

# Karakterisasi Fenotipe dan Genotipe Anggrek *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume Transforman Pembawa Konstruksi UBI::Cas9::U3::PDS3

*Phenotype and genotype characterization of Phalaenopsis amabilis (L.) Blume Orchid Transformant Harboring Construct UBI::Cas9::U3::PDS3*  
Amarilis Andani Kesuma<sup>1</sup>, Sri Nopitasari<sup>1</sup>, Yasushi Yoshioka<sup>2</sup>, Shogo Matsumoto<sup>3</sup>, Endang Semiarti<sup>1\*</sup>

Diterima 03 Desember 2020/Disetujui 26 Desember 2020

## ABSTRACT

*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume is an Indonesian national “Flower of Charm” (“Puspa Pesona”), an ornamental plant that by using genetic engineering we could improve the flower quality. In this study, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation and CRISPR/Cas9 genome editing system was used to edit the orchid genome more specific and precisely. Twelve months old putative transgenic plants originated from protocorm like bodies (PLBs) transformation harboring the T-DNA construct UBI::Cas9::U3::PDS3/plasmid pRGEB32. Proofing for the putative transformant plants were stably harboring the T-DNA constructs were conducted by genotype and phenotype characterization. The purpose of this study was to characterize genotypically and phenotypically the putative transformant of *P. amabilis* harboring T-DNA constructs UBI::Cas9::U3::PDS3 compared to non-transformant. Genotype characterization was carried out by detecting the integration of T-DNA harboring UBI::Cas9::U3::PDS3 on the *P. amabilis* genome using several primers for HPT, Cas9, PDS3 and trnL-F (internal control primers). Phenotype analysis was carried out by observing and analyzing chlorophyll content using spectrophotometric methods. The results showed that genome of putative *P. amabilis* transformant age 12 months could be amplified by the primers. Phenotypic analysis of *P. amabilis* transformant showed a change in plant color from green to pale (albino) with lower chlorophyll content compared to non-transformant. This indicates that the CRISPR/Cas9 technology is able to edit the genome of orchids. **Keywords:** Chlorophyll, CRISPR/Cas9, orchid, *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume, PHYTOENE DESATURASE 3 (PDS3), Transformant.

## ABSTRAK

*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume adalah tanaman hias “Puspa Pesona Indonesia” yang dapat ditingkatkan kualitasnya dengan teknik rekayasa genetika. Transformasi genetik dengan perantara *Agrobacterium tumefaciens* dan CRISPR/Cas9 digunakan dalam penelitian ini untuk pengeditan genom secara lebih spesifik dan presisi pada target sekuen gen PHYTOENE DESATURASE3 (PDS3) yaitu gen yang berperan penting pada biosintesis kloroplas. Dalam penelitian ini digunakan tanaman transforman umur 12 bulan yang ditumbuhkan dari protokorm yang telah diintegrasikan dengan T-DNA pembawa konstruksi UBI::Cas9::U3::PDS3/plasmid pRGEB32. Pembuktian tanaman transforman tersebut masih mengandung konstruksi T-DNA tersebut perlu dilakukan, yaitu dengan karakterisasi secara genotipe dan fenotipe. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkarakterisasi *P. amabilis* transforman pembawa T-DNA dengan konstruksi UBI::Cas9::U3::PDS3 secara genotip dan fenotip dibandingkan dengan *P. amabilis* non-transforman. Karakterisasi genotipe dilakukan dengan mendeteksi integrasi T-DNA pembawa konstruksi UBI::Cas9::U3::PDS3 pada genom anggrek *P. amabilis* menggunakan beberapa primer yaitu HPT, Cas9, PDS3 dan trnL-F (primer kontrol internal). Analisis karakter fenotipe dilakukan dengan pengamatan morfologi dan analisis kadar klorofil menggunakan metode spektrofotometri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa genom anggrek *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi UBI::Cas9::U3::PDS3 umur 12 bulan dapat teramplifikasi oleh semua primer. Analisis fenotipe *P. amabilis* transforman menunjukkan adanya perubahan warna tanaman dari hijau menjadi albino dengan kadar klorofil lebih rendah jika dibandingkan dengan *P. amabilis* non-transforman. Hal ini menunjukkan bahwa teknologi CRISPR/Cas9 dapat digunakan untuk mengedit genom tanaman anggrek. **Kata kunci:** Anggrek, CRISPR/Cas9, Klorofil, *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume, PHYTOENE DESATURASE 3 (PDS3), Transforman.

<sup>1</sup>Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Indonesia  
Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Yogyakarta, 55281

<sup>2</sup>Graduate School of Science, Nagoya University, Japan

<sup>3</sup>Graduate School of Bioagricultural Science, Nagoya University, Japan  
E-mail : endsemi@ugm.ac.id (\*penulis korespondensi)

## PENDAHULUAN

Anggrek (*Orchidaceae*) adalah tanaman hias eksotis yang terdiri lebih dari 800 genus dan 20.000 - 30.000 spesies (Godo *et al.*, 2010; Pangestu *et al.*, 2015). Salah satu genus anggrek yang cukup dikenal oleh masyarakat adalah *Phalaenopsis*. Spesies anggrek genus *Phalaenopsis* yang ditetapkan menjadi bunga nasional Indonesia adalah *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume dengan sebutan “Puspa Pesona Indonesia” (Puspitaningtyas dan Mursidawati, 2010).

Peningkatan kualitas anggrek dengan pembentukan anggrek variasi baru diperlukan untuk mendapatkan warna bunga, corak bunga, jumlah bunga dan ukuran bunga yang sesuai dengan keinginan. Metode transformasi genetika tanaman merupakan salah satu cara yang digunakan untuk menghasilkan anggrek dengan variasi baru. Prinsip transformasi genetika tanaman adalah menyisipkan gen fungsional ke dalam genom tanaman target, antara lain dengan bantuan mediasi dari bakteri *Agrobacterium tumefaciens* untuk meningkatkan kualitas pemuliaan tanaman (Hsing *et al.*, 2016).

Teknologi *CRISPR/Cas9* (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) merupakan salah satu teknik dalam rekayasa genetika untuk menyunting genom pada titik sekuen spesifik (Xu *et al.*, 2014). *CRISPR/Cas9* memiliki efisiensi mutasi yang tinggi sehingga dapat terjadi mutasi tanpa reproduksi seksual. Mekanisme *CRISPR/Cas9* dalam menyunting gen adalah dengan prinsip memotong untai ganda target dan menambahkan rekombinasi homolog pada target (Zhang *et al.*, 2013).

Gen *PHYTOENE DESATURASE 3* (*PDS3*) merupakan gen yang berlokasi di membran tilakoid. Umumnya gen *PDS3* sering digunakan sebagai *common maker gene* di berbagai spesies tanaman karena gen ini mudah dideteksi (Semarti *et al.*, 2020). Gen *PDS3* berperan dalam pengkodean *phytoene desaturase* (*phytoene dehydrogenase*) dan berperan sebagai enzim yang mengkatalisis desaturasi dari *pyhtoene* menjadi *zeta-carotene* selama biosintesis karotenoid. Diketahui bahwa mutasi *PDS3* dapat menyebabkan gangguan fungsi plastida. Gangguan fungsi plastida yang dimaksud adalah tidak terdiferensiasinya plastida pada

tanaman. Hal tersebut dapat menghambat proses pembentukan tilakoid. Tilakoid dalam jumlah minim pada tanaman ditunjukkan dengan penampakan morfologis yang albino. Gen ini hanya berinteraksi dengan gen-gen yang ada di organel fotosintetik sehingga sifat albino yang muncul tidak mempengaruhi viabilitas tanaman (Qin *et al.*, 2007; Brausemann *et al.*, 2017). Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi *P. amabilis* diduga transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS* secara genotipe dan fenotipe serta membandingkannya dengan *P. amabilis* non-transforman.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus – Oktober 2020 di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Sampel yang digunakan adalah planlet *P. amabilis* non-transforman dan transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS* umur 12 bulan yang kemudian diamati karakter fenotipe dan genotipenya. Analisis karakter fenotipe meliputi pengamatan karakter morfologi dan analisis kadar klorofil serta dilakukan pengamatan preparat anatomi daun. Analisis karakter genotipe dengan mendeteksi integrasi T-DNA pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3* pada genom anggrek *P. amabilis* menggunakan primer spesifik untuk gen *HPT*, gen *Cas9* dan *PDS3*, serta fragmen interspace DNA kloroplas *trnL-F* sebagai kontrol internal.

### Pengamatan Karakter Morfologi

Sebanyak 69 planlet yang ditanam pada medium kultur *in vitro* New *Phalaenopsis* (NP) + *activated charcoal* (2 g L<sup>-1</sup>) diamati karakter morfologinya yang meliputi jumlah daun, panjang daun, lebar daun dan warna daun. Sampel didokumentasikan menggunakan kamera, dihitung jumlah daun dan diukur panjang dan lebar daun dengan menggunakan jangka sorong. Warna daun kemudian diamati menggunakan *Royal Horticultural Society Colour Chart* (*Fans 3/green group*) edisi ke-6 (RHS *Color Chart* edisi ke-6). Data kuantitatif dari jumlah, panjang dan lebar daun diolah menggunakan *Microsoft Excel 2016*.

### Analisis Kadar Klorofil

Preparasi masing-masing sampel daun *P. amabilis* non-transforman dan transforman dilakukan dengan cara dipotong dan ditimbang masing-masing dengan berat  $\pm$  100 mg. Sampel diinkubasi pada suhu 20 °C selama 10-15 menit, kemudian diekstraksi dan diukur kadar klorofilnya.

Sampel sebanyak 0.1 g diekstraksi dengan cara digerus menggunakan mortar dan pestel lalu dilarutkan dalam 2 mL metanol dan dimasukkan ke dalam gelas ukur. Mortar dan pestel tersebut dibilas dengan 1.5 mL pelarut (akuades) sebanyak tiga kali lalu dimasukkan ke dalam gelas ukur yang sama. Ekstrak ditera hingga mencapai volume 8 mL. Sampel dimasukkan ke dalam tabung konikal (Biologix volume 15 ml, China) dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 2500 rpm. Supernatan diencerkan menjadi 1 mL ekstrak dan dilarutkan ke dalam 4 mL metanol dan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-Vis 1800, Japan) pada  $\lambda$ 665 nm dan  $\lambda$ 652 nm.

Hasil pengukuran kadar klorofil kemudian dianalisis dan dihitung menggunakan rumus Porra *et al.* (1989). Absorbansi yang telah dibaca pada panjang gelombang 665 nm dan 652 nm dimasukkan ke rumus berikut:

$$[\text{Ch a}] = 16,29 A_{665} - 8,54 A_{652}$$

$$[\text{Ch b}] = 30,66 A_{652} - 13,58 A_{665}$$

Keterangan :

[Ch a] = konsentrasi klorofil a

[Ch b] = konsentrasi klorofil b

### Pembuatan dan Pengamatan Preparat Anatomi Daun

Pembuatan preparat anatomi daun dilakukan menggunakan metode *embedding* merujuk kepada Sutikno (2016). Daun anggrek *P. amabilis* non-transforman dan *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi DNA *UBI::Cas9::U3::PDS3* dicuci dengan air hingga bersih, kemudian dikering anginkan di atas kertas tisu. Kemudian daun dipotong dengan ukuran  $\pm$  1 cm menggunakan silet lalu irisan paradermal diletakkan di atas gelas benda, ditambahkan satu tetes akuades kemudian ditutup dengan kaca penutup. Preparat segar irisan paradermal daun diamati menggunakan mikroskop (Olympus CX21, Japan) perbesaran 400 kali dan optilab

(Miconos, Indonesia) untuk mengetahui perbedaan kloroplas pada tanaman non-transforman dan transforman.

### Analisis Karakter Genotipe

Isolasi DNA genom tanaman dilakukan dengan menggunakan metode Murray & Thompson (1980) merujuk kepada Semiarti *et al.* (2007) dengan modifikasi kecepatan sentrifugasi. Sebanyak 0.1 g daun anggrek *P. amabilis* non-transforman dan *P. amabilis* transforman masing-masing digerus sampai halus menggunakan mortar dan pestel yang telah ditambahkan 500  $\mu$ L larutan *buffer* ekstraksi DNA yang terdiri dari *Cetyltrimethyl Ammonium Bromide* 3% (CTAB 3%), EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8), 0.7 M NaCl. Sampel diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 60 °C selama 30 menit. Larutan kloroform kemudian ditambahkan sebanyak 500  $\mu$ L lalu dihomogenisasi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 140 rpm pada suhu ruang selama 30 menit. Kemudian tutup *microtube* dibuka selama 10 detik untuk mengeluarkan gas yang terbentuk selama homogenisasi dan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 5 menit. Sampel yang diambil yaitu lapisan berwarna bening (*aqueous phase*) dan dimasukkan ke dalam tabung 1.5 mL baru. Isopropanol ditambahkan dengan 1x volume sampel (1:1), kemudian diinversi dan diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Sampel disentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 5 menit. Supernatan lalu dibuang dan pelet DNA dibilas dengan alkohol 70% sebanyak 250  $\mu$ L.

Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 2 menit. Pelet DNA kemudian dikeringkan di dalam inkubator dengan temperatur 37 °C atau suhu ruang selama 15-30 menit. Setelah kering, pelet DNA dilarutkan dengan TE (10T:0,1E) sebanyak 25  $\mu$ L. Sampel DNA yang telah diperoleh kemudian dilakukan pengujian kualitas pada gel agarose 0.8% dengan elektroforesis dalam 1x buffer TAE (*Tris Acetate EDTA*) dengan tegangan listrik 50 volt selama 30 menit. Pengamatan visualisasi kualitas pita-pita DNA dilakukan dengan pewarnaan gel agarose menggunakan 1% larutan EtBr (*Etidium Bromide*) selama 10 menit dan selanjutnya diamati dengan menggunakan UV transilluminator (Extrajene UV3CL, Taiwan), pemotretan dilakukan

dengan kamera Canon SX430 IS (Japan).

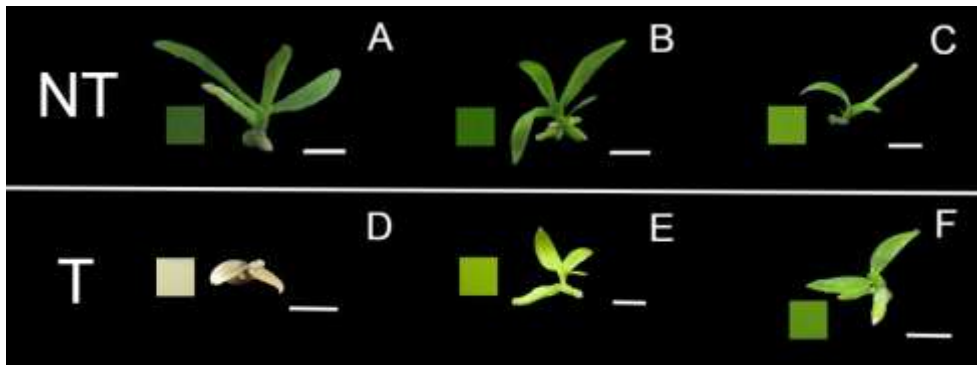
Sampel DNA diamplifikasi dengan beberapa primer spesifik untuk gen-gen *PDS3* (*Phytoene Desaturase 3*), *HPT* (*Hygromycin Phosphotransferase*), *Cas9* (*CRISPR-associated protein 9*) dan primer *trnL-F* (*interspace* DNA kloroplas *trnL* dan *trnF*) sebagai kontrol internal menggunakan BioRad T100 Thermal Cycler dengan komposisi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sebagai berikut: 1  $\mu$ L DNA (100ng/ $\mu$ L), primer 1  $\mu$ L (20 pmol/ $\mu$ L), 12.5  $\mu$ L PCR mix MyTaq™ HS Red Mix 2x (Bioline) dan *Nuclease-free water* 9.5  $\mu$ L sehingga volume akhir menjadi 25  $\mu$ L. Tahapan PCR meliputi pre-denaturasi pada kondisi 95 °C selama 1 menit, denaturasi 95 °C selama 15 detik, penempelan primer (*annealing*) untuk *trnL-F* 57 °C, *PDS3* 60 °C, *HPT* 61 °C, *Cas9* 62 °C selama 15 detik dan ekstensi 72 °C selama 10 detik dengan 35 siklus. Urutan sekuen primer yang digunakan akan diberikan berdasarkan permintaan. Amplikon di cek menggunakan gel elektroforesis dengan konsentrasi 1.2% dengan tegangan 50 volt selama 30 menit. Gel agarose kemudian direndam dalam 1% larutan EtBr selama 10 menit. Pengamatan DNA menggunakan UV transilluminator (Extragen

UV3CL, Taiwan), pemotretan dilakukan dengan kamera Canon SX430 IS (Japan).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan morfologi menunjukkan adanya perbedaan warna daun antara *P. amabilis* non-transforman dan transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3* (Gambar 1). Anggrek *P. amabilis* non-transforman memiliki daun berwarna hijau yang termasuk dalam kelompok warna *Green Group 137 Moderate Olive Green B* (Gambar 1 A), *Green Group 143 Strong Yellow Green A* (Gambar 1 B),

*Green Group 143 Strong Yellow Green C* (Gambar 1 C). Anggrek transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3* memiliki karakter fenotipe daun albino yang termasuk dalam kelompok warna *Yellow-Green Group 150 Light Yellow Green D* (Gambar 1 D), daun berwarna hijau-kekuningan yang termasuk dalam kelompok warna *Yellow-Green Group 149 Brilliant Yellow Green A* (Gambar 1 E), daun berwarna hijau yang termasuk dalam kelompok warna *Green Group 143 Strong Yellow Green C* (Gambar 1 F).



**Gambar 1.** Karakter morfologis anggrek *P. amabilis* non-transforman dan *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi DNA *UBI::Cas9::U3::PDS3*. Keterangan : (NT) Non-transforman, (T) Transforman, (A) Kotak warna hijau menunjukkan RHS *Color Chart* Edisi ke-6 *Green Group 137 Moderate Olive Green B*, (B) Kotak warna hijau menunjukkan RHS *Color Chart* Edisi ke-6 *Green Group 143 Strong Yellow Green A*, (C) Kotak warna hijau menunjukkan RHS *Color Chart* Edisi ke-6 *Green Group 143 Strong Yellow Green C*, (D) Kotak warna putih menunjukkan RHS *Color Chart* Edisi ke-6 *Yellow-Green Group 150 Light Yellow Green D*, (E) Kotak warna hijau-kekuningan menunjukkan RHS *Color Chart* Edisi ke-6 *Yellow-Green Group 149 Brilliant Yellow Green A*, (F) Kotak warna hijau menunjukkan RHS *Color Chart* Edisi ke-6 *Green Group 143 Strong Yellow Green C*. Skala: 1 cm.

Angrek *P. amabilis* non-transforman memiliki daun berwarna hijau yang tergolong dalam kelompok warna *green group* sedangkan *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi DNA *UBI::Cas9::U3::PDS3* memiliki tiga jenis variasi warna yaitu daun albino/putih dan hijau-kekuningan yang tergolong dalam kelompok warna *yellow-green group* serta daun berwarna hijau yang termasuk kelompok *green group*. Perbedaan ini dipengaruhi oleh kadar klorofil dan morfologi kloroplas yang terkandung pada setiap tanaman (Gambar 2 dan Gambar 3).

Diketahui dari penelitian ini bahwa daun transforman memiliki fenotipe berwarna putih pucat atau albino. Hal ini terjadi diduga karena adanya mutasi pada genom tanaman. Berdasarkan penelitian Semiarti *et al.* (2020) ditemukan bahwa metode *CRISPR/Cas9* dapat digunakan untuk mengedit genom pada protokorm angrek *P. amabilis*. Analisis sekuen pada target *PDS3* menunjukkan adanya mutasi dengan *knock out system* atau adanya delesi nukleotida selama proses perbaikan internal DNA. Proses perbaikan DNA ini disebut dengan mutasi gen *non-homologous end joining* (NHEJ) yang menghasilkan gen yang menjadi non-fungsional atau ter-*knock-out*. Mutasi ini menginduksi perubahan pada sekuen asam amino yang terjadi dan dapat mengganggu proses biosintesis karotenoid sehingga menyebabkan tidak terdiferensiasinya plastida. Hal tersebut dapat menghambat proses pembentukan tilakoid. Tilakoid dalam jumlah minimum pada tanaman ditunjukkan dengan penampakan morfologis albino atau

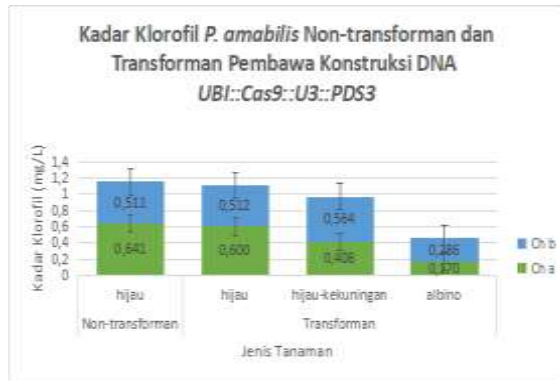
munculnya bercak putih pada daun (Qin *et al.*, 2007).

Warna hijau dan hijau-kekuningan pada *P. amabilis* transforman di duga terjadi karena pada proses pengeditan genom menggunakan *CRISPR/Cas9* terjadi kesalahan pemotongan *target site* atau sering disebut dengan *off-targeted*. T-DNA berhasil masuk ke dalam genom tanaman namun dimungkinkan untuk terinsersikan pada *target site* lain, sedangkan yang diharapkan adalah pengeditan genom yang bersifat *targeted/knock out* sesuai gen sasaran. Kesalahan pemotongan *target site* ini kemungkinan terjadi akibat PAM (*protospacer adjacent motif*) tidak dapat mengenali target sekuen yang dituju (Zhang *et al.*, 2015).

Parameter morfologis *P. amabilis* non-transforman dan transforman umur 12 bulan yang meliputi jumlah daun, panjang daun, dan lebar daun (Tabel 1) menunjukkan rerata jumlah daun pada *P. amabilis* non-transforman dan transforman berdaun hijau adalah  $4 \pm 1$  helai sedangkan pada *P. amabilis* transforman berdaun hijau-kekuningan adalah  $3 \pm 1$  helai dan transforman berdaun albino adalah  $2 \pm 0$  helai. Rerata panjang daun, non-transforman adalah  $16.06 \pm 1.09$  mm sedangkan transforman berdaun hijau adalah  $14.78 \pm 1.33$  mm, transforman berdaun hijau-kekuningan adalah  $14.55 \pm 1.35$  mm, transforman berdaun albino adalah  $3.79 \pm 1.12$  mm. Rerata lebar daun, non-transforman adalah  $4.86 \pm 0.66$  mm sedangkan transforman berdaun hijau adalah  $4.76 \pm 0.72$  mm, transforman berdaun hijau-kekuningan adalah  $4.44 \pm 1.99$  mm, transforman berdaun albino adalah  $2.02 \pm 0.42$  mm.

**Tabel 1.** Parameter morfologis daun *P. amabilis* non-transforman dan transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3*

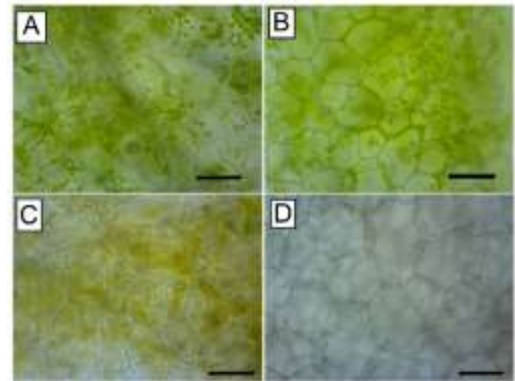
Parameter (Rerata)	Angrek <i>P. amabilis</i>			
	Non-transforman	Transforman pembawa konstruksi <i>UBI::Cas9::U3::PDS3</i>		
		Daun Hijau	Daun Hijau-kekuningan	Daun Albino
Jumlah daun (helai)	$4 \pm 1$	$4 \pm 1$	$3 \pm 1$	$2 \pm 0$
Panjang daun (mm)	$16.05 \pm 1.09$	$14.78 \pm 1.33$	$14.55 \pm 1.35$	$3.79 \pm 1.12$
Lebar daun (mm)	$4.86 \pm 0.66$	$4.76 \pm 0.72$	$4.44 \pm 1.19$	$2.02 \pm 0.42$



**Gambar 2.** Kadar klorofil *P. amabilis* non-transforman dan transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3*. Detail : (Ch a) Klorofil a, (Ch b) Klorofil b

Tanaman dengan daun albino menunjukkan tingkat pertumbuhan daun yang lebih rendah dibandingkan dengan tanaman dengan daun berwarna hijau maupun hijau-kekuningan, yang meliputi jumlah daun, panjang daun dan lebar daun. Namun demikian, daun *P. amabilis* non-transforman dan transforman berdaun hijau dan berdaun hijau-kekuningan memiliki kemiripan yang tinggi dalam jumlah daun, panjang daun dan lebar daun.

Kadar klorofil pada daun non-transforman lebih tinggi dibandingkan dengan daun transforman (Gambar 2). Total kadar klorofil non-transforman adalah  $1.152 \text{ mg L}^{-1}$  (klorofil a =  $0.641 \text{ mg L}^{-1}$ ; klorofil b =  $0.511 \text{ mg L}^{-1}$ ) sedangkan total kadar klorofil pada transforman berdaun hijau adalah  $1.112 \text{ mg L}^{-1}$  (klorofil a =  $0.600 \text{ mg L}^{-1}$ ; klorofil b =  $0.512 \text{ mg L}^{-1}$ ), total kadar klorofil transforman berdaun hijau-kekuningan adalah  $0.972 \text{ mg L}^{-1}$  (klorofil a =  $0.408 \text{ mg L}^{-1}$ ; klorofil b =  $0.564 \text{ mg L}^{-1}$ ), total kadar klorofil transforman berdaun albino adalah  $0.456 \text{ mg L}^{-1}$  (klorofil a =  $0.170 \text{ mg L}^{-1}$ ; klorofil b =  $0.286 \text{ mg L}^{-1}$ ). Kadar klorofil berkaitan dengan jumlah dan kondisi morfologis serta fisiologis dari kloroplas. Daun berwarna pucat atau bahkan albino mengandung klorofil namun dengan kadar yang lebih rendah dibandingkan dengan daun berwarna hijau segar. Kadar klorofil yang berbeda menunjukkan bahwa adanya perbedaan jumlah domain asam amino FtSH pada tanaman yang disebabkan oleh terjadinya

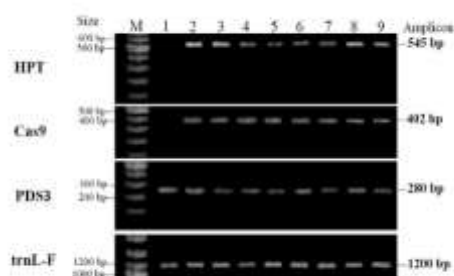


**Gambar 3.** Irisan paradermal daun *P. amabilis* non-transforman dan transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3*. Detail : (A) Daun *P. amabilis* non-transforman (B) Daun hijau *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3* (C) Daun hijau-kekuningan *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3* (D) Daun albino *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3*. Skala :  $100 \mu\text{m}$

mutasi gen. Kloroplas merupakan struktur perkembangan dari proplastid. Mutasi gen *PDS3* dapat menyebabkan perkembangan kloroplas terganggu dan dapat menyebabkan daun mengalami defisiensi pigmen (Qin *et al.*, 2007).

Gambar 3 menunjukkan irisan paradermal daun (penampang samping atau sejajar epidermis) *P. amabilis* non-transforman dan *P. amabilis* transforman. Terdapat kloroplas dewasa berwarna hijau pada *P. amabilis* non-transforman dan *P. amabilis* transforman berdaun hijau, sedangkan pada transforman berdaun hijau-kekuningan terdapat kloroplas dewasa berwarna hijau-kekuningan. *P. amabilis* transforman berdaun albino memiliki kloroplas yang belum sempurna terbentuk (proplastida) dan berwarna sangat pucat bahkan putih. Hal ini kemungkinan dikarenakan perkembangan proplastida menjadi kloroplas terhambat dan mengalami defisiensi (Qin *et al.*, 2007).





**Gambar 4.** Deteksi integrasi konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3* pada genom *P. amabilis*. M : 100 bp (*GeneRuler*) ; Lajur 1: *P. amabilis* non-transforman, Lajur 2-9: *P. amabilis* transforman pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3*.

Karakterisasi genotipe dilakukan dengan deteksi integrasi konstruksi T-DNA pembawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3* pada angrek *P. amabilis* transforman yang dibandingkan dengan non-transforman. Gambar 4 menunjukkan genom DNA *P. amabilis* transforman umur 12 bulan terbukti positif terintegrasi secara stabil membawa T-DNA dengan konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3* dengan teramplifikasinya fragmen gen *HPT* (545 bp) dan *Cas9* (402 bp) (Gambar 4 lajur 2-9). Fragmen DNA *trnL-F* (1 200 bp) dan gen *PDS3* (280 bp) setiap sampel tanaman dapat teramplifikasi (Gambar 4 lajur 1-9). Hal ini disebabkan *trnL-F* merupakan *interspace* DNA spesifik yang berlokasi di genom kloroplas pada setiap tanaman. Oleh sebab itu, *trnL-F* tepat digunakan sebagai kontrol internal pada tanaman (Hao *et al.*, 2009).

Gen *PDS3* (*PHYTOENE DESATURASE3*) terdapat di membran tilakoid dan berperan pada proses pembentukan tilakoid dan biosintesis karotenoid. Nama lain dari gen AT4G14210 ini adalah *DL3145C*, *FCAALL.28*, *PIGMENT DEFECTIVE 226* (Qin *et al.*, 2007). Pada umumnya gen *PDS3* sering digunakan sebagai gen penanda di berbagai spesies tanaman karena tanaman mutan *pds3* mudah dideteksi secara morfologis (Semiarti *et al.*, 2020; Nopitasari *et al.*, 2019). Mutasi pada struktur gen *PDS3* dapat menyebabkan fenotipe tanaman menjadi albino atau terdapat bercak putih pada daunnya (Koschmieder *et al.*, 2017). Gen *HPT* (*HYGROMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE*) adalah gen resisten

terhadap antibiotik higromisin, berfungsi sebagai marka untuk seleksi transforman pada medium kultur *in vitro*. Jika organisme dapat bertahan hidup pada medium kultur yang mengandung antibiotik higromisin maka organisme tersebut otomatis terseleksi dan menjadi kandidat transforman (Ouwerkerk *et al.*, 2001).

## KESIMPULAN

Angrek *P. amabilis* transforman umur 12 bulan tetap stabil membawa konstruksi *UBI::Cas9::U3::PDS3* pada genomnya. Fenotipe *P. amabilis* transforman hasil *genome editing* dengan *CRISPR/Cas9* menunjukkan adanya perubahan warna daun, antara lain menjadi hijau kekuningan dan albino dengan kadar klorofil yang lebih rendah jika dibandingkan dengan *P. amabilis* non-transforman.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Kementerian Riset dan Teknologi RI/BRIN yang telah memberikan dana untuk penelitian ini dengan hibah Desentralisasi Skema Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) 2020 dengan kontrak No.: 6/AMD/KP.PTNBH/2020 dan Surat Perjanjian No: 2723/UN1/DITLIT/DITLIT/PT/2020 yang merupakan lanjutan dari Hibah Penelitian Kerjasama Luar Negeri (PKLN) dengan kontrak No.: 2791/UN1.DITLIT/DIT-LIT/LT/2019, dan Hibah Japan Society for the Promotion of Sciences (JSPS)-BJRP 2018-2020 kontrak No. 219/D3/PG/2019.

## DAFTAR PUSTAKA

- Brausemann, A., S. Gemmecker., J. Koschmieder., Ghisla, S., P. Beyer., O. Einsle. 2017. Structure of Phytoene Desaturase Provides Insights into Herbicide Binding and Reaction Mechanisms Involved in Carotene Desaturation. *Structure*. 25:1222-1232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2017.06.002>

- Godo, T., M. Komori., E. Nakaoki., T. Yukawa., K. Miyoshi. 2010. Germination of Mature Seeds of *Calanthe tricarinata* Lindl., an Endangered Terrestrial Orchid, by Asymbiotic Culture *In Vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. 46:323-328. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9271-1>
- Hao, C., B.L. Huang., S.L. Chen., J. Mu. 2009. Evolution of the chloroplast trnL-trnF region in the gymnosperm lineages taxaceae and cephalotaxaceae. *Biochemical Genetics*. 47:351-169. <https://doi.org/10.1007/s10528-009-9233-7>
- Hsing, Hong-Xian., Yi-Jyun, Lin., Chii-Gong, Tong., Min-Jeng, Li., Yun-Jin, Chen., Swee-Suak, Ko. 2016. Efficient and heritable transformation of *Phalaenopsis* orchid. *Bot Stud*. 57:1-12. <https://doi.org/10.1186/s40529-016-0146-6>
- Koschmieder, J., M. Fehling-Kaschek., P. Schaub., S. Ghisla., A. Brausemann., J. Timmer., P. Beyer. 2017. Plant-type phytoene desaturase: Functional evaluation of structural implications. *PLoS ONE*. 12(11): e0187628. <https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0187628>
- Nopitasari, S., Y. Setiawati., M.D. Lawrie., A. Purwantoro., J. Widada., A.B. Sasongko., Y. Yoshioka., S. Matsumoto., K. Ninomiya., Y. Asano., E. Semiarti. 2019. Development an *Agrobacterium*-delivered *CRISPR/Cas9* for *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume Genome Editing System. Prosiding The 6th International Conference on Biological Science ICBS 2019. <https://doi.org/10.1063/5.0015868>
- Ouwerkerk, P.B.F., R.J. Hoge., A.H. Meijer. 2001. Glucocorticoid-inducible gene expression in rice. *Planta*. 213:370-378. <https://doi.org/10.1007/s004250100583>
- Pangestu, F., S.A. Aziz., D. Sukma. 2015. Karakterisasi Morfologi Anggrek *Phalaenopsis* Hibrida. *Jurnal Hortikultura Indonesia*. 5(1):29-35. <https://doi.org/10.29244/jhi.5.1.29-35>
- Porra, R.J., W.A. Thompson., P.E. Kricdemann. 1989. Determination of Accurate Extinction Coefficients and Simultaneous Equations for Assaying Chlorophylls a and b Extracted with Four Different Solvents: Verification of the Concentration of Chlorophyll Standards by Atomic Absorption Spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 975:384-394. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(89)80347-0)
- Puspitaningtyas, D.M. & Mursidawati. 2010. *Koleksi Anggrek Kebun Raya Bogor*. UPT Balai Pengembangan Kebun Raya-LIPI. Bogor
- Qin G., Gu H., Ma L., Peng Y., Deng X.W., Chen Z and Qu L. 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research* volume 17, pages471–482 <https://doi.org/10.1038/cr.2007.40>
- Semiarti, E., A. Indrianto., A. Purwantoro., S. Isminingsih., N. Suseno., T. Ishikawa., Y. Yoshioka., Y. Machida., C. Machida. 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of the wild orchid species *Phalaenopsis amabilis*. *Plant Biotechnology*. 24: 265-272. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.24.265
- Semiarti, E., S. Nopitasari., Y. Setiawati., M.D. Lawrie., A. Purwantoro., J. Widada., K. Ninomiya., Y. Asano., S. Matsumoto., Y. Yoshioka. 2020. Application of *CRISPR/Cas9* genome editing system for molecular breeding of orchids. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 25(1):61-68. <https://doi.org/10.22146/ijbiotech.39485>



- Sutikno. 2016. Buku Panduan Mikroteknik Tumbuhan. Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan. Universitas Gadjah Mada.
- Xu, R., H. Li., R. Qin., L. Wang., L. Li., P. Wei., J. Yang. 2014. Gene targeting using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated *CRISPR-Cas* system in rice. Springer Open Journal. 7:5. <https://doi.org/10.1186/s12284-014-0005-6>
- Zhang, X. H., L.Y. Tee., X.G. Wang., Q.S. Wang., Q.S. Huang., S.H. Yang. 2015. Off-target Effect in CRISPR/Cas9 mediated Genome Engineering. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 4:1-6. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37>
- Zhang, Y., N. B.J. Heidrich., C.W. Ampattu., C.W. Gunderson., H.S. Seifert., C. Schoen., J. Vogel., E.J. Sontheimer. 2013. Processing-independent *CRISPR* RNAs limit natural transformation in *Neisseria meningitidis*. Mol. Cell, 50:488-503. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.001>