

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Landasan Teori

2.1.1 Konstruksi Vektor

Vektor adalah molekul DNA/RNA yang memiliki fungsi umum sebagai pembawa material genetik tertentu ke sel target. Vektor dalam penelitian bioteknologi molekuler memiliki peran yang penting yang digunakan sebagai dasar penelitian kloning gen, ekspresi protein rekombinan, dan gen editing. Vektor bisa berupa plasmid, virus, biomaterial, dan nanopartikel. Plasmid paling sering digunakan sebagai vektor untuk penelitian gen editing dan ekspresi gen, termasuk pada penelitian menggunakan teknologi CRISPR/Cas9.

Konstruksi vektor merupakan bagian terpenting dan sebagai awal untuk untuk mengedit gen pada teknologi CRISPR/Cas9. Dalam CRISPR/Cas9, konstruksi vektor melibatkan penggabungan antara protein Cas9 dan sgRNA yang diarahkan ke sekuen target yang spesifik, sehingga memungkinkan terjadi pemotongan di lokasi yang diinginkan (Sharma & Sharma, 2015)

2.1.2 Padi

Tanaman padi (*Oryza sativa*) merupakan tanaman semusim yang memiliki morfologi batang bulat dan berongga yang biasa disebut dengan jerami, dan memiliki tulang daun sejajar. Berikut merupakan klasifikasi dari tanaman padi, antara lain :

Kingdom : Plantae
Subkingdom : Tracheophyta
Superdivisi : Spermatophyta
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliopsida

Subkelas : Commelinidae
 Ordo : Cypirales
 Family : Graminea
 Genus : Oryza
 Spesies : *Oryza sativa* L.

Padi pada umumnya dibagi menjadi dua berdasarkan cara menanamnya, antara lain : Pertama, padi sawah yaitu padi yang masa tanam dan pertumbuhannya memerlukan air. Tanaman padi sawah memiliki akar serabut dan menyerap zat hara dari tanah. Kedua padi kering atau padi gogo, yaitu padi yang tidak memerlukan genangan/air. Tidak terdapat perbedaan morfologis dan fisiologis dari kedua jenis padi tersebut (Monareh dan Ogie, 2020).

2.1.2 *Escherichia coli*

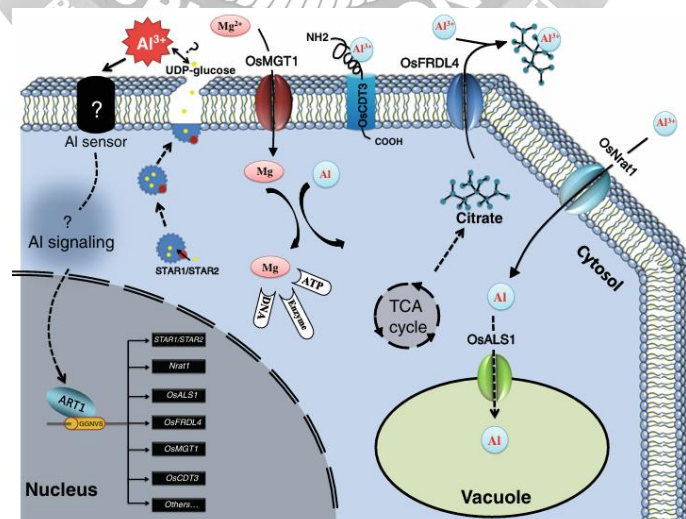
Escherichia coli adalah bakteri basil gram negatif yang merupakan organisme penyebab penyakit usus dan ekstraintestinal pada manusia, seperti bekateremia, pneumonia, dan infeksi perut lainnya (Mueller *et al.*, 2023). Namun, dalam dunia penelitian genetika dan biologi molekuler, bakteri ini merupakan organisme yang memiliki peranan penting. Salah satu strain *E. coli* yang sering digunakan adalah *E. coli* strain TOP10 yang kompeten dalam lingkup pengeditan gen. Genotipe pada strain ini, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1, menjadikannya sangat sesuai untuk kloning plasmid rekombinan dan rekayasa genetik lainnya. Strain TOP10 sebagai pembawa vektor rekombinan yang ideal karena kemampuannya dalam mengambil DNA bakteri asing secara efisien.

<i>E. coli</i> strains		Genotype	Source or References
K-12 strains	TOP10	<i>F₋ mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) €80lacZD M15 DlacX74 recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen

Gambar 2.1 Genotipe *E. coli* strain TOP10

2.1.2 Gen *ART1*

Gen *Alumunium Resistance Transcription factor 1 (ART1)* adalah gen yang ditemukan pada tanaman padi sebagai pengode faktor transkripsi yang berperan dalam toleransi alumunium. Namun, tidak semua spesies tanaman padi memiliki gen tersebut, hanya spesies *Oryza sativa*, khususnya varietas yang toleran terhadap alumunium seperti padi *japonica* dan *indica* (Yamaji *et al.*, 2009). Gen *ART1* berada pada kromosom 12, memiliki 2 ekson dan 1 intron, dengan total panjang sekuens 2.928bp. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa gen *ART1* mengontrol lebih dari 30 gen dalam berbagai fungsi untuk melindungi tanaman dari cekaman alumunium. Cekaman alumunium masuk ke dalam sel akar dan sinyal akan menginduksi gen *ART1* untuk mengaktifkan beberapa gen yang dikontrol antara lain gen *STAR1*, *STAR2*, *OsFRDL4*, *OsMATE*, *ALS1*, *OsNRAT*, dan lainnya (Gambar 2.2). Gen tersebut memiliki peran sebagai pendetoksifikasi alumunium, ekskresi asam organik, dan transportasi ion (Yamaji *et al.*, 2009).



Gambar 2. 2 Mekanisme toleransi Al yang diperantarai oleh *ART1*

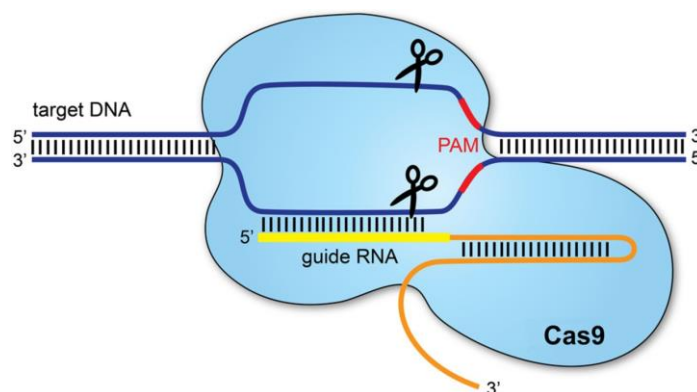
(Sumber : Ma *et al.*, 2014)

Saat tanaman mengalami cekaman alumunium, gen *ART1* akan menginduksi ekspresi gen lain untuk meminimalkan efek toksik dari alumunium di dalam sel tanaman. Transporter atau protein dikode oleh gen

target *ART1* yang bertugas sebagai pengikat ion aluminium dan mencegahnya memasuki sel. *ART1* juga berperan dalam *chelation* (pengikatan aluminium) di lingkungan akar (Yamaji *et al.*, 2009).

2.1.3 Teknik *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic/ Cas9* (CRISPR/Cas9)

CRISPR/Cas9 merupakan suatu teknologi dengan menggunakan pendekatan molekuler yang dapat memotong fragmen gen dengan bantuan protein Cas9 yang dipandu oleh *single guide RNA* (sgRNA) (Jinek *et al.*, 2012). Teknologi pengeditan gen menggunakan CRISPR merupakan salah satu teknik yang sangat diminati terutama dalam sel eukariotik. Penemuan CRISPR diawali dari penemuan urutan dalam domain ujung 3' pada gen *iap* saat Ishino *et al.* (1987) meneliti bakteri *Escherichia coli*. Peneliti sebelumnya mempelajari teknologi CRISPR dan menemukan varian protein Cas9 dapat dicirikan dengan adanya keberadaan dua domain struktural ribonuklease yang berfungsi untuk memotong DNA. *Single guide RNA* akan berikatan dengan protein Cas9 dan akan mencari urutan sgRNA komplementar di sepanjang urutan DNA genom. Cas9 akan memverifikasi situs *Protospacer Adjacent Motif* (PAM) dan urutan DNA yang ditemukan akan diikat serta dipotong sesuai dengan urutan DNA target (Gambar 2.3). Penggunaan protein Cas9 liar, seperti SpCas9 (*Staphylococcus pyogenes* Cas9) dan SaCas9 (*S. aureus* Cas9) dapat menyebabkan efek *off target*, delesi segmen besar, dan translokasi kromosom (Li *et al.*, 2023).

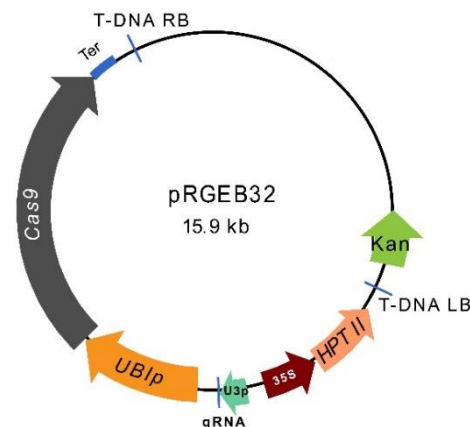


Gambar 2. 3 Ilustrasi pemotongan gen pada teknik CRISPR/Cas9

Pada penelitian ini, sgRNA yang didapat dari gen *ART1* dengan menggunakan aplikasi CHOPCHOP merupakan komponen kunci dalam sistem tersebut. Aplikasi CHOPCHOP dapat merancang sgRNA secara efisien dengan memprediksi lokasi yang memungkinkan dan cocok untuk pemotongan DNA secara presisi. Pemotongan sgRNA akan ditargetkan pada ekson 1 gen *ART1* (Lampiran 1). Pada umumnya, sgRNA terdiri atas CRISPR RNA (CrRNA) dan *Trans-activating* CRISPR RNA (TracrRNA). CrRNA mengandung 20 nukleotida *single guide* RNA dan 12 nukleotida segmen berulang untuk membantu stabilitas struktur RNA, sedangkan TracrRNA mengandung 14 nukleotida, untuk pengenalan dan pengikatan dengan RNA target, dan tiga struktur *stem-loop* (Mei *et al.*, 2016).

2.1.4 Plasmid pRGEB32

Plasmid pRGEB32 yang dibawa bakteri *E. coli* merupakan plasmid yang bertugas sebagai vektor pembawa protein Cas9 yang digunakan khusus untuk teknologi CRISPR/Cas9 (Gambar 2.4). Plasmid ini digunakan dalam berbagai penelitian untuk pengembangan tanaman yang toleransi terhadap berbagai stress lingkungan (Livak & Schmittgen, 2001). pRGEB32 dilengkapi elemen-elemen regulasi yang memungkinkan ekspresi gen yang efisien dan stabil dalam sel tanaman, seperti protein Cas9. Protein Cas9 merupakan endonuklease yang berasal dari sistem pertahanan bakteri yang berfungsi sebagai gunting pemotong plamid saat gen baru akan dieditkan pada vektor (Jinek *et al.*, 2012).



Gambar 2. 4 Gambar plasmid pRGEB32 pembawa protein

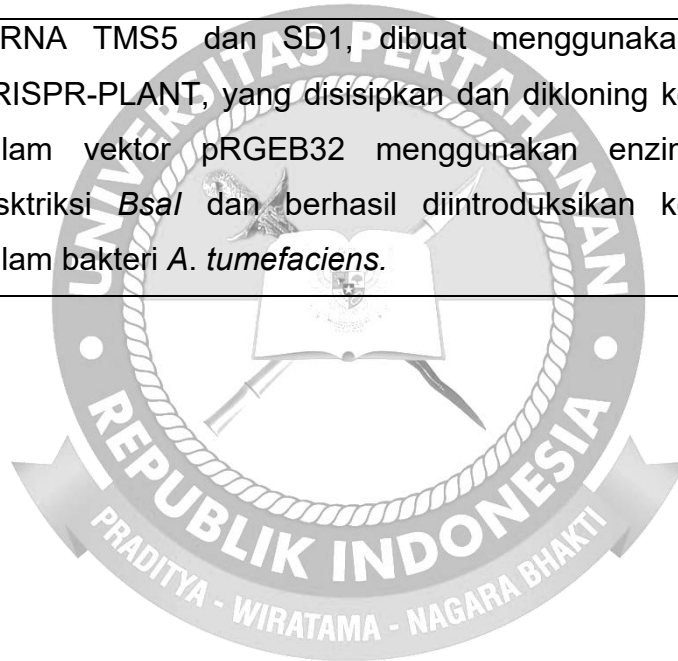
2.2 Hasil Penelitian Terdahulu

Penelitian mutasi gen dan pencarian gen resisten aluminium pernah dilakukan oleh Yamaji *et al.* (2009) menggunakan metode transposon tagging dan Ma *et al.* (2014) pada padi Japonica.

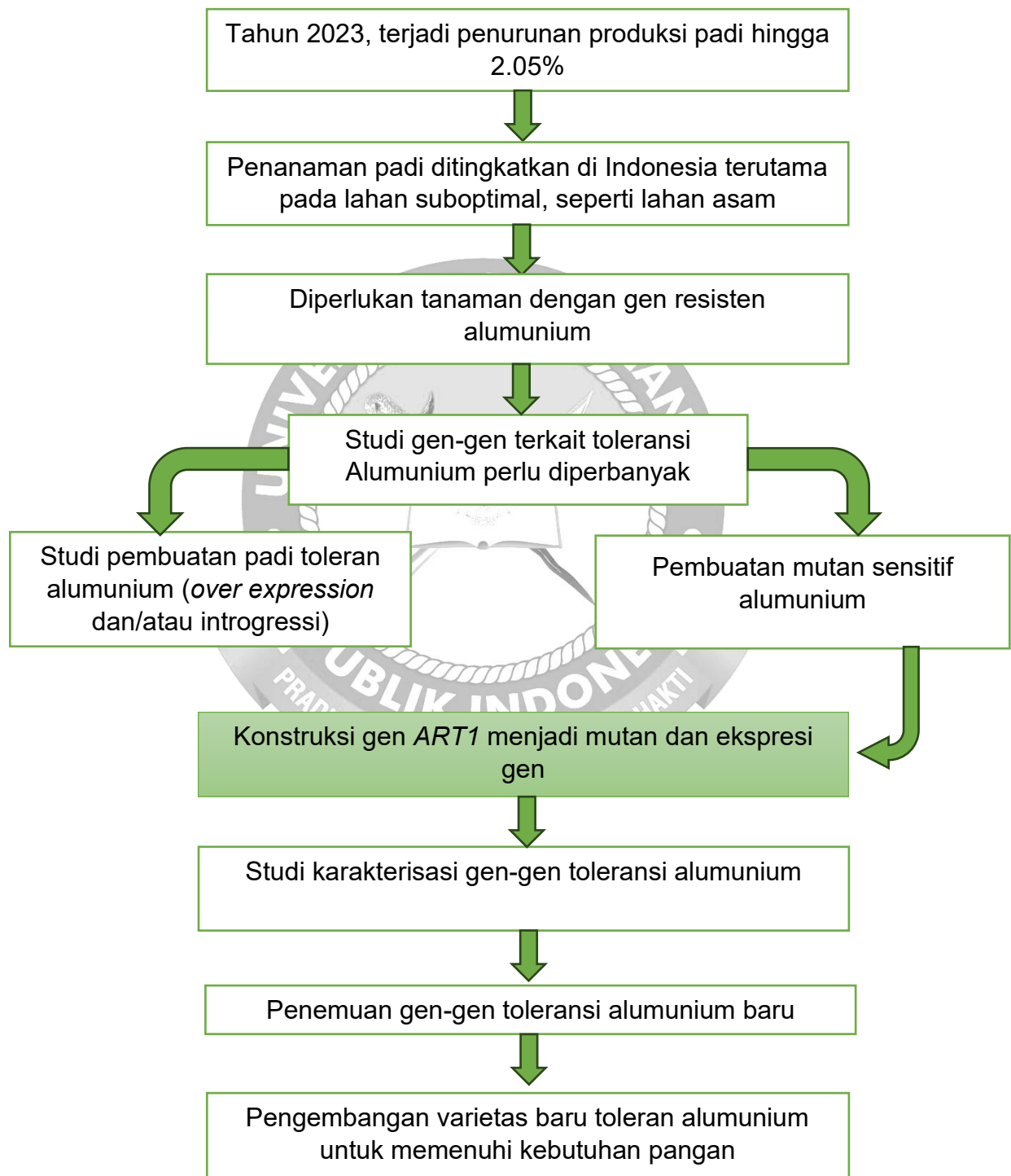
Tabel 2. 1 Penelitian Terdahulu

No.	Penelitian	Tahun
1.	Konstruksi vektor pRGEB32 menggunakan teknologi CRISPR/Cas9 menggunakan sgRNA <i>ART1</i> pada padi kultivar Inpago 5 menggunakan bakteri <i>E. coli</i> TOP10 dan <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . Antibiotik seleksi yang digunakan yaitu antibiotik kanamisin dan streptomisin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa vektor berhasil dikonstruksi.	(Fendiyanto, <i>et al.</i> , 2025)
2.	Dilakukan transformasi plasmid yang mengandung gen <i>merB</i> pada bakteri <i>E. coli</i> TOP10 menggunakan metode <i>heatshock</i> . Antibiotik seleksi yang digunakan yaitu antibiotik ampicilin. Hasil penelitian dapat dilihat bahwa bakteri rekombinan berhasil tumbuh pada media Luria Bertani (LB) dengan antibiotik ampicilin serta terdapat pita plasmid pada gel agarose yang divisualisasikan dengan UV.	(Rotinsulu <i>et al.</i> , 2019)
3.	Kloning dan transformasi vektor PJ804:77539 pada bakteri <i>E. coli</i> TOP10. Transformasi metode <i>heatshock</i> dan diseleksi dengan media padat dan media cair mengandung antibiotik ampicilin. Hasil penelitian dilihat dengan adanya pita plasmid dari isolasi plasmid <i>E. coli</i> rekombinan pada gel elektroforesis.	(Langden <i>et al.</i> , 2017)

No.	Penelitian	Tahun
3.	Penelitian ini merancang sgRNA menggunakan aplikasi CHOPCHOP dan mengonstruksi gen <i>xa13</i> menggunakan teknik CRISPR/Cas9. Plasmid yang digunakan adalah pRGEB32 yang dibawa oleh bakteri <i>E. coli</i> DH5 α dan diintroduksi ke bakteri <i>E. coli</i> TOP10. Hasil akhir penelitian, sgRNA berhasil diintroduksi pada vektor.	(Hardiyani <i>et al.</i> , 2023)
4.	sgRNA TMS5 dan SD1, dibuat menggunakan CRISPR-PLANT, yang disisipkan dan dikloning ke dalam vektor pRGEB32 menggunakan enzim restriksi <i>Bsa</i> I dan berhasil diintroduksi ke dalam bakteri <i>A. tumefaciens</i> .	(M.T. Andrew <i>et al.</i> , 2020)



2.3 Kerangka Pemikiran



Gambar 2. 5 Kerangka Berpikir