

**DETEKSI INTEGRASI T-DNA PEMBAWA KONSTRUKSI DNA
UBI::Cas9::U3::PDS3 PADA ANGGREK *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume
TRANSFORMAN**

Amarilis Andani Kesuma

16/393146/BI/09566

INTI SARI

Keunikan dan keindahan tanaman hias *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume berpotensi untuk dikembangkan secara inovatif melalui metode transformasi genetik. *CRISPR/Cas9* merupakan metode mutakhir yang tepat untuk digunakan dalam pengeditan genom tanaman secara spesifik dan presisi. Tujuan penelitian ini adalah mendeteksi integrasi T-DNA pembawa konstruksi DNA UBI::Cas9::U3::PDS3 pada genom anggrek *P. amabilis* dan mengkarakterisasi fenotip (morfologi dan anatomi) anggrek *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi DNA UBI::Cas9::U3::PDS3. Deteksi integrasi transgen pada genom tanaman dilakukan dengan isolasi total DNA genom menggunakan metode Murray & Thompson 1980, amplifikasi DNA genom tanaman dengan PCR menggunakan primer HPT (545 bp), primer Cas9 (402 bp), primer PDS3 (280 bp) dan primer trnL-F (1200 bp), cpDNA trnL-F merupakan fragmen DNA *interspace* pada genom kloroplas digunakan sebagai kontrol internal. Analisis karakter fenotip dilakukan dengan pengamatan morfologi, anatomi dan analisis kadar klorofil menggunakan metode spektrofotometri. Data dianalisis menggunakan Microsoft Excel 2016. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fragmen gen HPT (545 bp), gen Cas9 (402 bp) dan gen PDS3 (280 bp) teramplifikasi dari genom anggrek *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi DNA UBI::Cas9::U3::PDS3 umur 12 bulan. Karakter fenotipik *P. amabilis* transforman menunjukkan variasi warna daun: albino, hijau-kekuningan, dan hijau. Fenotip daun albino pada *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi DNA UBI::Cas9::U3::PDS3 terjadi karena tidak ditemukannya kloroplas dewasa sebab plastida tidak terdiferensiasi dengan baik sehingga proses pembentukan tilakoid terganggu.

Kata kunci : *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume, *CRISPR/Cas9*, *PHYTOENE DESATURASE 3* (PDS3)

DETECTION OF THE INTEGRATION OF T-DNA CARRYING DNA CONSTRUCT *UBI::Cas9::U3::PDS3* IN *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume ORCHID TRANSFORMANT

Amarilis Andani Kesuma

16/393146/BI/09566

ABSTRACT

The uniqueness and beauty of ornamental orchid plant *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume has some potentials to developed innovatively through genetic transformation methods. *CRISPR/Cas9* is a current method that is suitable for use in specific and precise plant genome editing. The purpose of this study were to confirm stable integration of T-DNA carrying DNA construct *UBI::Cas9::U3::PDS3* in the genome of *P. amabilis* orchid transformant and to characterize the phenotype (morphology and anatomy) of *P. amabilis* orchid transformant carrying DNA construct *UBI::Cas9::U3::PDS3*. Detection of transgene integration in plant genomes was checked by total genomic DNA isolation using Murray & Thompson 19880 method, amplification of plant genomic DNA by *Polymerase Chain Reaction* (PCR) using HPT primers (545 bp), Cas9 primers (402 bp), PDS3 primers (280 bp) and trnL-F primers (1200 bp), cpDNA trnL-F is an interspace DNA fragment from chloroplast genome that was used as internal control. Phenotypic characterization was carried out by observing morphology, anatomy, and analysis of chlorophyll concentration using spectrophotometric methods. Data were analyzed using Microsoft Excel 2016. The results showed that the *HPT* gene (545 bp), *Cas9* gene (402 bp) and the *PDS3* gene (280 bp) were amplified from the genome of 12 months- old *P. amabilis* orchid transformants that carrying DNA construct *UBI::Cas9::U3::PDS3*. The phenotype characters of *P. amabilis* transformant showed various leaf colors: albino, yellowish-green and green color. The phenotype of albino leaves in the *P. amabilis* transformant carrying the DNA construct *UBI::Cas9::U3::PDS3* occurred might be due to undifferentiated plastid that disrupted the thylakoid formation process.

Keywords: *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume, *CRISPR/Cas9*, *PHYTOENE DESATURASE 3 (PDS3)*