

KONSTRUKSI VEKTOR CRISPR/CAS9 UNTUK PENGEDITAN GEN *ROC5* PADA PADI KULTIVAR HAWARA BUNAR

NASHWA AQILA MAHARANI



DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
BOGOR
2024

- 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 SKRIPSI DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi dengan judul “Konstruksi Vektor CRISPR/Cas9 untuk Pengeditan Gen *ROC5* pada Padi Kultivar 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 skripsi ini.

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

Bogor, Agustus 2024

Nashwa Aqila Maharani
G3401201074

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

ABSTRAK

NASHWA AQILA MAHARANI. Konstruksi Vektor CRISPR/Cas9 untuk Pengeditan Gen *Roc5* pada Padi Kultivar Hawara Bunar. Dibimbing oleh MIFTAHUDIN dan MIFTAHUL HUDA FENDIYANTO.

Peningkatan produksi padi (*Oryza sativa* L.) dengan mengoptimalkan pemanfaatan lahan kering masam memerlukan upaya pemuliaan untuk meningkatkan efektifitas toleransi tanaman terhadap cekaman kekeringan. Padi kultivar Hawara Bunar merupakan varietas toleran asam yang perlu ditingkatkan kemampuan toleransinya terhadap cekaman kekeringan dengan mengatur tingkat penggulangan daun. Gen *ROC5* adalah gen yang terlibat dalam penggulangan daun. Pengeditan gen *ROC5* dengan teknologi CRISPR/Cas9 diharapkan dapat menghasilkan tanaman mutan yang lebih toleran kekeringan dengan respon penggulangan daun yang moderat dalam kondisi cekaman kekeringan. Penelitian ini bertujuan mengkonstruksi vektor rekombinan yang membawa sgRNA untuk gen *ROC5* dari tanaman padi kultivar Hawara Bunar. Plasmid pRGEB32 yang mengandung gen Cas9 digunakan untuk mengklon sgRNA *ROC5* dengan metode kloning Golden Gate dan transformasi heat shock. Konfirmasi sgRNA-*ROC5* dilakukan dengan PCR koloni, lalu plasmid diisolasi dan dilanjutkan verifikasi menggunakan metode PCR dengan primer spesifik dan primer sekuensing untuk vektor pRGEB32. Hasilnya menunjukkan bahwa hanya bakteri transforman pRGEB32-*ROC5*-cr1 yang tumbuh pada media seleksi. Hal ini mengindikasikan bahwa sgRNA *ROC5* berhasil disisipkan pada plasmid. Konfirmasi dengan PCR koloni dan PCR plasmid menggunakan primer spesifik membuktikan terdapat amplikon berukuran 425 bp. Data sekuensing juga menunjukkan terdapat sekuen sgRNA *ROC5* pada lokasi yang sesuai.

Kata kunci: cekaman kekeringan, pengeditan gen, penggulangan daun, sgRNA

ABSTRACT

NASHWA AQILA MAHARANI. CRISPR/Cas9 Vector Construction for *ROC5* gene editing in Rice cv. Hawara Bunar. Supervised by MIFTAHUDIN and MIFTAHUL HUDA FENDIYANTO.

Increasing rice (*Oryza sativa* L.) production by optimizing the utilization of acid dry lands requires breeding efforts to improve plant tolerance effectivity to drought stress. Rice cv. Hawara Bunar is an acid-tolerant variety that needs to be improved for its tolerance to drought stress by regulating the level of leaf rolling. The *ROC5* gene is a gene involved in leaf rolling. Editing the *ROC5* gene with CRISPR/Cas9 technology is expected to produce drought-tolerant mutant plants with a moderate leaf rolling under drought stress conditions. This study aimed to construct a recombinant vector carrying sgRNA for the *ROC5* gene from rice cv. Hawara Bunar. Plasmid pRGEB32 containing *Cas9* gene was used to clone *ROC5* sgRNA by the Golden Gate cloning method and heat shock transformation. Confirmation of sgRNA-*ROC5* was performed by PCR colony, then the plasmid was isolated and verified using the PCR method with specific primer for sgRNA and sequencing primer for the pRGEB32 vector. The results showed that only pRGEB32_*ROC5*-cr1 recombinant vector successfully transformed into *Escherichia coli* indicating that the *ROC5* sgRNA was inserted into the plasmid. Insert confirmation using colony PCR and plasmid PCR using specific primers produced amplicon of 425 bp. Sequencing data also showed the presence of *ROC5* sgRNA sequence at the target location.

Keywords: drought stress, gene editing, leaf rolling, transformation, sgRNA

KONSTRUKSI VEKTOR CRISPR/CAS9 UNTUK PENGEDITAN GEN *ROC5* PADA PADI KULTIVAR HAWARA BUNAR

NASHWA AQILA MAHARANI

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
2024

@Hak cipta milik IPB University

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.

Judul Skripsi : Konstruksi Vektor CRISPR/Cas9 untuk Pengeditan Gen *Roc5*
pada Padi Kultivar Hawara Bunar

Nama : Nashwa Aqila Maharani
NIM : G3401201074

@Hak cipta milik IPB University

Disetujui oleh

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



Digitally signed by:
Miftahudin

Date: 8 Agu 2024 19:51:02 WIB
Verify at [disign.ipb.ac.id](#)



Pembimbing 2:
Dr. Miftahul Huda Fendiyanto, S.Si., M.Si.

Diketahui oleh

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



Digitally signed by:
Iman Rusmana

Date: 9 Agu 2024 08:28:47 WIB
Verify at [disign.ipb.ac.id](#)

Tanggal Ujian: 6 Agustus 2024

Tanggal Lulus:

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 September 2023 sampai bulan Juni 2024, dengan judul “Konstruksi Vektor CRISPR/Cas9 untuk Pengeditan Gen *ROC5* pada Padi Kultivar Hawara Bunar”.

Terima kasih penulis ucapkan kepada para pembimbing, Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si. dan Dr. Miftahul Huda Fendiyanto, S.Si., M.Si. yang telah membimbing dan banyak memberi saran. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Ir. Achmad Farajallah, M.Si. selaku pembimbing akademik, Dr. Ir. Dorly, M.Si. selaku moderator seminar, dan Dr. Dra. Sri Listiyowati, M.Si. selaku penguji luar komisi pembimbing. Ungkapan terima kasih juga disampaikan kepada keluarga penulis Sri Hartati, Agus, Aji, Indra Rusyandi, nenek saya tercinta Rubiyah serta seluruh keluarga lainnya yang telah memberikan dukungan, doa, dan kasih sayangnya. Di samping itu, penghargaan penulis sampaikan kepada Ka Rani, Pak Arief Pambudi, Ka Farah, Ka Eka, Pak Asep beserta dan seluruh dosen khususnya dosen Departemen Biologi IPB yang telah memberikan ilmu selama penulis menempuh program Sarjana di IPB. Penulis juga mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada Keluarga Besar Biologi IPB angkatan 57, seluruh teman dan kolega yang telah banyak membantu dan memberikan dukungan yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu. 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 2024

Nashwa Aqila Maharani



DAFTAR ISI

DAFTAR GAMBAR	xi
I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
II METODE	2
2.1 Waktu dan Tempat	2
2.2 Alat dan Bahan	2
2.3 Prosedur Kerja	3
2.3.1 Konstruksi Vektor CRISPR/Cas9	3
2.3.2 Introduksi Vektor Rekombinan ke dalam <i>E. Coli</i> TOP10	4
2.3.3 Seleksi Koloni Positif	4
2.3.4 Isolasi Plasmid	5
2.3.5 Verifikasi plasmid rekombinan	5
2.4 Analisis Data	5
III HASIL DAN PEMBAHASAN	6
3.1 Konstruksi vektor CRISPR/Cas9-sgRNAROC5	6
3.2 Transformasi Plasmid pGREB32 Rekombinan ke dalam <i>E. coli</i> TOP10	7
3.3 Seleksi PCR Koloni Positif	8
3.4 PCR Plasmid dan Verifikasi Sekuens Sisipan sgRNA-ROC5	9
IV SIMPULAN DAN SARAN	11
4.1 Simpulan	11
4.2 Saran	11
DAFTAR PUSTAKA	12
LAMPIRAN	14
RIWAYAT HIDUP	15

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.