

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilakukan termasuk ke dalam penelitian deskriptif. Penelitian ini dilakukan menggunakan data-data sekunder berupa jenis tumbuhan langka yang diperoleh dari *GenBank*, kemudian dilakukan *alignment*, pembuatan sekuen konsensus, serta mendesain primer menggunakan penanda *Internal Transcribed Spacer* (ITS) untuk identifikasi tumbuhan langka.

#### 3.2 Alat dan Bahan

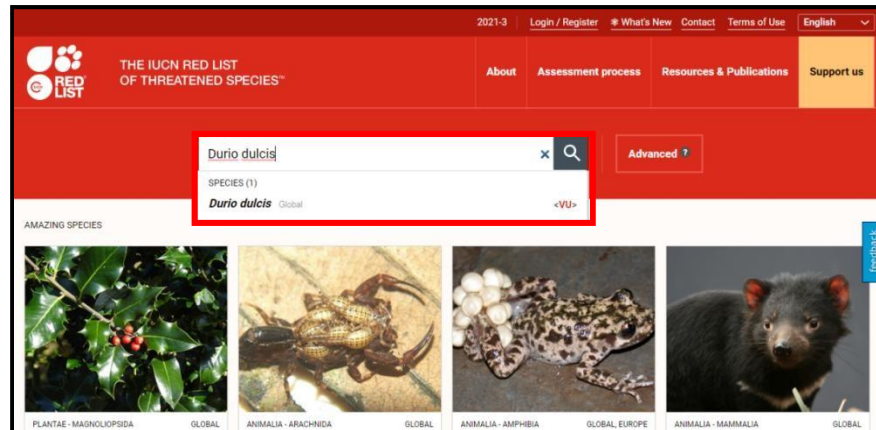
Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini yakni komputer yang terkoneksi jaringan internet dan bahan berupa sekuen DNA tumbuhan langka yang diperoleh dari *GenBank*.

#### 3.3 Prosedur Penelitian

##### 3.3.1 Pengambilan Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data sekuen DNA tumbuhan langka yang dikoleksi mengacu pada daftar spesies tumbuhan langka yang dikeluarkan oleh LIPI *Press* dan berbagai artikel terkait. Pemilihan tumbuhan dilakukan secara acak dengan melihat ketersediaan data pada *GenBank* menggunakan nomor akses ITS untuk memudahkan pencarian sekuen pada laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, serta artikel penelitian yang digunakan sebagai sumber. Pencarian artikel penelitian terkait dilakukan melalui *Google Scholar* dengan kata kunci “*DNA Barcoding*”, “*Internal Transcribed Spacer*”, “*Rare Plants DNA Sequences*”, dan beberapa kata kunci lain sesuai jenis tumbuhan yang dikehendaki.

Data tumbuhan yang digunakan juga mengacu pada standar kelangkaan *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) dengan kategori yang digunakan yakni *critically endangered* atau kritis (CR), *endangered* atau genting (EN), dan *vulnerable* atau rentan (VU). Perolehan data tumbuhan pada *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) *Redlist* ditunjukkan pada Gambar 3.1 dan Gambar 3.2.



Gambar 3.1. Laman IUCN  
(Sumber : *International Union for Conservation of Nature*)

Gambar 3.1 menunjukkan laman IUCN yang diakses dengan menuliskan ‘IUCN’ di bagian kotak *search*/pencarian pada *Google* atau dapat diakses pada laman <https://www.iucnredlist.org/>. Kemudian nama spesies yang akan dicari pada kotak pencarian (kotak merah). Hasil pencarian ditunjukkan pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Informasi data *Durio dulcis* pada laman IUCN  
(Sumber : *International Union for Conservation of Nature*)

Gambar 3.2 menunjukkan hasil pencarian dari *Durio dulcis*. Informasi mengenai data *Durio dulcis* yang diperoleh, diantaranya tertulis ‘*The Red List Assessment*’ yang menunjukkan bahwa spesies tersebut termasuk ke dalam kategori *Vulnerable* (VU) dengan tanggal *assessment* pada bagian ‘*Last Assessed*’ yakni 06 Februari 2020. Pada ‘*Scope Of Assessment*’ tertera Global yang artinya spesies ini masuk ke dalam kategori VU secara global.

Tabel 3.1 menunjukkan data sekunder tanaman langka di Indonesia, meliputi nama latin tanaman, nomor akses ITS, dan jumlah pasang basa untuk mempermudah pencarian data sekuen beserta ukurannya pada pangkalan data

*GenBank*. Terdapat 50 spesies tumbuhan langka yang dikoleksi (Tabel 3.1 dan Lampiran 3).

Tabel 3.1. Data Sekunder berbagai Tanaman Langka di Indonesia

No.	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah Pasang Basa (bp)	Status Kelangkaan	Daerah Sebaran
1	<i>Mangifera macrocarpa</i>	AB071688.1	656 bp	VU	Borneo, Jawa, Sumatera
2	<i>Pinanga arinasae</i>	AB271248.1	657 bp	EN	Bali
3	<i>Durio graveolens</i>	AF287720.1	684 bp	VU	Borneo, Sumatera
4	<i>Durio dulcis</i>	AF287715.1	689 bp	VU	Borneo
5	<i>Durio kutejensis</i>	AF287717.1	688 bp	VU	Borneo
6	<i>Durio acutifolius</i>	AF287700.1	684 bp	VU	Borneo, Sumatera
7	<i>Durio lowianus</i>	AF287711.1	688 bp	VU	Sumatera
8	<i>Phalaenopsis violacea</i>	AY390236.1	669 bp	VU	Sumatera
9	<i>Zingiber loerzingii</i>	MN803334.1	658 bp	VU	Sumatera
10	<i>Zingiber odoriferum</i>	KF359981.1	653 bp	CR	Borneo, Jawa
11	<i>Gonystylus bancanus</i>	MH432153.1	694 bp	CR	Borneo, Sumatera
12	<i>Eucalyptus deglupta</i>	HM596043.1	635 bp	VU	Sunda Kecil, Maluku, Papua, Sulawesi
13	<i>Eucalyptus urophylla</i>	HM596068.1	634 bp	EN	Sunda Kecil
14	<i>Artocarpus tamaran</i>	FJ917019.1	668 bp	VU	Borneo
15	<i>Artocarpus anisophyllus</i>	FJ917027.1	666 bp	VU	Borneo, Sumatera
16	<i>Dalbergia latifolia</i>	MH547586.1	653 bp	VU	Jawa
17	<i>Nepenthes spectabilis</i>	HM204908.1	593 bp	VU	Sumatera
18	<i>Nepenthes boschiana</i>	HM204893.1	690 bp	EN	Borneo
19	<i>Boesenbergia loerzingii</i>	MN803349.1	649 bp	CR	Sumatera
20	<i>Madhuca erythrophylla</i>	KF686213.1	636 bp	EN	Borneo, Sumatera
21	<i>Madhuca kuchingensis</i>	KF686219.1	637 bp	VU	Borneo
22	<i>Madhuca sarawakensis</i>	KF686234.1	636 bp	VU	Borneo
23	<i>Madhuca curtisii</i>	KF686211.1	636 bp	VU	Borneo
24	<i>Madhuca lancifolia</i>	KF686221.1	636 bp	VU	Borneo

Dea Amalia, 2022

PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK UNTUK IDENTIFIKASI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA BERDASARKAN PENANDA *Internal Transcribed Spacer (ITS)* SECARA *IN-SILICO*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

No.	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah Pasang Basa (bp)	Status Kelangkaan	Daerah Sebaran
25	<i>Manilkara fasciculata</i>	KM370922.1	635 bp	VU	Borneo, Sunda Kecil, Maluku, Papua, Sulawesi
26	<i>Palaquium xanthochymum</i>	KF686291.1	687 bp	VU	Borneo, Jawa, Sumatera
27	<i>Palaquium rigidum</i>	KF686281.1	676 bp	EN	Borneo
28	<i>Aquilaria hirta</i>	KY817966.1	673 bp	VU	Sumatera
29	<i>Globba variabilis</i>	AY339683.1	655 bp	VU	Sumatera
30	<i>Globba acehensis</i>	AY339732.1	656 bp	EN	Sumatera
31	<i>Globba multifolia</i>	AB049326.1	570 bp	EN	Sumatera
32	<i>Globba talangensis</i>	AY339735.1	655 bp	VU	Sumatera
33	<i>Hedychium muluense</i>	AF202393.1	627 bp	EN	Borneo
34	<i>Hedychium hasseltii</i>	AF202389.1	628 bp	CR	Jawa
35	<i>Hedychium horsfieldii</i>	AF478760.1	641 bp	VU	Jawa
36	<i>Paphiopedilum primulinum</i>	EF156143.1	623 bp	CR	Sumatera
37	<i>Paphiopedilum liemianum</i>	EF156123.1	623 bp	CR	Sumatera
38	<i>Paphiopedilum gigantifolium</i>	EF156103.1	657 bp	CR	Sulawesi
39	<i>Paphiopedilum victoria-mariae</i>	EF156156.1	633 bp	CR	Sumatera
40	<i>Paphiopedilum tonsum</i>	EF156150.1	662 bp	EN	Sumatera
41	<i>Paphiopedilum glaucophyllum</i>	EF156105.1	631 bp	EN	Jawa
42	<i>Paphiopedilum rothschildianum</i>	EF156135.1	658 bp	CR	Borneo
43	<i>Paphiopedilum javanicum</i>	EF156120.1	662 bp	EN	Borneo, Jawa, Sunda Kecil, Sumatera
44	<i>Paphiopedilum barbatum</i>	EF156087.1	661 bp	EN	Sumatera
45	<i>Paphiopedilum kolopakingii</i>	EF156121.1	659 bp	CR	Borneo
46	<i>Paphiopedilum supardii</i>	GQ505309.1	658 bp	CR	Borneo
47	<i>Paphiopedilum lowii</i>	JQ660867.1	696 bp	EN	Borneo, Jawa, Sulawesi, Sumatera

Dea Amalia, 2022

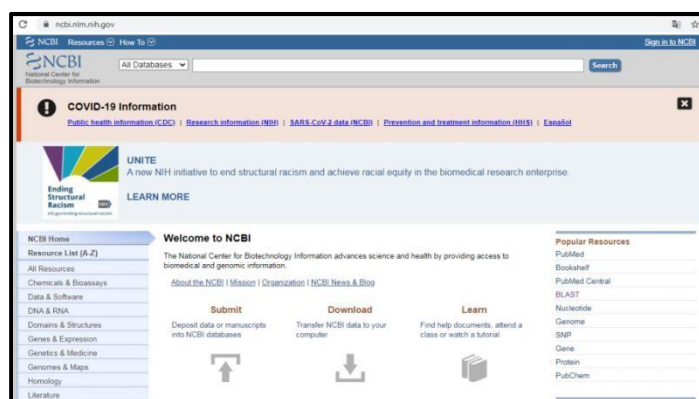
PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK UNTUK IDENTIFIKASI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA BERDASARKAN PENANDA Internal Transcribed Spacer (ITS) SECARA IN-SILICO

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

No.	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah Pasang Basa (bp)	Status Kelangkaan	Daerah Sebaran
48	<i>Paphiopedilum sangii</i>	EF156137.1	663 bp	CR	Sulawesi
49	<i>Paphiopedilum hookerae</i>	EF156116.1	661 bp	EN	Borneo
50	<i>Paphiopedilum superbiens</i>	EF156148.1	662 bp	EN	Sumatera

(Sumber : *National Center of Biotechnology Information*)

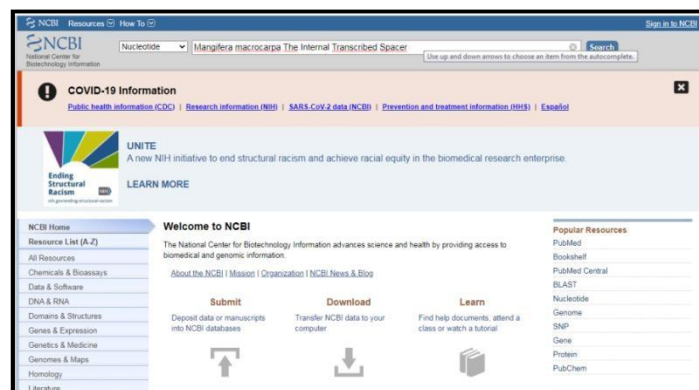
Langkah-langkah untuk memperoleh sekuen DNA pada *GenBank National Center of Biotechnology Information* (NCBI) ditunjukkan pada Gambar 3.3 hingga Gambar 3.10.



Gambar 3.3. Laman NCBI

(Sumber : *National Center of Biotechnology Information*)

Gambar 3.3 menunjukkan laman NCBI yang dapat diakses dengan menuliskan 'NCBI' di bagian kotak *search*/pencarian pada *Google* atau bisa diakses pada laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Data spesies dicari dengan mengubah tipe sekuen dan menuliskan nama spesies pada kolom pencarian (Gambar 3.4).



Dea Amalia, 2022

**PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK UNTUK IDENTIFIKASI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA BERDASARKAN PENANDA Internal Transcribed Spacer (ITS) SECARA IN-SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Gambar 3.4. Pencarian data sekuen DNA pada NCBI  
(Sumber : *National Center of Biotechnology Information*)

Gambar 3.4 menunjukkan pencarian data sekuen DNA yang dilakukan dengan mengubah tipe sekuen menjadi “*Nucleotide*” dan menuliskan nama spesies beserta penandanya, contoh “*Mangifera macrocarpa The Internal Transcribed Spacer*” atau “*Mangifera macrocarpa ITS*”. Hasil pencarian ditunjukkan pada Gambar 3.5.

GenBank - Send to: -

**Mangifera macrocarpa genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence**

GenBank: AB071688.1  
FASTA Graphics

Go to: [□](#)

LOCUS AB071688 656 bp DNA linear PLN 03-JUN-2003  
DEFINITION Mangifera macrocarpa genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, complete sequence.  
ACCESSION AB071688  
VERSION AB071688.1  
KEYWORDS .  
SOURCE Mangifera macrocarpa  
ORGANISM [Mangifera macrocarpa](#)  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetalae; rosids; malvids; Sapindales; Anacardiaceae; Mangifera.  
REFERENCE 1  
AUTHORS Yonemori,K., Honsho,C., Kanzaki,S., Eiadthong,W. and Sugiura,A.  
TITLE Phylogenetic relationships of Mangifera species revealed by ITS sequences of nuclear ribosomal DNA and a possibility of their hybrid origin  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 656)  
AUTHORS Yonemori,K., Honsho,C. and Kanzaki,S.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (17-SEP-2001) Keizo Yonemori, Kyoto University, Graduate School of Agriculture; Sakyo-ku, Kyoto, Kyoto 606-8502, Japan (E-mail:keizo@kais.kyoto-u.ac.jp, Tel:01-75-753-6053, Fax:01-75-753-6497)

FEATURES

source 1..656  
/organism="Mangifera macrocarpa"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:171943"  
misc\_RNA 1..265  
/product="Internal transcribed spacer 1"  
rRNA 266..428  
/product="5.8S ribosomal RNA"  
misc\_RNA 429..656  
/product="Internal transcribed spacer 2"  
variation 474  
/note="There is nucleotide additivity at this site"  
/note=""

ORIGIN

```

1 tcgagacctg ccaagcagaa cgaccctgta acttggtt aagtcgggg acgtcgggc
61 ctgtgtgcg cagccctcg ctgcgcgc gtcgggctt cgtgatgt gcaccctgc
121 gttgtgtgc cgtctgcgc cgtcgggtg ctttaacca ccccggtgg aattgcgca
181 agactgtt aacgaaggg ctgcctccg tgcctccgg acacgtgcg cgtctcggg
241 acgagcgc tccttctatt atatataag actctggca acgatattc cgtctcgc
301 atcagtag aagctgcga aatgcatac ttgtgtgaa ttgcagaat cgtgaacca
361 tcagcttt gaagcaagt tgcgcccaa gcccttagg gccggcagc tctcctggg
421 gtcaagcat cgttcccc cttccaaag gcccaagat cttcggcgc ggggggggg
481 aaattggct cctgtcgtc cgtcctgcb gttggccaa atctgattc tgggtgagc
541 ttccccgca cgtcgtggt cgtttgaaa agaccctagt gatcctgct tgcggttgc
601 ttccccgca cagcactct acaccctaa agaccggcg aaagccctc cgcatac

```

Gambar 3.5. Informasi data *Mangifera macrocarpa* menggunakan penanda *Internal Transcribed Spacer (ITS)*  
(Sumber : *National Center of Biotechnology Information*)

Dari Gambar 3.5 dapat dilihat hasil pencarian dari DNA sekuen *Mangifera macrocarpa* dengan penanda ITS. Terdapat enam kolom sekuen dan setiap kolom terdiri dari 11 baris sekuen dengan panjang karakter 10 (kotak merah). Terdapat beberapa kata yang masing-masing memiliki makna (Tabel 3.2).

Dea Amalia, 2022

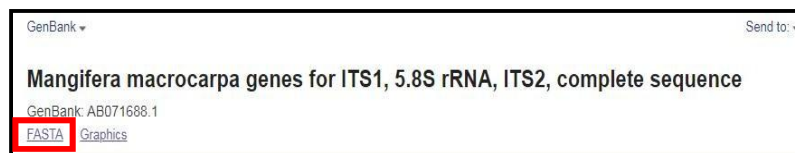
**PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK UNTUK IDENTIFIKASI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA BERDASARKAN PENANDA *Internal Transcribed Spacer (ITS)* SECARA IN-SILICO**

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Tabel 3.2. Poin dalam Hasil Data NCBI

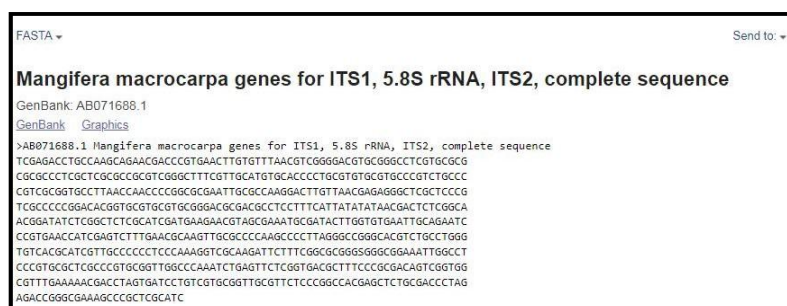
Kata	Makna
Nomor AB071688.1	Nomor akses sekuen
Nomor 656 bp	Sekuen terdiri dari 655 pasang basa atau memiliki panjang karakter tersebut.
03-JUN-2003	Tanggal publikasinya yaitu pada 3 Januari 2003.
<i>Mangifera macrocarpa</i>	Nama spesies pemilik sekuen DNA.
<i>Source - Features</i>	Informasi atau identitas dari sekuen tersebut.
'ORIGIN'	Tanda dimulainya sekuen DNA.
Angka 1 pada 'ORIGIN'	Indeks awal mula karakter tersebut.
Angka 61-601 pada 'ORIGIN'	Indeks selanjutnya pada karakter tersebut.
Tanda '//'	Tanda akhir sekuen DNA.

Tabel 3.2 menjelaskan makna dari setiap kata yang diperoleh dari hasil pencarian pada laman NCBI. Data yang diperlukan dalam penelitian berupa format FASTA yang dapat diperoleh dengan cara klik poin "FASTA" pada bagian ujung kiri atas (Gambar 3.6).



Gambar 3.6. Poin "FASTA"

Gambar 3.6 menunjukkan cara memperoleh data berupa format FASTA dari sekuen tanaman yang dikehendaki (kotak merah). Hasil format FASTA ditunjukkan pada Gambar 3.7.



Gambar 3.7. Data dalam format FASTA

Dari Gambar 3.7 diperoleh informasi sekuen DNA tanaman yang dibutuhkan dalam bentuk format FASTA, selanjutnya data disalin dan ditempel pada perangkat lunak *NotePad*. Nama pada data diubah agar memudahkan untuk dibaca (Gambar 3.8).

```
>AB071688.1_Mangifera_macrocarpa
TCGAGACCTGCCAAGCAGAAGACGACCCGTGAAC TTGTGTTAACGTCGGGGACGTGCGGGCC TC GTGCGCG
CGCGCCCTCGCTCGCCGCCTCGGGCTTTCTGTTGATGTGCACCCCTGCGTGTGCGTCCCGTCTGCC
CGTCGCGGTGCC TTAACCAACCCCGCGCGAATTGCGCAAGGACTTGTAAACGAGAGGGCTCGCTCCCG
TCGCCCGGACACGGTGTGCGTGTGCGGGACGCGACGCCCTCTTTCATTATATAACGACTCTCGGCA
ACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATAC TTGGTGTGAATTGCAAGATC
CCGTGAACATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGCCCTTAGGGCCGGGACGCTCGCTGGG
TGTACGATCTGTTGCCCCCTCCCAAGGTCGCAAGATTCTTTCGGCGGGGGGGGAAATTGGCT
CCCGTGCCTCGCCGTGCGTTGGCCAAATCTGAGTTCTCGGTGACGCTTTCGCCGACAGTGGTGG
CGTTTGA AAAACGACCTAGTGATCTGTGTCGGTTCGCCGGCCACGAGCTCTGCGACCCTAG
AGACCGGGCGAAAGCCCGCTCGCATC
```

Gambar 3.8. Data pada perangkat lunak *NotePad*

Gambar 3.8 menunjukkan perubahan nama pada data yang diperoleh dengan cara menghapus informasi lain selain nama spesies, nomor dan tanda '>', serta mengganti jarak atau spasi pada penamaan dengan menggunakan tanda '\_'. Agar nama terbaca, maka tanda '>' harus tetap dipakai di awal penamaan. Data sekuen DNA dari seluruh tumbuhan yang dibutuhkan diperoleh dengan melakukan semua tahapan di atas. Data yang telah dicari kemudian disimpan di dalam satu *file* yang sama seperti pada Gambar 3.9.

```
>AB071688.1_Mangifera_macrocarpa
TCGAGACCTGCCAAGCAGAAGACGACCCGTGAAC TTGTGTTAACGTCGGGGACGTGCGGGCC TC GTGCGCG
CGCGCCCTCGCTCGCCGCCTCGGGCTTTCTGTTGATGTGCACCCCTGCGTGTGCGTCCCGTCTGCC
CGTCGCGGTGCC TTAACCAACCCCGCGCGAATTGCGCAAGGACTTGTAAACGAGAGGGCTCGCTCCCG
TCGCCCGGACACGGTGTGCGTGTGCGGGACGCGACGCCCTCTTTCATTATATAACGACTCTCGGCA
ACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATAC TTGGTGTGAATTGCAAGATC
CCGTGAACATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGCCCTTAGGGCCGGGACGCTCGCTGGG
TGTACGATCTGTTGCCCCCTCCCAAGGTCGCAAGATTCTTTCGGCGGGGGGGGAAATTGGCT
CCCGTGCCTCGCCGTGCGTTGGCCAAATCTGAGTTCTCGGTGACGCTTTCGCCGACAGTGGTGG
CGTTTGA AAAACGACCTAGTGATCTGTGTCGGTTCGCCGGCCACGAGCTCTGCGACCCTAG
AGACCGGGCGAAAGCCCGCTCGCATC
>AB271248.1_Pinnanga_brihasae
CCGAGACCCGGACGAGGAAGACCGGCGAACATGTGAACGCAATGATCTTGGCGGGGAAGCATGGCCCT
ACC GCGACGTCACCCCTTGCCTCCCGCCCGCTGGGGGTGGCGGGGCTAATAGAACCCTGGTGC
CCAGGAGGTTGCAGAGAACAGAGAGCGCAAGATGGGGGACGCTGCGCCCGCCCTCCCTCCACTCG
GTGCGGGAGGAGTGTGCTGCTGTCGCGCCGATGCGCGCCATGATGATGATGACTCTCGGCAACG
GATATCTCGGCTCTGCTGATGAAGAATGTAGCGAAATGCGATACCTGGTGTGAATTGCAAGATCCCG
TGAACATCTGAATCTTTGAATGCAAGTTGCGCCGAGGCGACCCGGTGCAGGGGACGCTCTGGGAT
CACCGAATAATGATGCTCCGCTCTCGGGGCAATTGCTGGCTCCGGGTTGTCGGACGGGATCTG
GCCCGCCCGCCCGCGGACGGCGGAGACCGGGGCTCTGAGTGGCCGAGACGGCAGATGATG
GGACGCCCCGGGCTCTCCACGCTGGCGCCGAGCCGGAAGTGGCCCTGCGCCCAACC GCGACCGCC
TGGTCTGGGAGGATGACCTAGGATC
>AF287720.1_Durio_graveolens
TCGAAACCCGCTCGACGGACGACCCGGGACGCTTAAACGAAACACCGAGGGGRCGAGGTTGCCCCG
GCCCCGAGCCCTCCGGCCCGGGAGGGCGGACGGTCTGCTGCCCCCTACGGGGGGGGGGAAG
ATCGGCTGCTCGCCCCGCGAACGAAGACCCCGGGGGAATCGGCCAAGGAACCGAAACGAAAY
GGAGCGCGCGCGCTCGCATCCGCTCGCGGTGCGGTGCGGGGCGCGCGGACTCTTTTGTGCG
AAAAATGAAGGACTCTGGCAACGGATCTCTGGTCTCGCATGATGAAAAAGTACGAATGCGAT
ACTTGGTGTGAATTGCAAGATCCGTGAACATCGAGTCTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGCCATTAG
GCGGAGGGACGCTGCTGCTGGTGTGATGACGCTGCCCCCTCCGACCCCCGCTTGGGCTCGGG
GGGAGGGGGGGGGGGAAGATGCGCTCCCGATCCCGTGGTACGGTTGGCCCAAAAYGAGTCCCC
GGAAATGACAGCGCTGACGCTGCTGGTGAAGCGCCGGCTGCTCTGCTCGCCGGTGAAGCGCGCT
TTGTCACCCGGACCCCTCGGACCCCGCATGCTCGGTCGATGCTCGCGT
>AF287715.1_Durio_dulcis
TCGAAACCCGCTCGACGGACGACCCGGGACGCTTAAACGAAACACCGAGGGGRCGAGGTTGCCCCG
GCCCCGAGCCCTCCGGCCCGGGAGGGCGGACGGTCTGCTGCCCCCTACGGGGGGGGGGAACG
ATCGGCTGCTCGCCCCGCGAACGAAGACCCCGGGGGAATCGGCCAAGGAACCGAAACGAAAY
GGAGCGCGCGCGCTCGCATCCGCTCGCGGTGCGGTGCGGGGCGCGCGGACTCTTTTGTGCG
AAAAATGAAGGACTCTGGCAACGGATCTCTGGTCTCGCATGATGAAAAAGTACGAATGCGAT
ACTTGGTGTGAATTGCAAGATCCGTGAACATCGAGTCTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGCCATTAG
GCGGAGGGACGCTGCTGCTGGTGTGATGACGCTGCCCCCTCCGACCCCCGCTTGGGCTCGGG
GGGAGGGGGGGGGGGAAGATGCGCTCCCGATCCCGTGGTACGGTTGGCCCAAAAYGAGTCCCC
GGAAATGACAGCGCTGACGCTGCTGGTGAAGCGCCGGCTGCTCTGCTCGCCGGTGAAGCGCGCT
TTGTCACCCGGACCCCTCGGACCCCGCATGCTCGGTCGATGCTCGCGT
>AF287717.1_Durio_kuteiensis
TCGAAACCCGCTAGACGGACGACCCGGGACGCTTAAACGAAACACCGAGGGGRCGAGGTTGCCCCG
GCCCCGAGCCCTCCGGCCCGGGAGGGCGGACGGTCTGCTGCCCCCTACGGGGGGGGGGAACG
ATCGGCTGCTCGCCCCGCGAACGAAGACCCCGGGGGAATCGGCCAAGGAACCGAAACGAAAY
GGAGCGCGCGCGCTCGCATCCGCTCGCGGTGCGGTGCGGGGCGCGCGGACTCTTTTGTGCG
AAAAATGAAGGACTCTGGCAACGGATCTCTGGTCTCGCATGATGAAAAAGTACGAATGCGAT
ACTTGGTGTGAATTGCAAGATCCGTGAACATCGAGTCTTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGCCATTAG
GCGGAGGGACGCTGCTGCTGGTGTGATGACGCTGCCCCCTCCGACCCCCGCTTGGGCTCGGG
GGGAGGGGGGGGGGGAAGATGCGCTCCCGATCCCGTGGTACGGTTGGCCCAAAAYGAGTCCCC
GGAAATGACAGCGCTGACGCTGCTGGTGAAGCGCCGGCTGCTCTGCTCGCCGGTGAAGCGCGCT
TTGTCACCCGGACCCCTCGGACCCCGCATGCTCGGTCGATGCTCGCGT
>AF287713.1_Durio_kuteiensis
TCGAAACCCGCTAGACGGACGACCCGGGACGCTTAAACGAAACACCGAGGGGRCGAGGTTGCCCCG
GCCCCGAGCCCTCCGGCCCGGGAGGGCGGACGGTCTGCTGCCCCCTACGGGGGGGGGGAACG
```

Gambar 3.9. Contoh beberapa data dalam format FASTA

Pada Gambar 3.9 ditunjukkan data sekuen DNA yang telah dikumpulkan dalam satu *file* yang sama. Hal ini dilakukan agar memudahkan pada saat data



akan digunakan. Data yang telah diperoleh disimpan dengan format nama sesuai kebutuhan.

Pada Tabel 3.1 terdapat data daerah sebaran dari setiap tumbuhan yang diperoleh dari laman *Plant Of The World* yang diakses pada <https://powo.science.kew.org/> dengan menuliskan nama dari spesies tumbuhan yang dikehendaki maka akan didapatkan informasi daerah sebaran dari tumbuhan tersebut.

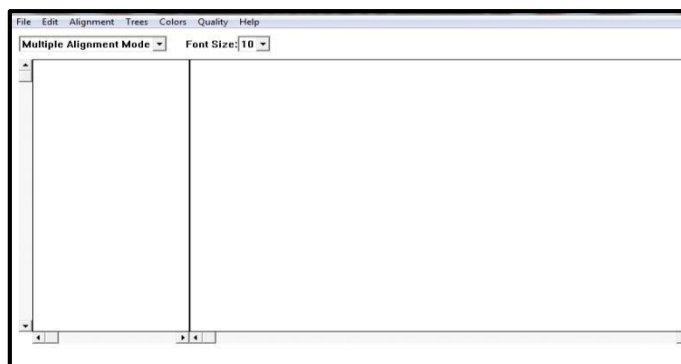
### 3.3.2 Sequence Alignment

Pengolahan data meliputi penyusunan dan penyesuaian data, serta karakterisasi menggunakan perangkat lunak ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). ClustalX hanya mampu membaca data dalam bentuk format FASTA oleh karena itu data yang digunakan yakni data yang telah disusun pada program *NotePad*. Perangkat lunak ClustalX dapat diunduh pada laman <http://www.clustal.org/download/current/>. Berikut langkah-langkah untuk melakukan *alignment* menggunakan ClustalX (Gambar 3.10) :

<b><i>Preprocessing Data – Sequence Alignment</i></b>
<p><b>mulai</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplikasi ClustalX diunduh</li> <li>2. Klik menu FILE – <i>Load Sequences</i></li> <li>3. <i>Input</i> data yang akan diolah, Klik <i>Open</i></li> <li>4. Klik menu <i>ALIGNMENT – Do Complete Alignment</i></li> <li>5. Beri nama untuk file yang akan disimpan, Klik OK</li> <li>6. Simpan data dalam FASTA format, Klik menu <i>FILE – Save Sequences As</i>, Klik FASTA format – Klik OK</li> </ol> <p><b>selesai</b></p>

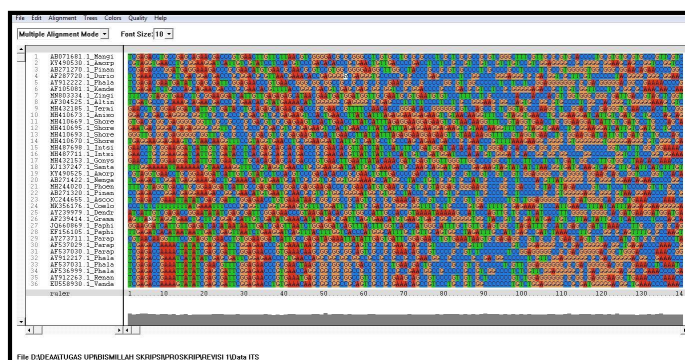
Gambar 3.10. Langkah-langkah melakukan *sequence alignment* menggunakan perangkat lunak ClustalX.

Ilustrasi langkah-langkah melakukan *sequence alignment* menggunakan perangkat lunak ClustalX ditunjukkan pada Gambar 3.11 hingga Gambar 3.15.



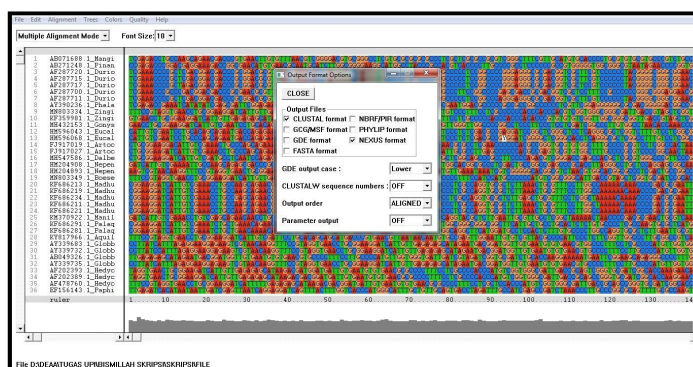
Gambar 3.11. Perangkat lunak ClustalX

Pada Gambar 3.11 ditunjukkan tampilan awal pada perangkat lunak ClustalX. Pengunduhan perangkat lunak ClustalX dapat dilakukan pada laman <http://www.clustal.org/download/current/>. Data yang terdapat pada *NotePad* di-*input* ke dalam ClustalX (Gambar 3.12).



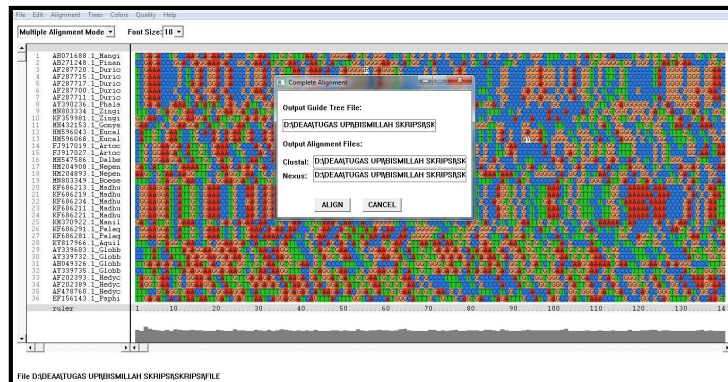
Gambar 3.12. Data sekuen DNA di-*input* pada ClustalX

Gambar 3.12 menunjukkan data sekuen DNA pada program *NotePad* yang telah di-*input* ke dalam ClustalX. Data sekuen tersebut memiliki panjang sekuen yang berbeda antara satu dan yang lainnya. Sebelum melakukan *alignment* data perlu disimpan dalam format NEXUS (Gambar 3.13).



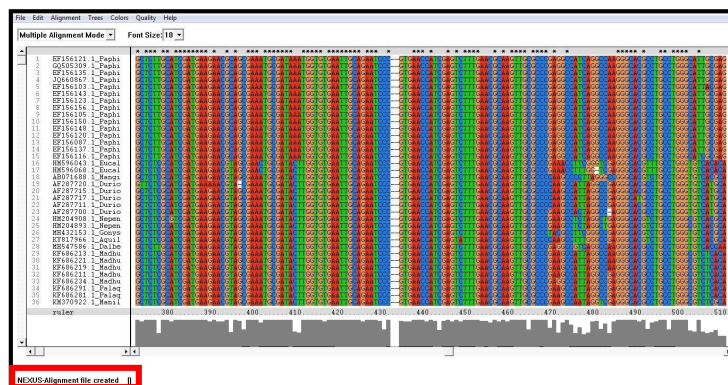
Gambar 3.13. Data disimpan dalam format NEXUS

Data disimpan dalam format NEXUS, yakni dengan cara klik bagian *Alignment* kemudian *Output Format File* dan pilih *NEXUS format* (Gambar 3.13). Selanjutnya dilakukan *alignment* seperti pada Gambar 3.14.



Gambar 3.14. *Alignment* pada perangkat lunak ClustalX

Pada Gambar 3.14, *alignment* dilakukan dengan cara klik *ALIGNMENT* kemudian pilih *Do Complete Alignment*, maka didapatkan hasil seperti pada Gambar 3.15. Terdapat perbedaan antara sekuen yang telah berhasil dilakukan *alignment* dengan yang belum dilakukan *alignment*.



Gambar 3.15. Hasil *alignment*

Gambar 3.15 menunjukkan data hasil *alignment* pada perangkat lunak ClustalX. Data yang berhasil dilakukan *alignment* akan muncul bacaan “*NEXUS-Alignment file created*” pada bagian bawah (kotak merah). Dari proses *alignment* menggunakan ClustalX ini didapatkan dua *output file* yakni *file* dengan format ‘aln’ dan ‘dnd’. Langkah selanjutnya yakni melakukan *sequence trimming* atau pemotongan, hal ini dilakukan untuk menyamakan atau menyeragamkan panjang dari setiap sekuennya. *File* dengan format ‘aln’ dibuka menggunakan *NotePad* untuk selanjutnya dilakukan proses *trimming*

dengan cara memotong sekuen bagian awal atau akhir dari sekuen DNA tersebut (Gambar 3.16 dan Gambar 3.17).

EF156121.L_Paphiopedilum_kolop	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
GU058599.L_Paphiopedilum_super	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156135.L_Paphiopedilum_roths	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
U004897.L_Paphiopedilum_louisii	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156103.L_Paphiopedilum_gigan	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156143.L_Paphiopedilum_primu	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156123.L_Paphiopedilum_liami	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156156.L_Paphiopedilum_victo	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156195.L_Paphiopedilum_glauc	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156150.L_Paphiopedilum_tonsu	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156148.L_Paphiopedilum_super	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156120.L_Paphiopedilum_ivan	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156087.L_Paphiopedilum_barba	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156137.L_Paphiopedilum_sangi	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
EF156116.L_Paphiopedilum_nooke	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
HM596843.L_Eucalyptus_deglupta	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
HM596869.L_Eucalyptus_urophyll	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AB871688.L_Mangi_fera_macrocarp	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AF287726.L_Durio_graveolens	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AF287715.L_Durio_dulcis	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AF287717.L_Durio_kutejensis	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AF287711.L_Durio_louianus	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AF287700.L_Durio_auclifolius	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
HM204908.L_Nepenthes_spectabil	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
HM204935.L_Nepenthes_boschiana	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
NH432153.L_Gonystylus_bencanus	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
KV817065.L_Aquilaria_hirta	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
HM547586.L_Dalbergia_latifolia	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
KF586213.L_Madhuca_erythrophyll	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
KF586221.L_Madhuca_lancifolia	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
KF586219.L_Madhuca_kuchingensi	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
KF586211.L_Madhuca_curtisii	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
KF586234.L_Madhuca_sarawakensis	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
KF586201.L_Palaquium_xanthochy	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
KF586281.L_Palaquium_rigidum	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
KH370922.L_Moniikera_fascicula	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
FJ917019.L_Artocarpus_tomaran	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
FJ917027.L_Artocarpus_anisophy	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AB271248.L_Pinnago_arinosae	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AV390236.L_Phalaenopsis_violac	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AV390732.L_Globba_cachensis	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AV390735.L_Globba_talangenensis	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AV390683.L_Globba_variabilis	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AB849326.L_Globba_multifolia	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AF282933.L_Hedychium_muluense	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AF478708.L_Hedychium_horsfield	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
AF202939.L_Hedychium_hasselii	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
NH803334.L_Zingiber_loerzingii	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
NH803349.L_Boesenbergia_loerzi	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
KF359981.L_Zingiber_odoriferum	GCAC	CAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCARGGGACGCGCTGCCTGG
	**	*****

Gambar 3.16. *Trimming* pada sekuen bagian awal

EF156121.L_Paphiopedilum_kolop	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
GU058599.L_Paphiopedilum_super	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156135.L_Paphiopedilum_roths	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
U004897.L_Paphiopedilum_louisii	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156103.L_Paphiopedilum_gigan	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156143.L_Paphiopedilum_primu	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156123.L_Paphiopedilum_liami	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156156.L_Paphiopedilum_victo	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156195.L_Paphiopedilum_glauc	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156150.L_Paphiopedilum_tonsu	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156148.L_Paphiopedilum_super	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156120.L_Paphiopedilum_ivan	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156087.L_Paphiopedilum_barba	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156137.L_Paphiopedilum_sangi	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
EF156116.L_Paphiopedilum_nooke	ATGC	TAATGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
HM596843.L_Eucalyptus_deglupta	CTCC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
HM596869.L_Eucalyptus_urophyll	CTCC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AB871688.L_Mangi_fera_macrocarp	CTCC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AF287726.L_Durio_graveolens	CTCC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AF287715.L_Durio_dulcis	CTCC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AF287717.L_Durio_kutejensis	CTCC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AF287711.L_Durio_louianus	CTCC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AF287700.L_Durio_auclifolius	CTCC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
HM204908.L_Nepenthes_spectabil	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
HM204935.L_Nepenthes_boschiana	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
NH432153.L_Gonystylus_bencanus	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
KV817065.L_Aquilaria_hirta	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
HM547586.L_Dalbergia_latifolia	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
KF586213.L_Madhuca_erythrophyll	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
KF586221.L_Madhuca_lancifolia	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
KF586219.L_Madhuca_kuchingensi	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
KF586211.L_Madhuca_curtisii	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
KF586234.L_Madhuca_sarawakensis	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
KF586201.L_Palaquium_xanthochy	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
KF586281.L_Palaquium_rigidum	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
KH370922.L_Moniikera_fascicula	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
FJ917019.L_Artocarpus_tomaran	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
FJ917027.L_Artocarpus_anisophy	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AB271248.L_Pinnago_arinosae	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AV390236.L_Phalaenopsis_violac	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AV390732.L_Globba_cachensis	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AV390735.L_Globba_talangenensis	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AV390683.L_Globba_variabilis	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AB849326.L_Globba_multifolia	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AF282933.L_Hedychium_muluense	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AF478708.L_Hedychium_horsfield	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
AF202939.L_Hedychium_hasselii	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
NH803334.L_Zingiber_loerzingii	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
NH803349.L_Boesenbergia_loerzi	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
KF359981.L_Zingiber_odoriferum	ATGC	TACTTGGTGTGARTTGCAGATCCC	GTAR	CCATCGAGTCTT
	*****		*****	

Gambar 3.17. *Trimming* pada sekuen bagian akhir

Tanda kotak merah pada Gambar 3.16 dan Gambar 3.17 menunjukkan daerah sekuen yang dibuang. Pada Gambar 3.16 ditunjukkan bagian awal sekuen yang dibuang, sehingga keseluruhan sekuen dimulai dengan basa DNA 'G'. Pada Gambar 3.17 juga ditunjukkan bagian akhir sekuen yang dibuang, sehingga keseluruhan sekuen diakhiri dengan basa DNA 'C'. Setelah keseluruhan sekuen seragam, maka *file* disimpan dengan format 'aln' untuk keperluan selanjutnya. *File* dengan format 'aln' ini dapat diubah menjadi format 'FASTA' dengan bantuan perangkat lunak ClustalX.

Dea Amalia, 2022

PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK UNTUK IDENTIFIKASI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA BERDASARKAN PENANDA Internal Transcribed Spacer (ITS) SECARA IN-SILICO

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

### 3.3.3 Pembuatan Sekuen Konsensus

Pembuatan sekuen konsensus dilakukan menggunakan perangkat lunak *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999). Berikut langkah-langkah untuk pembuatan sekuen konsensus menggunakan Bioedit (Gambar 3.18) :

#### **Preprocessing Data** –Pembuatan sekuen konsensus

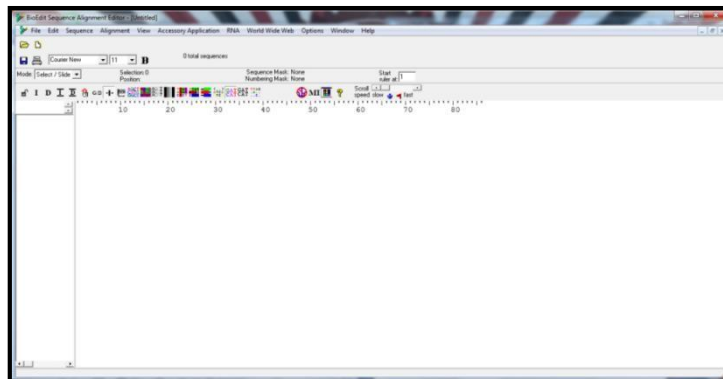
##### **mulai**

1. Aplikasi BioEdit dibuka
2. *Input* data yang akan diolah, Klik menu FILE – *Open*
3. Data sekuen tumbuhan yang akan digunakan dipilih dengan format ‘txt’ atau ‘aln’.
4. Klik *ALIGNMENT* – Pilih *Create Consensus Sequences*
5. Beri nama untuk file yang akan disimpan, Klik OK
6. Simpan data dalam FASTA format, Klik menu FILE – *Save Sequences As*, Klik FASTA format – Klik OK

##### **selesai**

Gambar 3.18. Tahapan pembuatan sekuen konsensus menggunakan perangkat lunak Bioedit.

Ilustrasi langkah-langkah pembuatan sekuen konsensus menggunakan perangkat lunak Bioedit ditunjukkan pada Gambar 3.19 hingga Gambar 3.25.



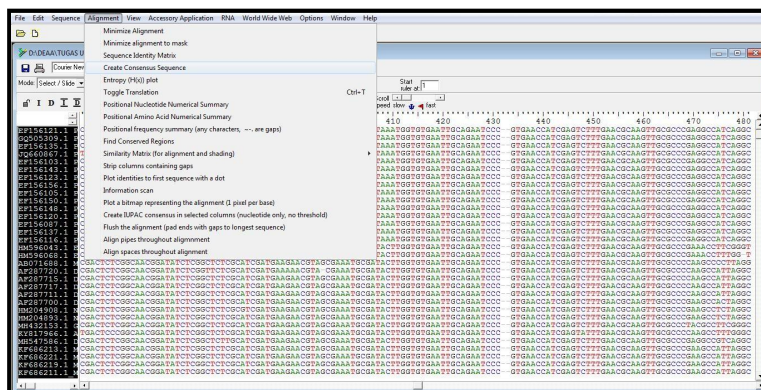
Gambar 3.19. Perangkat lunak BioEdit

Pada Gambar 3.19 ditunjukkan tampilan awal pada perangkat lunak BioEdit. Pengunduhan perangkat lunak BioEdit dapat dilakukan pada laman <https://bioedit.software.informer.com/>. Selanjutnya data sekuen DNA hasil *alignment* di-*input* ke dalam BioEdit (Gambar 3.20).



Gambar 3.20. *Input* data pada perangkat lunak BioEdit

Pada Gambar 3.20 ditunjukkan cara *input* data pada perangkat lunak BioEdit, yakni dengan klik simbol *folder* pada bagian kiri atas lalu pilih *file* yang akan di-*input*. Selanjutnya dilakukan pembuatan sekuen konsensus pada data yang telah di-*input* (Gambar 3.21).



Gambar 3.21. Pembuatan sekuen konsensus pada perangkat lunak BioEdit

Pembuatan sekuen konsensus dilakukan dengan cara klik *Alignment* pada BioEdit, kemudian pilih *Create Consensus Sequence* (Gambar 3.21). Hasil sekuen konsensus ditunjukkan pada Gambar 3.22.



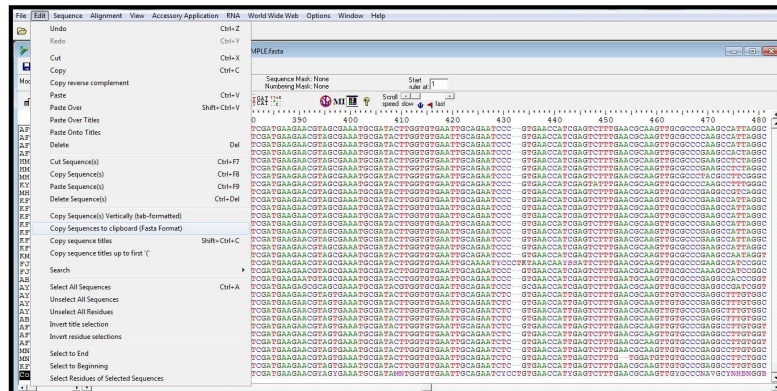
Gambar 3.22. Hasil Sekuen Konsensus

Dea Amalia, 2022

PENGEMBANGAN PRIMER DIAGNOSTIK UNTUK IDENTIFIKASI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA BERDASARKAN PENANDA *Internal Transcribed Spacer (ITS)* SECARA *IN-SILICO*

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Dari Gambar 3.22 dapat dilihat hasil sekuen konsensus pada baris terakhir yang dinamai dengan “*Consensus*”. Data disimpan dalam format FASTA pada perangkat lunak *NotePad* untuk dibuat kandidat primer (Gambar 3.23).



Gambar 3.23. Penyimpanan data sekuen konsensus pada perangkat lunak BioEdit

Penyimpanan data dilakukan dengan cara *block* bagian sekuen konsensus, kemudian pilih fitur *Edit* dilanjut dengan *Copy Sequences to clipboard (FASTA format)* pada perangkat lunak BioEdit (Gambar 3.23). Data disalin pada program *NotePad* untuk keperluan selanjutnya (Gambar 3.24).

```
>Consensus
RNHYDSVGDARGDNVRHBDDBSBRDNNNNBNHNVHVDHVRVNNVACHNRHKRAHNDTKRNNHHNNNN
HNNDDNRRNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNBBVVNYNNVNNNNNNHBNVNBVBHBRVHVSYYNNB
NNNBNNBVHNNNNVNBHNNNNVNDNBNBNNBGBNNHSHKYBYSYGVVVKCSSNNNNHNNNDNNNB
VCVGHGSAGNNHNGCRBYAAGKMVNNNNNNNNNNVNMGGAGVNNYNNVBBVYSNNBNYNNNNV
BNNVBBNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNBVGVMWYCNHNNNDNBNNNRNRHNNYNNNAWVYRATCTC
RGC AAYGGATATCTCGGCTCYGCAATCGATGAAGAACGYAGYGAAATGCGATAMNTGGTGTGAATT
GCAGAATCYCCTGTGAACCATYAGATCTTTGAACGCAAGTTGYGCCNAVGCYNHBNGBBVBAGGG
CACGYCTGCTYGGGBRTYDHVMRHNVYDVBHYSCBVNCCGAGDHHNNNNNNBNBVYBNNNNND
NNBNNNDNNGNNNNNGVNNKSKNANDNTGGCCYTCBYKYGNBNVNNNNNGVYCRGBBGGYYBAA
RNNBDDCADNNNNBNNNVHDDNNNNVNNRBRDYNDDNGKTSNBNDDNNNNVVMNNNNNDNNH
NGNNHVVNNBRBVBNNNNSBNNNNNNNNNNNRMRNBHNNBNVVHBNVNNVNRHVVNNNNB
NNNBVVNNBNNNNVNB5HRHCMHAHVVRHSNKVVRBDNNHVBVNRHTBRKKD-----
```

Gambar 3.24. Hasil FASTA pada program *NotePad*

Pada Gambar 3.24 ditunjukkan sekuen konsensus dalam format FASTA yang telah disalin pada perangkat lunak *NotePad*. Basa DNA selain ‘ATGC’ yang tertera pada sekuen konsensus kemudian diubah pada *NotePad* berdasarkan IUPAC DNA Codes (Gambar 3.25).

IUPAC nucleotide code	Base
A	Adenine
C	Cytosine
G	Guanine
T (or U)	Thymine (or Uracil)
R	A or G
Y	C or T
S	G or C
W	A or T
K	G or T
M	A or C
B	C or G or T
D	A or G or T
H	A or C or T
V	A or C or G
N	any base
or -	gap

Gambar 3.25. IUPAC DNA Codes

(Sumber: *The International Union of Pure and Applied Chemistry*)

Gambar 3.25 menunjukkan basa-basa yang digunakan untuk mengubah data selain 'ATGC' yang terdapat pada sekuen konsensus. Hasil perubahan sekuen konsensus ditunjukkan pada Gambar 3.26.

```

>Consensus
ATCTGCGGAAGGATCATTGTGCGAAACCTGCCTAGTTAGGATGACCCGCGAACTGATTAATGAAATG
CCGAGAGAACCTGGGGGATCTGGTGGCTTGGGTCACCTATGGGCATGTGCTGTTGCAGTGACCTTG
ATTTCCCGCCGAGCCCCCTCGGGAGCTGTGTTGGCGCCGCTGGCGGCCGGAATAAACAACCC
CCGGCGCAGATTTGCGCCAAGGAACATGAAACATAAACGAGGGAGCGGGCGCCCCCTCGGCCTCG
GGAGCGCGTGTGCGGGAGCCTCCGCGACTCCATATTCCTCGGAATCATAAAAAAGACTCTC
GGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAAGAACYAGCGAAATGCGATACCTGGGTGAATT
GCAGAATCCCTGTGAACCATCAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCGAGGCCATCAGGCCGAGGG
CACGCCTGCCTGGGCGTACGCATTGCATCGCCCCCCCCGAGACCTAACGCGCTGTCCATACG
GACTCTTCGGCCGGTGCGGGGCGGAGTTTGGCCCTCCCGTGTTCCTGGGGGTCGCGGTCTAA
GAGCGCAGGGGCCGGTGACGGCCCTCGACACGACAAGTGGTGGTCAAAGTATGTACACAGAGC
TGTTGTGCGACGTGCGCCGGTCTGCTGGGATGTGAAGGCCCTCAATCCTAAGACCTGTTTG
GAACGCCGCTTGGGGCCATCAAACCATGAGCCGTGGACAGCCATTTGGTT-----
-----|

```

Gambar 3.26. Hasil sekuen konsensus

Gambar 3.26 menunjukkan sekuen konsensus yang telah disesuaikan dengan IUPAC DNA Codes dan disimpan dalam program *NotePad*. Selanjutnya, dilakukan perancangan primer menggunakan fitur 'design primer' pada perangkat lunak FastPCR.

### 3.3.4 Desain Primer

Pemilihan sekuen konsensus yang berkandidat untuk dijadikan primer menggunakan perangkat lunak FastPCR (Kalender *at al.*, 2017), serta untuk mengoptimisasi perancangan primer untuk urutan DNA atau cDNA target. Hal ini dilakukan dengan tujuan agar primer yang akan dibuat memiliki efisiensi dan selektivitas yang baik. Selektivitas yang dimaksud yakni dipastikan bahwa pasangan primer tersebut tepat mengikat targetnya. Selain



itu, perangkat lunak FastPCR juga berguna untuk menentukan lokasi primer, orientasi, serta panjang dari setiap amplicon. Berikut langkah-langkah untuk mendesain primer menggunakan perangkat lunak FastPCR (Gambar 3.27) :

### ***Preprocessing Data*** – Desain Primer

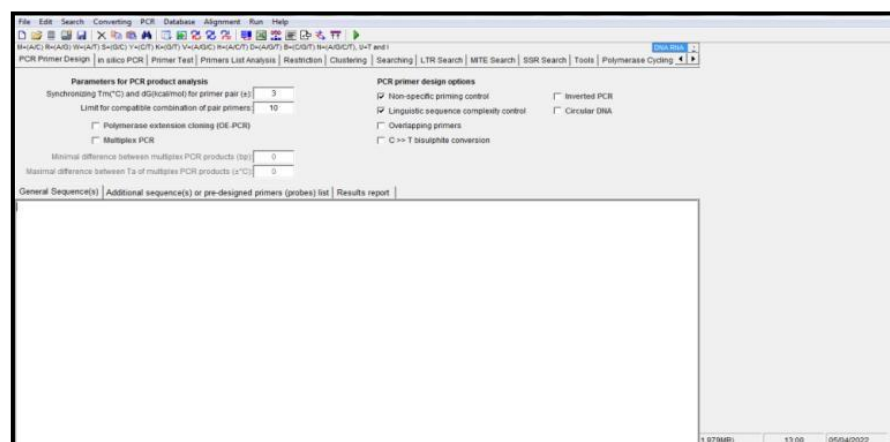
#### **mulai**

1. Aplikasi FastPCR dibuka
2. *Input* data yang akan diolah, Klik menu FILE – *Open*
3. Data hasil konsensus dipilih – Klik *Open*
4. Primer dibuat, Klik *PCR PrimerDesign* – Klik *RUN*
5. Data disimpan, Klik menu FILE – *Save As* dengan format ‘txt’. – Klik OK.

#### **selesai**

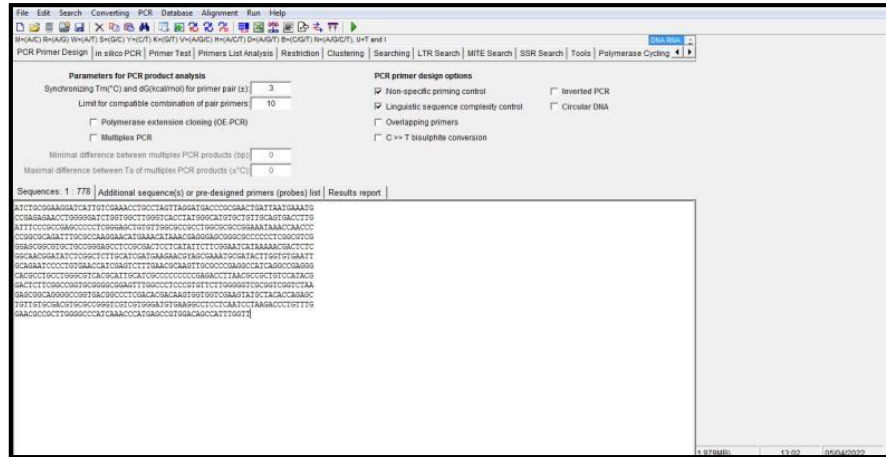
Gambar 3.27. Langkah-langkah mendesain primer menggunakan perangkat lunak FastPCR.

Ilustrasi langkah-langkah mendesain primer dengan FastPCR ditunjukkan pada Gambar 3.28 hingga Gambar 3.30.



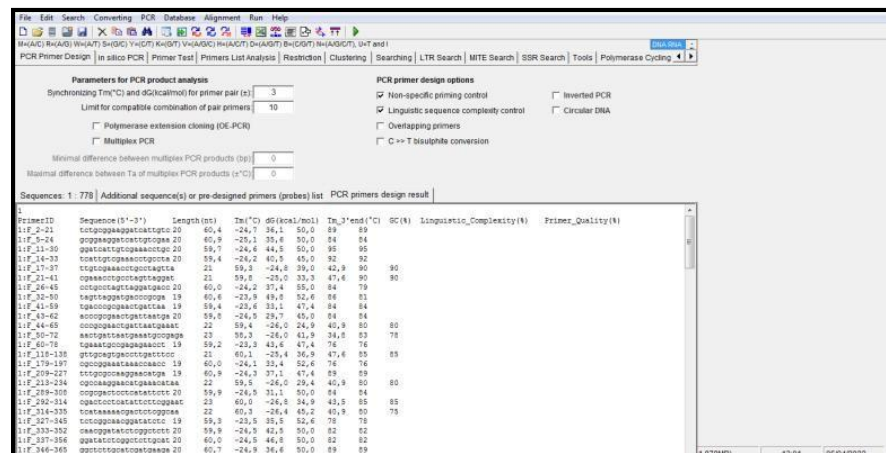
Gambar 3.28. Perangkat lunak FastPCR

Pada Gambar 3.28 ditunjukkan tampilan awal pada perangkat lunak FastPCR. Pengunduhan perangkat lunak FastPCR dapat dilakukan pada laman <https://primerdigital.com/fastpcr.html>. Data sekuen konsensus yang terdapat pada *NotePad* di-*input* ke dalam FastPCR (Gambar 3.29).



Gambar 3.29. Sekuen konsensus di-input pada FastPCR

Pada Gambar 3.29 dilakukan desain kandidat primer melalui fitur ‘PCR Primer Design’ pada FastPCR, kemudian sekuen konsensus di-input pada bagian ‘General Sequences’ dalam format FASTA. Data diolah dengan cara klik ‘RUN’ dan didapatkan hasil kandidat-kandidat primer dari konsensus seperti pada Gambar 3.30.



Gambar 3.30. Hasil desain primer

Dari Gambar 3.30 ditunjukkan hasil kandidat-kandidat primer pada FastPCR yang diperoleh dari sekuen konsensus. Kandidat-kandidat primer disimpan pada program *Microsoft Excel* untuk selanjutnya dilakukan uji *in-silico* PCR.

### 3.3.5 Uji Coba *In-Silico* PCR

Pengoptimalan primer yang telah didesain dilakukan menggunakan perangkat lunak *in-silico* PCR. Mekanisme kerja perangkat lunak ini mengacu pada alat komputasi yang biasa digunakan untuk menghitung hasil

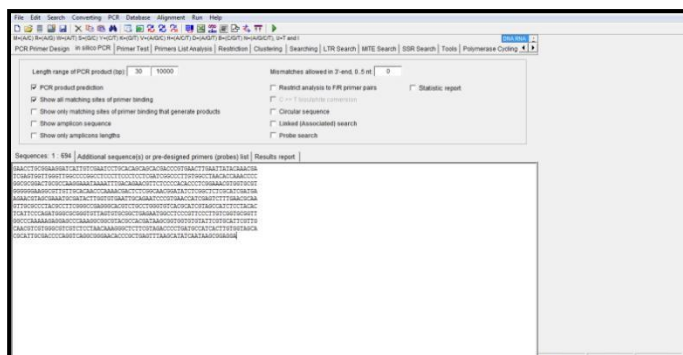
reaksi berantai polimerase (PCR). Beberapa hal yang bisa didapatkan dari proses ini meliputi penentuan lokasi primer, orientasi, serta panjang dari setiap amplicon. Kalendar *et al.* (2011) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa DNA *template* diampifikasi melalui siklus berulang, meliputi: 1) denaturasi (perombakan DNA *template* untai ganda menjadi DNA tunggal); 2) proses *annealing* (primer pada DNA *template*); dan 3) reaksi ekstensi (pemanjangan primer menggunakan bantuan DNA polimerase). Tahap pembuatan sekuen dan uji coba primer dengan *in-silico* PCR dilakukan menggunakan perangkat lunak FastPCR.

Langkah-langkah untuk uji coba primer dengan *in-silico* PCR menggunakan perangkat lunak FastPCR, yakni (Gambar 3.31) :

<b><i>Preprocessing Data – In silico</i> PCR</b>
<p><b>mulai</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aplikasi FastPCR dibuka</li> <li>2. Pilih <i>in-silico</i> PCR</li> <li>3. Data hasil desain primer dibuka, kemudian salah satu kandidat primer dipilih untuk diuji coba – <i>Copy File</i></li> <li>4. File disalin atau <i>Paste</i> pada laman ‘<i>Additional Sequences</i>’</li> <li>5. Salah satu sekuen DNA dipilih, kemudian <i>Copy File – Paste</i> pada laman ‘<i>General Sequence</i>’.</li> <li>6. Klik RUN – Buka laman ‘<i>PCR Result</i>’ untuk melihat hasil.</li> </ol> <p><b>selesai</b></p>

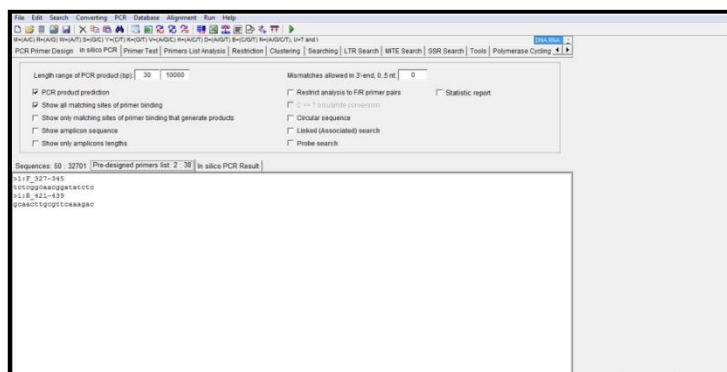
Gambar 3.31. Langkah-langkah uji coba *in-silico* PCR menggunakan FastPCR.

Ilustrasi langkah-langkah uji coba *in-silico* PCR dengan perangkat lunak FastPCR ditunjukkan pada Gambar 3.32 hingga Gambar 3.35.



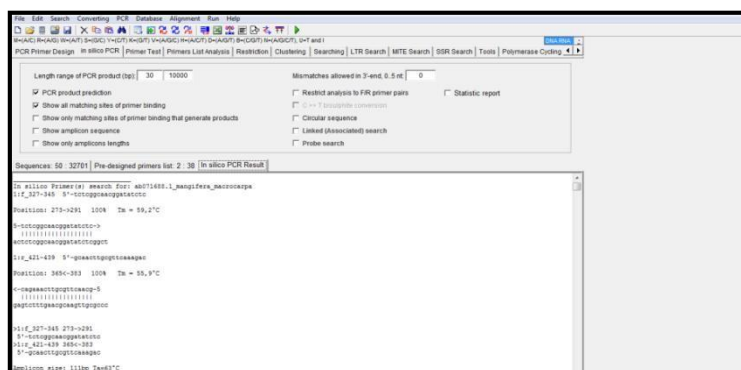
Gambar 3.32. FASTA tumbuhan di-input pada FastPCR

Uji coba *in-silico* PCR dilakukan melalui fitur '*in-silico* PCR' pada perangkat lunak FastPCR. Sekuen tumbuhan yang dikehendaki di-input pada bagian '*General Sequences*' (Gambar 3.32), sedangkan pasangan kandidat primer di-input pada bagian '*Additional Sequences*' (Gambar 3.33).



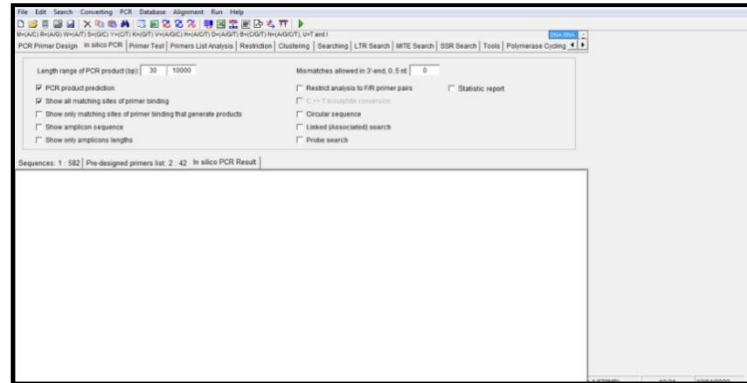
Gambar 3.33. Pasangan kandidat primer di-input pada FastPCR

Pada Gambar 3.33, pasangan kandidat primer yang di-input ke dalam FastPCR dituliskan menggunakan simbol 'lebih dari' atau '>' agar terbaca oleh program FastPCR. Pengolahan data dilakukan dengan cara klik '*RUN*'. Hasil amplifikasi dapat dilihat pada bagian '*In-silico PCR Result*' (Gambar 3.34 dan Gambar 3.35).



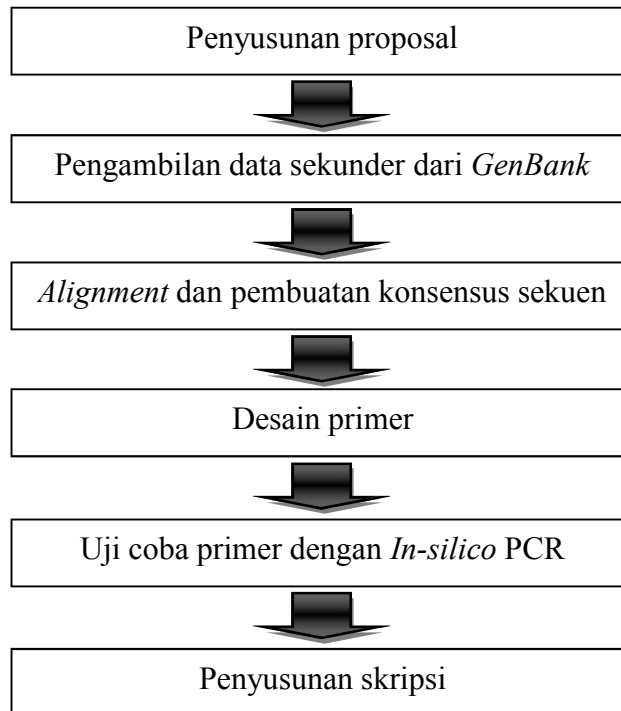
Gambar 3.34. Hasil positif *in-silico* PCR

Gambar 3.34 menunjukkan hasil positif, yakni tumbuhan berhasil teramplifikasi yang ditandai dengan keluarnya amplicon dari tumbuhan tersebut. Hasil negatif atau tumbuhan yang tidak berhasil teramplifikasi ditunjukkan dengan tidak keluarnya amplicon (Gambar 3.35).



Gambar 3.35. Hasil negatif *in-silico* PCR

### 3.4 Alur Penelitian



Gambar 3.36. Alur penelitian