

**Rekayasa Genetika Anggrek *Dendrobium lineale* Rolfe
dengan CRISPR/Cas9 Genome Editing System untuk
Pembentukan Fenotip Daun Variegata**

Oleh

Lailia Zubaidah

19/447348/PBI/01627

INTISARI

Dendrobium lineale Rolfe merupakan anggrek endemik Papua yang memiliki bentuk bunga yang indah, memiliki kandungan antioksidan yang potensial untuk biomedis. Lamanya fase vegetatif dan tingkat produksi yang rendah menyebabkan perlunya inovasi dalam bioteknologi untuk meningkatkan nilai dari anggrek spesies tersebut. Aplikasi CRISPR/Cas9 genome editing system dengan memutasi gen VAR2 dapat menyebabkan terjadinya perubahan fenotip daun menjadi variegata pada daun anggrek *D. lineale*. Transformasi genetik tanaman melalui perantara bakteri *Agrobacterium tumefaciens* merupakan metode yang sering digunakan untuk transfer T-DNA ke dalam genom tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh metode yang efisien untuk mengintroduksi T-DNA pembawa konstruksi 35S::GFP::Ubi::Cas9::U3::VAR2 pada plasmid pRGEB32 dengan transformasi genetik melalui *A. tumefaciens*. Peneliti sebelumnya telah melakukan transformasi genetik menggunakan konstruksi Ubi::Cas9::U3::VAR2/PDS3 pada planlet anggrek. Maka dari itu, deteksi integrasi T-DNA dan mutasi pada tanaman transforman *D. lineale* non GFP perlu dilakukan. Metode yang dilakukan meliputi; perkecambahan secara *in vitro* pada media MS, NP dan VW dengan penambahan ekstrak tomat : pepton (PET) (100 : 2 g/L) di beberapa variasi konsentrasi 0, 25, 50 dan 100%. Protokorm anggrek yang berumur 10 minggu digunakan untuk transformasi genetik melalui *A. tumefaciens* dengan nilai OD₆₀₀ bakteri 0,4, 0,6, dan 0,8 dan penambahan konsentrasi *acetosyringone* 0, 25, 50 dan 100 µM. Konfirmasi integrasi T-DNA dilakukan melalui PCR dilanjutkan analisis sekuens untuk deteksi mutasi. Selanjutnya, analisis fenotip tanaman transforman baik pada *D. lineale* dengan konstruksi GFP ataupun non GFP. Hasil perkecambahan menunjukkan persentase perkecambahan mencapai 100% pada media VW 100% PET. Pada transformasi genetik tanaman, OD₆₀₀ 0,6 (4,8, 6,2%) dan penambahan *acetosyringone* 25 µM (2,6, 3,9%) memiliki hasil efisiensi transformasi paling optimum. Berdasarkan analisis PCR T-DNA terintegrasi dengan genom tanaman baik pada tanaman kandidat transforman dengan konstruksi GFP ataupun non GFP. Terdapat mutasi pada sekuens target. Terlihat perbedaan warna pada kandidat transforman GFP yang berpendar di bawah sinar UV. Terdapat perbedaan warna fenotip daun pada tanaman transforman dan non transforman.

Kata Kunci: *D. lineale*, CRISPR/Cas9, VAR2, PDS3, *A. tumefaciens*, Variegata.

Genetic Engineering of *Dendrobium lineale* Rolfe Orchid by Using CRISPR/Cas9 Genome Editing System for Creating Variegated Leaves Phenotype

By
Lailia Zubaidah
19/447348/PBI/01627

ABSTRACT:

Dendrobium lineale Rolfe is a Papua endemic orchid that has the beauty shape of the flower, it contains an antioxidant compound that potential for biomedical study. However, the length of vegetative stages and low production rate make this orchid less attractive thus innovation in biotechnology to improve the value of this orchid is an important step. The application of CRISPR/Cas9 genome editing system by mutating *VAR2* gene can influence leaf phenotypic changes into variegata on *D. lineale* leaf. Plant genetic transformation through *Agrobacterium tumefaciens* is a method that widely used to transfer T-DNA into plant genome. The objective of this study was to obtain the efficient method for introducing T-DNA construct *35S::GFP::UBI::Cas9::U3::VAR2/pRGEB32* using *A. tumefaciens*-mediated transformation. Previous research has been transformed T-DNA construct *UBI::Cas9::U3::VAR2/PDS3* thus, detection of T-DNA integration and mutation of candidate transformants is needed. The method occurred after the following: seed germination was conducted by MS, NP, VW media with the addition of organic compound, tomato extract: peptone (PET) (100 : 2 g/L) in various mixed concentrations 0, 25, 50, 100%. Tenth-week-old protocorms were used for transformation through *A. tumefaciens* at various OD₆₀₀ bacteria 0,4, 0,6, 0,8 and the addition of acetosyringone concentrations 0, 25, 50, 100 µM. PCR assays were used for confirmation of T-DNA integration and sequence analysis for mutation detection. Furthermore, phenotypic analysis for transformant plantlet either GFP and non GFP construct. The result of seed germination presented that VW 100% PET has 100% germination. In transformation data, OD₆₀₀ 0,6 (4,8, 6,2%) and the addition of 25 µM acetosyringone (2,6, 3,9%) have the highest transformation efficiency. PCR analysis confirmed T-DNA integration in the plant genome in both GFP and non GFP construct. There were mutations at the sequence target. GFP transformant fluorescent under UV light. There were bit difference between leaves of transformant and non transformant plantlets.

Keywords: *D. lineale*, CRISPR/Cas9, *VAR2*, *PDS3*, *A. tumefaciens*, Variegata.