



# **TRANSFORMASI GEN CRISPR/Cas9-gRNA-CsCS PADA TANAMAN JERUK UNTUK PENINGKATAN KETAHANAN TERHADAP PENYAKIT HUANGLONGBING**

**DINAR NOVELLIA AISYAH**



**PROGRAM STUDI PEMULIAAN DAN BIOTEKNOLOGI TANAMAN  
SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2021**



### *@Hak cipta milik IPB University*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



## PERNYATAAN MENGENETIKAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Transformasi Gen CRISPR/Cas9-gRNA-CsCS pada Tanaman Jeruk untuk Peningkatan Ketahanan terhadap Penyakit Huanglongbing” adalah karya saya dengan arahan dari dosen pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor.

Bogor, Agustus 2021

Dinar Novellia Aisyah  
A253180021



## SUMMARY

DINAR NOVELLIA AISYAH. Transformation of the CRISPR/Cas9-gRNA-CSCc Gene in Citrus Plant for Increased Resistance to *Huanglongbing* Disease. Supervised by AGUS PURWITO, and MIA KOSMIATIN.

Citrus production in Indonesia has not been able to cope with Huanglongbing's disease (HLB) and there was not an effective way has been found to eliminate its effects until now. This study was conducted to assemble HLB-resistant citrus plants through a genetic transformation using the CRISPR/Cas-9-CsCS gene via the *Agrobacterium tumefaciens* vector to edit the citrus' genome. The explants were zygotic and nucellar citrus embryos (11 – 15 weeks after anthesis) from somatic hybrid citrus, zygotic hybrid citrus, citrus endosperm culture, and JC (*Japance citroen*) rootstock. The transformation was carried out using the *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 vector which had been inserted with the CRISPR/Cas-9-CsCS gene and made a suspension with a density of 0.2. The inoculation time treatments consist of 15, 20, 25, and 30 min of inoculation time. The co-cultivation period occurred for 2 – 3 days in a dark condition at room temperature until a “halo” was formed around the explant. The putative transformant embryo selection was carried out in a medium with 100 mg/L hygromycin. The growth acceleration was carried out by shoot tip grafting (STG) on 5 months old JC (*Japance citroen*) rootstock. The results of the selection were confirmed by a PCR test on the STG plant population. The selection results showed that more than 52.86% of embryos were able to survive in a selection medium, and 24 STG plants were confirmed by PCR test containing the hygromycin marker gene. The highest transformation efficiency value of the nucellar embryo was 13.8% with an inoculation time of 20 min, and the regeneration efficiency value was 32.53%. After STG was carried out in a greenhouse, shoots of nucellar embryos had a higher mean number of shoots and leaves compared with shoots and leaves from zygotic embryos. The transformation results showed that 55.56% of the JC citrus transformant plants did not show symptoms of HLB attack after artificial inoculation in vivo aged 10 BSI.

*Keywords: gene transformation, citrus, citrus embryo, woody plant.*



Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

© Hak Cipta milik IPB, tahun 2021  
Hak Cipta dilindungi Undang-Undang

*Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah, dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB.*

*Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB.*

# **TRANSFORMASI GEN CRISPR/Cas9-gRNA-CsCS PADA TANAMAN JERUK UNTUK PENINGKATAN KETAHANAN TERHADAP PENYAKIT HUANGLONGBING**

**DINAR NOVELLIA AISYAH**

Tesis  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister pada  
Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman

**PROGRAM STUDI PEMULIAAN DAN BIOTEKNOLOGI TANAMAN  
SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2021**



**@Hak cipta milik IPB University**

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

**Tim Penguji pada Ujian Tesis:**

- 1 Dr. Ir. Diny Dinarti., M.Si.
- 2 Dr. Dewi Sukma, S.P, M.Si.





@Hak cipta milik IPB University

IPB University

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang  
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :  
a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah  
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.  
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

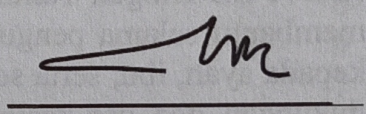
Judul Tesis : Transformasi Gen CRISPR/Cas9-gRNA-CsCS pada Tanaman Jeruk untuk Peningkatan Ketahanan terhadap Penyakit Huanglongbing  
Nama : Dinar Novellia Aisyah  
NIM : A253180021

Disetujui oleh



Pembimbing 1:  
Prof. Dr. Ir. Agus Purwito, M.Sc. Agr

Pembimbing 2:  
Dr. Mia Kosmiatin, S.Si, M.Si.



Diketahui oleh



Ketua Program Studi:  
Dr. Ir. Yudiwanti Wahyu EK, M.S.  
NIP. 196311071988112001

Dekan Sekolah Pascasarjana :  
Prof. Dr. Ir. Anas Miftah Fauzi, M.Eng  
NIP. 196004191985031002



Tanggal Lulus: 27 AUG 2021

Tanggal Ujian:  
14 Agustus 2021





## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah subhanaahu wa ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Maret 2019 sampai bulan Agustus 2020 ini ialah transformasi gen pada tanaman jeruk, dengan judul Transformasi Gen CRISPR/Cas9-gRNA-CsCS pada Tanaman Jeruk untuk Peningkatan Ketahanan terhadap Penyakit Huanglongbing”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Ir. Agus Purwito, M.Sc. Agr, dan Dr. Mia Kosmiatin, S.Si, M.Si yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada moderator seminar, dan penguji luar komisi pembimbing. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Gen Pertanian (BB Biogen) yang telah memfasilitasi tempat dan dana penelitian (DIPA BB Biogen Tahun 2019) beserta staf dan rekan Laboratorium yang telah membantu selama pengumpulan data. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada ayah, ibu, serta seluruh keluarga dan teman teman yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2021

*Dinar Novellia Aisyah*

## DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat	4
1.5 Ruang Lingkup	5
1.6 Hipotesis	5
II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Botani Tanaman Jeruk	6
2.2 Huanglongbing	7
2.3 Transformasi Gen	9
2.4 Pengeditan Genom	11
2.5 Percepatan Pertumbuhan Tanaman	13
III METODE	14
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	14
3.2 Alat dan Bahan	14
3.3 Prosedur Kerja	14
3.4 Analisis data	18
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	20
4.1 Pertumbuhan Tanaman Secara <i>In Vitro</i>	20
4.2 Pertumbuhan Tanaman Secara <i>In Vivo</i>	23
4.3 Transformasi Gen dan Uji Ketahanan	26
V SIMPULAN DAN SARAN	30
5.1 Simpulan	30
5.2 Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	38
RIWAYAT HIDUP	41



## DAFTAR TABEL

1	Transformasi gen CRISPR/Cas-9-gRNA-CsCS terhadap jenis embrio, lama inokulasi, dan interaksi antara jenis embrio dan lama inokulasi yang berbeda pada jeruk JC.	20
	Pertumbuhan embrio jeruk pasca transformasi gen CRISPR/Cas-9-gRNA-CsCS secara <i>in vitro</i> terhadap jenis embrio dan asal embrio jeruk yang berbeda.	22
	Rata – rata tinggi tanaman dan jumlah daun tanaman putatif transforman jeruk JC secara <i>in vitro</i> pada umur 8 MST	23
	Nilai efisiensi transformasi, persentase keberhasilan <i>shoot tip grafting</i> dan nilai efisiensi regenerasi pada tanaman jeruk JC transforman	24
	Persentase tanaman jeruk JC transforman yang menunjukkan gejala tahan dan tidak tahan setelah dilakukan uji ketahanan terhadap penyakit HLB	28

## DAFTAR GAMBAR

1	Bagan alir penelitian transformasi gen CRISPR/Cas9-gRNA-CsCS pada tanaman jeruk untuk peningkatan ketahanan terhadap penyakit Huanglongbing	5
2	Gejala penyakit Huanglongbing dan serangga vektornya	8
3	Peta konstruk utama kaset CRISPR/Cas-9-gRNA-CsCS dengan membawa gen ketahanan terhadap antibiotik higromisin dan promotor kuat CAMV 35S untuk inisiasi ketahanan tanaman jeruk terhadap penyakit HLB	12
4	Perbedaan embrio zigotik dan embrio nuselar	14
5	Peta konstruk lengkap kaset CRISPR/Cas9-gRNA-CsCS yang akan diinsersikan kedalam genom tanaman jeruk untuk inisiasi ketahanan terhadap penyakit HLB	15
6	Rancangan gRNA pada vektor <i>A.tumefaciens</i> strain EHA 105 yang disisipi gen CRISPR/Cas-9-gRNA-CsCS yang akan diinsersikan kedalam genom tanaman jeruk untuk inisiasi ketahanan terhadap penyakit HLB	16
7	Pertumbuhan tanaman jeruk transforman dan putative transforman secara <i>in vivo</i>	25
8	Evaluasi tanaman transforman dan uji ketahanan terhadap penyakit Huanglongbing	27
9	Hasil uji ketahanan tanaman transforman terhadap penyakit Huanglongbing	28



## DAFTAR LAMPIRAN

1	Komposisi media MS dan tambahan modifikasi MS	39
2	Tabel <i>analysis of variance</i> perlakuan jenis embrio dan waktu inokulasi	40
3	Tabel <i>analysis of variance</i> perlakuan jenis embrio dan asal embrio	40
4	Tabel <i>analysis of variance</i> perlakuan jenis embrio dan asal embrio	40

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



### *@Hak cipta milik IPB University*

Hak Cipta Dilindungi Undang-undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber :
  - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah
  - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB University.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.