

INDUKSI MUTASI GEN *GAI* DENGAN SISTEM CRISPR/*Cas9* *GENOME EDITING* UNTUK PEMBUATAN ANGGREK *Arachnis flos-aeris* (L.) Rchb.f. MINI

INTISARI

Arachnis flos-aeris merupakan anggrek tropis dengan nilai estetika dan ekonomi tinggi, namun pertumbuhan batang yang relatif tinggi membatasi efisiensi budidaya, transportasi, dan pemanfaatannya sebagai tanaman hias. Penyuntingan genom menggunakan sistem CRISPR/*Cas9* yang menargetkan gen *GAI* (*Gibberellic Acid Insensitive*), salah satu gen penyandi protein DELLA sebagai regulator negatif jalur pensinyalan giberelin, merupakan pendekatan yang potensial dengan tujuan untuk menghasilkan *A. flos-aeris* berfenotip kerdil dengan tetap mempertahankan estetika dan ukuran bunganya. Penelitian ini meliputi optimasi perkecambahan biji secara *in vitro*, isolasi dan karakterisasi gen *GAI*, desain dan konstruksi sgRNA ke dalam vektor pRGEB32, transformasi plasmid ke *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, serta transformasi genetik pada protokorm melalui metode perendaman. Keberhasilan transformasi dikonfirmasi melalui deteksi gen *Cas9* menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR), sedangkan penyuntingan gen *GAI* diverifikasi melalui analisis sekuens DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media NP yang diperkaya ekstrak tomat 100 g/L merupakan media paling efektif untuk mendukung perkembangan embrio hingga fase 5. Penambahan asetosiringon 100 μ M menghasilkan efisiensi transformasi tertinggi sebesar 12,59%. Analisis molekuler mengonfirmasi keberhasilan integrasi konstruksi T-DNA *UBI::CRISPR/Cas9::U3::GAI* ke dalam genom *A. flos-aeris* serta mengidentifikasi mutasi berupa substitusi dan insersi pada daerah target gen *GAI* di domain DELLA. Tanaman transforman menunjukkan perubahan morfologi berupa penurunan tinggi dan lebar tanaman serta pertumbuhan yang lebih kompak, disertai perubahan anatomi berupa penurunan ukuran sel protomeristem dibandingkan *wild type*. Hasil penelitian ini memberikan dasar ilmiah bagi pengembangan varietas anggrek mini *A. flos-aeris* melalui penerapan penyuntingan genom menggunakan sistem CRISPR/*Cas9*, sehingga berpotensi meningkatkan nilai estetika, nilai komersial, serta efisiensi pemanfaatannya sebagai tanaman hias pada ruang yang terbatas.

Kata kunci: *Agrobacterium-mediated transformation*, *Arachnis flos-aeris*, Anggrek mini, CRISPR/*Cas9* Genome Editing, gen *GAI*.

INDUCTION OF *GAI* GENE MUTATION USING CRISPR/*Cas9* GENOME EDITING TO GENERATE *Arachnis flos-aeris* (L.) Rchb.f. MINI ORCHID

ABSTRACT

Arachnis flos-aeris is a tropical orchid with high ornamental and economic value; but its relatively tall stem growth limits cultivation efficiency, transportation, and utilization as an ornamental plant in limited spaces. Genome editing using the CRISPR/*Cas9* system targeting the *GAI* (*Gibberellic Acid Insensitive*) gene, which encodes the DELLA protein as a key negative regulator of the gibberellin signaling pathway, represents a promising approach with the aim of generating dwarf *A. flos-aeris* plants while maintaining their ornamental value and flower size. This study involved *in vitro* seed germination optimization, isolation and characterization of the *GAI* gene, sgRNA design and construction into the pRGE32 vector, plasmid transformation into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, and genetic transformation of orchid protocorms using the immersion method. Transformation was confirmed by detecting the *Cas9* gene using PCR, while genome editing was verified through DNA sequence analysis. The results showed that NP medium supplemented with 100 g/L tomato extract was the most effective medium for promoting embryo development to protocorm phase 5. Supplementation with 100 μ M acetosyringone produced the highest transformation efficiency of 12,59%. Molecular analysis confirmed the successful integration of the *UBI::CRISPR/Cas9::U3::GAI* T-DNA construct into the *A. flos-aeris* genome and identified substitution and insertion mutations within the target region of the *GAI* gene in the DELLA domain. The transformed plants exhibited morphological changes characterized by reduced plant height and width and a more compact growth habit, accompanied by anatomical changes including smaller protomeristem cell size compared with the wild-type plants. These findings provide a scientific basis for developing *A. flos-aeris* mini orchid through CRISPR/*Cas9*-mediated genome editing, offering potential to enhance ornamental value, commercial value, and cultivation efficiency in limited spaces.

Keywords : *Agrobacterium-mediated transformation*, *Arachnis flos-aeris*, CRISPR/*Cas9* Genome Editing, *GAI* gene, Mini orchid.