UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Konstruksi Plasmid Sistem CRISPR/Cas9 Genome Editing dan Analisis Off-target In silico Pada Gen MTMR3 dalam Sel Kanker Payudara
RAHMI NAFI'IMAMA, apt. Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri, M.Sc., Ph.D; Prof. Dr.rer.nat. apt. Adam Hermawan,
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

INTISARI

Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) merupakan subtipe kanker payudara yang paling agresif dengan pilihan terapi yang masih terbatas. Ekspresi protein Myotubularin-related protein 3 (MTMR3) dilaporkan meningkat pada jaringan karsinoma payudara dibandingkan jaringan parakarsinoma dan berkorelasi positif dengan status TNBC. MTMR3 berperan dalam regulasi autofagi sehingga berpotensi menjadi target penyuntingan genom berbasis CRISPR/Cas9. Penelitian ini bertujuan mendesain *single-guide RNA* (sgRNA) yang menargetkan *MTMR3*, menganalisis potensi *off-target* menggunakan beberapa *software* bioinformatika, dan mengonstruksi plasmid pX459-sgRNA *MTMR3*.

sgRNA didesain menggunakan CHOPCHOP, sedangkan prediksi *off-target* dilakukan menggunakan CHOPCHOP, CRISPOR, CCTop, COSMID, dan Cas-OFFinder. Hasil prediksi diintegrasikan dan dianalisis berdasarkan *mismatch*, *indel*, motif *protospacer adjacent motif* (PAM), skor *Cutting Frequency Determination* (CFD), serta anotasi genomik dan fungsional. Konstruksi plasmid meliputi digesti pX459 menggunakan BbsI, *annealing* oligonukleotida, ligasi, transformasi ke dalam *Escherichia coli* DH5α, PCR koloni, dan sekuensing Sanger.

sgRNA 5′-GATTGGCCTGGATGCACTCAAGG-3′ dipilih karena menargetkan bagian awal *coding sequence MTMR3*, memiliki kandungan GC 55%, efisiensi *on-target* prediktif 50,27, dan skor spesifisitas MIT 81. Integrasi prediksi menghasilkan 7.326 kandidat *off-target*, dengan 10 sekuens teridentifikasi oleh kelima perangkat lunak. Stratifikasi CFD menghasilkan 424 anotasi gen/region yang memenuhi ambang risiko, dengan *RFX3* diprioritaskan untuk validasi eksperimental. Transformasi menghasilkan koloni pada media ampisilin dan PCR koloni menunjukkan pita dugaan positif disertai amplifikasi nonspesifik. Namun, sekuensing Sanger tidak mengonfirmasi sisipan sgRNA dan menunjukkan bahwa situs BbsI masih utuh. Penelitian ini menghasilkan kandidat sgRNA *MTMR3* beserta profil prediksi *off-target* sebagai dasar optimasi konstruksi plasmid dan validasi eksperimental lebih lanjut.

Kata kunci: CRISPR/Cas9, *MTMR3*, sgRNA, *off-target*, PCR koloni

UNIVERSITAS
GADJAH MADA
Konstruksi Plasmid Sistem CRISPR/Cas9 Genome Editing dan Analisis Off-target In silico Pada Gen MTMR3 dalam Sel Kanker Payudara
RAHMI NAFI'IMAMA, apt. Dyaningtyas Dewi Pamungkas Putri, M.Sc., Ph.D; Prof. Dr.rer.nat. apt. Adam Hermawan,
Universitas Gadjah Mada, 2026 | Diunduh dari http://etd.repository.ugm.ac.id/

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) *is an aggressive breast cancer subtype with limited therapeutic options*. MTMR3 *protein expression has been reported to be upregulated in breast carcinoma tissues compared with paracarcinoma tissues and positively associated with* TNBC *status*. Myotubularin-related protein 3 (MTMR3) *regulates autophagy and therefore represents a potential target for* CRISPR/Cas9*-based genome editing. This study aimed to design a single-guide RNA* (sgRNA) *targeting MTMR3*, *analyze potential off-target sites using multiple bioinformatics tools, and construct a* pX459-sgRNA *MTMR3 plasmid*.

The sgRNA *was designed using* CHOPCHOP, *whereas off-target sites were predicted using* CHOPCHOP, CRISPOR, CCTop, COSMID, *and* Cas-OFFinder. *Predictions were evaluated based on mismatches, indels, protospacer adjacent motifs, Cutting Frequency Determination* (CFD) *scores, and genomic and functional annotations. Plasmid construction comprised* BbsI *digestion, oligonucleotide annealing, ligation, transformation into Escherichia coli* DH5α, *colony PCR, and Sanger sequencing*.

The sgRNA 5′-GATTGGCCTGGATGCACTCAAGG-3′ *was selected because it targets the early coding sequence of MTMR3 and exhibited* 55% GC *content, a predicted on-target efficiency of* 50.27, *and an* MIT *specificity score of* 81. *Integrated prediction yielded* 7,326 *off-target candidates*, *of which* 10 *were identified by all five tools. CFD-based stratification identified* 424 *gene/region annotations meeting the risk thresholds, with RFX3 prioritized for experimental validation. Transformation produced colonies on ampicillin-selective medium, while colony* PCR *generated putative positive bands with nonspecific amplification. However, Sanger sequencing did not confirm* sgRNA *insertion and showed that the* BbsI *site remained intact. This study provides an MTMR3-targeting* sgRNA *candidate and its predicted off-target profile as a basis for plasmid construction optimization and further experimental validation.*

Keywords: CRISPR/Cas9, *MTMR3*, sgRNA, *off-target*, *Colony* PCR