutasi, *knock in* maupun *knock out* gen target. CRISPR/Cas9 telah digunakan pada anggrek, namun masih sangat minim serta efisiensi transformasi genetik masih di bawah 2% (rendah). Penelitian ini bertujuan mengembangkan dan meningkatkan persentase efisiensi transformasi melalui agroinfiltrasi pada anggrek *D. macrophyllum* yang dimediasi dengan *Agrobacterium* melalui sistem CRISPR/Cas9. Metode yang digunakan terdiri dari 1) Transformasi *pRGEB32* yang mengandung T-DNA ke *A. tumefaciens* EHA105; 2) Konfirmasi keberadaan T-DNA pada *pRGEB32/A. tumefaciens* EHA105 dengan PCR menggunakan primer *Cas9* dan *HPT*; 3) Transfer T-DNA ke genom tanaman menggunakan agroinfiltrasi *Agrobacterium*; 4) Konfirmasi integrasi T-DNA pada genom transforman. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa 8 tanaman *D. macrophyllum* transforman yang diuji dengan PCR terbukti membawa T-DNA pada genomnya dengan hasil amplifikasi DNA positif untuk gen *Cas9* (402 bp), *HPT* (545 bp), *VAR2* (723 bp), dan *ACTIN* (114 bp) sebagai kontrol internal. Sebanyak 60 sampel agroinfiltrasi (100%) positif membawa T-DNA. Metode Agroinfiltrasi dapat menjadi metode alternatif yang inovatif untuk *genome editing system* dengan CRISPR/Cas9 pada anggrek.

Kata kunci: CRISPR/Cas9, Agroinfiltrasi, *Dendrobium macrophyllum*, Transformasi.

APPLICATION OF GENETIC TRANSFORMATION AGROINFILTRATION METHODS ON ORCHIDS USING CRISPR/Cas9 GENOME EDITING SYSTEM

ABSTRACT

Orchids (Orchidaceae) are ornamental plants that generally have beautiful flowers. One of the most popular types of orchids and cultivated as a local orchid is *Dendrobium macrophyllum*. However, the orchid growth phase is relatively long, so innovative methods are needed to improve the character of the orchid, one of which is the addition of variegata characters. Efforts to improve the phenotypic character can be done by using the genome editing method using CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Protein Cas 9*) through agroinfiltration techniques by injecting foreign genes into plant tissues. CRISPR/Cas9 is the latest genome editing method that can cause mutation, knock in and knock out of target genes. CRISPR/Cas9 has been used on orchids, but it is still very minimal and the efficiency of genetic transformation is still below 2% (low). This study aims to develop and increase the percentage of transformation efficiency through agroinfiltration of *D. macrophyllum* orchids mediated by *Agrobacterium* through the CRISPR/Cas9 system. The method used consisted of 1) Transformation of *pRGEB32* containing T-DNA into *A. tumefaciens* EHA105; 2) Confirmation of the presence of T-DNA in *pRGEB32/A.tumefaciens* EHA105 by PCR using *Cas9* and *HPT* primers; 3) Transfer of T-DNA to plant genome using *Agrobacterium* agroinfiltration; 4) Confirmation of T-DNA integration in the transformant genome. The results of this study showed that 8 *D. macrophyllum* transformants tested by PCR were proven to carry T-DNA in their genomes with positive DNA amplification results for the genes *Cas9* (402 bp), *HPT* (545 bp), *VAR2* (723 bp), and *ACTIN* (114 bp) as internal control. A total of 60 agroinfiltration samples (100%) were positive for carrying T-DNA. Agroinfiltration method can be an innovative alternative method for genome editing system with CRISPR/Cas9 in orchids.

Keywords: CRISPR/Cas9, Agroinfiltration, *Dendrobium macrophyllum*, Transformation