



KONSTRUKSI CRISPR/CAS9 MULTIPLEKS UNTUK PENYUNTINGAN GEN HASIL, KETAHANAN PENYAKIT, HAMA, DAN KEKERINGAN PADA PADI IPB 3S DAN HAWARA BUNAR

FIRDHA CHAYLIA AYU RACHMANDIKA



**PROGRAM STUDI BIOLOGI TUMBUHAN
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026**



@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 MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis dengan judul “Konstruksi CRISPR/Cas9 Multipleks untuk Perbaikan Gen Hasil, Ketahanan Penyakit, Hama, dan Kekeringan pada IPB 3S dan Hawara Bunar” 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 2026

Firdha Chaylia Ayu Rachmandika
G3503241023



@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.

RINGKASAN

FIRDHA CHAYLIA AYU RACHMANDIKA. Konstruksi CRISPR/Cas9 Multipleks untuk Perbaikan Gen Hasil, Ketahanan Penyakit, Hama, dan Kekeringan pada IPB 3S dan Hawara Bunar. Dibimbing oleh MIFTAHUDIN, RIZKY DWI SATRIO, dan HAMIM.

Peningkatan produktivitas dan ketahanan padi di Indonesia masih terkendala oleh keterbatasan varietas unggul yang adaptif terhadap cekaman biotik dan abiotik. Metode konvensional, seperti persilangan memerlukan waktu yang lama serta tidak selalu menghasilkan kombinasi sifat yang diharapkan, sedangkan mutagenesis konvensional belum mampu menghasilkan pengeditan gen yang spesifik. Teknologi CRISPR/Cas9 menawarkan pendekatan pengeditan genom presisi yang memungkinkan modifikasi spesifik pada target DNA, termasuk pengeditan beberapa gen secara simultan. Penelitian ini bertujuan untuk (1) menganalisis sekuens gen *TB1*, *Gn1a*, *GS3*, *ABA8ox2*, *ERF922*, dan *ACL1* yang berperan dalam pengaturan jumlah anakan, panjang bulir, toleransi terhadap cekaman kekeringan, serta ketahanan terhadap hama wereng coklat dan penyakit blas pada kultivar Hawara Bunar dan IPB 3S; (2) mendesain sgRNA untuk gen-gen target tersebut serta menganalisis potensi *off-target* secara *in silico* sebagai dasar pengeditan genom berbasis CRISPR/Cas9; dan (3) mengonstruksi serta mengklon vektor CRISPR/Cas9 multipleks untuk pengeditan beberapa gen secara simultan. Metode penelitian meliputi isolasi DNA, amplifikasi PCR, sekuensing gen target, analisis bioinformatika secara *in silico*, serta, konstruksi vektor CRISPR/Cas9 multipleks yang selanjutnya ditransformasikan ke dalam *A. tumefaciens*. Hasil penelitian menunjukkan adanya variasi *single nucleotide polymorphism* (SNP) pada sekuens gen target dengan tingkat polimorfisme yang bervariasi. Gen *ABA8ox2* pada kultivar Hawara Bunar memiliki jumlah SNP tertinggi, yaitu 56 SNP (9,61%), sedangkan gen *ACL1* pada kultivar IPB 3S memiliki jumlah SNP terendah, yaitu 2 SNP (0,35%). Desain sgRNA menghasilkan potensi *off-target* tertinggi pada sgRNA *ABA8ox2_1* dengan empat situs *off-target*, sedangkan sgRNA *Gn1a_1* dan *GS3_1* tidak menunjukkan situs *off-target*. Konstruksi vektor CRISPR/Cas9 multipleks berhasil dirakit untuk menargetkan tiga gen (*TB1*, *GS3*, dan *ACL1*) pada kultivar Hawara Bunar menggunakan enam kaset sgRNA serta empat gen (*Gn1a*, *ABA8ox2*, *ACL1*, dan *ERF922*) pada kultivar IPB 3S menggunakan delapan kaset sgRNA. Keberhasilan konstruksi dikonfirmasi melalui PCR, elektroforesis, dan sekuensing yang menunjukkan pita DNA sesuai ukuran target, yaitu 461 bp pada konstruksi Level 0, 851 bp pada plasmid Level 1 kosong, 1.200 bp pada konstruksi Level 1 tiga sgRNA, 1.300 bp pada konstruksi Level 1 empat sgRNA, 434 bp pada konstruksi Level 2 barnost, 1.200 bp pada konstruksi Level 2 tiga sgRNA, serta 400 bp pada konstruksi Level 2 empat sgRNA. Hasil sekuensing menunjukkan kesesuaian sekuens tanpa mutasi, dan vektor rekombinan yang telah terverifikasi berhasil ditransformasikan ke dalam *A. tumefaciens*. Penelitian lanjutan diperlukan untuk mengevaluasi keberhasilan pengeditan genom secara *in vivo*, efisiensi penyuntingan, serta dampaknya terhadap karakter fenotipik tanaman.

Kata kunci: CRISPR, kloning modular, multipleks gRNA, *Oryza sativa* L., pengeditan genom.



SUMMARY

FIRDHA CHAYLIA AYU RACHMANDIKA. Construction of Multiplex CRISPR/Cas9 for Trait Improvement, Disease, Pest, and Drought Resistance in IPB 3S and Hawara Bunar Rice Varieties. Supervised by MIFTAHUDIN, RIZKY DWI SATRIO, and HAMIM.

Rice productivity and resilience enhancement in Indonesia remain constrained by the limited availability of superior varieties adaptive to biotic and abiotic stresses. Conventional methods, such as hybridization, are time-consuming and often fail to yield the desired trait combinations, whereas traditional mutagenesis lacks the capability to achieve specific gene editing. CRISPR/Cas9 technology offers a precise genome editing approach that enables site-specific modifications of target DNA, including the simultaneous editing of multiple genes. This study aims to (1) analyze the sequences of the *TB1*, *Gn1a*, *GS3*, *ABA8ox2*, *ERF922*, and *ACL1* genes which regulate tiller number, grain length, drought tolerance, brown planthopper resistance, and blast disease resistance in Hawara Bunar and IPB 3S cultivars; (2) design sgRNAs for these target genes and analyze potential off-target profiles in silico as a baseline for CRISPR/Cas9-based genome editing; and (3) construct and clone multiplex CRISPR/Cas9 vectors for simultaneous multi-gene editing. The methodology encompassed DNA isolation, PCR amplification, target gene sequencing, in silico bioinformatics analysis, and the construction of multiplex CRISPR/Cas9 vectors, which were subsequently transformed into *A. tumefaciens*. The results revealed single nucleotide polymorphism (SNP) variations across the target gene sequences with fluctuating polymorphism rates. The *ABA8ox2* gene in the Hawara Bunar cultivar exhibited the highest number of mutations, totaling 56 SNPs (9.61%), whereas the *ACL1* gene in the IPB 3S cultivar displayed the lowest, with 2 SNPs (0.35%). Regarding the sgRNA design, the highest off-target potential was observed in sgRNA *ABA8ox2_1* with four off-target sites, whereas sgRNA *Gn1a_1* and *GS3_1* exhibited no off-target sites. The multiplex CRISPR/Cas9 vector constructs were successfully assembled to target three genes (*TB1*, *GS3*, and *ACL1*) in the Hawara Bunar cultivar using six sgRNA cassettes, and four genes (*Gn1a*, *ABA8ox2*, *ACL1*, and *ERF922*) in the IPB 3S cultivar using eight sgRNA cassettes. Successful construction was confirmed via PCR, electrophoresis, and sequencing, which demonstrated DNA bands corresponding to the expected target sizes: 461 bp for the Level 0 construct, 851 bp for the empty Level 1 plasmid, 1,200 bp for the Level 1 three-sgRNA construct, 1,300 bp for the Level 1 four-sgRNA construct, 434 bp for the Level 2 bar-nos construct, 1,200 bp for the Level 2 three-sgRNA construct, and 400 bp for the Level 2 four-sgRNA construct. Sequencing results confirmed sequence fidelity without any unwanted mutations, and the verified recombinant vectors were successfully transformed into *A. tumefaciens*. Future research is required to evaluate in vivo genome editing success, editing efficiency, and the subsequent impacts on plant phenotypic characteristics.

Keywords: CRISPR/Cas9, Genome editing, Modular cloning, Multiplex gRNA, *Oryza sativa* L.



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 2026 ¹
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.



@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.



KONSTRUKSI CRISPR/CAS9 MULTIPLEKS UNTUK PENYUNTINGAN GEN HASIL, KETAHANAN PENYAKIT, HAMA, DAN KEKERINGAN PADA PADI IPB 3S DAN HAWARA BUNAR

FIRDHA CHAYLIA AYU RACHMANDIKA

Tesis
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister pada
Program Studi Biologi Tumbuhan

**PROGRAM STUDI BIOLOGI TUMBUHAN
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2026**



@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.

Judul Tesis : Konstruksi CRISPR/Cas9 Multipleks untuk Perbaikan Gen Hasil, Ketahanan Penyakit, Hama, dan Kekeringan pada IPB 3S dan Hawara Bunar

Nama : Firdha Chaylia Ayu Rachmandika

NIM : G3503241023

Disetujui oleh

Pembimbing 1:

Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si.

Pembimbing 2:

Dr. Rizky Dwi Satrio, S.Si., M.Si.

Pembimbing 3:

Prof. Dr. Ir. Hamim, M.Si.

Diketahui oleh

Ketua Program Studi:

Dr. Ir. Aris Tjahjoleksono, DEA.

NIP 19581228 198503 1 003

Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam :

Dr. Berry Juliandi, S.Si., M.Si.

NIP 19780723 200701 1 001

Tanggal Ujian : 27 Juli 2026

Tanggal Lulus :



@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.



PRAKATA

Puja 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 Januari sampai bulan November 2025 ini ialah *Genome Editing*, dengan judul “Konstruksi CRISPR/Cas9 Multipleks untuk Perbaikan Gen Hasil, Ketahanan Penyakit, Hama, dan Kekeringan pada IPB 3S dan Hawara Bunar”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si, Dr. Rizky Dwi Satrio, S.Si., M.Si., dan Prof. Dr. Ir Hamim, M.Si yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada dosen program studi Biologi Tumbuhan, moderator seminar, dan penguji luar komisi pembimbing. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada Beasiswa Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) Kementerian Pendidikan Tinggi, Sains, dan Teknologi Republik Indonesia dan beserta staf laboratorium dan rekan-rekan seperjuangan yang telah membantu selama pengumpulan data. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada ayah, ibu, serta seluruh keluarga yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayang.

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

Bogor, Agustus 2026

Firdha Chaylia Ayu Rachmandika

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 mengumunkan 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.



DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	ii
DAFTAR GAMBAR	ii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Karakteristik Padi IPB 3S	4
2.2 Karakteristik Padi Hawara Bunar	4
2.3 Teknologi CRISPR/Cas9 dan Konsep Multipleks-gRNA	5
2.4 Multipleks gRNA dan Sistem Vektor	6
2.5 Metode <i>Golden Gate Assembly</i> (GGA)	7
2.6 Gen Target Pengatur Arsitektur Malai dan Ketahanan Padi	8
III METODE	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2 Alat dan Bahan	15
3.3 Prosedur Kerja	15
IV HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Isolasi DNA Padi IPB 3S dan Hawara Bunar	22
4.2 Desain Primer dan Amplifikasi Gen Target	23
4.3 Analisis <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP) pada Gen Target	24
4.4 Desain Oligo sgRNA	25
4.5 Evaluasi Potensi Efek <i>Off-Target</i> Sistem CRISPR/Cas9	28
4.6 Konstruksi Vektor CRISPR/Cas9-sgRNA	29
4.7 Introduksi Vektor Rekombinan pada <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4044	43
V SIMPULAN DAN SARAN	46
5.1 Simpulan	46
5.2 Saran	46



DAFTAR TABEL

1	Primer PCR untuk konfirmasi insert sgRNA (Hahn <i>et al.</i> 2020)	19
2	Nilai kemurnian dan konsentrasi hasil isolasi DNA Genom Padi	22
3	Oligo Primer Gen Target Data Mencakup Urutan <i>Forward</i> dan <i>Reverse</i> , Suhu Penempelan (Tm) yang Dioptimasi, dan Ukuran Gen Target	23
4	Karakteristik variasi SNP berdasarkan ukuran amplikon, jumlah SNP, dan persentase SNP pada gen target setiap kultivar padi	25
5	Oligo sgRNA gen target padi Hawara Bunar	25
6	Oligo sgRNA gen target padi IPB 3S	26

DAFTAR GAMBAR

1	Ilustrasi CRISPR-Cas9 yang didalamnya terdapat keterlibatan komponen DNA target, <i>guide</i> RNA, PAM, dan enzim Cas9	6
2	Ilustrasi konstruksi vektor multipleks pada sistem <i>modular cloning</i>	7
3	Ilustrasi sistem tRNA-sgRNA pada <i>modular cloning</i>	7
4	Regulasi ukuran gabah pada tanaman padi yang dimediasi oleh sinyal G protein	9
5	Peran Gen <i>TBI</i> terhadap jaringan regulasi anakan padi. Gen <i>TBI</i> akan memengaruhi metabolisme gula dan kadar hormon seperti ABA dan JA yang bertujuan untuk menjaga tunas anakan tetap dalam kondisi dorma	10
6	Regulasi arsitektur malai padi oleh auksin dan interaksinya dengan sitokinin. Gen <i>Gn1a/OsCKX2</i> menghambat kadar sitokinin, sehingga memengaruhi pembentukan dan pemeliharaan meristem aksilar serta arsitektur malai	11
7	Regulasi gen <i>ACL1</i> terhadap ketahanan dan kerentanan padi di cekaman biotik (BPH) (dimodifikasi dari Tao <i>et al.</i> 2024)	12
8	Mekanisme jalur pensinyalan gen <i>ERF922</i> (dimodifikasi dari Sharma <i>et al.</i> 2013)	13
9	Mekanisme molekuler pada gen <i>ABA8ox2</i> (Ma <i>et al.</i> 2018)	14
10	Diagram alir penelitian konstruksi vektor CRISPR multipleks	15
11	Desain kloning multipleks berbasis sistem <i>Golden Gate Assembly</i> tahap perakitan dari Level 0 hingga Level 2 dengan penggunaan plasmid-plasmid modular untuk ekspresi simultan gRNA. (A) IPB 3S; (B) Hawara Bunar.	18
12	Hasil Isolasi DNA genom padi IPB 3S dan Hawara Bunar	22
13	Elektroforegram hasil PCR gen target (IPB 3S = Padi IPB 3S; HB = Hawara Bunar)	24
14	Ilustrasi prediksi mutasi berupa <i>long deletion</i> pada gen target hasil pengeditan CRISPR/Cas9 meliputi gen <i>ERF922</i> (A), gen <i>TBI</i> (B), gen <i>GS3</i> (C), Gen <i>ABA8ox2</i> (D), Gen <i>Gn1a</i> (E), dan Gen <i>ACL1</i> (F)	27
15	Grafik total situs <i>off-target</i> potensial dari masing-masing sgRNA yang dirancang pada genom padi berdasarkan analisis <i>cas off-finder</i>	29

- 16 Peta fisik konstruksi plasmid Level 0 posisi 1 menggunakan plasmid pFH50 (A) Plasmid kosong (*empty vector*/non rekombinan); (B) Plasmid rekombinan dan sekuens *overhang* 30
- 17 Koloni transforman hasil transformasi vektor rekombinan sgRNA gen *TBI* pada posisi 1 menggunakan plasmid pFH50 (A = konstruksi TB1_1; B = konstruksi TB1_2); (C) Elektroforegram hasil PCR koloni untuk verifikasi konstruksi sgRNA Level 0 gen *TBI* pada plasmid pFH50 (posisi 1) (M: marker DNA 1kb) 31
- 18 Peta fisik konstruksi plasmid Level 0 posisi 2 menggunakan plasmid pAK002 (A) Plasmid kosong (*empty vector*/nonrekombinan); (B) Plasmid rekombinan dan sekuens *overhang* 32
- 19 Koloni transforman hasil transformasi vektor rekombinan sgRNA gen *GS3* pada posisi 2 menggunakan plasmid pAK002 (A = GS3_1; B = GS3_2); (C-D) Elektroforegram hasil PCR koloni untuk verifikasi konstruksi sgRNA Level 0 gen *GS3* pada plasmid pAK002 (posisi 2) (M: marker DNA 1kb) 33
- 20 Koloni transforman hasil transformasi vektor rekombinan sgRNA gen *ABA8ox2* pada posisi 2 menggunakan plasmid pAK002 (A = ABA8ox2_1; B = ABA8ox2_2); (C) Elektroforegram hasil PCR koloni untuk verifikasi konstruksi sgRNA Level 0 gen *ABA8ox2* pada plasmid pAK002 (posisi 2) (M: marker DNA 1kb) 34
- 21 Peta fisik konstruksi plasmid Level 0 posisi 3 menggunakan plasmid pAK003 (A) Plasmid kosong (*empty vector* / non rekombinan); (B) Plasmid rekombinan dan sekuens *overhang* 1
- 22 Koloni transforman hasil transformasi vektor rekombinan sgRNA gen *ACL1* pada posisi 3 menggunakan plasmid pAK003 (A = ACL1_1; B = ACL1_2); (C) Elektroforegram hasil PCR koloni untuk verifikasi konstruksi sgRNA Level 0 gen *ACL1* pada plasmid pAK003 (posisi 3) (M: marker DNA 1kb) 32
- 23 Peta fisik konstruksi plasmid Level 0 posisi 3 menggunakan plasmid pAK003 (A) Plasmid kosong (*empty vector*/nonrekombinan); (B) Plasmid rekombinan dan sekuens *overhang* 33
- 24 Koloni transforman hasil transformasi vektor rekombinan sgRNA gen *ERF922* pada posisi 4 menggunakan plasmid pAK004 (A = ERF922_1 ; B = ERF922_2) ; (C) Elektroforegram hasil PCR koloni untuk verifikasi konstruksi sgRNA Level 0 gen *ACL1* pada plasmid pAK003 (posisi 3) (M: marker DNA 1kb) 34
- 25 Peta fisik konstruksi plasmid Level 1 Kaset 2 menggunakan plasmid pICH47761 pada konstruksi sgRNA; (A) plasmid kosong (*empty vector* / nonrekombinan); (B) plasmid rekombinan pada multipleks 3 sgRNA; dan (C) plasmid rekombinan pada multipleks 4 sgRNA (D) sekuens *overhang* pada multipleks 3 sgRNA; dan (E) sekuens *overhang* pada multipleks 4 sgRNA 37
- 26 Koloni transforman hasil transformasi vektor rekombinan Level 1 pada padi Hawara Bunar (A = Kaset 1; B = Kaset 2); Elektroforegram hasil kloning multipleks Level 1 yang mengandung satu promoter U6 (pFH36) / U3 (pFH38) dan tiga sgRNA pada padi varietas Hawara Bunar 38

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.

27	Kromatogram hasil sekuensing yang menunjukkan urutan sgRNA pada plasmid rekombinan pICH47751 (<i>cassette</i> 1) dan pICH47761 (<i>cassette</i> 2) menggunakan perangkat lunak Snapgene	39
28	Koloni transforman hasil transformasi vektor rekombinan Level 1 padi IPB 3S (A= <i>cassette</i> 1; B= <i>cassette</i> 2); (C-D) Elektroforegram hasil kloning multipleks Level 1 pada kaset 1 yang mengandung satu promoter U6 (pFH36) dan empat sgRNA pada padi varietas IPB 3S	39
29	Kromatogram hasil sekuensing yang menunjukkan urutan sgRNA pada plasmid rekombinan pICH47751 (<i>cassette</i> 1) dan pICH47761 (<i>cassette</i> 2) menggunakan perangkat lunak snapgene	40
30	Peta fisik konstruksi plasmid rekombinan level 2 (pAGM4673); (A) plasmid kosong (<i>empty vector</i> / nonrekombinan); (B) plasmid rekombinan pada multipleks 3 sgRNA; (C) sekuens <i>overhang</i> pada multipleks 3 sgRNA; dan (D) sekuens <i>overhang</i> pada multipleks 4 sgRNA	41
31	(A) Koloni transforman hasil transformasi vektor rekombinan level 2 padi Hawara Bunar; (B) Validasi molekuler gen bar dan sgRNA + <i>scaffold</i> pada padi varietas Hawara Bunar	42
32	(A) Koloni transforman hasil transformasi vektor rekombinan Level 2 padi IPB 3S; (B) Validasi molekuler gen bar dan sgRNA + <i>scaffold</i> pada padi varietas IPB 3S	43
33	(A) Koloni transforman hasil introduksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4044 yang membawa plasmid rekombinan Level 2 untuk padi varietas Hawara Bunar; (B) Hasil seleksi <i>Triparental Mating</i> pada media seleksi antibiotik kanamisin + streptomisin + rifampisin; (C) Elektroforegram hasil validasi konstruksi akhir pada <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4044 yang membawa plasmid rekombinan Level 2, mengandung gen Cas9, gen penanda seleksi (bar), serta kaset sgRNA di bawah kendali promoter U6 (pFH36) yang ditujukan untuk padi varietas Hawara Bunar	43
34	(A) Koloni transforman hasil introduksi <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4044 yang membawa plasmid rekombinan Level 2 untuk padi varietas IPB 3S; (B) Hasil seleksi <i>Triparental Mating</i> pada media seleksi antibiotik kanamisin + streptomisin + rifampisin (C) Elektroforegram hasil validasi konstruksi akhir pada <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4044 yang membawa plasmid rekombinan Level 2, mengandung gen Cas9, gen penanda seleksi (bar), serta kaset sgRNA di bawah kendali promoter U6 (pFH36) yang ditujukan untuk padi varietas IPB 3S	44