Desain sgRNA dan Optimasi Konstruksi Sistem CRISPR/Cas9 Berbasis Plasmid pX459 sebagai Tahap Awal
Pengembangan Model Knockout Gen MTMR4
Umi Mukholifah, apt. Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri, M.Sc., Ph.D; Dr. Ria Fajarwati Kastian, M.Biotech., M.Bio.
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
LEMBAR PENGESAHAN ii
PERNYATAAN BEBAS PLAGIASI iii
PRAKATA iv
DAFTAR ISI vi
DAFTAR TABEL ix
DAFTAR GAMBAR x
DAFTAR LAMPIRAN xi
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN xii
Intisari xv
Abstract xvi
BAB I PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Permasalahan Penelitian 4
1.3 Tujuan Penelitian 5
1.4 Manfaat Penelitian 5
1.5 Keaslian Penelitian 6
1.6 Ruang Lingkup Penelitian 8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA DAN LANDASAN TEORI 10
2.1 Tinjauan Pustaka 10
2.1.1 Myotubularin dan *MTMR4* 10
2.1.2 Phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) 11
2.1.3 Teknologi Analisis Fungsi Gen 11
2.1.4 CRISPR/*Cas9* 12
2.1.5 Desain *sgRNA* 13
2.1.6 Analisis *Off-Target* pada Sistem CRISPR/Cas9 14
2.1.7 Plasmid pX459 16
2.1.8 Konstruksi dan Validasi Plasmid CRISPR/*Cas9* 17
2.2 Landasan Teori 19

Desain sgRNA dan Optimasi Konstruksi Sistem CRISPR/Cas9 Berbasis Plasmid pX459 sebagai Tahap Awal
Pengembangan Model Knockout Gen MTMR4
Umi Mukholifah, apt. Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri, M.Sc., Ph.D; Dr. Ria Fajarwati Kastian, M.Biotech., M.Bio.S
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

2.3 Hipotesis 21
BAB III METODE PENELITIAN 22
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian 22
3.2 Alat 22
3.3 Bahan 22
3.4 Prosedur Penelitian 23
3.4.1 Desain *sgRNA* 23
3.4.2 Analisis Potensi *Off-Target In Silico* 24
3.4.3 Desain Primer 25
3.4.4 Annealing Oligonukleotida *sgRNA* 26
3.4.5 Digesti Plasmid pX459 26
3.4.6 Purifikasi dan Ekstraksi Gel Plasmid Hasil Digesti 26
3.4.7 Ligasi Insert *sgRNA MTMR4* ke Plasmid pX459 27
3.4.8 Pembuatan Sel Kompeten *E. coli* DH5α 29
3.4.9 Transformasi dan Perbanyakan Plasmid 30
3.4.10 Validasi Awal Konstruksi Plasmid 30
3.5 Analisis Data 31
3.6 Diagram Alir Penelitian 33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN 34
4.1 Desain *sgRNA MTMR4* untuk Sistem CRISPR/Cas9 Berbasis Plasmid pX459 34
4.1.1 Identifikasi Kandidat *sgRNA* Menggunakan CHOPCHOP 34
4.1.2 Verifikasi Lokasi Target Menggunakan Ensembl 36
4.1.3 Analisis Domain Protein MTMR4 37
4.1.4 Penetapan *sgRNA* Terpilih 39
4.2 Analisis Potensi *Off-target sgRNA MTMR4* In Silico 39
4.2.1 Perbandingan hasil prediksi antar perangkat lunak 39
4.2.2 Distribusi Lokasi Genom Off-target sgRNA MTMR4 42
4.2.3 Identifikasi Kandidat Off-target Prioritas Berdasarkan Konsensus Prediksi Lima Perangkat Lunak 44
4.2.4 Analisis Skor Cutting Frequency Determination (CFD) pada Kandidat Off-Target Konsensus 46

Desain sgRNA dan Optimasi Konstruksi Sistem CRISPR/Cas9 Berbasis Plasmid pX459 sebagai Tahap Awal
Pengembangan Model Knockout Gen MTMR4
Umi Mukholifah, apt. Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri, M.Sc., Ph.D; Dr. Ria Fajarwati Kastian, M.Biotech., M.Bio.S
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

4.2.5 Evaluasi Spesifisitas *sgRNA MTMR4* 51
4.3 Konstruksi Plasmid pX459 52
4.3.1 Desain Oligonukleotida *sgRNA* 52
4.3.2 *Annealing* Oligonukleotida 53
4.3.3 Digesti dan Purifikasi Plasmid pX459 55
4.3.4 Ligasi Oligonukleotida ke Plasmid pX459 57
4.3.5 Transformasi dan Seleksi Koloni 59
4.3.6 Isolasi Plasmid Rekombinan (MiniPrep) 61
4.4 Validasi Konstruksi Plasmid pX459-*sgRNA MTMR4* 63
4.4.1 Konfirmasi *Insert sgRNA* Menggunakan PCR 63
4.4.2 Konfirmasi *Insert* Menggunakan *Sanger Sequencing* 66
4.5 Rekonstruksi Plasmid dan Konfirmasi Insert Menggunakan Colony PCR .. 69
4.6 Keterbatasan Penelitian 71
BAB V PENUTUP 74
5.1 Kesimpulan 74
5.2 Saran 75
DAFTAR PUSTAKA 77
LAMPIRAN 87

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**Desain sgRNA dan Optimasi Konstruksi Sistem CRISPR/Cas9 Berbasis Plasmid pX459 sebagai Tahap Awal
Pengembangan Model Knockout Gen MTMR4**
Umi Mukholifah, apt. Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri, M.Sc., Ph.D; Dr. Ria Fajarwati Kastian, M.Biotech., M.Bio.S
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR TABEL

Tabel 1.5 Perbandingan penelitian terdahulu dan posisi penelitian ini ……6
Tabel 3.1 Sekuens oligonukleotida sgRNA……..……25
Tabel 3.2 Sekuens primer colony PCR……...25
Tabel 3.3 Sekuens primer sekuensing……....25
Tabel 3.4 Variasi metode ligasi pada konstruksi plasmid……...28
Tabel 4.1 Kandidat off-target prioritas berdasarkan tingkat konsensus prediksi antarperangkat lunak……..45
Tabel 4.2 Kandidat *off-target* berbasis *mismatch* ……..48
Tabel 4.3 Kandidat *off-target* berbasis *indel* ……..49
Tabel 4.4 Desain oligonukleotida sgRNA untuk konstruksi plasmid pX459…....52
Tabel 4.5 Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian plasmid hasil digesti.....56
Tabel 4.6 Hasil transformasi produk ligasi dan re-transformasi…….....59
Tabel 4.7 Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian plasmid hasil isolasi.....61
Tabel 4.8 Hasil optimasi suhu annealing dan jumlah siklus PCR untuk konfirmasi *insert sgRNA MTMR4*.....64
Tabel 4.9 Parameter kualitas hasil *Sequencing*…..……....66

Desain sgRNA dan Optimasi Konstruksi Sistem CRISPR/Cas9 Berbasis Plasmid pX459 sebagai Tahap Awal
Pengembangan Model Knockout Gen MTMR4
Umi Mukholifah, apt. Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri, M.Sc., Ph.D; Dr. Ria Fajarwati Kastian, M.Biotech., M.Bio.
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Peta backbone plasmid Px459……..17
Gambar 3.1 Diagram alir penelitian…….33
Gambar 4.1 Hasil identifikasi kandidat sgRNA……34
Gambar 4.2 Lokasi target *sgRNA* pada struktur gen *MTMR4*……...36
Gambar 4.3 Domain *MTMR4*……....38
Gambar 4.4 Perbandingan jumlah prediksi *off-target sgRNA MTMR4*…….40
Gambar 4.5 Distribusi lokasi genom kandidat off-target yang lima software……42
Gambar 4.6 Diagram Venn……...44
Gambar 4.7 Skema proses *annealing*…….....54
Gambar 4.8 Skema digesti plasmid……...55
Gambar 4.9 Perbandingan hasil elektroforesis DNA plasmid digesti pX459…....56
Gambar 4.10 Skema ligasi oligonukleotida *sgRNA* ke plasmid pX459…….....57
Gambar 4.11 Hasil elektroforesis produk PCR konstruksi plasmid……...65
Gambar 4.12 *Chromatogram Sanger Sequencing*…….67
Gambar 4.13 Hasil transformasi *E.coli* kompeten hasil rekonstruksi ulang……..69
Gambar 4.14 Hasil elektroforesis produk colony PCR hasil rekonstruksi ulang...70

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
**Desain sgRNA dan Optimasi Konstruksi Sistem CRISPR/Cas9 Berbasis Plasmid pX459 sebagai Tahap Awal
Pengembangan Model Knockout Gen MTMR4**
Umi Mukholifah, apt. Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri, M.Sc., Ph.D; Dr. Ria Fajarwati Kastian, M.Biotech., M.Bio.S
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 CDS *MTMR4*.....86
Lampiran 2 Protokol PCR Colony.....87
Lampiran 3 Desain Primer.....89
Lampiran 4 Protokol Gel Extraction.....92
Lampiran 5 Protokol Isolasi Plasmid (Qiagen)……94
Lampiran 6 Protokol Isolasi Plasmid (FavorPrep)……...96
Lampiran 7 Hasil Gel Elektroforesis……98
Lampiran 8 Hasil Transformasi……..……...100
Lampiran 9 Hasil Gel Elektroforesis Sanger……..101