

KONSTRUKSI VEKTOR CRISPR/*Cas9* UNTUK PENGEDITAN GEN *StTOPP6* PADA TANAMAN KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) IPB CP1

SINDA CAHYANI



DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025

- 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 mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

PERNYATAAN MENGENAI SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul “Konstruksi Vektor CRISPR/Cas9 untuk Pengeditan Gen *StTOPP6* pada Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) IPB CP1” 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 laporan akhir ini.

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

Bogor, Agustus 2025

Sinda Cahyani
G3401211061

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 mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

ABSTRAK

SINDA CAHYANI. Konstruksi Vektor CRISPR/Cas9 untuk Pengeditan Gen *StTOPP6* pada Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) IPB CP1. Dibimbing oleh MIFTAHUDIN dan ARIS TIAHJOLEKSONO.

Perkembangan teknologi *genome editing* memungkinkan penyuntingan *susceptible gene* (S-gene) sebagai metode menjanjikan untuk memodifikasi tanaman menjadi tahan penyakit. Protein TOPP6 pada tanaman kentang dapat berinteraksi dengan efektor RipAS dari *Ralstonia solanacearum* yang mendorong virulensi sehingga menyebabkan tanaman mengalami gejala penyakit layu bakteri. Penelitian ini bertujuan mengkonstruksi vektor rekombinan CRISPR/Cas9 pembawa sgRNA dari gen *StTOPP6*. Keberadaan gen target dari kentang kultivar IPB CP1 telah dikonfirmasi dan dua sgRNA telah didesain. Oligo sgRNA telah disisipkan ke dalam plasmid pHSE401 diikuti dengan transformasi ke sel kompeten *Escherichia coli* TOP10. Verifikasi penyisipan sgRNA dilakukan dengan PCR koloni dan PCR plasmid yang menghasilkan amplicon berukuran sesuai target 478 pb. Transformasi konstruksi vektor rekombinan pHSE401_Cr1 ke *Agrobacterium tumefaciens* LBA4044 berhasil dilakukan dengan *triparental mating* yang ditandai dengan tumbuhnya koloni bakteri pada media seleksi dan munculnya pita berukuran 478 pb pada hasil PCR koloni.

Kata kunci: pHSE401, *Ralstonia solanacearum*, sgRNA, *triparental mating*

ABSTRACT

SINDA CAHYANI. CRISPR/Cas9 Vector Construction for *StTOPP6* Gene Editing in Potato (*Solanum tuberosum* L.) IPB CP1. Supervised by MIFTAHUDIN and ARIS TIAHJOLEKSONO.

The development of genome editing technology has enabled susceptible-gene (S-gene) editing techniques to emerge as a promising method for developing plants disease resistant. In potatoes, the type one phosphatase protein 6 (TOPP6) interacts with the RipAS effector of *Ralstonia solanacearum*, enhancing effector virulence, leading to bacterial wilt symptoms in the plant. This study aimed to construct a CRISPR/Cas9 recombinant vector carrying sgRNA to disrupt the *StTOPP6* gene. The presence of the *StTOPP6* gene in the potato cultivar IPB CP1 was confirmed and two high-precision sgRNAs were designed. These sgRNAs were inserted into the pHSE401 plasmid and transformed into *Escherichia coli* TOP10 cells. Verification of sgRNA insertion was conducted using colony PCR and plasmid PCR. The resulting amplicon showed an expected band size 478 bp. The recombinant vector construct, pHSE401_Cr1, was subsequently transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4044 via *triparental mating*. The sgRNA construct in pHSE401 plasmid was successfully transformed into *A. tumefaciens* LBA4044, it was confirmed by the growth of bacterial colonies on selection medium and the appearance of a 478 bp band in colony PCR results.

Keywords: pHSE401, *Ralstonia solanacearum*, sgRNA, *triparental mating*

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 2025
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.

KONSTRUKSI VEKTOR CRISPR/*Cas9* UNTUK PENGEDITAN GEN *StTOPP6* PADA TANAMAN KENTANG (*Solanum tuberosum* L.) IPB CP1

SINDA CAHYANI

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana pada
Program Studi Biologi

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2025**



@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 mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

Judul Skripsi : Konstruksi Vektor CRISPR/Cas9 untuk Pengeditan Gen *StTOPP6*
pada Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) IPB CP1

Nama : Sinda Cahyani

NIM : G3401211061

Disetujui oleh

Pembimbing 1:
Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M. Si



Pembimbing 2:
Dr. Ir. Aris Tjahjoleksono, DEA



Diketahui oleh

Ketua Departemen Biologi:
Dr. Ir. Iman Rusmana, M.Si
NIP. 196507201991031002



Tanggal Ujian: 10 Juli 2025

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 mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.



PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanaahu wa Ta'ala atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema pengeditan gen menggunakan sistem CRISPR/Cas9 dipilih dalam penelitian, dilaksanakan sejak bulan Oktober 2024 sampai bulan Juni 2025, dengan judul “Konstruksi Vektor CRISPR/Cas9 untuk Pengeditan Gen *StTOPP6* pada Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) IPB CP1”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si. dan Dr. Ir. Aris Tjahjoleksono, DEA. yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Rika Indri Astuti, S.Si, M.Si. selaku pembimbing akademik. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada keluarga penulis Ibu Cucu Cuminar, Pak Warsa, Gilang, Dwi, serta keluarga lainnya yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada Desi, Vivi Alvian, Rizki Rahma, Azizah, Cintami, Pak Asep, Pak Arief Pambudi, Ka Afridha, Ka Farah, Ka Rani, dan seluruh staff tenaga pendidik Departemen Biologi IPB yang telah memberikan ilmu dan mendukung secara penuh selama penulis menempuh program Sarjana di IPB. Penulis juga mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada Keluarga Besar Biologi IPB angkatan 58, seluruh teman dan kolega yang telah banyak membantu dan memberikan dukungan yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu. Terakhir penulis mengucapkan terima kasih kepada G-Dragon dan *boy group* Treasure yang sudah *comeback* dan menerbitkan karya-karya baru ketika penulis dalam masa penelitian, yang dapat membangkitkan semangat penulis dalam menyelesaikan studi. Semoga Allah Subhanahu wa Ta'ala membalas kebaikan yang telah seluruh pihak berikan kepada penulis dengan sebaik-baik balasan.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, sehingga besar harapan penulis untuk mendapatkan kritik dan saran yang membangun. Semoga karya ilmiah ini bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan dan bagi kemajuan ilmu pengetahuan.

Bogor, Agustus 2025

Sinda Cahyani

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 mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB University.

DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
II METODE	3
2.1 Waktu dan Tempat	3
2.2 Alat dan Bahan	3
2.3 Prosedur Kerja	3
2.4 Analisis Data	6
III HASIL DAN PEMBAHASAN	7
3.1 Desain Primer untuk Verifikasi Gen <i>StTOPP6</i>	7
3.2 Verifikasi Gen <i>StTOPP6</i> pada Kentang IPB CP1	7
3.3 Desain sgRNA	8
3.4 Konstruksi Vektor Rekombinan pHSE401-sgRNA	9
3.5 Transformasi Vektor Rekombinan ke Sel <i>Escherichia coli</i>	11
3.6 Verifikasi Transforman dengan PCR Koloni	12
3.7 Transformasi Vektor Rekombinan ke Sel <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
IV SIMPULAN DAN SARAN	15
4.1 Simpulan	15
4.2 Saran	15
DAFTAR PUSTAKA	16
LAMPIRAN	16
RIWAYAT HIDUP	16

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.

DAFTAR GAMBAR

1	Fragmen PCR amplifikasi DNA <i>StTOPP6</i> . Fragmen dielektroforesis pada gel agarosa 1% dalam buffer TAE 1X selama 28 menit pada 100 volt. S = fragmen gen <i>StTOPP6</i> , M = marka DNA <i>ladder</i> 100 pb	7
2	Hasil pengeditan sekuen parsial ekson 2 gen <i>StTOPP6</i> dengan panjang 501 pb. Sekuen berwarna merah = Posisi Cr 1 (sgRNA 1), Sekuen berwarna hijau = Posisi Cr 2 (sgRNA 2)	8
3	Skema peta wilayah gen <i>StTOPP6</i> yang menunjukkan situs target sgRNA dalam ekson 2 (NCBI)	8
4	Pensejajaran sekuen sgRNA pada situs target kentang IPB CP1 dan SolTub 3.0. Situs target ditandai dengan warna kuning, kotak persegi menunjukkan posisi PAM (NGG)	9
5	Hasil elektroforesis DNA pHSE401. M = marka DNA <i>ladder</i> 1 kb, 1 = pHSE401 hasil linearisasi, 2 = pHSE401 sebelum linearisasi	10
6	Peta fisik konstruksi plasmid rekombinan pHSE401_sgRNASTOPP6.	10
7	Transformasi plasmid rekombinan ke dalam <i>E. coli</i> TOP10 pada media LB agar. A = Kontrol negatif sel kompeten tanpa pHSE401 pada media seleksi kanamisin, B = Kontrol positif sel kompeten tanpa pHSE401 pada media seleksi streptomisin, C = pHSE401_Cr1 pada media seleksi kanamisin, D = pHSE401_Cr2 pada media seleksi kanamisin	11
8	Fragmen PCR koloni <i>E. coli</i> TOP10 hasil transformasi. Fragmen koloni positif sepanjang 478 pb terdiri dari 20 pb urutan sgRNA sisipan + 458 pb kerangka vektor. M1 = marka DNA <i>ladder</i> 1 kb, Cr1 = koloni hasil transformasi dengan <i>insert</i> sgRNA1 (Cr1), Cr2 = koloni hasil transformasi dengan <i>insert</i> sgRNA2 (Cr2), M2 = marka DNA <i>ladder</i> 100 pb	12
9	Hasil PCR plasmid rekombinan. M = marka DNA <i>ladder</i> 1 kb, Cr1 = Hasil isolasi plasmid pHSE401_Cr1, Cr2 = Hasil isolasi plasmid pHSE401_Cr2	13
10	Transformasi plasmid rekombinan ke dalam <i>A. tumefaciens</i> LBA4044 dengan <i>triparental mating</i> (A) <i>Triparental mating</i> (B) Hasil cawan sebar <i>A. tumefaciens</i> LBA4044 transforman	13
11	PCR koloni hasil <i>triparental mating</i> <i>A. tumefaciens</i> LBA4044_pHSE401_Cr1. M = marka DNA <i>ladder</i> 1 kb, Cr1 = hasil PCR koloni dengan <i>insert</i> sgRNA1 (Cr1)	14

DAFTAR LAMPIRAN

1	Komposisi media	16
2	Kromatogram sekuen parsial gen <i>StTOPP6</i> kentang IPB CP1	16