

**Rekayasa Genom Anggrek *Dendrobium capra* J.J. Smith,  
*Dendrobium lineale* Rolfe dan *Dendrobium macrophyllum* A. Rich dengan  
Metode CRISPR/Cas9**

**Yuli Setiawati  
17/417057/PBI/01494**

**INTISARI**

*Dendrobium* merupakan genus pada suku Orchidaceae yang memiliki jumlah  $\pm 1600$  jenis yang tersebar di dataran Asia Tenggara dan Australia dan 275 jenis diantaranya dapat ditemukan di Indonesia. Saat ini masih terdapat dua permasalahan utama pada anggrek yaitu, rendahnya produksi tanaman dan masih memerlukan waktu yang lama untuk berbunga. Oleh karena itu dibutuhkan suatu pendekatan untuk memecahkan permasalahan tersebut. Penyuntingan genom menggunakan CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated-9*) metode presisi dalam bidang biologi molekuler yang mampu menginduksi rusaknya untai ganda DNA pada sekuens dengan motif spesifik. Namun, sebelum menggunakan gen fungsional untuk pertunasan dan pembungaan maka pada penelitian ini digunakan gen kloroplas, *VARIEGATED 2* (*VAR2*). Gen ini akan digunakan sebagai gen indikator keberhasilan metode CRISPR/Cas9 pada genom *Dendrobium*. Tujuan penelitian ini ialah untuk mendapatkan metode yang paling optimum dalam mengintroduksi plasmid pRGE32 pembawa T-DNA *Ubi::Cas9::U3::VAR2* dengan metode transformasi melalui perantara *Agrobacterium* pada tiga spesies *Dendrobium* yaitu, *D. capra*, *D. lineale* dan *D. macrophyllum*. Sebagai pra-penelitian telah dilakukan pengecekan sensitifitas protokorm umur 8 minggu dan planlet umur 16 minggu pada media seleksi yang ditambahkan antibiotik higromisin konsentrasi 0;2;4;6;8 dan 10 mg/L. Kemudian, pada penelitian juga dilakukan perendaman protokorm pada waktu yang berbeda yaitu: 0;15;30 dan 45 menit dalam kultur *Agrobacterium* untuk mendapatkan nilai efisiensi yang paling tinggi. Selanjutnya dilakukan pengecekan pemanfaatan eksplan berupa planlet yang dilukai dengan cara ditusuk pada bagian bulb dan dipotong ujung daun pertama dan keduanya. Hasil yang didapatkan setiap spesies memiliki sensitifitas terhadap antibiotik higromisin yang berbeda. Pada *D. lineale* 10 mg/L dan *D. macrophyllum* 6 mg/L. Namun, planlet ketiga jenis anggrek sensitive pada konsentrasi 10 mg/L. Selanjutnya, waktu inokulasi 15 menit waktu optimum untuk mendapatkan efisiensi transformasi 0.66% pada *D. macrophyllum* dan 45 menit untuk mendapatkan efisiensi transformasi 1.16% pada *D. lineale*. Planlet dapat dijadikan target eksplan untuk transformasi genetik dengan perantara *Agrobacterium*. Secara fenotip, terdapat perubahan warna dan adanya pertumbuhan yang berbeda antara tanaman nontransforman dan transforman *D. capra*, *D. lineale* dan *D. macrophyllum*. Secara genotipik, terdapat substitusi pada bagian *target site* gen *VAR2* pada *D. lineale* dan *D. macrophyllum* sedangkan pada *D. capra* tidak didapatkan perubahan.

**Kata kunci** : CRISPR/Cas9, *Dendrobium*, transformasi genetik, varigata

**Genome Engineering of *Dendrobium capra* J.J. Smith, *Dendrobium lineale* Rolfe and *Dendrobium macrophyllum* A. Rich Orchid by using CRISPR/Cas9 Method**

**Yuli Setiawati**  
**17/417057/PBI/01494**

**ABSTRACT**

*Dendrobium* is a genus in the Orchidaceae family which has number of  $\pm 1600$  species spread across Southeast Asia and Australia and 275 of *Dendrobium* can be found in Indonesia. Currently, there are two main problems with orchids, namely, low production of plants and still require a long time to flower. Therefore, we need an approach to solve this problem. Genome editing using *CRISPR/Cas9* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated-9*) is precision methods in the field of molecular biology that is able to induce damage to double strands of DNA in sequences with specific motifs. However, before using functional genes for budding and flowering, this study used the chloroplast gene, *VARIEGATED2* (*VAR2*), which will be used as an indicator gene for the success of the *CRISPR/Cas9* method in the *Dendrobium* genome. The purpose of this study was to obtain the most optimum method for introducing plasmid pRGEB32 T-DNA carried *Ubi::Cas9::U3::VAR2* by using *Agrobacterium*-mediated transformation in, *D. capra*, *D. lineale* and *D. macrophyllum*. As a pre-eliminary, the sensitivity of 8-weeks-old protocorm and 16-weeks-old plantlet in the selection media were added with antibiotic hygromycin concentration of 0, 2, 4, 6, 8 and 10 mg/L. Then, the study also carried out immersion protocorm at different times, namely: 0, 15, 30 and 45 minutes in *Agrobacterium* culture to get the highest value of efficiency. Next, we checked explants in the form of plantlets that have been injured by stabbed in the bulb part and cut off the tip of the first and second leaf. The results obtained for each species have sensitivity to different hygromycin antibiotics. At *D. lineale* 10 mg/L and *D. macrophyllum* 6 mg/L. However, plantlet of three species was sensitive to a concentration of 10 mg/L. Furthermore, the inoculation time 15 mins was optimum time to get efficiency 0.66% at *D. macrophyllum* and 45 minutes to get transformation efficiency 1.16% at *D. lineale*. Plantlets can be used as texplants for genetic transformation with *Agrobacterium*. Phenotypically, there was a change in color and the presence of different growth between non-transformation plants and transformants *D. capra*, *D. lineale* and *D. macrophyllum*. Genotypically, there was a substitution at the target site of the *VAR2* gene site in *D. lineale* and *D. macrophyllum* while in *D. capra* there was no change.

**Keywords** : *CRISPR/Cas9*, *Dendrobium*, Genetic transformation, variegation