

## **REVIEW: INDUKSI KERAGAMAN BERBASIS BIOTEKNOLOGI PADA TANAMAN ANGGREK (*Orchids Sp.*)**

### **Review: Induction of Diversity Based on Biotechnology in Orchids**

Sudirman, Nirwansyah Amier\*, M. Alfian Ikhlasul Amal

Departemen Agronomi, Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin

\*Email: amieramier1819@gmail.com

#### **ABSTRAK**

Anggrek (*Orchids Sp.*) merupakan tanaman hias yang banyak dikenal oleh masyarakat karena keindahannya. Namun saat ini kendala yang banyak dihadapi oleh masyarakat pada umumnya dan khususnya para pelaku usaha budidaya anggrek adalah keterbatasan dalam pengetahuan perbanyakan anggrek. Melangkah pada pokok permasalahan tersebut, maka dalam review ini akan dijelaskan metode dalam perbanyakan anggrek melalui bioteknologi untuk memperbanyak keragaman. Ada tiga metode yang akan dijelaskan yaitu metode berbasis mutasi (Polyploidi/kolkisin dan Iridiasi gamma), transgenetik (mikroRNA dan agrobacterium) dan molekuler (CRISPR/Cas9). Dalam ulasan ini, kami mengkonsolidasikan kemajuan terbaru dalam penelitian tentang transisi bunga dan perkembangan bunga anggrek yang menekankan pada metode induksi keragaman, dan juga memperkenalkan beberapa kasus manipulasi yang berhasil dari pembungaan atau perkembangan bunga melalui penerapan pemuliaan bioteknologi.

**Kata Kunci: Anggrek, Mutasi, Molekuler, Transgenetik.**

#### **ABSTRACT**

Orchids (*Orchids Sp.*) is an ornamental plant that is widely known by the public because of its beauty. However, currently the obstacles faced by many people in general and especially the orchid cultivation business actors are limitations in the knowledge of orchid propagation. Stepping on the subject matter, this review will explain the method of propagation of orchids through biotechnology to increase diversity. Three methods will be explained, namely mutation-based methods (polyploidy/colchicine and gamma irradiation), transgenic (microRNA and agrobacterium) and molecular (CRISPR/Cas9) methods. In this review, we consolidate recent advances in research on flower transition and orchid flower development with an emphasis on diversity induction methods, and also introduce several cases of successful manipulation of flowering or flower development through the application of biotechnology breeding.

**Key words: Mutation, Molecular, Orchid, Transgenic.**

#### **PENDAHULUAN**

Anggrek (*Orchids Sp.*) merupakan tanaman hias yang banyak dikenal oleh masyarakat karena keindahannya. Saat ini, sebanyak 29.199 spesies anggrek dengan beberapa ratus nama spesies baru diidentifikasi dan diterbitkan setiap tahunnya (370 di 2013) serta diperkirakan secara total sebanyak 31.000 spesies anggrek (Govaerts et al., 2017; Joppa et al., 2011).

Saat ini, tanaman anggrek bukan hanya sebatas sebagai tanaman hias namun sudah menjadi komoditas ekspor yang memiliki nilai jual yang tinggi. Saat ini, industri anggrek sudah bernilai jutaan dolar, seperti di beberapa negara yaitu Australia, Malaysia, Singapura, Thailand

dan beberapa negara lainnya. Anggrek berada di posisi keenam dari sepuluh besar bunga potong di dunia khususnya anggrek jenis *Cymbidium* menyumbang 3% dari total produksi bunga potong (De dan Debnath, 2011).

Namun saat ini kendala yang banyak dihadapi oleh masyarakat pada umumnya dan khususnya para pelaku usaha budidaya anggrek adalah keterbatasan dalam pengetahuan perbanyakan anggrek. Upaya perbanyakan anggrek dapat dilakukan melalui kegiatan pembudidayaan dengan jalan perbanyakan anggrek secara vegetatif, generatif, maupun melalui kultur jaringan. Perbanyakan secara vegetatif dapat dilakukan melalui pemisahan rumpun, stek batang maupun pemisahan keki. Untuk saat ini, teknologi perbanyakan anggrek

yang banyak dikembangkan adalah melalui kultur jaringan. Hal ini, karena metode ini dianggap efektif mengingat hasil yang diperoleh bisa dalam jumlah yang banyak dan dalam waktu yang cukup singkat. Selain itu, melalui sistem kultur jaringan maka kualitas bunga anggrek dapat ditingkatkan. Keunggulan bunga anggrek ditentukan oleh warna, ukuran, bentuk, susunan, jumlah kuntum bunga pertangkai, panjang tangkai dan daya tahan kesegaran bunga anggrek (Widiastoety et al., 2010).

Melangkah pada pokok permasalahan tersebut, maka dalam review ini akan dijelaskan metode dalam perbanyak anggrek melalui bioteknologi untuk memperbanyak keragaman. Ada tiga metode yang akan dijelaskan yaitu metode berbasis mutasi, transgenik dan molekuler. Hal ini sangat penting dikarenakan dalam review ini akan didapatkan hasil dari setiap metode sehingga mampu memberikan pemahaman mengenai perbanyak keragaman anggrek melalui induksi berbasis bioteknologi. Dalam ulasan ini, kami mengkonsolidasikan kemajuan terbaru dalam penelitian tentang transisi bunga dan perkembangan bunga anggrek yang menekankan pada metode induksi keragaman, dan juga memperkenalkan beberapa kasus manipulasi yang berhasil dari pembungaan atau perkembangan bunga melalui penerapan pemuliaan bioteknologi.

## **1.1 Induksi Keragaman *Orchids Sp.* Berbasis Mutasi**

### **1.1.1 Mutasi Polyploid (Kolkisin)<sup>1</sup>**

Sejak penemuan anggrek tetraploid *Phalaenopsis* asli yang memiliki bentuk bunga dan intensitas warna yang lebih baik memprakarsai terciptanya berbagai hibrida komersial yang signifikan melalui perkembangbiakan poliploid. Selama dua dekade terakhir, program sukses untuk mengubah 20 spesies *Phalaenopsis* diploid menjadi tetraploid (Chen et al., 2011). Poliploidisasi biasanya dicapai dengan memasukkan kolkisin pada tanaman pertanian atau hortikultura termasuk anggrek (Azmi et al., 2016; Tuwo and Indrianto, 2016).

Konsentrasi kolkisin yang lebih tinggi menghasilkan polong yang lebih pendek pada 16 minggu setelah subkultur (WAP). Beberapa polong yang diberi kolkisin kering dan mati yang dapat disebabkan toksisitas kolkisin yang dicapai pada konsentrasi tinggi (1000 dan 2000 mg/L). Perlakuan konsentrasi 1000 sampai

10000 mg/L menyebabkan tunas jatuh dan perlakuan konsentrasi 2000 mg/L pada kuncup muda *Lilium* menyebabkan persentase kematian hingga 81,3 dan 47,0% untuk varietas Con Amore dan Acapulco (Nakasone, 1960; Wu et al., 2007).

Persentase jumlah polong dan biji berkecambah dipengaruhi secara signifikan oleh konsentrasi kolkisin. Persentase jumlah polong menurun pada konsentrasi kolkisin yang lebih tinggi. Polong dengan perlakuan kolkisin konsentrasi tinggi menghasilkan sangat sedikit biji yang berkecambah, seperti 500 mg/L selama tiga hari, 1000 mg/L selama lima hari, dan 2000 mg/L selama tiga dan lima hari. Hasil tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi kolkisin yang lebih tinggi tidak hanya berpengaruh pada penampilan polong, tetapi juga pada bagian dalam dimana terjadi pembentukan dan perkembangan embrio.

Penapisan semai putatif poliploid mutan dilakukan secara visual dengan membandingkan semai diploid kontrol dan semai yang diperoleh dari perlakuan kolkisin pada 16 WAS. Skrining bibit yang diperoleh dari perlakuan kolkisin 50 mg L<sup>-1</sup> selama tiga hari, 50 mg L<sup>-1</sup> selama lima hari, dan 500 mg L<sup>-1</sup> selama lima hari, menghasilkan persentase bibit poliploid putatif (PMS) 27,35, 39,20, dan 92,80% masing-masing. Terdapat perbedaan yang signifikan berdasarkan uji kontras ortogonal untuk beberapa karakter yang diamati, seperti panjang dan lebar organ basal pitocorn (BOP), panjang daun, serta panjang dan diameter akar, antara semai dengan kontrol diploid dan semai yang diperoleh dari semua perlakuan kolkisin. Bahkan, PMS dari semua pengobatan kolkisin memiliki panjang dan lebar 1,5 kali BOP dibandingkan dengan bibit normal (NS). Hasil serupa dicatat dari konsentrasi colchicines 50 mg L<sup>-1</sup> selama tiga dan lima hari, dan 500 mg L<sup>-1</sup> selama lima hari. Perubahan poliploid yang diberi perlakuan kolkisin bervariasi atau tergantung spesies dan mungkin tidak selalu muncul dalam bentuk raksasa, terutama pada kondisi in vitro. Pengamatan anatomi mengungkapkan bahwa PMS dari semua pengobatan kolkisin memiliki panjang dan lebar stomata abaksial secara signifikan lebih besar daripada NS.

Konsentrasi kolkisin 50 mg L<sup>-1</sup> selama tiga dan lima hari, dan 500 mg L<sup>-1</sup> selama lima hari efektif untuk mendapatkan bibit mutan poliploid. Kolkisin pada 50 mg L<sup>-1</sup> selama tiga dan lima hari memiliki persentase bibit mutan

poliploidi 60% dari keseluruhan PMS yang diperiksa. Persentase tertinggi semai mutan poliploidi diperoleh dari konsentrasi kolkisin 500 mg L<sup>-1</sup> selama lima hari, dengan semua PMS yang diperiksa teridentifikasi sebagai semai mutan poliploidi.

### **1.1.2 Mutasi Iridiasi Gamma<sup>2</sup>**

#### **1.1.2.1 Pengaruh dosis radiasi gamma yang berbeda pada PLB *Dendrobium Sonia-28***

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian Dehghi dan Joniyasa (2017) menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan yang diamati antara dosis iradiasi yang berbeda. Dalam penelitian ini, penurunan bertahap dalam tingkat kelangsungan hidup dan pertumbuhan berat selanjutnya dari populasi yang dirawat diamati dengan peningkatan dosis radiasi yang sesuai. Tingkat kelangsungan hidup PLB yang diobati dengan radiasi gamma menurun dibandingkan dengan kontrol berkisar dari 9,8 dengan kontrol yang tidak diobati menjadi 0,6 pada 200 Gy. Ada penurunan yang signifikan dalam tingkat kelangsungan hidup PLB sementara dosis radiasi gamma meningkat sedangkan PLB yang diradiasi dengan dosis rendah radiasi gamma menunjukkan penurunan tingkat kelangsungan hidup yang dapat diabaikan. Lebih lanjut, nilai LD50 dari pengobatan PLB yang diperkirakan pada akhir empat minggu tercatat pada 43 Gy.

#### **1.1.2.2 Pengamatan morfologi permukaan PLB**

Pengamatan morfologi permukaan *Dendrobium Sonia-28* PLB di bawah *scanning electron microscope* (SEM). Pengamatan SEM dimulai dalam kondisi cahaya setelah satu bulan penyinaran. Permukaan PLB yang kaya stomata dapat dilihat dengan jelas di bawah SEM. Kerusakan permukaan PLB yang diradiasi semakin intensif dengan meningkatnya dosis radiasi. Tidak ada pengaruh yang signifikan dari dosis yang lebih rendah pada ukuran stomata. Namun, stomata dalam dosis tinggi PLB yang diradiasi secara signifikan berkurang ukurannya. Apalagi studi yang dilakukan oleh Ahuja *et al.* (2014) melaporkan bahwa dosis iradiasi gamma yang lebih tinggi mengakibatkan penghambatan konduktansi stomata. Pergerakan stomata diatur oleh banyak faktor abiotik dan biotik, termasuk radiasi dan hormon tanaman etilen.

Demikian juga dinyatakan bahwa tidak terjadi perubahan ultrastruktur pada organel sel yang terjadi pada dosis iradiasi gamma 0 sampai 5 Gy. Sedangkan pemberian gamma dosis relatif tinggi mengakibatkan perubahan struktur kloroplas dan terganggunya membran organel. Mereka juga melaporkan bahwa beberapa bagian dari mitokondria telah diubah secara struktural. Sinar gamma menyebabkan kloroplas kehilangan integritas struktural. Pola teratur grana dan stroma tilakoid terganggu, dan beberapa tilakoid tampak sedikit melebar. Sebagian besar stroma menampilkan tampilan kristal, yang dapat meningkatkan tekanan air yang diberikan oleh perlakuan iradiasi gamma.

#### **1.1.2.3 Pengamatan TEM PLB *Dendrobium Sonia-28* setelah perlakuan iradiasi sinar gamma**

Efek radiasi gamma pada sel PLB dianalisis menggunakan Mikroskop Elektron Transmisi (TEM). Analisis TEM menunjukkan bahwa vakuola sentral besar, kloroplas dan mitokondria yang tidak rusak serta membran plasma utuh lebih banyak diamati pada sel PLB yang tidak diradiasi

#### **1.1.2.4 Keragaman genetik planlet hasil iradiasi**

Lima primer yang berbeda menghasilkan berbagai pita mono dan polimorfik dan digunakan untuk menilai dan membandingkan kesetiaan genetik PLB yang diperoleh dari PLB yang diradiasi dibandingkan dengan PLB yang tidak diradiasi. Kelima primer tersebut menghasilkan pita 48, 46, 46, 45, 43, 46, 38, 39, 36, 32 dan 31 pada kontrol, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150 dan 200 Gy PLB iradiasi, masing-masing. Ukuran produk amplifikasi ini berkisar antara 100bp dan 3000 bp. Terdapat pita polimorfik 2.1, 2.1, 12.5, 8.3, 12.5, 10.4, 4.2 dan 6.3% dibandingkan dengan kontrol untuk PLB iradiasi 30, 40, 50, 60, 80, 100, 150 dan 200 Gy. Nilai indeks kesamaan berkisar antara 0 sampai 1,0. Panjang dan jumlah cabang berkurang pada planlet setelah dosis iradiasi gamma PLB yang lebih tinggi. Jumlah tunas tertinggi diperoleh dari PLB yang tidak diberi perlakuan dan yang diberi perlakuan dosis rendah dengan sekitar dua tunas lepas sedangkan iradiasi pada dosis yang lebih tinggi hanya menghasilkan satu tunas. Iradiasi sinar gamma menunda munculnya tunas planlet, selain itu dosis gamma yang lebih tinggi mengurangi rata-rata jumlah tunas yang

dihasilkan tiap planlet. Umumnya panjang tunas anakan berkurang secara bertahap seiring dengan peningkatan dosis. Panjang tunas maksimum diamati pada planlet yang tidak diberi perlakuan sedangkan penurunan panjang tunas tertinggi diamati setelah dosis iradiasi 100 Gy.

#### **1.1.2.5 Ciri morfologi planlet in vitro setelah perlakuan iradiasi sinar gamma**

Hubungan antara pertumbuhan PLB yang diradiasi dan dosis radiasi gamma telah dibuktikan dengan menyelidiki perubahan morfologi dan pertumbuhan planlet yang dirawat dan yang tidak. Karakteristik morfologi plantlet terus menurun seiring dengan peningkatan dosis iradiasi selama enam bulan setelah penyinaran.

Panjang dan jumlah cabang berkurang pada planlet setelah dosis iradiasi gamma PLB yang lebih tinggi. Panjang tunas maksimum diamati pada planlet (0,8 cm) yang tidak diberi perlakuan sedangkan penurunan panjang tunas tertinggi diamati setelah dosis iradiasi 100 Gy (0,3 cm).

Pada penelitian ini peningkatan dosis radiasi sinar gamma menyebabkan penurunan rata-rata jumlah daun planlet hasil PLB *Dendrobium Sonia-28*. Hanya ada 3 daun yang tercatat untuk plantlet dosis tinggi yang diradiasi sedangkan untuk kontrol dan perlakuan dengan dosis iradiasi gamma yang lebih rendah, rata-rata jumlah daun 4 dan 5 daun per planlet. Penurunan jumlah akar maksimum diamati setelah dosis radiasi gamma 150 Gy. Peningkatan dosis iradiasi menyebabkan perkembangan akar terhambat sehingga menyebabkan ukuran akar yang buruk dan jumlah akar per planlet yang lebih sedikit.

Sementara dosis yang lebih tinggi dari radiasi gamma menghambat pertumbuhan planlet, tidak ada kelainan morfologi yang signifikan yang diamati menggunakan dosis sinar gamma yang lebih rendah.

## **1.2 Induksi Keragaman *Orchids Sp.* Berbasis Transgenik**

### **1.2.1 Micro-RNA**

#### **1.2.1.1 Pembuatan resistansi virus ganda yang menargetkan RdRp dari CymMV dan ORSV**

RdRp sangat penting untuk replikasi virus. Konstruksi amiRNA yang menargetkan RdRp virus dapat memberikan ketahanan yang

lebih kuat dari tanaman inang terhadap infeksi virus. Strateginya adalah untuk mengidentifikasi target amiRNA yang sesuai dengan menggunakan Web MicroRNA Designer mengikuti kriteria pemilihan. Dengan menghindari sekuens *off-target* potensial dan termostabilitas rendah, sekuens CymMV amiRNA yang dipilih mengandung 21-nt yang melengkapi nukleotida 952–972 CymMV RdRp. Urutan ORSV amiRNA yang dipilih adalah 5'-TTTTCGGGTAAACCCCTT-3', sesuai dengan nukleotida 3040-3060 ORSV RdRp. Setelah pencarian BLAST, tidak ada gen *N. benthamiana* yang melengkapi urutan 21-nt dari amiR-CymMV atau amiR-ORSV yang cocok. Urutan ini menggantikan 21 nukleotida miRNA dewasa dalam prekursor *Oryza sativa* miR528, dimasukkan ke dalam vektor pG0229 untuk membuat konstruksi pG0229-preamiRNA-CymMV-ORSV. Mengingat tujuan jangka panjang kami untuk menghasilkan anggrek transgenik yang tahan virus, kami memilih prekursor osa-miR528 yang dilestarikan monokotil sebagai tulang punggung konstruksi. Berdasarkan laporan keberhasilan penggunaan amiRNA berdasarkan prekursor osa-MIR528 yang menargetkan *N. benthamiana* UPF1 untuk membungkam transkrip UPF131, kami mengadopsi *backbone* pra-miR528 untuk menghasilkan amiRNA yang menargetkan RNA RdRp dari CymMV dan ORSV.

#### **1.2.1.2 Verifikasi integrasi transgen menggunakan analisis Southern blot**

Upaya untuk menggabungkan transgen menjadi progeni berurutan dengan melintasi garis transgenik diferensi berhasil dan diverifikasi dengan Southern blot. Sebanyak sebelas jalur transgenik T0 yang diduga dipilih untuk pengujian resistansi virus. Tanaman T0 positif disilangkan sendiri untuk menghasilkan T1 dan kemudian tanaman transgenik T2. Garis pohon tanaman transgenik T2 yang tidak menunjukkan gejala infeksi campuran CymMV dan ORSV dipilih untuk disilangkan untuk menghasilkan tanaman transgenik F1 yang mengandung masing-masing transgen dari kedua tetuanya. Nomor salinan transgen dari tanaman transgenik generasi F2 dan F3 menunjukkan salinan transgen tunggal.

#### **1.2.1.3 Persentase resistensi yang tinggi terhadap CymMV**

Untuk menguji resistensi CymMV yang diberikan oleh amiRNA-CymMV-ORSV pada

tanaman *N. benthamiana* transgenik generasi F3 dan F4, progenik tipe liar dan transgenik yang menyimpan amiRNA-CymMV-ORSV ditantang dengan CymMV pada tahap enam daun. Pada 21 hari pasca inokulasi, gejala khas CymMV diamati pada semua tanaman tipe liar. Namun, semua tanaman transgenik amiRNA-CymMV-ORSV menunjukkan tingkat resistensi yang tinggi, dan tidak ada gejala penyakit yang terlihat. Tidak adanya virus dalam ekstrak daun sistemik tanaman transgenik amiRNA-CymMV-ORSV yang diinokulasi secara individual pada 21 dpi dikonfirmasi oleh western blot.

Berdasarkan hasil transgenik amiRNA tanaman *N. benthamiana* yang ditantang virus, tanaman transgenik yang diuji memang resisten terhadap CymMV, mengingat tidak adanya gejala dan protein mantel virus pada tanaman yang diinokulasi. Di sini, kami menunjukkan bahwa konstruksi amiRNA yang menargetkan CymMV RdRp yang terletak di nukleotida 952-972 dapat menghambat akumulasi CymMV secara efektif di bawah infeksi CymMV tunggal. Urutan nukleotida yang dipilih terletak di ujung 5' gen CymMV RdRp, menunjukkan bahwa langkah inisiasi terjemahan protein RdRp diblokir, sehingga mencegah replikasi CymMV dan menimbulkan resistensi CymMV.

#### **1.2.1.4 Resistensi yang lemah terhadap ORSV**

Meskipun tanaman transgenik yang sama diinokulasi dengan ORSV menggunakan tanaman *N. benthamiana* tipe liar sebagai kontrol pada 8 dpi, sebagian besar daun yang muncul dari amiRNA-CymMV-ORSV dan semua tanaman *N. benthamiana* tipe liar menunjukkan distorsi dan mosaik gejala ringan. Persentase tanaman transgenik F3 amiRNA yang rendah memberikan ketahanan terhadap inokulasi ORSV, sedangkan pada tanaman F4 tidak ditemukan resisten. Ini mungkin karena pemisahan transgen di pabrik F4.

Untuk tanaman transgenik yang tidak resisten terhadap ORSV dapat dijelaskan dengan beberapa kemungkinan alasan. Alasan pertama adalah urutan yang dirancang untuk penekanan dalam konstruksi amiRNA yang melengkapi nukleotida 3040-3060 mungkin bukan pilihan terbaik. Urutan di dekat ujung 3 dari gen ORSV RdRp menunjukkan bahwa menekan gen yang diinginkan mungkin tidak seefektif urutan di dekat ujung 5'. Urutan target yang lebih dekat ke terminal 5' mungkin lebih efektif karena urutan

tersebut menghambat translasi protein terkait pada awal translasi.

### **1.2.2 Transformasi *Agrobacterium***

#### **1.2.2.1 Pemilihan eksplan yang ditransformasikan**

Gen penanda resistensi higromisin dipilih karena sebelumnya digunakan untuk transformasi spesies *Oncidium* yang dimediasi *A. tumefaciens* (You *et al.* 2003, Liao *et al.* 2004), dan untuk hibrida *Phalaenopsis* bersama dengan urutan gen  $\beta$ -glukuronidase (Belarmino & Mii 2000, Chai *et al.* 2002, Mishiba *et al.* 2005, Chan *et al.* 2005). Berdasarkan pengamatan ini, dalam penelitian ini kami telah menggunakan vektor pCAMBIA 1301 yang menyimpan sekuens gen untuk resistensi hygromycin, GUS (*uidA*), dan GFP selain salinan gen *OsSERK1* untuk mengevaluasi kemungkinan perannya dalam stimulasi pembentukan embrio somatik.

Selama tahap seleksi 5 bulan, tanaman yang berasal dari PLB yang ditandai dengan adanya satu atau dua daun mati setelah dua bulan, sedangkan PLB anakan tanpa daun membentuk kalus yang menghasilkan PLB baru yang selanjutnya berkembang menjadi planlet. Perlu dicatat bahwa tahap perkembangan eksplan sangat penting untuk keberhasilan transformasi anggrek. Misalnya, dilaporkan bahwa untuk *Oncidium* umur planlet yang digunakan untuk transformasi mempengaruhi toleransi higromisin (Liao *et al.* 2003). Selain itu, dalam sebuah ulasan (Texeira da Silva 2013) disebutkan bahwa *coniferyl alcohol*, yang dikenal sebagai penginduksi gen *vir*, hadir di PLB pada tingkat yang lebih tinggi daripada di jaringan lain, sehingga menunjukkan bahwa PLB ideal untuk transformasi yang dimediasi *Agrobacterium*.

#### **1.2.2.2 Analisis gen PCR dan *OsSERK1* dari transforman putatif *C. Maxima***

Setelah sebulan pertumbuhan media seleksi MS, 89,5% dari PLB bertahan. Untuk memverifikasi apakah PLB sekunder diubah, tes berbasis PCR digunakan untuk memverifikasi keberadaan gen *OsSERK1*. Fragmen yang diharapkan (612 bp) diamati pada 4 dari 30 transforman yang diduga. Efisiensi transformasi yang rendah ini (sekitar 10%), menegaskan perlunya langkah seleksi yang lebih ketat untuk menghilangkan positif palsu. Untuk itu, waktu seleksi diperpanjang menjadi lima bulan.

Kemampuan untuk mentransfer T-DNA tertentu ke sel inang bergantung pada latar belakang kromosomnya (Yasmine & Debener 2010), efisiensi kedua strain *A. tumefaciens* dinilai dengan mengevaluasi persentase protokorm yang bertahan terhadap seleksi higromisin. GV3101 / pMP90 gagal memberikan transforman apa pun sementara galur EHA105, biasanya digunakan untuk spesies monokotil, menghasilkan (7,4 1,8)% PLB yang layak setelah berlarut-larut mengikuti seleksi higromisin.

Kehadiran protein fusi GFP5-GUSA di pCAMBIA-OsSERK1 menawarkan kemungkinan untuk mengidentifikasi transforman dengan mengamati epifluoresensi. Setelah masa pertumbuhan selama lima bulan pada media selektif-Hyg, diduga transforman disaring secara acak. Pada inspeksi, semua transforman yang diduga menunjukkan fenotipe normal, dan tidak ada tanda-tanda dwarfisme yang diamati. Fluoresensi terdeteksi pada 70% dari kedua kalus dan tanaman yang beregenerasi. Tidak ada fluoresensi latar belakang yang diamati pada kalus dan tanaman yang tidak ditransformasi.

### **1.2.2.3 Embriogenesis somatik pada eksplan yang ditransformasikan**

Persentase embrio yang secara signifikan lebih tinggi (80% dibandingkan 57%) terbentuk dari dalam eksplan daun *C. maxima*, yang mengandung kaset OsSERK1, yang diperoleh dari planlet yang diregenerasi dari PLB sekunder dibandingkan dengan yang berasal dari tumbuhan tipe liar bila dikultur pada media MS bebas hormon. Selanjutnya, jumlah total embrio per daun secara signifikan lebih tinggi pada daun yang diperoleh dari transforman yang ditanam pada media MS bebas hormon dibandingkan dengan daun yang tidak ditransformasi: 2,3 0,7 berbanding 1,5 0,2 ( $F = 0,022$ ). Menariknya, kehadiran TDZ atau BA mengakibatkan penurunan persentase pembentukan embrio. Karena telah diketahui bahwa keseimbangan auksin / sitokinin yang tepat merangsang embriogenesis pada anggrek (Novak *et al.* 2014) sangat menggoda untuk berspekulasi bahwa penambahan eksternal sitokinin dapat mengganggu rasio auksin / sitokinin fisiologis endogen yang diperlukan untuk embriogenesis somatik.

## **1.3 Induksi keragaman *Orchids Sp.* Berbasis Molekuler (CRISPR/Cas9)**

### **1.3.1 Transformasi genetik tanaman dimediasi oleh *Agrobacterium tumefaciens***

Dalam penelitian ini protokorm digunakan untuk bahan transformasi menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 yang membawa TDNA dengan UBI :: Cas9 :: U3 :: PDS pada pRGE32. Efisiensi transformasi pada *P. amabilis* dengan menggunakan PDS3T1 sgRNA adalah 0,9%, lebih rendah dari efisiensi transformasi menggunakan PDS3T2 sgRNA yaitu 0,96%. Efisiensi transformasi pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan dengan penelitian sebelumnya. *Agrobacterium* transformasi termidiasi adalah metode yang memungkinkan produksi transforman stabil dan sebagai model untuk mempelajari lokalisasi seluler dan interaksi antara protein yang penting untuk pengembangan analisis genom fungsional.

Dalam hasil ini efisiensi transformasi rendah mungkin karena efisiensi yang rendah dalam integrasi TDNA ke dalam genom tanaman. Peningkatan lebih lanjut pada efisiensi transformasi ini terletak pada manipulasi genetik tanaman itu sendiri, yang membutuhkan pemahaman yang lebih baik tentang proses yang mendasarinya dengan mempertimbangkan kerentanan sel tanaman terhadap infeksi *Agrobacterium* serta identifikasi gen tanaman yang terlibat dalam proses transformasi.

### **1.3.2 Deteksi CRISPR / Cas9 berbasis PCR diedit di pabrik transforman**

Kandidat transforman disaring menggunakan PCR untuk mengkonfirmasi integrasi TDNA. Primer HPT dan Cas9 digunakan untuk menyaring kandidat untuk mengkonfirmasi transformasi konstruksi pRGE32 yang menyimpan TDNA (UBI :: Cas9 :: U3 :: PDS). Setelah itu, protokorm hijau berumur 8 minggu yang ditanam pada media seleksi digunakan sebagai bahan penyaringan. Kami meregenerasi transforman di media NP + ZPT (NAA: BA 1: 2). Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa TDNA telah berhasil memasuki genom tumbuhan. Ini mengacu pada pita yang terdeteksi muncul di beberapa primer yang digunakan. Hasil penelitian menunjukkan ukuran amplikon spesifik dari masing-masing pasangan primer yaitu HPT (504 bp), Cas9 (402 bp), PDS (280 bp) dan trnLF (1200 bp) sebagai pengendalian internal. Hasil menunjukkan tidak ada multiband atau pergeseran pita pada

elektroforesis gel. Kemungkinan ini tidak terjadi pada penyisipan genom sehingga tidak ada penebalan pita atau pita ekstra yang muncul. Sehingga perlu dilakukan konfirmasi dengan menggunakan metode analisis Sanger Sequencing untuk melihat ada tidaknya mutasi tersebut.

### **1.3.3 Analisis urutan CRISPR / Cas9-diedit di pabrik transforman**

Urutannya hanya dapat diperkirakan dengan membandingkan nontransformant dengan transforman dan mengacu pada penanda yang digunakan. Proses perbaikan ini disebut mutasi gen NHEJ (*Nonhomologous end join*) yang mengakibatkan *knockout*. Mutasi ini menyebabkan perubahan urutan asam amino yang juga akan mengubah fenotipik.

Dalam penelitian kami sebelumnya, untuk mengedit gen PDS3 homolog pada angrek *P. amabilis*, kami menggunakan vektor pKIR1.1 (Tsutsui dan Higashiyama, 2016) dengan promotor AtRPS5A dari Arabidopsis, tetapi kami tidak mendapatkan mutan yang menunjukkan penyisipan atau penghapusan di situs target gen PDS3. Fenomena ini menyebabkan pergeseran bingkai pada urutan asam amino yang diterjemahkan.

## **KESIMPULAN**

Berdasarkan pemaparan hasil review didapatkan bahwa:

1) Mutasi Polyploid. Skrining secara visual terhadap bibit yang diperoleh dari perlakuan kolkisin diklasifikasikan menjadi bibit normal (NS), yaitu bibit yang memiliki morfologi yang mirip dengan kontrol, dan bibit mutan poliploidi putatif (PMS). Semua PMS yang diberi perlakuan kolkisin berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol pada organ basal protocorm (BOP) panjang dan lebar, panjang daun, serta panjang dan diameter akar. Analisis jumlah kromosom PMS menunjukkan bahwa 50 mg L<sup>-1</sup> selama tiga atau lima hari aplikasi kolkisin dan 500 mg L<sup>-1</sup> selama lima hari aplikasi kolkisin menghasilkan 60 dan 100% bibit mutan tetraploid masing-masing.

2) Mutasi Iridiasi Gamma. PLB *Dendrobium Sonia-28* sangat sensitif terhadap sinar gamma. Dosis optimum PLBs dan planlet *Dendrobium Sonia-28* adalah dosis radiasi gamma yang lebih rendah (10 dan 20 Gy) karena jumlah kelangsungan hidup dan laju pertumbuhan PLB pada dosis iradiasi gamma

yang lebih tinggi menurun dan permukaan serta organ-organ sel rusak dibandingkan dengan kontrol. Lebih lanjut, hasil kami menunjukkan bahwa iradiasi sinar gamma mungkin mempengaruhi karakteristik molekuler yang ditransfer ke regenerasi planlet.

3) Tanaman transgenik yang mengekspresikan mikroRNA buatan (amiRNA) telah terbukti memberikan ketahanan spesifik terhadap virus yang sesuai. Penggunaan amiRNA untuk menghasilkan tanaman *N. benthamiana* transgenik resisten CymMV yang sangat resisten terhadap infeksi CymMV. transgenik amiRNA dapat mengekspresikan amiR-CymMV dan memberikan persentase resistensi yang tinggi terhadap CymMV, sementara kurangnya tingkat ekspresi amiR-ORSV yang dapat dideteksi pada tanaman *N. benthamiana* transgenik amiR-ORSV menyebabkan resistensi yang lemah terhadap infeksi ORSV. Kami optimis terhadap penerapan amiRNA sebagai pendekatan yang menjanjikan untuk menghasilkan angrek tahan CymMV di masa depan.

4) Transformasi *Agrobacterium*. PLB *Cattleya maxima* yang ditransformasikan lebih efisien dalam membentuk embrio somatik (60 - 80%) daripada kontrol yang tidak diubah (45 - 57%), dan kontras ini dimaksimalkan dalam medium bebas hormon, Murashige dan Skoog (MS) (80% dari tanaman dibandingkan dengan 57% yang tidak ditransformasi). Temuan ini mendukung gagasan bahwa SERK memainkan peran penting dalam embriogenesis Angrek.

5) Sistem KO (Knock-Out) editing genom CRISPR / Cas9 dapat diterapkan pada angrek khususnya *Phalaenopsis amabilis*. Gen PHYTOENE DESATURASE 3 (PDS3) dapat digunakan sebagai model / marker gen yang memudahkan untuk menentukan apakah duaPDS3 paralel mengalami gangguan pada jaringan yang diamati. Sebanyak 0,96% transforman PDS diperoleh dari jalur PDS3T2. Beberapa transforman menunjukkan warna daun pucat dibandingkan tanaman non-transforman. Studi ini menunjukkan bahwa target gen telah berhasil diedit oleh sistem CRISPR / Cas9 dan dapat diterapkan untuk kebutuhan genetik pada keturunannya.

## **DAFTAR PUSTAKA**

Augusta, C-A. Y. and Rino, C. 2018. *Agrobacterium-mediated transformation*

- of the wild orchid *Cattleya maxima* Lindl. *Universitas Scientiarum*, Vol. 23 (1): 89-107.
- Azmi, T.K.K., Sukma, D., Aziz, S.A. and Syukur, M. 2015. Polyploidy Induction of Moth Orchid (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume) by Colchicine Treatment on Pollinated Flowers. *The Journal of Agricultural Sciences*, Vol.11(2): 62-73.
- Chen W.-H., Kao Y.-L., Tang C.-Y., Jean G.-T. 2011. Endopolyploidy in *Phalaenopsis* orchids and its application in polyploid breeding in Orchid. *Biotechnology, World Scientific*, Vol. 2:25–48. DOI: 10.1142/9789814327930\_0002.
- De, L.C. and Debnath, N.G. 2011. Vision 2030. National Research Center for Orchids, Pakyong, Sikkim, India.
- Dehghani, R. and Joniyasa, A. 2017. Gamma Irradiation-Induced Variation in *Dendrobium Sonia-28* Orchid Protocorm-Like Bodies (PLBs). *Fungal Genomics & Biology*, Vol. 7 (2): 2-11. doi:10.4172/2165-8056.1000151
- Govaerts R, Bernet P, Kratochvil K, Gerlach G, Carr G, Alrich P, Pridgeon AM, Pfahl J, Campacci MA, Holland Baptista D, Tigges H, Shaw J, Cribb P, George A, Kreuz K, Wood JJ. 2017. World checklist of Orchidaceae. Kew: Facilitated by the Royal Botanic Gardens. Akses: <http://apps.kew.org/wcsp/> (15 April 2021).  
<https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1004>
- Joppa L.N, Roberts D.L, Pimm S.L. 2011. How many species of flowering plants are there?. *Proceedings of the Royal Society B*, Vol. 278: 554-559.
- Petchthai, U., LeYee, C.S. and Wong, S-M. 2018. Resistance to CymMV and ORSV in artificial microRNA transgenic *Nicotiana benthamiana* plants. *Scientific Reports*, Vol. 8: 1-8. DOI:10.1038/s41598-018-28388-9
- Semiarti, E., Nopitasari, S., Setiawati, Y., Lawrie, M.D., Purwanto, A., Widada, J., Ninomiya, K., Asano, Y., Matsumoto, S. And Yoshioka, Y. 2020. Application of CRISPR/Cas9 genome editing system for molecular breeding of orchids. *Indonesian Journal of Biotechnology*, Vol. 25(1): 61-68.
- Tuwo M., Indrianto A. (2016). Improvement of orchid *Vanda* hybrid (*Vanda limbata* Blume X *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*) by colchicines treatment in vitro. *Modern Appl. Sci.* 10 (11), 83. 10.5539/mas.v10n11p83
- Widiastoety, D., Nina, S. dan Muchtar, S. 2010. Potensi Anggrek *Dendrobium* dalam Meningkatkan Variasi dan Kualitas Anggrek Bunga Potong. *Jurnal Litbang Pertanian*. 29(3): 101-106.