

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Hasil dari penelitian yang telah dilaksanakan menunjukkan *backbone* plasmid yang diinginkan berhasil dikonstruksi. *Cassette* ekspresi tRNA – gRNA berhasil disambungkan membentuk 1 *operon* tersendiri yang diekspresikan dengan daerah gRNA yang berisi *AarI Entry Site*. Hal ini memungkinkan pergantian sekuens gen target sesuai keinginan penelitian masing-masing. Adapun ekspresinya terjadi melalui *promoter AtU6* dan diterminasi oleh *AtU6 Terminator*. Sedangkan ekspresi ORF *Cas9* dikendalikan oleh *promoter 2x CaMV35S* yang berada tepat setelah *AtU6 Terminator*.
2. Metode yang paling tepat untuk konstruksi *backbone* plasmid adalah teknik *Golden Gate*. Selain itu, implementasi teknik ini untuk memperkecil jumlah fragmen yang perlu disatukan dinamakan *Golden Gate – PCR*. Dari kedua strategi yang dicetuskan, *Direct PCR from Golden Gate* merupakan strategi yang paling efisien. Keterbatasan dari strategi ini adalah hanya memungkinkan untuk fragmen-fragmen berukuran kecil (91-841 bp).

B. Saran

Backbone plasmid yang berhasil dikonstruksi bersifat nonfungsional dan hanya dapat bekerja untuk kegiatan rekayasa genetika tanaman apabila sekuens gen target sepanjang 20 nukleotida dengan *overhang 5'-TGCA-3'* pada *coding strand* dan *5'-AAAC-3'* pada *template strand* diinsersikan pada bagian *AarI Entry Site* melalui teknik *Golden Gate* dengan enzim *AarI* sebagai enzim restriksi tipe IISnya. Selain itu, plasmid ini juga didesain untuk menargetkan sejumlah gen target melalui satu *operon*. Teknik yang dapat diaplikasikan untuk melaksanakan kegiatan tersebut adalah dengan *double strand oligo annealing – Golden Gate Reaction – PCR* (menargetkan daerah tRNA-sgRNA1, 2, 3, dan seterusnya secara terpisah dengan *overhang* yang berbeda-beda serta *non palindromic*) – konstruksi plasmid akhir melalui *Golden Gate*.