

INTISARI

Anggrek (*Orchidaceae*) merupakan tanaman hias yang dikenal memiliki nilai estetika tinggi dari bentuk, warna, dan keharuman bunganya. *Dendrobium 'Cheddi Jagan'* digunakan dalam penelitian ini karena memiliki bunga yang menarik dengan warna ungu. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan bunga varigata pada anggrek *D. 'Cheddi Jagan'* dengan CRISPR/Cas9 yang diintegrasikan ke genom tanaman melalui T-DNA pembawa konstruksi UBI::Cas9::U3::CHS dalam genom *D. 'Cheddi Jagan'* dan menentukan pengaruh penyuntingan genom menggunakan CRISPR/Cas9 tersebut terhadap warna bunga pada *D. 'Cheddi Jagan'*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi analisis tanaman *D. 'Cheddi Jagan'* *wild type* sebelum dilakukan agroinfiltrasi, meliputi analisis warna bunga menggunakan RHS *colour chart*, analisis molekuler dengan isolasi genom DNA dan amplifikasi PCR gDNA dengan primer spesifik gen *CHS*, selanjutnya T-DNA yang membawa konstruksi CRISPR/Cas9-sgRNA yang sesuai target sekuen gen *CHS* diintegrasikan menggunakan perantara *Agrobacterium tumefaciens* dengan metode agroinfiltrasi, dan deteksi integrasi T-DNA pada genom anggrek dilakukan dengan PCR menggunakan primer spesifik gen *CHS* dan gen *Cas9*, serta gen *ACTIN* sebagai kontrol. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen *CHS* telah berhasil diamplifikasi sepanjang 3.731 bp dan motif protein CHS yang terkonservasi berada pada urutan basa 2.748 hingga 2.798 atau berukuran 50 bp yang mengandung domain *Super family* PLN03172 dan PLN03170. Integrasi plasmid pRGEB32 dengan konstruksi UBI::Cas9::U3::CHS ke dalam *A. tumefaciens* strain GV3101 telah berhasil dilakukan, yang ditunjukkan dengan terdeteksinya gen *HPT* sepanjang 545 bp dan *Cas9* sepanjang 402 bp. Selanjutnya analisis molekuler pada bunga anggrek kandidat transforman menunjukkan bahwa gen *Cas9* dengan ukuran 402 bp terdeteksi dan pengamatan warna bunga dengan RHS *colour chart* menunjukkan pudarnya warna ungu pada bunga anggrek *D. 'Cheddi Jagan'* *wild type* yang sebelumnya berkode *Strong Purplish Red* (N72A) menjadi berkode *Strong Reddish Purple* (N72B) serta muncul warna putih pada ujung sepal bunga kandidat transforman. Hal ini menunjukkan bahwa integrasi T-DNA pembawa konstruksi UBI::Cas9::U3::CHS dan transformasi genetik dengan metode agroinfiltrasi berhasil dilakukan.

Kata Kunci: Agroinfiltrasi, *CHALCONE SYNTHASE (CHS)*, CRISPR/Cas9, *Dendrobium 'Cheddi Jagan'*, Bunga varigata

ABSTRACT

Orchids (*Orchidaceae*) are ornamental plants that are known to have high aesthetic value in the shape, colour, and fragrance of their flowers. *Dendrobium* 'Cheddi Jagan' was used in this study because it has attractive flowers with purple colour. The objective of this study was to obtain variegated flowers in the orchid *D.* 'Cheddi Jagan' detected by CRISPR/Cas9 integrated into the plant genome through the integration of the T-DNA carrier construct UBI::Cas9::U3::CHS and to determine the effect of genome editing using CRISPR/Cas9 on flower colour in *D.* 'Cheddi Jagan'. The methods used in this study include the analysis of *D.* 'Cheddi Jagan' wild type before agroinfiltration, including flower colour analysis using the RHS colour chart, molecular analysis with genomic DNA isolation and PCR amplification of gDNA with specific primers of the CHS gene, then T-DNA carrying CRISPR/Cas9-sgRNA construction that targets the *CHS* gene sequence is integrated using *Agrobacterium tumefaciens* intermediary with agroinfiltration method, and detection of T-DNA integration in orchid genome is done by PCR using specific primers of *CHS*, *Cas9*, and *ACTIN* gene as control. The results showed that the *CHS* gene had been successfully amplified along 3,731 bp and the conserved CHS protein motif was in the base sequence 2,748 to 2,798 or 50 bp and containing PLN03172 and PLN03170 Super family domains. Integration of plasmid pRGE32 with the UBI::Cas9::U3::CHS construction into *A. tumefaciens* strain GV3101 was successfully carried out, as indicated by the detection of the *HPT* gene 545 bp and *Cas9* 402 bp. Furthermore, molecular analysis of the transformant candidate orchid flowers showed that the *Cas9* gene with a size of 402 bp was detected and observation of flower colour with the RHS colour chart showed a faded purple colour in the *D.* 'Cheddi Jagan' wild type orchid flowers which previously coded Strong Purplish Red (N72A) to code Strong Reddish Purple (N72B) and a white tinge appeared at the sepal tip of the transformant candidate flower. This indicates that the integration of T-DNA carrying the UBI::Cas9::U3::CHS construct and genetic transformation by the agroinfiltration method was successful.

Keywords: Agroinfiltration, *CHALCONE SYNTHASE* (*CHS*), CRISPR/Cas9, *Dendrobium* 'Cheddi Jagan', Variegated flower