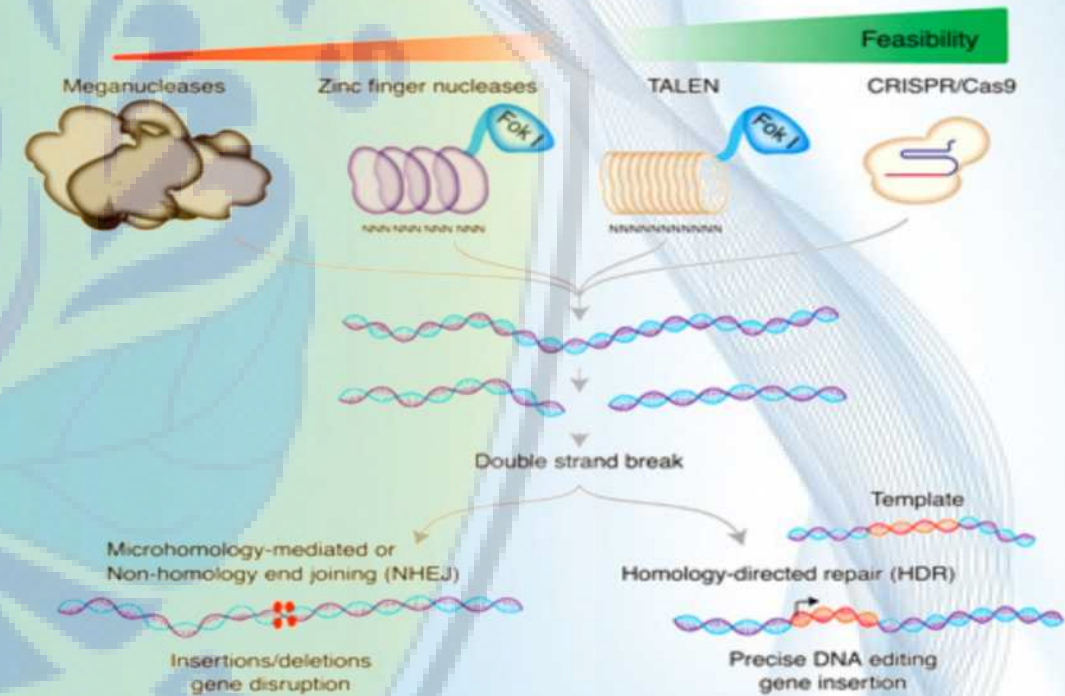


# GENOM EDITING ANALISA DNA & PROTEIN



[http://en.wikipedia.org/wiki/Genome\\_editing](http://en.wikipedia.org/wiki/Genome_editing)

**Penulis:**

Sholeh Avivi  
Syafira Fatihatul Husna  
Lailly Nur Uswatul Hasanah

Anggota APPTI No. 036/KTA/APPT/2015  
Anggota IKAPI No. 127/JTI/2011

Jember University Press  
Jl. Kalimantan 37 Jember 68121  
Telp. 0331-330224, psw. 0319  
E-mail: [upt-penerbitan@unej.ac.id](mailto:upt-penerbitan@unej.ac.id)



Monograf

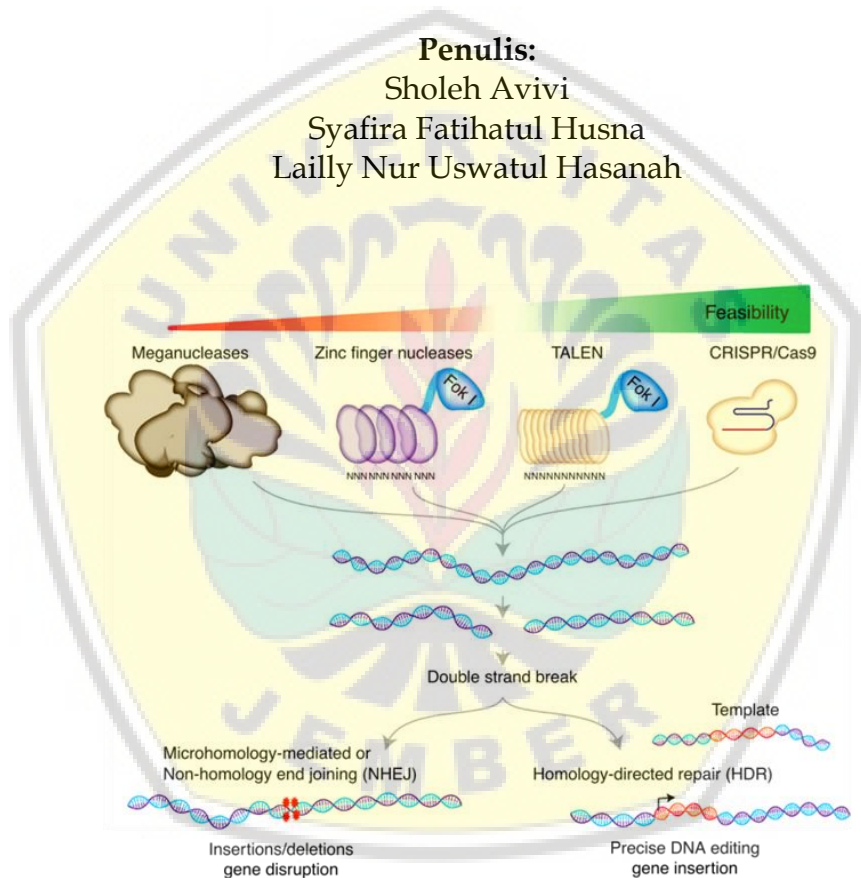
# Genom Editing Analisa DNA & Protein

Penulis:

Sholeh Avivi

Syafira Fatihatul Husna

Lailly Nur Uswatul Hasanah



Sumber: [https://en.wikipedia.org/wiki/Genome\\_editing](https://en.wikipedia.org/wiki/Genome_editing)

UPT PENERBITAN DAN PERCETAKAN  
UNIVERSITAS JEMBER  
2020

## Genom Editing Analisa DNA & Protein

**Penulis:**

Sholeh Avivi  
Syafira Fatihatul Husna  
Lailly Nur Uswatul Hasanah

**Desain Sampul dan Tata Letak**

Risky Fahriza, M. Arifin, M. Hosim

ISBN: 978-623-7226-94-9

**Penerbit:**

UPT Percetakan & Penerbitan Universitas Jember

**Redaksi:**

Jl. Kalimantan 37  
Jember 68121  
Telp. 0331-330224, Voip. 00319  
*e-mail*: [upt-penerbitan@unej.ac.id](mailto:upt-penerbitan@unej.ac.id)

**Distributor Tunggal:**

UNEJ Press  
Jl. Kalimantan 37  
Jember 68121  
Telp. 0331-330224, Voip. 0319  
*e-mail*: [upt-penerbitan@unej.ac.id](mailto:upt-penerbitan@unej.ac.id)

Hak Cipta dilindungi Undang-Undang. Dilarang memperbanyak tanpa ijin tertulis dari penerbit, sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apapun, baik cetak, *photoprint*, maupun *microfilm*.

## Kata Pengantar

Genom editing merupakan metode rekayasa genom organisme. Bidang ini merupakan bidang yang relative baru pada bidang rekayasa genetika. Dengan genom editing dimungkinkan dilakukan rekayasa genetika suatu organisme dengan tepat, melalui proses pemotongan, penghilangan, dan penambahan suatu DNA dengan DNA organisme lain.

Metode ini lebih baik dari metode rekayasa genetika sebelumnya, mengingat pada metode sebelumnya dilakukan dengan memanfaatkan bantuan Agrobacterium dan atau Bombardment, yang menginsersi gen target secara acak ke genom suatu organisme. Akibatnya insersi DNA yang terjadi bersifat acak ini, maka hasilnya tidak bisa diperkirakan.

Pada monograf Genom Editing Analisa DNA & Protein yang ditulis oleh saudara Sholeh Avivi, saudari Syafira Fatihatul Husna dan saudari Lailly Nur Uswatul Hasanah ini, diuraikan secara substansial pengertian dasar serta cara-cara melakukan genom editing. Meskipun disajikan secara ringkas dan sistematika yang sederhana, pembaca diharapkan dapat mengambil manfaat dari buku ini.

Buku ini sangat sesuai bagi mahasiswa yang sedang mempelajari rekayasa genetika. Juga sangat sesuai bagi peneliti yang akan melakukan rekayasa genom suatu organisme dengan keakuratan yang tinggi. Mudah-mudahan buku ini memberikan barokah manfaat bagi penulis, pembaca dan kita semua.

Prof. Dr. Ir. Bambang Sujanarko, M.M.

## PRAKATA

Puji syukur Penulis panjatkan kepada Allah, Rab yang maha esa. atas rahmat dan ijin-Nya Penulis dapat menyelesaikan Buku Monograf “Genom Editing Analisa DNA & Protein”.

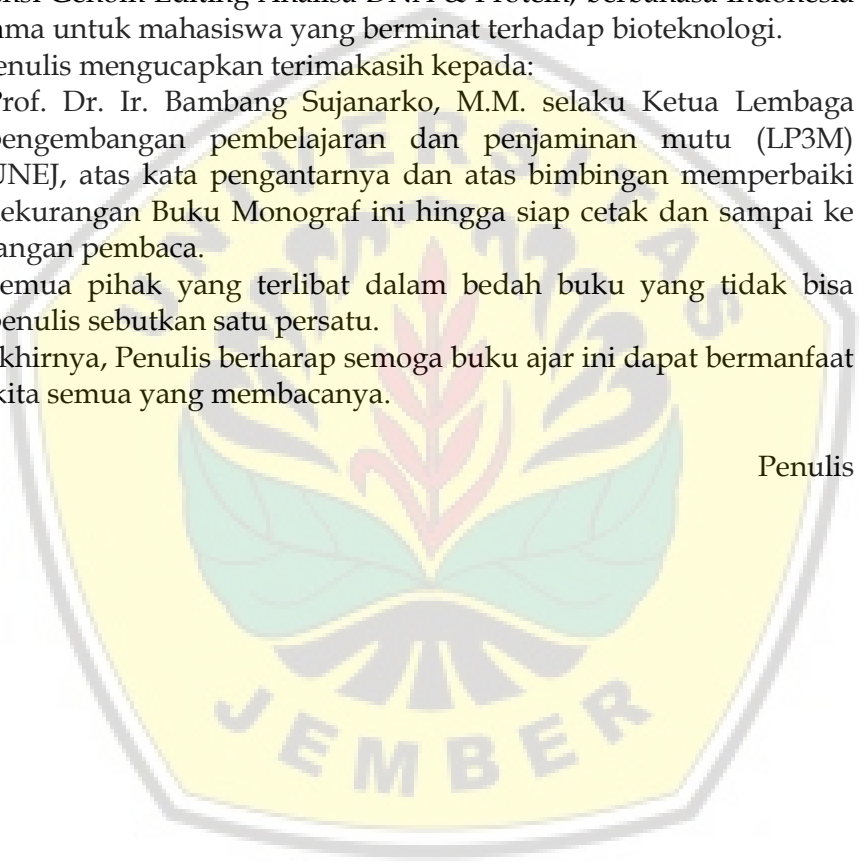
Tujuan dari penyusunan buku ini adalah menyediakan buku referensi Genom Editing Analisa DNA & Protein, berbahasa Indonesia terutama untuk mahasiswa yang berminat terhadap bioteknologi.

Penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Sujanarko, M.M. selaku Ketua Lembaga pengembangan pembelajaran dan penjaminan mutu (LP3M) UNEJ, atas kata pengantarnya dan atas bimbingan memperbaiki kekurangan Buku Monograf ini hingga siap cetak dan sampai ke tangan pembaca.
2. Semua pihak yang terlibat dalam bedah buku yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu.

Akhirnya, Penulis berharap semoga buku ajar ini dapat bermanfaat bagi kita semua yang membacanya.

Penulis



## DAFTAR ISI

<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>iii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>iv</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>viii</b>
<b>GENOME EDITING</b> .....	<b>1</b>
1.1 Pendahuluan .....	1
1.2 Genome Editing.....	2
1.3 Sejarah Genome Editing .....	2
1.4 CRISPR.....	11
1.5 Bagaimana CRISPR bekerja secara natural di alam?.....	12
1.6 Aplikasi CRISPR di Laboratorium.....	14
1.7 Tahapan menggunakan CRISPR.....	16
1.8 Analisa Sekuen DNA dan Protein.....	28
1.9 Analisa sekuen DNA.....	30
1.10 Analisa Sekuen Protein.....	40
1.11 Pengenalan NCBI.....	41
1.12 Pencarian sekuen homolog menggunakan perangkat BLAST dan FASTA .....	42
1.13 Analisa filogenetik.....	43
1.14 Teknik mendesain Primer .....	48
1.15 Kesimpulan.....	63
1.16 Daftar Pustaka.....	65
1.17 Glosarium .....	74
1.18 Indeks .....	79
<b>BIOGRAFI PENULIS</b> .....	<b>81</b>

## DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1 Generasi nuklease yang berbeda digunakan untuk pengeditan genom dan jalur perbaikan DNA yang digunakan untuk memodifikasi DNA target..... 4
- Gambar 2 Kelompok nuklease yang direkayasa. Warna yang cocok menandakan pola pengenalan DNA. .... 9
- Gambar 3 Mekanisme CRISPR/Cas9..... 11
- Gambar 4 Jalur imunitas CRISPR terhadap serangan virus bakteriofaga..... 14
- Gambar 5 DNA dipotong oleh Cas9 yang terikat tepat dengan sgRNA (tracrRNA-crRNA) yang khusus menempel di DNA target PAM. .... 15
- Gambar 6 laman database genome Saccharomyces..... 17
- Gambar 7 Screen program Benchling. Pilih Inventory lalu klik ikon + di pojok kanan atas. .... 18
- Gambar 8 Dua kotak yang berisi angka-angka di dalamnya menunjukkan skore On-Target dan Off-Target dari gRNA ..... 20
- Gambar 9 Klik on No Region Set di bawah Genome Region. Di layar akan Nampak window dialog kemudian klik on button Find Genome Matches..... 21
- Gambar 10 Plasmid pML107 dari koleksi Addgene Plasmid Repository. Sekuen gen Cas9 panah ungu di bagian bawah. .... 23
- Gambar 11 Diagram skema modifikasi DNA provirus HIV-1 dengan technology CRISPR/Cas9.. .... 26

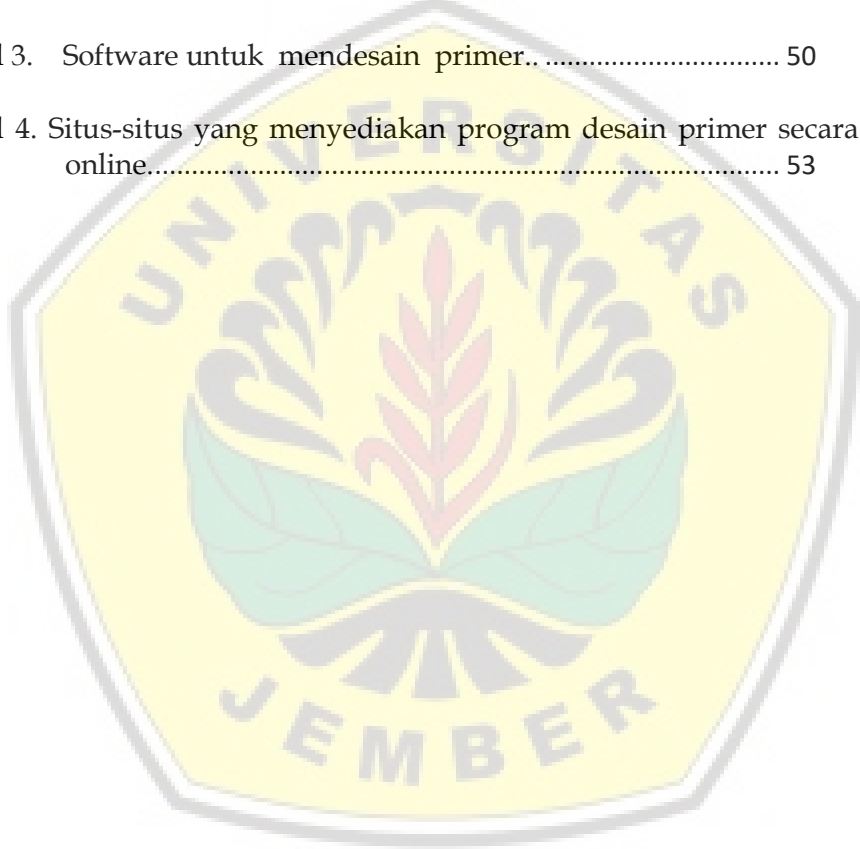


Gambar 12 Foto diambil pada saat 1 bulan setelah inokulasi, menunjukkan bahwa penyakit Hawar api menginduksi fenotipe wild type dan beberapa galur transgenic menjadi nekrosis pada daun apel. Pada galur transgenic setelah gejala daun nekrosis muncul regenerasi tunas baru (panah merah dan biru). Gala (G); Golden Delicious (GD). .....	27
Gambar 13 Chromatogram sekuen forward ITS2 Anopheles .....	31
Gambar 14 Chromatogram dengan kualitas baik (A) dan buruk (B). Gambar C dan D merupakan kasus yang sering dijumpai pada chromatogram hasil sekuensing sanger. Kurang lebih duapuluh basa nukleotida awal mempunyai peak yang tidak jelas, karena ini merupakan daerah penempelan primer	32
Gambar 15 Tool-tool BLAST di NCBI .....	43
Gambar 16 Struktur rDNA and Pre-rRNA Eukariotik. ....	45
Gambar 17 Peta genome mitokondria manusia.....	45
Gambar 18 Peta genom Kloroplast pada tanaman Tembakau .....	47
Gambar 19 posisi primer forward dan reverse terhadap DNA template. ....	48



## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Tanaman Tropis hasil rekayasa genom editing CRISP/Cas9 toleran stress biotik dan abiotic.....	25
Tabel 2. Gen yang di rekayasa dengan CRISP/Cas9 menghasilkan tanaman tahan stress biotik dan abiotic.....	29
Tabel 3. Software untuk mendesain primer.....	50
Tabel 4. Situs-situs yang menyediakan program desain primer secara online.....	53



## GENOME EDITING

### 1.1 Pendahuluan

Sektor pertanian telah mengalami kemajuan pesat dibidang teknologi. Kemajuan tersebut bertujuan untuk meningkatkan produksi pertanian sehingga mampu memenuhi kebutuhan nutrisi dan pangan baik bagi manusia maupun ternak. Seiring perkembangan zaman, tantangan dibidang pertanian semakin kompleks, mulai dari ketersediaan lahan pertanian yang semakin berkurang, organisme pengganggu tanaman yang mengurangi intensitas produksi, faktor biotik maupun cekaman abiotik seperti salinitas, kekeringan, genangan, suhu rendah dan suhu tinggi akibat cuaca yang ekstrim (Kawano, Ito, and Sakagami 2009; Begcy et al. 2012; Shanker et al. 2014)

Tantangan tersebut menuntut manusia untuk terus belajar, meneliti dan memperbaiki keadaan di sektor pertanian sehingga pertanian dapat tetap hidup dan memenuhi tugasnya dalam memenuhi kebutuhan pangan manusia. Pengembangan teknologi pertanian marak diberbagai komponen untuk meningkatkan produksi pertanian seperti teknologi benih, pemupukan berimbang, pemuliaan tanaman, sarana dan prasarana mesin pertanian, dan bioteknologi (Driedonks, Rieu, and Vriezen 2016).

Pemuliaan tanaman konvensional untuk merubah susunan gen sesuai dengan kehendak peneliti membutuhkan waktu yang lama dalam pelaksanaannya, namun kini telah ditemukan teknologi yang lebih efisien bernama *genome editing*. Teknologi *genome editing* memungkinkan pemulia dapat merakit individu tanaman baru yang memiliki sifat-sifat unggul sesuai kehendak pemulia dalam waktu yang relatif singkat (Borrelli et al. 2018). Teknologi *genome editing* merupakan pengembangan dari transformasi genetik yang dilakukan secara *in vitro*. *Genome editing* terus berkembang dari masa ke masa mulai tahun 1990-an. Tool (alat) *genome editing* pertama adalah *Meganucleases* pada tahun 1990 (Mushtaq et al. 2019), kemudian pada akhir 1990 *Oligonucleotide-directed mutagenesis* telah ditemukan, lalu pertengahan tahun 2000 ditemukan *Zinc Finger Nucleases* (Mohan 2016). Pada awal tahun 2010 alat *genome*

## 1.16 Daftar Pustaka

- AFP. 2020. "US Trial Shows 3 Cancer Patients Had Their Genomes Altered Safely by CRISPR". ScienceAlert. Retrieved 2020-02-09.
- Alachiotis, Nikolaos, Emmanouella Vogiatzi, Pavlos Pavlidis, and Alexandros Stamatakis. 2013. "ChromatoGate: A Tool for Detecting Base Mis-Calls in Multiple Sequence Alignments by Semi-Automatic Chromatogram Inspection." *Computational and Structural Biotechnology Journal* 6 (7): e201303001. <https://doi.org/10.5936/csbj.201303001>.
- Begcy, Kevin, Eduardo D. Mariano, Agustina Gentile, Carolina G. Lembke, Sonia Marli Zingaretti, Glaucia M. Souza, and Marcelo Menossi. 2012. "A Novel Stress-Induced Sugarcane Gene Confers Tolerance to Drought, Salt and Oxidative Stress in Transgenic Tobacco Plants." *PLoS ONE* 7 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044697>.
- Borrelli, Virginia M G, Vittoria Brambilla, Peter Rogowsky, Adriano Marocco, and Alessandra Lanubile. 2018. "The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR / Cas9 Technology" 9 (August). <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01245>.
- Breslauer, K. J., R. Frank, H. Blocker, and L. A. Marky. 1986. "Predicting DNA Duplex Stability from the Base Sequence." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (11): 3746-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.3746>.
- Brown, John W.S., and Peter J. Shaw. 1998. "Small Nucleolar RNAs and Pre-RRNA Processing in Plants." *Plant Cell* 10 (5): 649-57. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.5.649>.
- Capecci, Mario R. 2005. "Gene Targeting in Mice: Functional Analysis of the Mammalian Genome for the Twenty-First Century." *Nature Reviews Genetics* 6 (6): 507-12. <https://doi.org/10.1038/nrg1619>.
- Carroll, Dana. 2017. "Genome Editing: Past, Present, and Future." *Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (4): 653-59.
- Chang, Howard H.Y., Nicholas R. Pannunzio, Noritaka Adachi, and Michael R. Lieber. 2017. "Non-Homologous DNA End Joining and Alternative Pathways to Double-Strand Break Repair."

- Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (8): 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>.
- Chavarriaga-Aguirre, Paul, Alejandro Brand, Adriana Medina, Mónica Prías, Roosevelt Escobar, Juan Martinez, Paula Díaz, Camilo López, Willy M. Roca, and Joe Tohme. 2016. "The Potential of Using Biotechnology to Improve Cassava: A Review." *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 52 (5): 461–78. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9776-3>.
- Cheong, Kang Hao, Jin Ming Koh, and Michael C. Jones. 2019. "Black Swans of CRISPR: Stochasticity and Complexity of Genetic Regulation." *BioEssays* 41 (7): 1–3. <https://doi.org/10.1002/bies.201900032>.
- Chuang, Li Yeh, Yu Huei Cheng, and Cheng Hong Yang. 2013. "Specific Primer Design for the Polymerase Chain Reaction." *Biotechnology Letters* 35 (10): 1541–49. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>.
- Cyranoski, David. 2019. "The CRISPR-Baby Scandal: What's next for Human Gene-Editing." *Nature* 566, 440–442; 2019, no. x: 135. <https://www.nature.com/articles/d41586-019-00673-1>.
- Deng, Dong, Chuangye Yan, Jianping Wu, Xiaojing Pan, and Nieng Yan. 2014. "Revisiting the TALE Repeat." *Protein and Cell* 5 (4): 297–306. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0035-2>.
- Dieffenbach, C. W., T. M.J. Lowe, and G. S. Dveksler. 1993. "General Concepts for PCR Primer Design." *Genome Research* 3 (3). <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>.
- Driedonks, Nicky, Ivo Rieu, and Wim H. Vriezen. 2016. "Breeding for Plant Heat Tolerance at Vegetative and Reproductive Stages." *Plant Reproduction* 29 (1–2): 67–79. <https://doi.org/10.1007/s00497-016-0275-9>.
- Enrique Arenas, Nelson, and Luz Mary Salazar. 2019. "Steps and Tools for PCR-Based Technique Design." *Biotechnology and Bioengineering*, 1–16. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83671>.
- Fang, Yuan, Wen Qi Shi, and Yi Zhang. 2017. "Molecular Phylogeny of Anopheles Hyrcanus Group Members Based on ITS2 RDNA." *Parasites and Vectors* 10 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2351-x>.

- França, Lilian T.C., Emanuel Carrilho, and Tarso B.L. Kist. 2002. "A Review of DNA Sequencing Techniques." *Quarterly Reviews of Biophysics* 35 (2): 169–200. <https://doi.org/10.1017/S0033583502003797>.
- Gao, Caixia. 2018. "The Future of CRISPR Technologies in Agriculture." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (5): 275–76. <https://doi.org/10.1038/nrm.2018.2>.
- Hall, Tom, Ibis Biosciences, and Ca Carlsbad. 2011. "BioEdit: An Important Software for Molecular Biology." *GERF Bulletin of Biosciences* 2 (June): 60–61. <https://doi.org/10.1002/prot.24632>.
- Haque, Effi, Hiroaki Taniguchi, Md Mahmudul Hassan, Pankaj Bhowmik, M. Rezaul Karim, Magdalena Śmiech, Kaijun Zhao, Mahfuzur Rahman, and Tofazzal Islam. 2018. "Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology for the Improvement of Crops Cultivated in Tropical Climates: Recent Progress, Prospects, and Challenges." *Frontiers in Plant Science* 9 (May): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00617>.
- Hasanah, L.N.U. 2018. Identifikasi vektor potensial malaria asal Bangsring Banyuwangi Berdasarkan markah molekuler internal transcribed spacer 2 (its2). Skripsi. Prodi Biologi. Fakultas matematika dan ilmu pengetahuan alam. Universitas Jember.
- Hebert, Paul D.N., Alina Cywinska, Shelley L. Ball, and Jeremy R. DeWaard. 2003. "Biological Identifications through DNA Barcodes." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270 (1512): 313–21. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>.
- Holt, Nathalia, J Wang, Kenneth Kim, and Geoffrey Friedman. 2010. "Zinc Finger Nuclease-Mediated CCR5 Knockout Hematopoietic Stem Cell Transplantation Controls HIV-1 in Vivo." *Nature Biotechnology* 28 (8): 839–47. <https://doi.org/10.1038/nbt.1663.Zinc>.
- Jannah Patty, Dessy Nurul, Tazkia Ayu Safitri, and Henny Saraswati. 2020. "Specific Primer for Human Bcl-2-Protein Expression Analysis." *KnE Life Sciences* 2020: 46–52. <https://doi.org/10.18502/cls.v5i2.6438>.
- Jarman, S. N., and N. G. Elliott. 2000. "DNA Evidence for Morphological and Cryptic Cenozoic Speciations in the

- Anaspididae, 'living Fossils' from the Triassic." *Journal of Evolutionary Biology* 13 (4): 624–33. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00207.x>.
- Jiang, Fuguo, and Jennifer A Doudna. 2017. "CRISPR - Cas9 Structures and Mechanisms." *Annu. Rev. Biophys.* 46: 505–31. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>.
- Joung, J Keith, and Jeffrey D Sander. 2013. "TALENs: A Widely Applicable Technology for Targeted Genome Editing." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14 (1): 49–55. <https://doi.org/10.1038/nrm3486>. TALENs.
- Kamel, A. Abd-Elsalam. 2003. "Bioinformatic Tools and Guideline for PCR Primer Design." *African Journal of Biotechnology* 2 (5): 91–95. <https://doi.org/10.5897/ajb2003.000-1019>.
- Kawano, Naoyoshi, Osamu Ito, and Jun Ichi Sakagami. 2009. "Morphological and Physiological Responses of Rice Seedlings to Complete Submergence (Flash Flooding)." *Annals of Botany* 103 (2): 161–69. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn171>.
- Klug, Aaron. 2010. "The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation." *Annual Review of Biochemistry* 79 (1): 213–31. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-010909-095056>.
- Li, Hongyi, Yang Yang, Weiqi Hong, Mengyuan Huang, Min Wu, and Xia Zhao. 2020. "Applications of Genome Editing Technology in the Targeted Therapy of Human Diseases: Mechanisms, Advances and Prospects." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>.
- Liu, Mingjie, Saad Rehman, Xidian Tang, Kui Gu, Qinlei Fan, Dekun Chen, and Wentao Ma. 2019. "Methodologies for Improving HDR Efficiency." *Frontiers in Genetics* 10 (JAN): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00691>.
- Mak, ANS., P. Bradley, AJ. Bogdanove, and BL. Stoddard. 2013. "TAL Effectors: Function, Structure, Engineering and Applications." *Curr Opin Struct Biol.* 23 (1): 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.11.001>.
- Marraffini, Luciano A. 2013. "CRISPR-Cas Immunity against



- Phages: Its Effects on the Evolution and Survival of Bacterial Pathogens." *PLoS Pathogens* 9 (12): 1-4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003765>.
- Martin-pizarro, Carmen, and David Posé. 2018. "Genome Editing as a Tool for Fruit Ripening Manipulation" 9 (September): 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01415>.
- Mladenov, Emil, and George Iliakis. 2011. "The Pathways of Double-Strand Break Repair." *DNA Repair - On the Pathways to Fixing DNA Damage and Errors*, no. September. <https://doi.org/10.5772/24572>.
- Mohan, Chakravarthi. 2016. "Genome Editing in Sugarcane: Challenges Ahead." *Frontiers in Plant Science* 7 (October): 1-5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01542>.
- Moura, Carina Carneiro de Melo, Fabian Brambach, Kevin Jair Hernandez Bado, Konstantin V. Krutovsky, Holger Kreft, Sri Sudarmiyati Tjitrosoedirdjo, Iskandar Z. Siregar, and Oliver Gailing. 2019. "Integrating DNA Barcoding and Traditional Taxonomy for the Identification of Dipterocarps in Remnant Lowland Forests of Sumatra." *Plants* 8 (11). <https://doi.org/10.3390/plants8110461>.
- Mushtaq, Muntazir, Aafreen Sakina, Shabir Hussain Wani, Asif B. Shikari, Prateek Tripathi, Abbu Zaid, Aravind Galla, et al. 2019. "Harnessing Genome Editing Techniques to Engineer Disease Resistance in Plants." *Frontiers in Plant Science* 10 (May). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00550>.
- Nadakuduti, Satya Swathi, C. Robin Buell, Daniel F. Voytas, Colby G. Starker, and David S. Douches. 2018. "Genome Editing for Crop Improvement - Applications in Clonally Propagated Polyploids with a Focus on Potato (*Solanum Tuberosum* L.)." *Frontiers in Plant Science* 871 (November): 1-11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01607>.
- Niko McCarty. 2018. CRISPR – How It Works, Top Applications and How to Use It Yourself. <https://medium.com/@NikoMcCarty/almost-everything-you-should-know-about-crispr-how-it-works-top-applications-and-how-to-use-it-61e27b04bea6>. Download 15 April 2020.
- Norris, Laura C., and Douglas E. Norris. 2015. "Phylogeny of



- Anopheline (Diptera: Culicidae) Species in Southern Africa, Based on Nuclear and Mitochondrial Genes." *Journal of Vector Ecology* 40 (1): 16-27. <https://doi.org/10.1111/jvec.12128>.
- Panero, José L., and Bonnie S. Crozier. 2003. "Primers for PCR Amplification of Asteraceae Chloroplast DNA." *Lundellia* 6 (1): 1-9. <https://doi.org/10.25224/1097-993x-6.1.5>.
- Pavlopoulos, Georgios A., Theodoros G. Soldatos, Adriano Barbosa-Silva, and Reinhard Schneider. 2010. "A Reference Guide for Tree Analysis and Visualization." *BioData Mining* 3 (1): 1-16. <https://doi.org/10.1186/1756-0381-3-1>.
- Pérez-Quintero, Alvaro L., Luis M. Rodriguez-R, Alexis Dereeper, Camilo López, Ralf Koebnik, Boris Szurek, and Sebastien Cunnac. 2013. "An Improved Method for TAL Effectors DNA-Binding Sites Prediction Reveals Functional Convergence in TAL Repertoires of *Xanthomonas Oryzae* Strains." *PLoS ONE* 8 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068464>.
- Phunngam, Prin, Umarin Boonkue, Theeraphap Chareonviriyaphap, Michael J. Bangs, and Uraivan Arunyawat. 2017. "Molecular Identification of Four Members of the Anopheles Dirus Complex Using the Mitochondrial Cytochrome C Oxidase Subunit i Gene." *Journal of the American Mosquito Control Association* 33 (4): 263-69. <https://doi.org/10.2987/17-6679.1>.
- Pompili, Valerio, Lorenza Dalla Costa, Stefano Piazza, Massimo Pindo, and Mickael Malnoy. 2020. "Reduced Fire Blight Susceptibility in Apple Cultivars Using a High-Efficiency CRISPR/Cas9-FLP/FRT-Based Gene Editing System." *Plant Biotechnology Journal* 18 (3): 845-58. <https://doi.org/10.1111/pbi.13253>.
- Putri, SP., FJP Nusantara, and SE. Putri. 2017. "Aplikasi Pendekatan Metabolomik Untuk Ilmu Pangan Dan Mikrobiologi." *Bunga Rampai Forum Peneliti Muda Indonesia*. <https://doi.org/10.1177/1461444810365020>.
- Rehm, B. H.A. 2001. "Bioinformatic Tools for DNA/Protein Sequence Analysis, Functional Assignment of Genes and Protein Classification." *Applied Microbiology and Biotechnology* 57 (5-6): 579-92. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0844-0>.

- Saitou, Naruya, and Masatoshi Nei. 1987. "The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees." *Molecular Biology and Evolution* 4 (4): 406-25. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Saraswathy, Nachimuthu, and Ponnusamy Ramalingam. 2011. "Protein Sequencing Techniques." *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*, 193-201. <https://doi.org/10.1533/9781908818058.193>.
- Shankar, Sumitra, Ahalya Sreekumar, Deepti Prasad, Ani V. Das, and M. Radhakrishna Pillai. 2018. "Genome Editing of Oncogenes with ZFNs and TALENs: Caveats in Nuclease Design 06 Biological Sciences 0604 Genetics." *Cancer Cell International* 18 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0666-0>.
- Shanker, Arun K., M. Maheswari, S. K. Yadav, S. Desai, Divya Bhanu, Neha Bajaj Attal, and B. Venkateswarlu. 2014. "Drought Stress Responses in Crops." *Functional & Integrative Genomics* 14 (1): 11-22. <https://doi.org/10.1007/s10142-013-0356-x>.
- Shanmugam, Sabarathinam, Huu Hao Ngo, and Yi Rui Wu. 2020. *Advanced CRISPR/Cas-Based Genome Editing Tools for Microbial Biofuels Production: A Review. Renewable Energy*. Vol. 149. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.10.107>.
- Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman, and R. M. Myers. 1989. "Attachment of a 40-Base-Pair G + C-Rich Sequence (GC-Clamp) to Genomic DNA Fragments by the Polymerase Chain Reaction Results in Improved Detection of Single-Base Changes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1): 232-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.1.232>.
- Shendure, Jay, Shankar Balasubramanian, George M. Church, Walter Gilbert, Jane Rogers, Jeffery A. Schloss, and Robert H. Waterston. 2017. "DNA Sequencing at 40: Past, Present and Future." *Nature* 550 (7676). <https://doi.org/10.1038/nature24286>.

- Shendure, Jay, and Hanlee Ji. 2008. "Next-Generation DNA Sequencing." *Nat Biotechnol* 26: 1135–45.
- Simon, Carola, and Rolf Daniel. 2011. "Metagenomic Analyses: Past and Future Trends." *Applied and Environmental Microbiology* 77 (4): 1153–61. <https://doi.org/10.1128/AEM.02345-10>.
- Steel, Mike, and David Penny. 2000. "Parsimony, Likelihood, and the Role of Models in Molecular Phylogenetics." *Molecular Biology and Evolution* 17 (6): 839–50. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026364>.
- Taanman, Jan Willem. 1999. "The Mitochondrial Genome: Structure, Transcription, Translation and Replication." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1410 (2): 103–23. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00161-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00161-3).
- Thomas Gaj, Charles A. Gersbach, and Carlos F. Barbas. 2013. "ZFN, TALEN and CRISPR/Cas-Based Methods for Genome Engineering." *Trends Biotechnol.* 31 (7): 397–405. <https://doi.org/doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004>.
- Urnov, Fyodor D., Edward J. Rebar, Michael C. Holmes, H. Steve Zhang, and Philip D. Gregory. 2010. "Genome Editing with Engineered Zinc Finger Nucleases." *Nature Reviews Genetics* 11 (9): 636–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2842>.
- Vasquez, Karen M., Kathleen Marburger, Zsafia Intody, and John H. Wilson. 2001. "Manipulating the Mammalian Genome by Homologous Recombination." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (15): 8403–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.111009698>.
- Vijayan, K., and CH. Tsou. 2010. "DNA Barcoding in Plants Taxonomy in a New Perspective.Pdf." *Current Science* 99 (11): 1530–41.
- Waugh, John. 2007. "DNA Barcoding in Animal Species: Progress, Potential and Pitfalls." *BioEssays* 29 (2): 188–97. <https://doi.org/10.1002/bies.20529>.
- Wiedenheft, Blake, Samuel H. Sternberg, and Jennifer A. Doudna. 2012. "RNA-Guided Genetic Silencing Systems in Bacteria and Archaea." *Nature* 482 (7385): 331–38. <https://doi.org/10.1038/nature10886>.

- Xiao, Qiaoqiao, Deyin Guo, and Shuliang Chen. 2019. "Application of CRISPR/Cas9-Based Gene Editing in HIV-1/AIDS Therapy." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9 (MAR): 1-15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00069>.
- Zoller, Mark J., and Michael Smith. 1989. *Oligonucleotide-Directed Mutagenesis of DNA Fragments Cloned into M13 Vectors. Recombinant DNA Methodology*. Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-765560-4.50036-8>.



## 1.17 Glosarium

<i>Aligment</i>	: proses pensejajaran sekuen
Bakteriofaga	: Virus yang menyerang bakteri
<i>Barcoding</i>	: metode untuk mengidentifikasi organisme berdasrkansekuen pendek yang terkonservasi sekaligus juga bervariasi
Bioedit	: <i>Software</i> yang digunakan untuk analisis dan editing sekuen DNA.
Bioteknologi	: pemanfaatan prinsip ilmiah dan kerekayasaan terhadap organisme, sistem atau proses biologis, untuk menghasilkan dan atau meningkatkan potensi organisme maupun menghasilkan produk dan jasa bagi kepentingan hidup manusia.
Bootstrap	: nilai pengulangan dalam rekonstruksi pohon filogenetik
Cas9	: Protein effector complexes. Protein nuclease. Protein Cas9 dan Cpf1 merupakan golongan protein Cas yang disebut dengan protein Class2. Protein ini ukurannya besar, protein tunggal yang memiliki banyak domain yang dapat digunakan untuk mengikat gRNA dan kemudian mengawali memotong-motong DNA double strand menjadi potongan2 pendek. Sedangkan Cas effector complexes yang lain memiliki banyak protein, bukan protein tunggal.
<i>Chromatogram</i>	: Merupakan output hasil sekuensing DNA atau protein berupa pickpick
<i>Consensus</i>	: sekuen gabungan antara forwardsequence dan reversesequence (sekuen utuh)
CRISPR	: <i>Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats</i> . adalah sekuen DNA palindromic, alat (tool) yang digunakan untuk meng-edit DNA dan RNA sehingga dapat merekayasa organisme hidup. Sekuen CRISPR dalam

- bentuk sudah jadi yang berasosiasi dengan protein nuclease seperti Cas9 dan Cpf1
- crRNA : (CRISPR RNA). RNA yang urutannya merupakan komplemen dengan potongan DNA virus. crRNAs kemudian terikat pada sebuah protein besar yang disebut dengan protein effector complex dan menuntun nya ke arah sekuen DNA virus bakteriofaga yang komplemen dengan crRNA.
- DDBJ : DNA Data Bank of Japan (DDBJ) adalah database biologis yang mengumpulkan urutan DNA bagi asam nukleat.
- Double strand break repair : Perbaikan untai ganda adalah suatu konsep dalam pengeditan genom. Untai ganda diperbaiki dengan cara menghapus beberapa basa nukleotida dengan enzim.
- EMBL : European Molecular Biology Laboratory, Eropa adalah lembaga penelitian biologi molekuler untuk asam nukleat.
- FASTA : meruapakan format file untuk data sekuen DNA maupun protein
- Filogenetik : merupakan percabangan yang menunjukkan tingkat kekerabatan organisme
- Fragmen DNA : Potongan, sekuen, segmen, sebagian DNA
- Genbank : Genbank (Amerika Serikat) yang memiliki database sekuens genetik NIH, koleksi beranotasi dari semua sekuens DNA yang tersedia untuk umum.
- Genom : Seluruh untai DNA satu set yang berada dalam sel
- Genom editing : Proses merekayasa genom dengan cara memotong, menghilangkan, menyisipkan untai DNA pada genom
- gRNA (sgRNA) : Single guide RNA. gRNA di buat berdasarkan urutan DNA organisme yang di rekayasa pada posisi di mana DNA akan di edit. gRNA akan mengarahkan protein Cas9 mengenali



- daerah spesifik pada genom tanaman.
- Homologi : sekuen yang mempunyai similaritas tinggi
- Homologous recombination : Metode mengedit genom sel hidup paling pertama yang di gunakan oleh peneliti. Metode ini merubah (merekombinasikan) informasi genetic antara 2 sekuan DNA yang sama (homologous).
- Kb : kilo base = 1000 bp, ukuran relatif untaian DNA.
- Kloning : proses perbanyakkan yang menghasilkan turunan sesuai dengan tetuanya, tanpa melalui proses fertilisasi
- Kloning DNA : Proses merekayasa dan menggandakan DNA
- Knockdown* : Kondisi ekspresi gen menurun karena proses rekayasa gen
- Knockouts* : Kondisi ekspresi gen tidak terjadi karena gen nya sudah di potong menjadi tidak aktif
- Meganucleases : Ditemukan pada akhir 1980-an, merupakan enzim golongan endonuklease yang ditandai oleh kemampuan nya mengenali dan memotong sekuens DNA besar (dari 14 hingga 40 pasangan basa).
- MIPS : Metal Interaction in Protein Structures adalah basis data logam dalam struktur makromolekul tiga dimensi yang tersedia di Bank Data Protein. Ion logam terikat dalam protein memiliki fungsi katalitik dan struktural.
- NCBI : *National Center for Biotechnology Information*. Merupakan salah satu bagian dari United States National Library of Medicine, sebuah cabang dari National Institutes of Health (NIH). NCBI memuat data yang relevan untuk bioteknologi dan biomedik dan seringkali menjadi sumber data yang banyak dirujuk oleh peneliti.
- NRL-3D : Database diadaptasi ke program akses multi-



- database dari National Biomedical Research Foundation Sumber Daya Informasi Protein (PIR) dan diproduksi dalam format yang mirip dengan PIR-International Protein Sequence Database
- ORF : open reading frame, untai DNA yang dapat ditranskripsikan menjadi RNA dan atau dapat ditranslasikan menjadi protein
- Organisme transgenik : organisme yang sudah mengalami perubahan genetik hasil transformasi DNA
- PAM (protospacer-adjacent motif) : Sekuen pada genom organisme yang akan di edit. Ukurannya 2–6-bp DNA yang posisinya terletak dekat dengan sekuen DNA target dari protein nuclease Cas9 pada CRISPR.
- PIR : Protein Information Resource, Amerika Serikat adalah database urutan untuk menyediakan referensi silang konteks antara entri database sendiri bagi untai protein.
- Primer : Merupakan DNA sekuen pendek (oligonukleotida) yang urutan basa nitrogennya *reverse complement* dengan sekuen target pada DNA cetakan (*template*). Primer yang digunakan dalam PCR biasanya tersedia sepasang yaitu primer *forward* dan *reverse*.
- SWISS-PROT : Adalah basis data urutan protein yang dikuratori yang berusaha keras untuk memberikan anotasi tingkat tinggi (seperti deskripsi fungsi protein, struktur domainnya, modifikasi pasca-translasi, varian) juga database yang terkait penting dalam database protein.
- TALENs : (Transcription Activator-Like Effector Nucleases). Pada tahun 2009, satu jenis protein baru di temukan dan menjadi satu jenis protein yang berperan lebih baik dalam dunia genom editing. Protein TALENs di rekayasa dari protein yang secara alami

- memiliki kemampuan untuk terikat dengan sekuen DNA yang spesifik. TALENs mempunyai kelebihan lebih simple dan jauh lebih mudah di rekayasa dibandingkan ZFN.
- Toleran : (tumbuhan mampu menahan serangan penyakit tanpa mengalami kematian atau menderita kerusakan/kehilangan hasil yang serius.
- tracrRNA : Pada beberapa sistem CRISPR membutuhkan RNA kedua yang disebut dengan tracrRNA yang berfungsi membantu tugas dari crRNA. tracrRNA bersifat komplementer terhadap pre-proses crRNAs.
- Transformasi : proses mentransfer/memindahkan gen asing ke dalam genom tanaman gen (organisme) lain.
- Transgenik : sel, jaringan, spesies yang genomnya telah disisipi gen yang berasal dari luar sel, jaringan atau spesies tersebut
- TrEMBL : Peningkatan aliran data dari proyek genom ke database urutan, basis pengetahuan protein SWISS-PROT menghadapi sejumlah tantangan dalam timnya dan cara padat karya anotasi basis data manual.
- Vektor plasmid : Untain DNA melingkar yang sering digunakan untuk membawa DNA target untuk rekayasa genetika
- ZFNs : (Zink Finger Nukleases). Protein untuk genom editing. Peneliti pada tahun 1990-an mulai menggunakan *zinc-finger nucleases* (ZFN) untuk meningkatkan keakuratan dan kespesifikan genom editing dan mengurangi kejadian salah target (off-target edits).. Struktur ZFNs sendiri di rekayasa dari protein natural yang di temukan pada organisme eukariot.

## 1.18 Indeks

- A**  
alignment, 37, 38, 43, 65
- B**  
Bakteriofaga, 13, 76  
*barcoding*, 45, 47  
BioEdit, 32, 34, 37, 38, 69  
bioteknologi, 1, 3, 12, 42, 50, 65, 78  
Bootstrap, 76
- C**  
Cas9, 6, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 67, 69, 70, 72, 75, 76, 77, 79  
Chromatogram, 32, 33, 67, 76  
consensus, 32, 39, 43  
CRISPR, 2, 3, 6, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 22, 24, 27, 28, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80  
crRNA, 13, 14, 16, 77, 80
- D**  
DDBJ, 42, 77  
Double strand break repair, 4, 77
- E**  
EMBL, 42, 77
- F**  
Fasta, 40  
filogenetik, v, 43, 44, 47, 48, 66, 76  
Fragmen DNA, 3, 77
- G**  
GenBank, 23, 42, 43  
genom, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 21, 22, 26, 29, 43, 47, 48, 59, 64, 65, 77, 78, 79, 80  
Genom editing, 2, 7, 77  
gRNA (sgRNA), 77
- H**  
homologi, 43, 44, 47, 64, 65  
Homologous Recombination, 74
- K**  
kb, 19  
kloning, 61  
Kloning DNA, 78  
Knockdown, 78  
Knockouts, 78
- M**  
Meganucleases, 1, 3, 6, 78  
MIPS, 78
- N**  
NCBI, v, vii, 42, 43, 44, 54, 65, 78  
NRL-3D, 78
- O**  
ORF, 58, 79  
Organisme transgenik, 79

## P

PAM (protospacer-adjacent motif), 79

PIR, 79

Primer, v, 49, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 68, 69, 70, 79

## S

SWISS-PROT, 79, 80

## T

TALENs, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 70, 73, 79

Toleran, 80

tracrRNA, vi, 14, 16, 80

transformasi, 1, 2, 25, 26, 65, 79

transgenik, 83

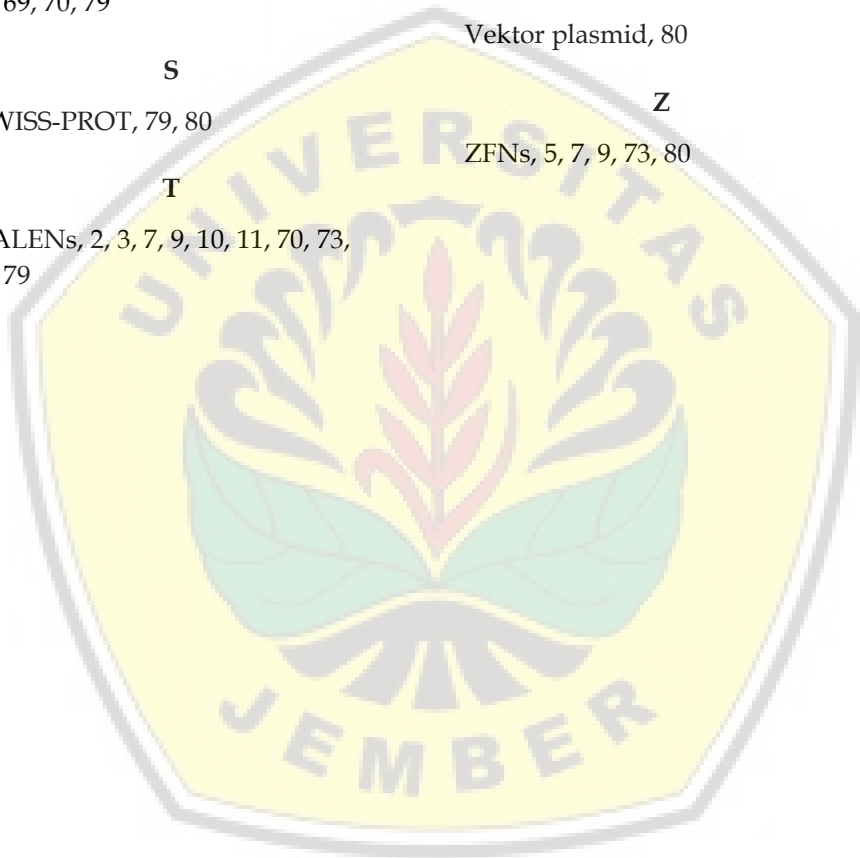
TrEMBL, 80

## V

Vektor plasmid, 80

## Z

ZFNs, 5, 7, 9, 73, 80



## BIOGRAFI PENULIS 1



Dr. Ir. Sholeh Avivi, MSi. merupakan putra pertama pengasuh Pondok Pesantren Putri El-Aniesah Kaliwates Jember dari pasangan KH. A. Fauzan Shofwan dan Ibu Nyai Hj. Lilik Maslihah. Lahir di Lamongan pada tanggal 21 Juli 1969. Pendidikan Madrasah di MIN PGAN 6Th Jember (1982), SMP A. Wahid Hasyim Tebuireng Jombang (1985) dan SMAN 1 Jember (1988). Pendidikan S1 (1993), S2 (1995) dan S3 (2000), di selesaikan dari Institut Pertanian Bogor.

Menikah dengan Nurul Muanasah SAg., dan di karuniai 4 orang anak. Bidang riset yang di tekuni adalah Pemuliaan Tanaman dengan memanfaatkan Bioteknologi Rekayasa Genetika. Penelitian Disertasi menghasilkan tanaman transgenik tembakau dan kacang tanah yang mengandung gen PStV. Sebagian penelitian Disertasi di kerjakan penulis di Queensland Agricultural Biotechnology Centre, University of Queensland, Australia pada tahun 1998. Penulis di terima mengabdikan di Program Studi Agronomi Fakultas pertanian Universitas Jember pada tahun 2000. Minat meneliti bidang Rekayasa Genetika lebih intens di lakukan saat bergabung di Center for Development of Advances Sciences and Technology (CDAST) UNEJ, meneliti tebu toleran genangan (Grant Kemenristek DIKTI 2014-2016) dan singkong toleran cekaman air (Grant Kemenristek DIKTI 2016-2018). "Training on The Development and Implementation of Genome Editing in Plant" di selesaikan penulis pada tahun 2018 di Gyeongsang National University (GNU), Korea Selatan. Mulai tahun 2019 dengan memanfaatkan teknologi Genom Editing penulis meneliti tomat tinggi sucrose (Grant Penguatan Program IDB, 2019) bekerjasama dengan Prof. Jae-Yean Kim, GNU. Jabatan penulis di mulai dari menjadi ketua Center for Bisafety (C-Bios) tahun 2002-2005, ketua lab Genetika dan Pemuliaan tanaman pada tahun 2005-2006, di lanjutkan menjadi sekretaris PS Magister Agronomi tahun 2007-2008. Saat ini penulis di percaya memegang amanah menjadi Sekretaris Lembaga Pengembangan Pembelajaran dan Penjaminan Mutu (LP3M) UNEJ sejak tahun 2017. Buku "Bioteknologi-Rekayasa Genetika Tanaman" serta buku "Pemuliaan Tanaman: Aplikasi dan Prospek" diselesaikan bersama Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, MP. pada tahun 2019. Monograf Genom Editing Analisa DNA & Protein ini diselesaikan pada tahun 2020.

## BIOGRAFI PENULIS 2



Syafira Fatihatul Husna, mahasiswa Magister Bioteknologi Universitas Jember Tahun 2019/2020, pasangan Mustajab dan Sri Suparmi di Ngawi, Jawa Timur, 14 April 1997. Pendidikan terakhir S1 Sarjana Pertanian (Prodi Agroteknologi) di Universitas Jember, Indonesia, tahun 2015/2019. Bidang Riset yang ditekuni adalah Analisa Ekspresi Gen-Gen terkait Somatik Embriogenesis, Respon Sitokinin, dan Biosintesis Etilen pada Kalus Padi Padi Sub Species Indica, Javanica, dan Japonica. Latar belakang penelitian S1 adalah Analisa Genotipa Penentu Sifat Aromatik pada Padi Lokal Varietas Merah Wangi, Pendok, Genjah Arum, dan Mentik Wangi Susu. Monograf Genom Editing Analisa DNA & Protein ini diselesaikan pada tahun 2020.

## BIOGRAFI PENULIS 3



Lailly Nur Uswatul Hassanah, mahasiswa Magister Bioteknologi Universitas Jember Tahun 2019/2020, anak sulung dari pasangan Mafakir dan Susanti, Lahir di Jember, 12 Maret 1996. Pendidikan terakhir S1 Sarjana Biologi (Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) di Universitas Jember, Indonesia, tahun 2014/2018. Bidang Riset yang ditekuni adalah analisis protein imunogenik protein kelenjar saliva Anopheles, DNA barkoding untuk identifikasi Anopheles sebagai upaya pengendalian penyebaran penyakit Malaria di Indonesia. Buku ini adalah buku pertama yang ditulis oleh saya, sekaligus menjadi pijakan pertama saya untuk menulis buku-buku yang lain di kemudian hari. Monograf Genom Editing Analisa DNA & Protein ini diselesaikan pada tahun 2020.