



UNIVERSITAS PERTAHANAN RI

**KONSTRUKSI VEKTOR REKOMBINAN pRGE32-sgRNA
UNTUK MENGEDIT GEN ART1 PADA PADI DENGAN
TEKNIK CRISPR/Cas9 UNTUK MENUNJANG KETAHANAN
PANGAN**

ELSA QONITA AZZAHROH 320210301012

**Skripsi yang Ditulis Untuk Memenuhi Sebagian Persyaratan dalam
Mendapatkan Gelar Sarjana**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM MILITER
PROGRAM STUDI BIOLOGI**

BOGOR 2025

LEMBAR PERSETUJUAN SKRIPSI

Nama : Elsa Qonita Azzahroh
NIM : 320210301012
Program Studi : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Militer
Judul Skripsi : Konstruksi Vektor Rekombinan pRGEB32-sgRNA untuk Mengedit Gen *ART1* pada Padi dengan Teknik CRISPR/Cas9 untuk Menunjang Ketahanan Pangan

Dosen Pembimbing I,



Dr. Miftahul Huda Fendiyanto, S.Si., M.Si.
Penata III/c NIP. 199212022022031002
Tanggal : 9 Agustus 2025

Dosen Pembimbing II,



Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si.
Pembina Utama Muda IV/c
Tanggal : 11 Agustus 2025

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi



Sukanto, S.Si., M.Sc.
Letkol Arh NRP. 11970023040672
Tanggal : 11 Agustus 2025

Dekan Fakultas MIPA Militer



Dr. Ir. Ence Darmo Jaya Supena, M.Si.
Pembina Utama Muda IV/c
Tanggal : 12/8-2025

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

Nama : Elsa Qonita Azzahroh
 NIM : 320210301012
 Program Studi : Biologi
 Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Militer
 Judul Skripsi : Konstruksi Vektor Rekombinan pRGEB32-sgRNA untuk Mengedit Gen *ART1* pada Padi dengan Teknik CRISPR/Cas9 untuk Menunjang Ketahanan Pangan

No.	Nama/Pangkat/Korps/Gol./NIP	Tanda Tangan	Tanggal
1.	Dosen Pembimbing I: Dr. Miftahul Huda Fendiyanto, S.Si., M.Si. Penata III/c NIP. 199212022022031002		9/8 ²⁵
2.	Dosen Pembimbing II: Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si. Pembina Utama Muda IV/c		11/8 ²⁵
3.	Dosen Penguji I: Dr. Rizky Dwi Satrio, S.Si., M.Si. Penata Muda Tk. I III/b NIP. 199212062022031001		9/8 ²⁵
4.	Dosen Penguji II: Dr. Isna Arofatus Nikmah, S.Si., M.Si. Penata Muda Tk. I III/b NIP. 199206112022032001		9/8 ²⁵

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini tidak terdapat karya atau bagian karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan jenjang apapun di suatu Perguruan Tinggi; dan sepanjang sepengetahuan saya juga tidak terdapat istilah, frasa, kalimat, paragraf, subbab atau bab dari karya yang pernah ditulis atau diterbitkan; kecuali yang secara tertulis diajukan dalam naskah ini dan disebutkan dalam Daftar Referensi.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa terdapat plagiat dalam skripsi ini, saya bersedia menerima sanksi sesuai ketentuan peraturan/undang-undang yang berlaku.

Bogor, 19 Juli 2025



Elsa Qonita Azzahroh

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH
UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Pertahanan Republik Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Elsa Qonita Azzahroh
NIM : 320210301012
Program Studi : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam MIliter
Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Pertahanan Republik Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneeksklusif** (*Non-exclusive Royalty-Free Right*) atas karya ilmiah saya yang berjudul :

Konstruksi Vektor Rekombinan pRGEB32-sgRNA untuk Mengedit Gen *ART1* pada Padi dengan Teknik CRISPR/Cas9 untuk Menunjang Ketahanan Pangan

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan), Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Pertahanan Republik Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data [*database*], merawat, dan mempublikasi tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Bogor

Pada tanggal : 19 Juli 2025

Yang menyatakan



Elsa Qonita Azzahroh

NIM. 320210301012

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis haturkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena berkat Rahmat dan karunia-Nya penulisan skripsi dengan judul : “Konstruksi Vektor Rekombinan pRGE32-sgRNA untuk Mengedit Gen *ART1* pada Padi dengan Teknik CRISPR/Cas9 untuk Menunjang Ketahanan Pangan” dapat diselesaikan. Penulisan skripsi ini ditujukan sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Militer, Universitas Pertahanan Republik Indonesia.

Penulisan skripsi ini dapat diselesaikan berkat bantuan dan dukungan dari berbagai pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Untuk itu, pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Dr. Miftahul Huda Fendiyanto, S.Si., M.Si. selaku pembimbing 1 yang telah memberikan bimbingan, saran, masukan, dan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini;
2. Prof. Dr. Ir. Miftahudin, M.Si. selaku pembimbing 2 yang telah memberikan bimbingan, saran, masukan, dan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini;
3. Dr. Rizky Dwi Satrio, S.Si., M.Si. selaku penguji 1 yang telah memberikan masukan pada seminar proposal dan seminar hasil kepada penulis;
4. Dr. Isna Arofatun Nikmah, S.Si., M.Si. selaku penguji 2 yang telah memberikan masukan pada seminar proposal dan seminar hasil kepada penulis;
5. Bapak Eri Sutarto dan Ibu Safitri Hafsari serta saudara Afif Naqib Izudin yang selalu memberikan dukungan, doa, serta semangat dalam mengerjakan skripsi.
6. Nazhifa Anindya Raissa Dewanti dan SMSK Truly Yuswantari Firdaus selaku teman dan sahabat baik penulis yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyusunan skripsi.

7. Rekan seperjuangan Prodi Biologi Cohort 2 yang sangat luar biasa dalam kebersamaan dan kekeluargaan, serta rekan bekerja di laboratorium yang telah memberikan semangat untuk mengerjakan penelitian di laboratorium;
8. Dr. Ir. Ence Darmo Jaya Supena, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Militer, Universitas Pertahanan Republik Indonesia;
9. Kolonel CKM (Purn) Nurhadiyanta, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing akademik, para dosen Prodi Biologi, serta staf Prodi Biologi yang telah memberikan ilmu dan arahan selama menempuh sarjana di Universitas Pertahanan.

Peneliti menyadari bahwa skripsi ini masih kurang sempurna. Oleh karena itu, dengan kerendahan hati mengharapkan mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi kesempurnaan skripsi ini.

Bogor, 19 Juli 2025



Elsa Qonita Azzahroh

ABSTRAK

KONSTRUKSI VEKTOR REKOMBINAN pRGE32-sgRNA UNTUK MENGEDIT GEN *ART1* PADA PADI DENGAN TEKNIK CRISPR/Cas9 UNTUK MENUNJANG KETAHANAN PANGAN

Produksi padi mengalami penurunan pemenuhan kebutuhan mencapai 2,05% pada tahun 2023, terutama disebabkan oleh berkurangnya lahan subur untuk penanaman padi. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk meningkatkan produksi padi melalui pengembangan varietas padi yang beradaptasi pada lahan suboptimal seperti lahan masam. Untuk mendukung upaya tersebut, diperlukan studi fungsional gen yang terlibat dalam toleransi padi terhadap tanah masam dan cekaman aluminium. Penelitian ini bertujuan untuk: 1. mengkonstruksi vektor pRGE32 rekombinan dengan sgRNA dari gen *ART1* dan mengintroduksikannya ke sel bakteri *E. coli* strain TOP10 dan *A. tumefaciens*, 2. serta menganalisis ekspresi gen toleransi aluminium pada protoplas yang diintroduksi vektor pRGE32 rekombinan dengan sgRNA dari gen *ART1*. Konstruksi vektor rekombinan CRISPR/Cas9 dilakukan dengan teknik *Golden Gate cloning*, kemudian vektor rekombinan diintroduksikan ke sel bakteri *E. coli* TOP10 dan *A. tumefaciens* dengan metode kejut panas. Plasmid rekombinan juga diintroduksikan ke protoplas dengan teknik elektroforasi untuk selanjutnya dilakukan analisis ekspresi gen menggunakan teknik RT-qPCR. Hasil percobaan menunjukkan bahwa vektor rekombinan pRGE32-sgRNA *ART1* Berhasil dikonstruksi dan telah diverifikasi menggunakan teknik PCR koloni dan gel elektroforesis yang menghasilkan pita DNA berukuran ± 430 bp. Hasil amplifikasi DNA kemudian disekuensekan dan menunjukkan bahwa sgRNA berhasil disisipkan ke dalam vektor pRGE32. Analisis ekspresi gen menunjukkan bahwa gen *art1* mutan pada protoplas terekspresi rendah dan berbeda signifikan dengan kontrol yang membuktikan bahwa gen telah mengalami pengeditan. Penelitian ini dapat menjadi dasar untuk membuat kultivar unggul padi toleran aluminium.

Kata Kunci : CRISPR/Cas9, padi, pRGE32, sgRNA

ABSTRACT

CONSTRUCTION OF RECOMBINANT VECTOR pRGEB32-sgRNA TO EDIT THE ART1 GENE IN RICE WITH CRISPR/Cas9 TECHNIQUE TO SUPPORT FOOD SECURITY

Rice production experienced a 2.05% decline in meeting national demand in 2023, primarily due to the reduction of fertile land available for rice cultivation. Therefore, efforts are needed to increase rice production through the development of rice varieties that are adapted to suboptimal lands, such as acidic soils. To support this effort, functional studies of genes involved in rice tolerance to acidic soil and aluminum stress are essential. This study aimed to: (1) construct a recombinant pRGEB32 vector carrying sgRNA targeting the ART1 gene and introduce it into E. coli strain TOP10 and Agrobacterium tumefaciens; and (2) analyze the expression of aluminum tolerance-related genes in rice protoplasts introduced with the recombinant pRGEB32 vector. The recombinant CRISPR/Cas9 vector was constructed using the Golden Gate cloning technique, and the recombinant plasmid was introduced into E. coli TOP10 and A. tumefaciens via heat shock. The plasmid was also introduced into rice protoplasts using electroporation, followed by gene expression analysis using RT-qPCR. Experimental results showed that the recombinant vector pRGEB32-sgRNA ART1 was successfully constructed and verified using colony PCR and gel electrophoresis, resulting in a DNA band of approximately 430 bp. DNA amplification products were subsequently sequenced and confirmed the successful insertion of the sgRNA into the pRGEB32 vector. Gene expression analysis showed that ART1 expression in mutant protoplasts was significantly lower compared to the control, indicating successful gene editing. This research may serve as a basis for the development of superior aluminum-tolerant rice cultivars.

Keywords: CRISPR/Cas9, pRGEB32, rice, sgRNA

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN SKRIPSI.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAHv	
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK	viii
<i>ABSTRACT</i>	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Landasan Teori	5
2.2 Hasil Penelitian Terdahulu.....	10
2.3 Kerangka Pemikiran	12
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	11
3.1 Desain Penelitian	11
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.3 Alat dan Bahan Penelitian	12

3.4 Prosedur Penelitian	14
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	21
4. 1 Konstruksi Vektor pRGEB32-sgRNA <i>ART1</i>	21
4.2 Transformasi Plasmid pRGEB32 Rekombinan ke <i>E.coli</i> TOP10	22
4. 3 Seleksi PCR Koloni	22
4. 4 Verifikasi Sekuen Sisipan sgRNA-ART1	24
4. 5 Transformasi Protoplas Menggunakan Plasmid pRGEB32- ART1 Rekombinan	25
4. 6 Isolasi RNA dan DNA Protoplas Rekombinan	26
4.7 <i>Triparental Mating Agrobacterium tumefaciens</i> dan Isolasi Plasmid Rekombinan	29
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	31
5.1 Kesimpulan.....	31
5.2 Saran.....	31
DAFTAR PUSTAKA.....	32
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Genotipe <i>E. coli</i> strain TOP10	5
Gambar 2. 2 Mekanisme toleransi AI yang diperantarai oleh <i>ART1</i>	6
Gambar 2. 3 Ilustrasi pemotongan gen pada teknik CRISPR/Cas9	7
Gambar 2. 4 Plasmid pRGEB32 pembawa protein	8
Gambar 2. 5 Kerangka Pemikiran.....	10
Gambar 4. 1 Peta fisik plasmid pRGEB32 yang terdapat sisipan sgRNA- ART1.....	21
Gambar 4. 2 Hasil Transformasi pRGEB32-ART1 ke dalam <i>E. coli</i> TOP10.	22
Gambar 4. 3 Hasil PCR koloni dan peta fisik pRGEB32	23
Gambar 4. 4 Plasmid rekombinan pRGEB32-ART1.....	24
Gambar 4. 5 Analisis hasil sekuensing.....	25
Gambar 4. 6 Hasil isolasi protoplas perbesaran 40x.....	26
Gambar 4. 7 Hasil PCR isolasi cDNA protoplas dan peta fisik RNA	29
Gambar 4. 8 Ekspresi gen relatif <i>ART1</i>	28
Gambar 4. 9 Hasil PCR isolasi DNA protoplas dan peta fisik DNA	30
Gambar 4.10 Hasil <i>triparental mating</i>	30

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Penelitian Terdahulu.....	8
Tabel 3. 1 Jadwal Kegiatan Penelitian.....	12
Tabel 3. 2 Oligonukleotida yang digunakan dalam pengeditan gen	13
Tabel 3. 3 Oligonukleotida yang digunakan dalam ekspresi gen.....	19
Tabel 4. 1 Hasil nanodrop isolasi RNA dan DNA protoplas rekombinan .	26



DAFTAR SINGKATAN

ART1	: <i>Alumunium Resistance Transcription factor 1</i>
CRISPR/Cas9	: <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9</i>
CrRNA	: CRISPR RNA
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
GKG	: Gabah Kering Giling
LAF	: <i>Laminar Air Flow</i>
LB	: Luria Bertani
NFW	: <i>Nuclease Free Water</i>
PAM	: <i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
sgRNA	: <i>Single Guide Ribonucleic Acid</i>
TracrRNA	: <i>Trans-activating CRISPR RNA</i>
UV	: Ultraviolet