

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam kategori penelitian deskriptif karena untuk mengetahui keberadaan variabel dalam fenomena yang diselidiki, seperti pengembangan diagnostik primer secara *in silico* untuk mendeteksi kelangkaan jenis tumbuhan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memberikan gambaran atau deskripsi tentang fakta dan hubungan fenomena tersebut (Sugiyono, 2005). Daftar jenis tumbuhan langka yang dikumpulkan dari GenBank digunakan sebagai data sekunder untuk penelitian ini. Selanjutnya, proses *alignment*, pembuatan *consensus* sekuen, dan identifikasi tumbuhan langka dilakukan dengan menggunakan penanda trnL-F.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2024 hingga April 2025 dan dilakukan di Laboratorium Riset Departemen Pendidikan Biologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FPMIPA), Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudi No.299, Bandung.

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3.1

Tabel 3.1 Alat yang digunakan dalam penelitian

No	Alat	Spesifikasi	Kegunaan
1.	Laptop	ASUS X441M, Intel(R) Celeron(R) N4000 CPU	Perangkat untuk mengolah dan menganalisis data
2.	Jaringan Internet	-	Sebagai akses internet.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdapat pada Tabel 3.2

Tabel 3.2 Bahan yang digunakan dalam penelitian

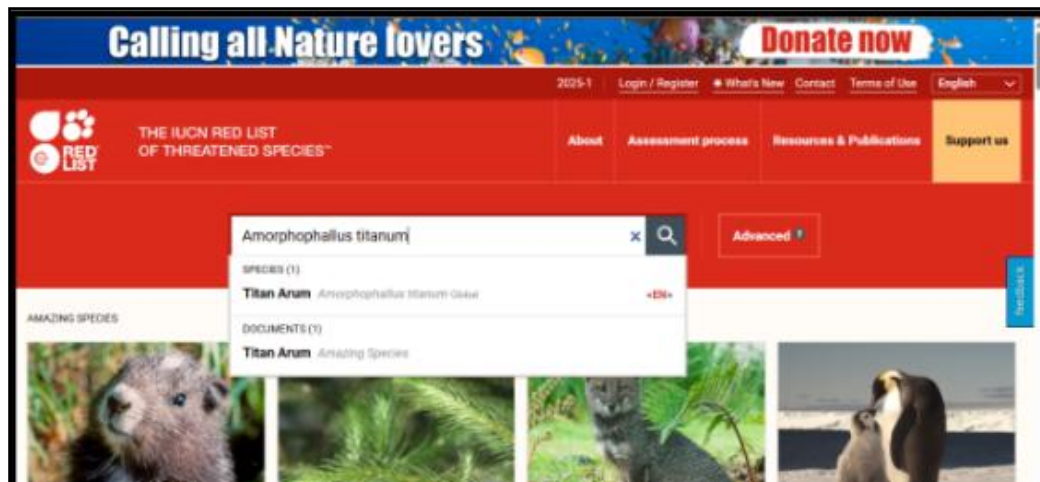
No	Bahan	Kegunaan
1.	Sekuen DNA dari 30 <i>sample</i> tumbuhan langka pada NCBI (Tabel 3.3) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)	<i>sample</i> yang digunakan untuk penelitian
2.	IUCN Red List (https://www.iucnredlist.org/search)	Mencari status kelangkaan tumbuhan.
3.	Program <i>Microsoft Excel</i>	Membuat tabel data sekuen DNA tumbuhan langka dan hasil analisis.
4.	Program NotePad	Membuat FASTA format.
5.	Program <i>ClustalX 2.1</i>	Menjajarkan (<i>alignment</i>) sekuen DNA.
6.	Program <i>BioEdit</i>	Membuat <i>consensus</i> sekuen DNA.
7.	Program <i>FastPCR 6.8</i>	Mendesain primer, menguji coba kandidat primer tumbuhan langka, dan <i>in silico</i> PCR

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari sekuen DNA sekunder tumbuhan langka berdasarkan penanda *trnL-F* yang ditemukan di <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, serta artikel penelitian yang digunakan sebagai sumber. Pencarian artikel penelitian terkait dilakukan melalui GoogleScholar dengan kata kunci “*DNA Barcoding*”, “*Rare Plants DNA Sequences*”, “*trnL-F Intergenic Spacer*”, dan beberapa kata kunci lain yang sesuai.

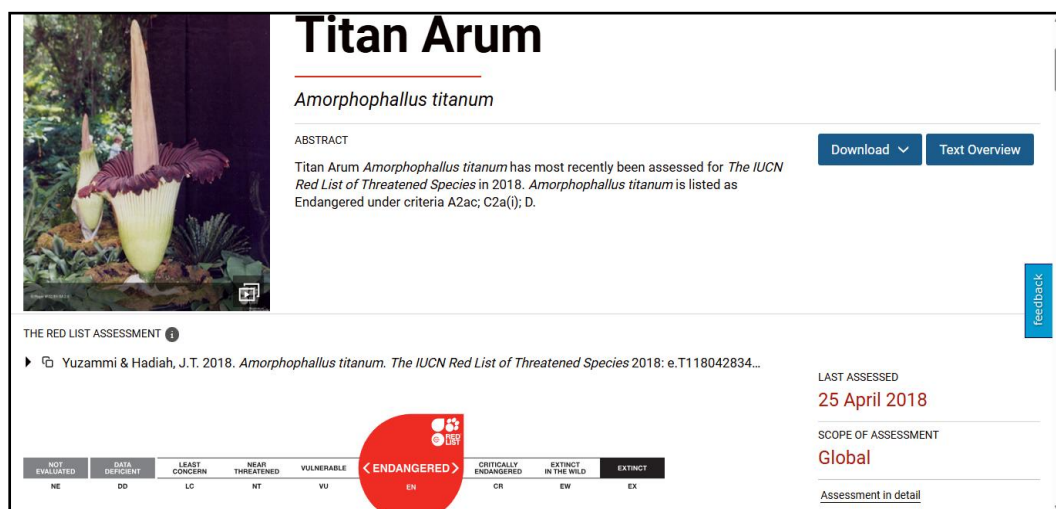
Data tumbuhan yang digunakan juga mengacu pada standar kelangkaan *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) dengan kategori yang digunakan yakni (CR; kritis), (EN; genting), dan (VU; rentan). Berikut cara memperoleh data tumbuhan pada *IUCN_Redlist* :



Gambar 3.1 Laman IUCN

(Sumber : *International Union for Conservation of Nature*)

Website *International Union for Conservation of Nature* dapat dibuka dengan menuliskan 'IUCN' di bagian kotak search/pencarian pada *Google* atau bisa diakses pada laman <https://www.iucnredlist.org/>. Kemudian ketik nama spesies yang akan dicari pada kotak pencarian (Gambar 3.1).



Gambar 3.2 Informasi data *Amorphophallus titanum* pada laman IUCN

(Sumber : *International Union for Conservation of Nature*)

Gambar 3.2. menunjukkan hasil pencarian dari *Amorphophallus titanum*. Dari contoh informasi data tersebut dapat dilihat pada bagian 'The Red List Assessment' bahwa spesies tersebut termasuk ke dalam kategori *Endangered* (EN) dengan tanggal *assessment* pada bagian 'Last Assessed' yakni 25 April 2018. Pada

‘*Scope Of Assessment*’ tertera Global yang artinya spesies ini masuk ke dalam kategori EN secara global.

Tabel 3.3 menunjukkan kumpulan data sekunder tumbuhan langka berdasarkan penanda trnL-F. Penanda trnL-F, yang merupakan bagian dari DNA kloroplas, sering digunakan dalam studi taksonomi karena tingkat konservasinya yang tinggi serta kemampuannya dalam membedakan spesies yang memiliki kekerabatan dekat. Informasi seperti jumlah pasangan basa memberikan gambaran mengenai panjang fragmen DNA yang dianalisis, sedangkan status IUCN mengindikasikan tingkat keterancaman spesies tersebut. Dengan mengetahui daerah sebaran, peneliti dapat mengaitkan data genetik dengan kondisi geografis dan ekologis spesies, yang sangat penting untuk strategi konservasi ke depan.

Tabel 3.3 Data sekunder sekuen DNA tumbuhan langka berdasarkan penanda trnL-F

No.	Suku/Familia	Nama Spesies	Nomor Akses	Jumlah Pasang Basa	Status IUCN	Daerah Sebaran
1.	Altingiaceae	<i>Altingia excelsa</i>	DQ352226.1	967 bp	VU	Sumatera dan Jawa
2.	Araceae	<i>Amorphophallus titanum</i>	AY555180.1	962 bp	EN	Bengkulu, Sumatera Barat
3.	Burseraceae	<i>Canarium zeylanicum</i>	FJ466479.1	1031 bp	VU	Sri Lanka
4.	Dipterocarpaceae	<i>Hopea beccariana</i>	KY979256.1	971 bp	VU	Kalimantan
5.	Ebenaceae	<i>Diospyros celebica</i>	DQ924221.1	904 bp	VU	Sulawesi Tengah dan Selatan
6.		<i>Diospyros maritima</i>	DQ924254.1	926 bp	CR	Sumatera, dan Sulawesi
7.	Eriocaulaceae	<i>Eriocaulon sharmae</i>	MK879920.1	893 bp	CR	India
8.	Fabaceae (Leguminosae)	<i>Archidendron pauciflorum</i>	ON054976.1	872 bp	VU	Sumatera, dan Jawa
9.	Lauraceae	<i>Beilschmiedia anay</i>	GU250781.1	889 bp	EN	Amerika Tengah dan Meksiko

No.	Suku/Familia	Nama Spesies	Nomor Akses	Jumlah Pasang Basa	Status IUCN	Daerah Sebaran
10.		<i>Persea chamissonis</i>	GU250761.1	910 bp	EN	Amerika Tengah dan Selatan
11.		<i>Persea cinerascens</i>	GU250759.1	910 bp	EN	Amerika Tengah dan Selatan
12.		<i>Persea floccosa</i>	GU250780.1	948 bp	VU	Amerika Tengah dan Selatan
13.		<i>Persea longipes</i>	GU250760.1	910 bp	EN	Amerika Tengah dan Selatan
14.		<i>Persea schiedeana</i>	GU250777.1	915 bp	EN	Amerika Tengah dan Selatan
15.	Moraceae	<i>Artocarpus anisophyllus</i>	FJ917091.1	983 bp	VU	Sumatera dan Kalimantan
16.		<i>Artocarpus tamaran</i>	KU855464.1	965 bp	VU	Kalimantan
17.	Myrtaceae	<i>Syzygium spathulatum</i>	MG836254.1	828 bp	EN	Sumatera dan Kalimantan
18.	Nymphaeaceae	<i>Nymphaea lotus</i> var <i>stuhlmanni</i>	MW809883.1	1430 bp	EN	Afrika
19.		<i>Nymphaea nouchali</i> var. <i>caerulea</i>	MW809876.1	1372 bp	EN	Afrika
20.		<i>Nymphaea zenkeri</i>	MW809789.1	1425 bp	CR	Afrika
21.	Orchidaceae	<i>Anoectochilus zhejiangensis</i>	MT872540.1	998 bp	EN	China
22.	Psilotaceae	<i>Pleione formosana</i>	MT212392.1	894 bp	VU	Taiwan dan China
23.		<i>Psilotum nudum</i>	AY327836.1	828 bp	CR	Kalimantan, dan Papua
24.	Santalaceae	<i>Santalum album</i>	MG999497.1	782 bp	VU	Nusa Tenggara Timur (terutama di Pulau Timor dan Sumba)
25.	Taxaceae	<i>Taxus wallichiana</i>	MH267586.1	852 bp	EN	Afghanistan

No.	Suku/Familia	Nama Spesies	Nomor Akses	Jumlah Pasang Basa	Status IUCN	Daerah Sebaran
26.	Thymelaeaceae	<i>Aquilaria beccariana</i>	AY216741.1	536 bp	VU	Sumatera dan Kalimantan
27.		<i>Aquilaria hirta</i>	KY927233.1	498 bp	VU	Sumatera dan Kalimantan
28.		<i>Aquilaria malaccensis</i>	AY216746.1	563 bp	CR	Sumatera dan Kalimantan
29.		<i>Aquilaria microcarpa</i>	KU244042.1	498 bp	EN	Sumatera dan Kalimantan
30.		<i>Gonystylus bancanus</i>	AY216759.1	538 bp	CR	Sumatera, Kalimantan, dan sebagian Papua

Keterangan: Kritis (*critically endangered*/CR), Genting (*endangered*/EN), Rawan (*vulnerable*/VU)

Tabel 3.4 menunjukkan kumpulan data tumbuhan langka berdasarkan penanda trnL-F, untuk keperluan proses pengujian *in silico* yang mengandung data spesies, nomor akses, jumlah pasang basa, status IUCN, dan daerah sebaran. Nomor akses dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies tumbuh yang berbeda.

Tabel 3.4 Data sekuen DNA tumbuhan langka berdasarkan penanda trnL-F untuk uji *in silico*

No	Suku/Familia	Nama Spesies	No. Akses trnL-F	Jumlah Pasang Basa (bp)	Status IUCN	Daerah Sebaran
1.	<i>Heliconiaceae</i>	<i>Heliconia stricta</i>	FJ621299.1	922 bp	VU	Amerika Selatan
2.	<i>Araceae</i>	<i>Alocasia sanderiana</i>	JQ238778.1	407 bp	CR	Filipina
3.	<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>Dipterocarpus alatus</i>	MN641721.1	437 bp	VU	Sumatra selatan
4.		<i>Dipterocarpus bourdillonii</i>	MN641719.1	435 bp	CR	India
5.		<i>Dipterocarpus gracilis</i>	MN641725.1	433 bp	VU	Sumatra dan Kalimantan
6.		<i>Dipterocarpus turbinatus</i>	MK051055.1	427 bp	VU	Myanmar dan Thailand

No	Suku/Familia	Nama Species	No. Akses trnL-F	Jumlah Pasang Basa (bp)	Status IUCN	Daerah Sebaran
7.		<i>Dipterocarpus kerrii</i>	MN641723.1	436 bp	EN	Thailand dan Filipina
8.		<i>Hopea nervosa</i>	EF659995.1	464 bp	VU	Sumatra dan Kalimantan
9.		<i>Hopea sangal</i>	EF660003.1	464 bp	VU	India
10.		<i>Hopea nutans</i>	EF659997.1	463 bp	VU	Sumatra dan Kalimantan
11.		<i>Shorea faguetiana</i>	AB452234.1	436 bp	EN	Sumatra dan Kalimantan
12.		<i>Shorea guiso</i>	AB452249.1	437 bp	VU	Sumatra dan Kalimantan

Keterangan: Kritis (*critically endangered*/CR), Genting (*endangered*/EN), Rawan (*vulnerable*/VU)

Tabel 3.5 menyajikan data tumbuhan langka yang telah dianalisis menggunakan penanda trnL-F melalui uji *in silico* PCR, yang merupakan metode simulasi amplifikasi DNA secara komputerisasi. Data yang disajikan meliputi nama spesies tumbuhan, nomor akses sekuens DNA dari database GenBank sebagai identifikasi resmi, jumlah pasangan basa (*base pairs*) dari fragmen trnL-F yang berhasil diamplifikasi, status konservasi spesies menurut kriteria IUCN, serta wilayah penyebaran geografis masing-masing spesies. Pemilihan penanda trnL-F didasarkan pada karakteristiknya yang sangat informatif, yaitu memiliki tingkat variasi genetik yang cukup tinggi sehingga mampu membedakan antarspesies dengan akurasi yang baik, serta kemudahan dalam amplifikasi PCR karena ukuran fragmen yang relatif pendek dan primer universal yang efektif. Informasi ini sangat penting untuk memvalidasi spesifisitas primer yang digunakan dalam amplifikasi, memastikan bahwa primer hanya menargetkan sekuens DNA spesifik dari tumbuhan langka yang diteliti (Triesita *et al.*, 2018). Selain itu, data ini juga berperan dalam menentukan prioritas konservasi dengan mengacu pada tingkat ancaman yang dihadapi spesies dan sebaran geografisnya, sehingga upaya pelestarian dapat dilakukan secara lebih terarah dan efektif (Anwar, 2024). Dengan

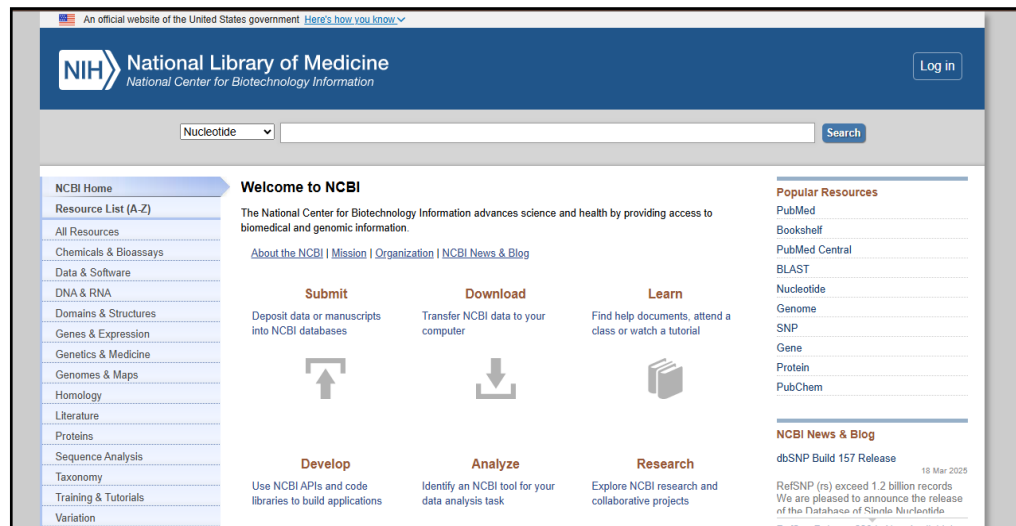
demikian, penggunaan penanda trnL-F yang didukung oleh analisis in silico memberikan kontribusi signifikan dalam mendukung strategi konservasi tumbuhan langka melalui pendekatan molekuler yang cepat dan akurat.

Tabel 3.5 Data sekuen DNA tumbuhan tidak langka berdasarkan penanda trnL-F untuk uji efektivitas

No	Suku/Familia	Nama Species	No. Akses trnL-F	Jumlah Pasang Basa (bp)	Status IUCN	Daerah Sebaran
1.	<i>Acanthaceae</i>	<i>Raphanus raphanistrum</i>	GQ268043.1	954 bp	LC	Afrika Utara
2.	<i>Encalyptaceae</i>	<i>Encalypta vulgaris</i>	EU128000.1	854 bp	LC	Amerika Utara
3.		<i>Archidendron microcarpum</i>	ON054981.1	873 bp	LC	Asia Tenggara dan Australia utara
4.	<i>Gymnomitriaceae</i>	<i>Marsupella sphacelata</i>	OQ507759.1	958 bp	LC	Australia utara
5.		<i>Marsupella sprucei</i>	OQ507738.1	959 bp	LC	Australia utara
6.	<i>Melastomataceae</i>	<i>Melastoma dodecandrum</i>	KJ612005.1	825 bp	LC	Tiongkok selatan
7.	<i>Poaceae</i>	<i>Phleum pratense</i>	EU639580.1	831 bp	LC	Eurasia
8.		<i>Phalaris arundinacea</i>	EU639579.1	839 bp	LC	Amerika Utara
9.		<i>Beckmannia syzigachne</i>	EU639570.1	827 bp	LC	Amerika Utara
10.		<i>Psathyrostachys juncea</i>	KP210982	941 bp	LC	Rusia dan Mongolia
11.		<i>Phaulopsis imbricata</i>	KC420617.1	857 bp	LC	Afrika selatan
12.	<i>Polytrichaceae</i>	<i>Polytrichum piliferum</i>	EU128012.1	820 bp	LC	Amerika Utara

Keterangan: Resiko rendah (*least concern*/LC)

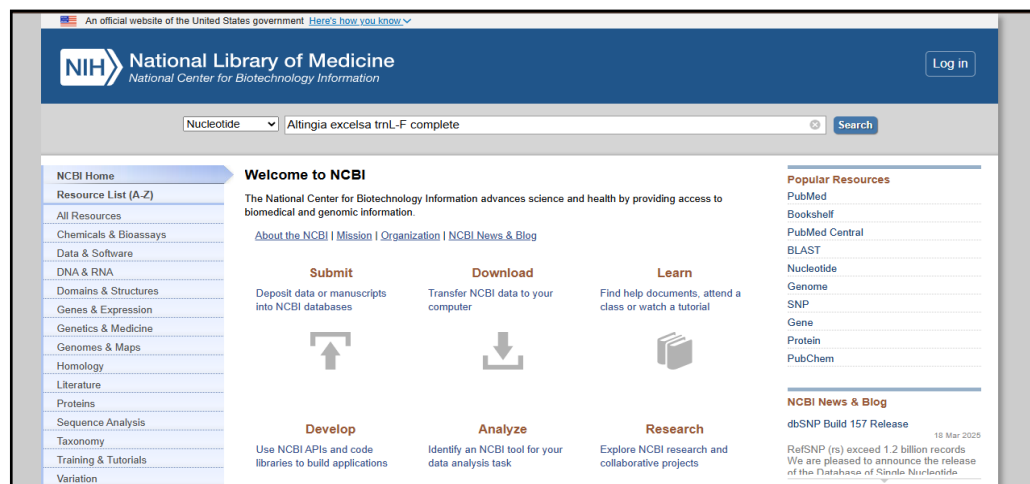
Berikut merupakan langkah-langkah memperoleh sekuen DNA pada GenBank:



Gambar 3.3 Laman NCBI

(Sumber : *National Center of Biotechnology Information*)

Website *National Center of Biotechnology Information* dapat dibuka dengan menuliskan ‘NCBI’ di bagian kotak search/pencarian pada *Google* atau bisa diakses pada laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Gambar 3.3).



Gambar 3.4 Tipe sekuen diubah menjadi “*Nucleotide*”, kemudian nama spesies dan penandanya dimasukkan.

(Sumber : *National Center of Biotechnology Information*)

Pencarian sekuen DNA dilakukan dengan mengetikkan nama spesies serta penandanya, contoh “*Altingia excelsa trnL-F*” dapat dilihat pada Gambar 3.4.

Altingia excelsa voucher E. A. Widjaja. s.n. tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergenic spacer, complete sequence

GenBank: DQ352226.1
[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)

Go to: [▼](#)

LOCUS DQ352226 967 bp DNA linear PLN 01-MAY-2006
 DEFINITION Altingia excelsa voucher E. A. Widjaja. s.n. tRNA-Leu (trnL) gene, partial sequence; trnL-trnF intergenic spacer, complete sequence

ACCESSION DQ352226
 VERSION DQ352226.1
 KEYWORDS .

SOURCE chloroplast Liquidambar excelsa
 ORGANISM Liquidambar excelsa
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; eudicotyledons; Gunneridae; Pentapetales; Saxifragales; Altingiaceae; Liquidambar.

REFERENCE 1 (bases 1 to 967)
 AUTHORS Ickert-Bond,S.M. and Wen,J.
 TITLE Phylogeny and biogeography of Altingiaceae: Evidence from combined analysis of five non-coding chloroplast regions
 JOURNAL Mol. Phylogenet. Evol. 39 (2), 512-528 (2006)
 PUBMED 16439163

REFERENCE 2 (bases 1 to 967)
 AUTHORS Ickert-Bond,S.M. and Wen,J.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (31-DEC-2005) Botany, The Field Museum of Natural History, 1400 S. Lake Shore Dr., Chicago, IL 60605-2496, USA

FEATURES
 source
 1..967
 /organism="Liquidambar excelsa"
 /organelle="plastid:chloroplast"
 /mol_type="genomic DNA"
 /specimen_voucher="E. A. Widjaja. s.n."
 /db_xref="taxon:64109"
 /note="authority: Altingia excelsa Noronha"

misc_feature
 <1..>967
 /note="contains tRNA-Leu (trnL), trnL-trnF intergenic spacer, and tRNA-Phe (trnF)"

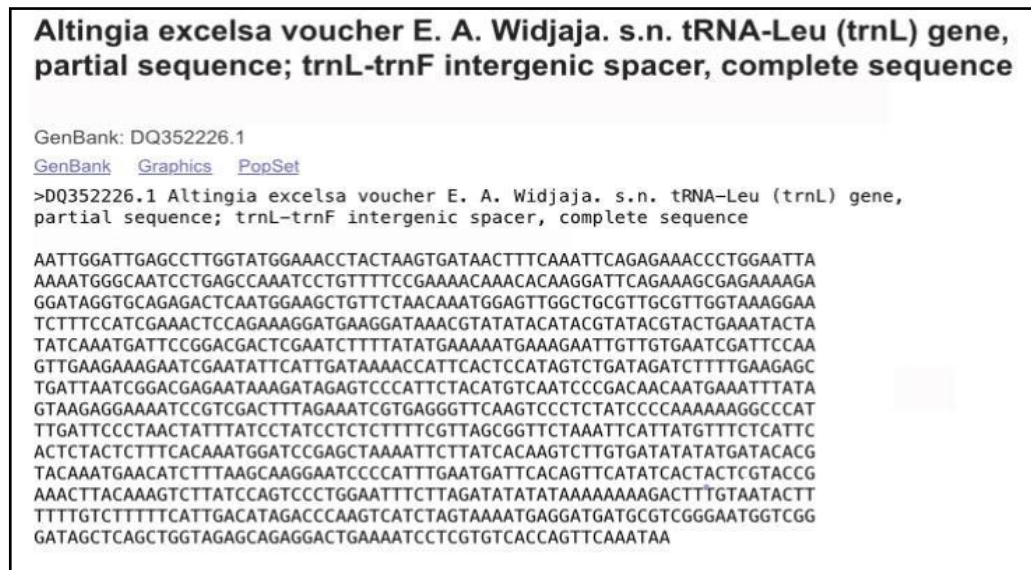
ORIGIN
 1 aattggattg agccttggtg tggaaacctg ctaagtata actttcaaat tcagagaaac
 61 cctggaatta aaaatgggca atcctgagcc aaatcctgtt ttccgaaaac aaacacaagg
 121 attcagaaga cgagaaaaga ggatagggtc agagactcaa tggagctgt tctaacaagt
 181 ggagttggct gcgttgctgt ggtaaggaa tctttccatc gaaactccag aaaggatgaa
 241 ggataaacgt atatacatc gtatacgtac tgaataacta tatcaaatga ttccggagca
 301 ctggaatctt ttatatgaaa aatgaaagaa ttgttgtgaa tcgattccaa gttgaagaaa
 361 gaatcgaata ttcatgtata aaacatttca ctccatagtc tgatagatct ttggaagagc
 421 tgattaatcg gacgagaata aagatagagt cccattctac atgtcaatcc cgacaacaat
 481 gaaatttata gtaagaggaa aatcgtgca ctttagaaat cgtgagggtt caagtccttc
 541 tatccccaaa aaagcccat ttgattccct aactatttat cctatcctct cttttcgta
 601 gcggttctaa attcattatg ttctctatc actctactct ttcacaaatg gatcgaagct
 661 aaaaattctta tcacaagtct tgtgatata atgatacagc tacaaatgaa catcttaagt
 721 caaggaatcc ccatttgaat gattcacagt tcatacact actcgtaccg aaactttcaa
 781 agtcttatcc agtccctgga atttcttaga tatataataa aaaaagactt tgtaatactt
 841 tttgtctttt ttcatgtaca tagaccacag tcatttagta aaatgaggat gatgcgtcgg
 901 gaatggctcg gatagctcag ctggtagagc agaggactga aaatcctcgt gtcaccagtt
 961 caaataa

//

Gambar 3.5 Informasi data *Amorphophallus titanum* menggunakan penanda trnL-F.

(Sumber : *National Center of Biotechnology Information*)

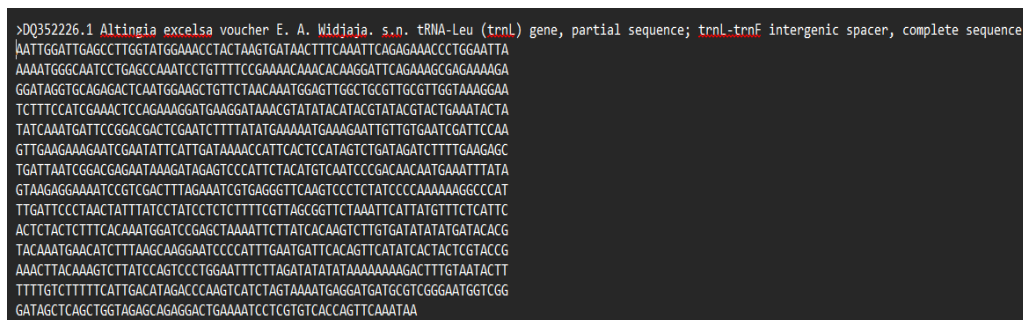
Untuk mendapatkan sekuen DNA tanpa informasi lain, maka klik “FASTA” pada bagian atas sisi kiri seperti yang terdapat pada Gambar 3.5. Setelah itu, akan muncul informasi sekuen dari salah satu spesies tumbuhan langka beserta nomor aksesinya seperti pada Gambar 3.6.



Gambar 3.6 Contoh data sekuen salah satu tumbuhan langka berdasarkan penanda trnL-F

(Sumber: *National Center for Biotechnology Information*)

Dari Gambar 3.6 diperoleh informasi sekuen yang dibutuhkan, selanjutnya data disalin dan ditempel pada perangkat lunak NotePad.



Gambar 3.7 Data pada perangkat lunak NotePad

Langkah selanjutnya adalah mengubah nama data untuk menjadi lebih mudah dibaca. Untuk mengubah nama, informasi selain nama spesies, nomor, dan tanda ">" dihapus, dan tanda "_" digunakan untuk mengganti spasi atau jarak pada nama. Agar nama dapat dibaca, tanda ">" harus tetap digunakan di awal nama (Gambar 3.8)

```
>DQ352226.1_Altingia_excelsa
AATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTA
AAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTTCCGAAAAACAACACAAGGATTCAGAAAGCGAGAAAAAGA
GGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTTGGCTGCGTTGCGTTGGTAAAGGAA
TCTTTCCATCGAAACTCCAGAAAGGATGAAGGATAAACGTATATACATACGTATACGTACTGAAATACTA
TATCAAATGATTCCGGACGACTCGAATCTTTTATATGAAAAATGAAAGAATTGTTGTGAATCGATTCCAA
GTTGAAGAAAGAATCGAATATTCATTGATAAAACCATTCACTCCATAGTCTGATAGATCTTTTGAAGAGC
TGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTCTACATGTCAATCCCGACAACAATGAAATTTATA
GTAAGAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAAGGCCCAT
TTGATTCCCTAACTATTTATCCTATCCTCTCTTTTCGTTAGCGGTTCTAAATTCATTATGTTTCTCATTC
ACTCTACTCTTTACAAAATGGATCCGAGCTAAAATTCCTATCACAAGTCTTGTGATATATATGATACACG
TACAAATGAACATCTTTAAGCAAGGAATCCCCATTGTAATGATTACAGTTCATATCACTACTCGTACCG
AAACTTACAAAGTCTTATCCAGTCCCTGGAATTTCTAGATATATATAAAAAAAGACTTTGTAATACTT
TTTTGTCTTTTTCATTGACATAGACCAAGTCATCTAGTAAAATGAGGATGATGCGTCGGGAATGGTCGG
GATAGCTCAGCTGGTAGAGCAGAGGACTGAAAATCCTCGTGTCACCAGTTCAAATAA
```

Gambar 3.8 Format penamaan

Untuk mendapatkan data sekuen DNA dari seluruh tumbuhan yang dibutuhkan, ikuti langkah-langkah di atas. Selanjutnya, data yang ditemukan disimpan dalam *file* yang sama, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.9.

```
>DQ352226.1_Altingia_excelsa
AATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACTAAGTGATAACTTTCAAATTCAGAGAAACCTGGAATTA
AAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTTCCGAAAAACAACACAAGGATTCAGAAAGCGAGAAAAAGA
GGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTTGGCTGCGTTGCGTTGGTAAAGGAA
TCTTTCCATCGAAACTCCAGAAAGGATGAAGGATAAACGTATATACATACGTATACGTACTGAAATACTA
TATCAAATGATTCCGGACGACTCGAATCTTTTATATGAAAAATGAAAGAATTGTTGTGAATCGATTCCAA
GTTGAAGAAAGAATCGAATATTCATTGATAAAACCATTCACTCCATAGTCTGATAGATCTTTTGAAGAGC
TGATTAATCGGACGAGAATAAAGATAGAGTCCCATTCTACATGTCAATCCCGACAACAATGAAATTTATA
GTAAGAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAAGGCCCAT
TTGATTCCCTAACTATTTATCCTATCCTCTCTTTTCGTTAGCGGTTCTAAATTCATTATGTTTCTCATTC
ACTCTACTCTTTACAAAATGGATCCGAGCTAAAATTCCTATCACAAGTCTTGTGATATATATGATACACG
TACAAATGAACATCTTTAAGCAAGGAATCCCCATTGTAATGATTACAGTTCATATCACTACTCGTACCG
AAACTTACAAAGTCTTATCCAGTCCCTGGAATTTCTAGATATATATAAAAAAAGACTTTGTAATACTT
TTTTGTCTTTTTCATTGACATAGACCAAGTCATCTAGTAAAATGAGGATGATGCGTCGGGAATGGTCGG
GATAGCTCAGCTGGTAGAGCAGAGGACTGAAAATCCTCGTGTCACCAGTTCAAATAA

>AY55180.1_Amorphophallus_titanum
TGAGCCTTGGTATGGAAACCTACTAAGTGGTAACCTTCCAACTCAGAGAAACCTGGAATAAAAATGGG
CAATCCTGAGCAAAATCCTGTTTTGAGAAAAAGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAAC
AAATGGAGTTGATTGCATTGCGTTGGTAGCTGGAATTCCTCTTTCTATCTAAATACAGAAAAGATAACC
CTATATACCTAAATACGACGTATATATCTGACATATCAACGATTAATCAGGACCAAAATCCATAATAA
TTATTTATATAATATAATAATTTTATATAATATAATAATTTTAAATTTTATGAAAAATTAAGAG
TTATTGCGAATCCATTCTAAATTAAGTAAGAGTGAATATTCAGTGATCAAAATCATTGAAAAAATAA
TGATTAATCGGACGAGAATAAAGAGAGAGTCCCATTCTACATGTCAATCCGACAACAATGAAATTTATA
GTAAGAGGAAAATCCGTCGACTTTAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAAAAACCAITTT
ACCTCTTAAGTATTTTTCTCTTTTCCGTCGGTGAATCAAAATCACTATGTTTCCATTACTCTACTC
TTTCGCAAAAAGATCCGAGCGTTTATGTTAGTTTAGCACAGTTTGTGCAATACACGTACAAGAAG
ATATATGTACAAAGACTCCGAGATTTGAATTTTCACTATTCACAATCTATATTGTAGGTTATCCTTA
CACTTATAAATACAAAAGGTCCTCTTTTATTAAGACCAAAAAATTTTCAGGGATTAGGTAAGGGTT
TTAAAATTTTTTGTCTTTTAAATGGACATAAACCAAGCCCTAGTAAGATAAGGCAATGCATGGAAAA
TAGTCGGGATAGCTAGTTGGTAGAGCAGAGGACTGAAAATCCTCGTGTCA

>FJ466479.1_Canarium_zeylanicum
CGAAATCGGTAGACGCTACGGACTTAATTGGATTGAGCCTTGGTATGGAAACCTACTAAGTGATAACTTT
CAAATTCAGAGAAACCTGGAATAAAAAATGGGCAATCCTGAGCCAAATCCTGTTTACGAGAACAAACA
AGGGTTTCAGAACACGAGAAAGGGGATAGGTGCAGAGACTCAATGGAAGCTGTTCTAACAAATGGAGTTGA
TTGCTTTTTTTTGGGAAAGAAAGGAAATGAATCCTCTATCCAATATCGAAACTCCATAAGGATGAAG
GATAAGCCTATATACACTAGTATAGTAATGAAAAACTATCTCAAAAATGATGACCAGAAATCCGTATTT
TTTTTATGAAAAAAGAAAGAAATGTTGGGAATCGATTCCAAGTTGAAGAAAGAAATCGAATATTCAT
TGATCAAATCATTCACTCCATAGTCTGATCGATCTTTCTTTTGAAGAACTTTAATTGGACGAGAAATC
AAGATAGAGTCCATTTCTATGTCATAGTAATAGCGGTAATGAAATTTATAGTAGAGGAAATC
```

Gambar 3.9 Contoh beberapa data dalam format FASTA

Untuk memudahkan saat dibutuhkan, data yang telah dikumpulkan disimpan dalam satu *file* yang sama. Kemudian, sesuai kebutuhan, data disimpan dengan format nama yang sesuai.

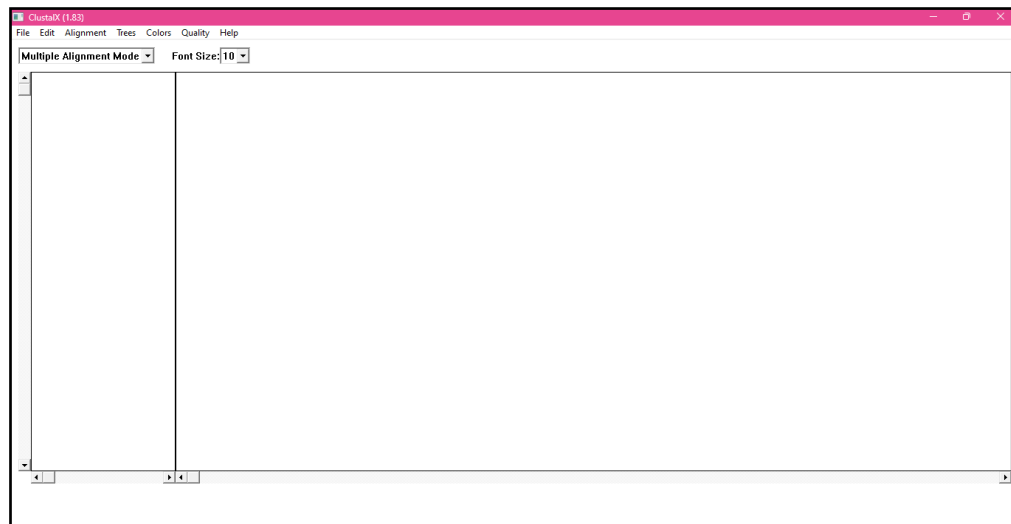
3.4.2 Sequence Alignment

ClustalX digunakan untuk pensejajaran sekuen DNA ini. Program ClustalX memasukkan format FASTA yang berisi sekuen DNA tumbuhan langka berdasarkan penanda *trnL-F* yang telah disusun sebelumnya (Perwitasari *et al.*, 2020). *Alignment* dilakukan sebelum PCR untuk memastikan primer yang dirancang tepat menempel pada daerah target DNA yang konservatif dan spesifik, sehingga amplifikasi berhasil dan akurat (Rani *et al.*, 2024). Teknik *alignment* juga membantu menentukan tingkat homologi dan variasi genetik antar sekuen, yang penting untuk menghindari *mispriming* dan meningkatkan efisiensi amplifikasi PCR (Santoso, 2001). Proses pensejajaran sekuen DNA pada ClustalX, dapat dilihat sebagai berikut.

Proses Pensejajaran Sekuen DNA (<i>Sequence Alignment</i>)
1. Jalankan aplikasi ClustalX. 2. Pilih menu File, lalu <i>Load Sequences</i>. 3. Pilih file Fasta Format <i>sample</i>, klik Open. 4. Pilih menu Alignment, lalu <i>Do Complete Alignment</i>. 5. Beri nama file sebagai output, klik OK. Program ClustalX langsung memproses pensejajaran tersebut. 6. Simpan data dalam FASTA format, Klik menu FILE – <i>Save Sequences As</i>, Klik FASTA format – Klik OK

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

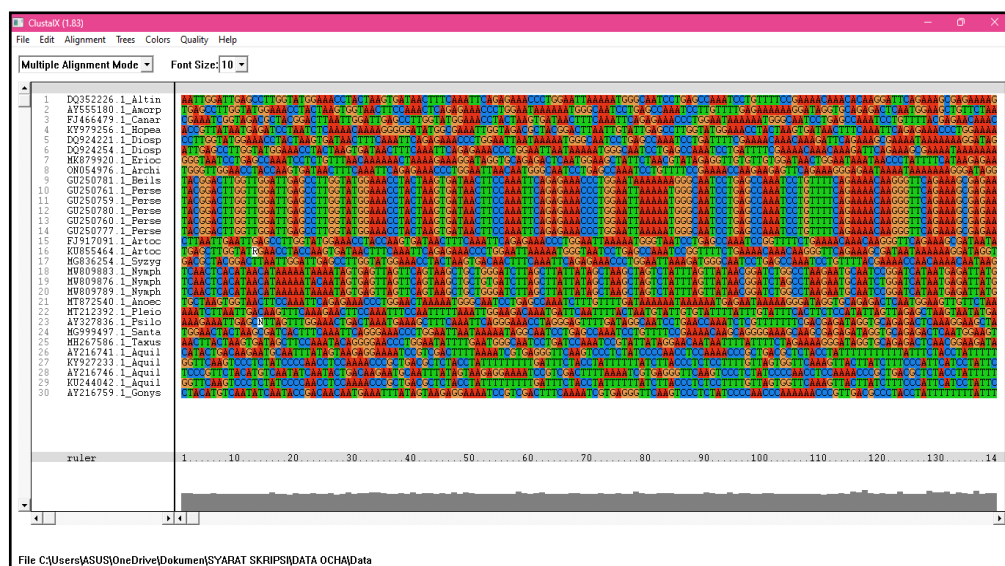
Berikut ini merupakan ilustrasi tahapan-tahapan yang dilakukan dalam proses *sequence alignment* dengan memanfaatkan perangkat lunak ClustalX, yang mencakup serangkaian prosedur sistematis untuk menyelaraskan urutan-urutan biologis secara komparatif guna mengidentifikasi kesamaan evolusioner maupun fungsional di antara sekuens yang dianalisis (Lampiran 1), langkah-langkahnya sebagai berikut:



Gambar 3.11 Perangkat lunak ClustalX

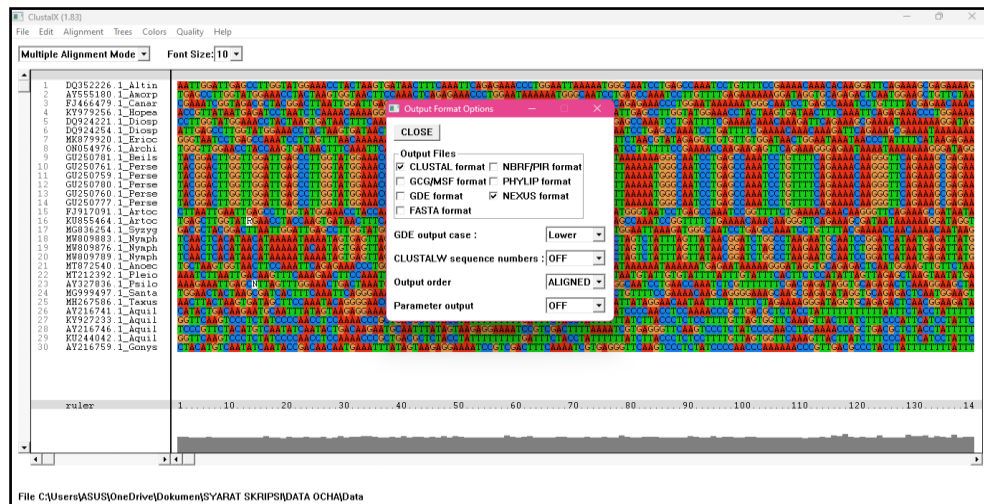
Perangkat lunak ClustalX bisa diunduh pada laman

<http://www.clustal.org/download/current/>.



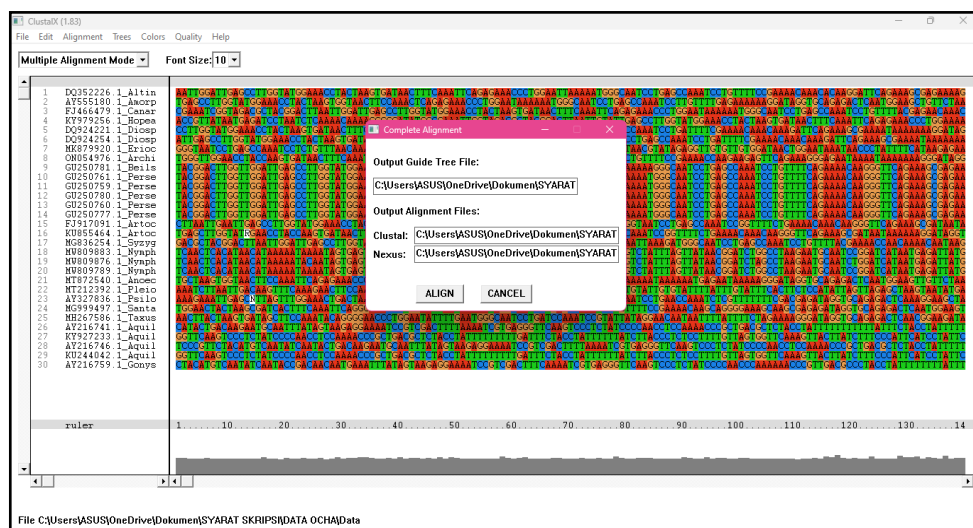
Gambar 3.12 Data sekuen DNA diinput pada ClustalX

Jika file dimasukkan ke dalam perangkat lunak ClustalX, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.9, maka akan muncul seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.12. Berbagai sekuen memiliki panjang yang berbeda satu sama lain, seperti yang ditunjukkan pada gambar.



Gambar 3.13 Data disimpan dalam format NEXUS

Sebelum menyimpan data dalam format NEXUS, klik bagian *Alignment*, kemudian *Output Format File*, dan pilih format NEXUS, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.13.



Gambar 3.14 Lakukan alignment dengan cara Pilih *ALIGNMENT* – Do Complete Alignment

Langkah selanjutnya dilakukan dalam urutan yang sama seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.10 Setelah semua langkah telah dilakukan, hasil akan dihasilkan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 3.15. Sekuen yang telah melakukan *alignment* berhasil akan berbeda dari yang belum.



Gambar 3.15 Sekuen DNA setelah dilakukan proses *alignment*

Pada bagian bawah, bacaan "NEXUS Alignment file created" akan muncul sebagai hasil dari proses *alignment* menggunakan ClustalX, yang menghasilkan dua *output file*, yaitu file dengan format "*aln*" dan "*dnd*".

3.4.3 Membuat *Consensus* Sekuen

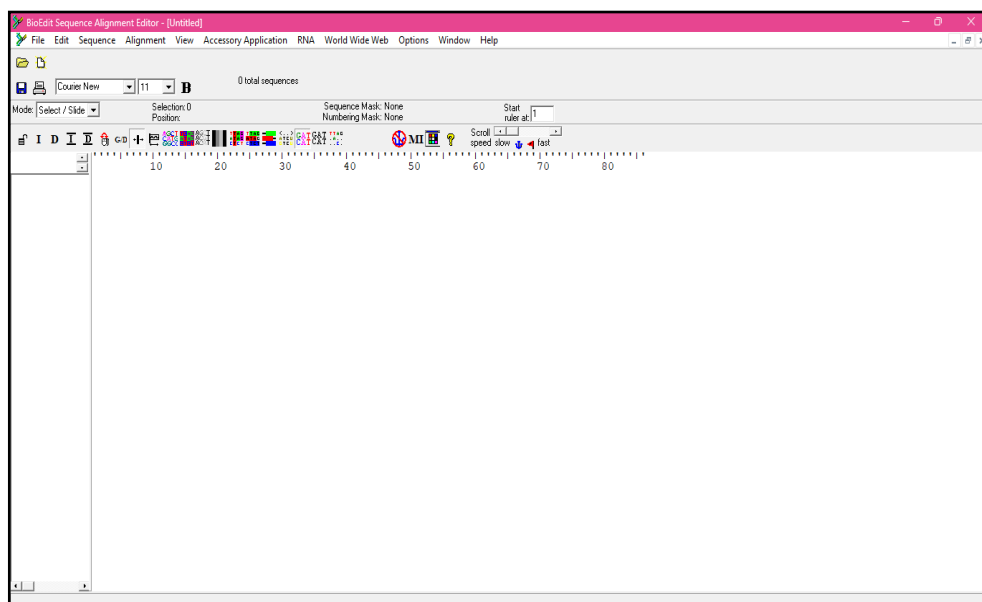
Program BioEdit merupakan salah satu perangkat lunak yang dapat dimanfaatkan untuk membentuk sekuen konsensus pada tumbuhan langka, khususnya dengan menggunakan penanda genetik *trnL-F* (Triesita *et al.*, 2018). Proses ini dilakukan dengan terlebih dahulu memasukkan file sekuen DNA dari tumbuhan langka yang telah melalui tahap penyelarasan (*alignment*) ke dalam program tersebut. Setelah data dimasukkan, BioEdit memungkinkan pengguna untuk mengidentifikasi posisi-posisi nukleotida yang paling umum atau dominan di antara berbagai sekuen, sehingga menghasilkan satu sekuen konsensus yang merepresentasikan karakter genetik utama dari sampel yang dianalisis. Proses pembentukan *consensus* pada program BioEdit, dapat dilihat sebagai berikut.

Preprocessing Data –Pembuatan *Consensus* Sekuen

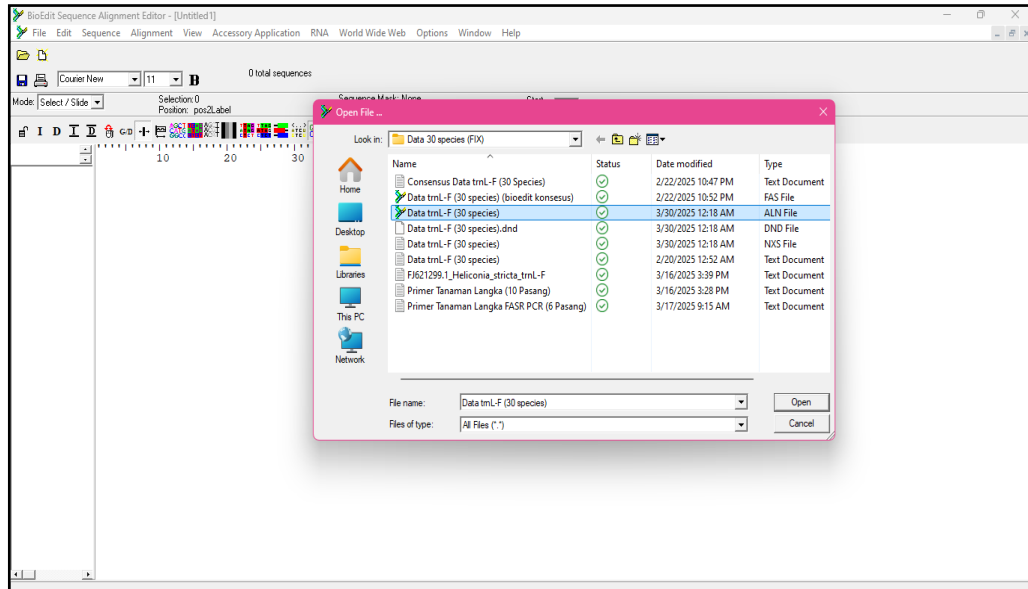
1. Jalankan aplikasi BioEdit.
2. Pilih menu File, lalu *Open*.
3. Pilih file hasil pensejajaran sekuen format (.aln), klik *Open*.
4. Pilih menu *Alignment*, lalu *Create Consensus Sequence*.
5. Klik hasil *Consensus*, pilih menu Edit, lalu *Copy Sequences to Clipboard* (Fasta Format).
6. Simpan data dalam FASTA format, Klik menu FILE – *Save Sequences As*, Klik FASTA format – Klik OK.
7. Jalankan aplikasi Notepad. Paste hasil *consensus* sekuen pada aplikasi Notepad. Pilih menu Edit, lalu Save.

Gambar 3.16 Langkah-langkah pembuatan *consensus sequence* menggunakan BioEdit.

Berikut merupakan ilustrasi langkah-langkah pembuatan *consensus* sekuen menggunakan perangkat lunak Bioedit :

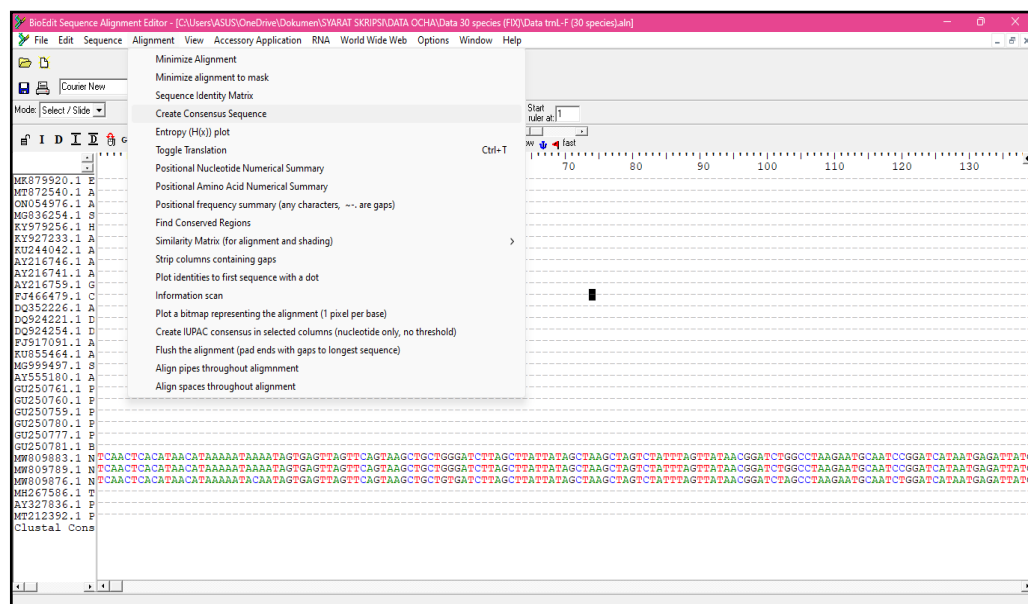


Gambar 3.17 Perangkat lunak BioEdit



Gambar 3.18 Data yang telah dikumpulkan di *input*, klik Simbol folder pada sebelah kiri atas.

Selanjutnya dilakukan pembuatan *consensus* sekuen pada data yang telah diinput, dapat dilihat pada Gambar 3.19.

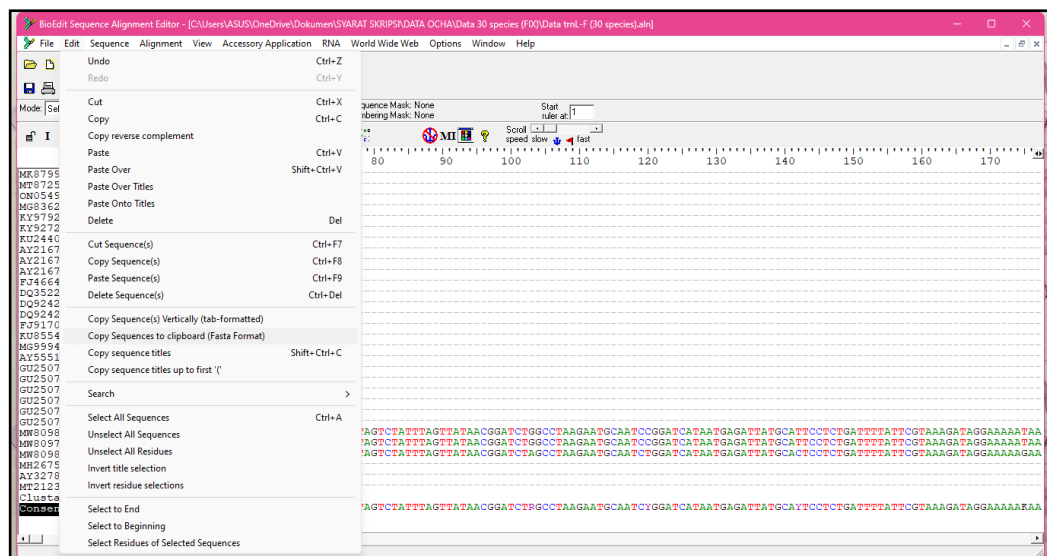


Gambar 3.19 *Consensus* sekuen dibuat dengan cara klik *Alignment*, kemudian pilih *Create Consensus Sequence*



Gambar 3.20 Hasil *Consensus* Sekuen

Pada Gambar 3.20 menunjukkan baris terakhir yang menghasilkan *consensus* sekuen, yang disebut "*Consensus*". Selanjutnya, untuk membuat primer, data disimpan dalam format FASTA di NotePad (Gambar 3.22).



Gambar 3.21 Data disimpan dalam FASTA format dengan cara *Block consensus* – *Edit – Copy Sequences to clipboard* (FASTA format).

```

Consensus
TCAACTCACATAACATAAAAAATAMAATAGTGAGTTAGTTCAGTAAGCTGCTGKGATCTTAGCTTATTATAGCTAAGCTAGTC
AAAAAKAAGAAGAATATTGACCGTTCCACTATTTCAKATCGAGCAGGGAATGCGCGGAGGAGAGGCAGATATATGTGGGA
AAAGGGTTAAAAATAGGAGCAGGCACCTTTTTCCGATATCGGATCGGTATTTAATGAATTGAATGGTCTAACAGRAAGGAA
RDATTGAGCCTTGGTWTGGAAACYTACYAARTGDHARTTHCAAATT CAGRGRAACCYHGAANDWHYWNRAWDDGGHAATC
DABRHWHRVHDDHRHBDKWKGGATAACKVBRDHDWHTNDVBHTVDNBNNNDNNBDDHDNMKWMRKMHDNNNDNNNDNNN
DNNNNHNNNDNRHNNNDNYHDMWWWNNNNNNNDHNDHNDHDDHHDWDNDWDWBWWNNNDNNNDHNDNNNDHNRNDYH
KHBDDYDDDKHWNBKVDADADHBNHTDATBDVDCGAGRATAAAGAKAGAGTCCMDTTYTACMYTGTHAAWRNCGACAACAC
KRGRKWMVARKMSCMKRTYYCYAVBMMNHMARDRHNBRBYNDVRCYYNDHHTRWYTTWYKWDDRHNHYHVHNBHNBHT
NDNNNDHWDHBNHTHWBWyWAGTYNHBYNNNDYNNVYNNHNNNNR TATTGATATABDYDNDNNNNHNNNDNNVNBDBHB
DVRHWDWYWNNDNDHNNBNHNBNAWYADDHBNDDNDHHRDNNHBYHNNNNNNNNNNNDNNNDHNNNNNDHNBVN
VHNBNNNDADVDGTCGGATAGCWCAGHTGGTAGARCWSRSDMBKRWRWCKMKSGTVBYVYVMGTTCAAATAA

```

Gambar 3.22 Hasil FASTA disimpan pada perangkat lunak NotePad.

Basa DNA selain ‘ATGC’ yang tertera pada *consensus* kemudian diubah pada perangkat lunak NotePad (Gambar 3.24) berdasarkan IUPAC DNA Code (Gambar 3.23). Penggunaan IUPAC DNA code dalam desain primer bertujuan untuk mengakomodasi variasi genetik pada daerah target DNA, meningkatkan spesifisitas primer, dan memastikan keberhasilan reaksi PCR (Nuryady, M. M., *et al*, 2023).

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 3.23 IUPAC DNA Codes

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

```

Consensus
TCAACTCACATAACATAAAAAATACAATAGTGAGTTAGTTCAGTAAGCTGCTGTGATCTTAGCTTATTATAGCTAAGCTAGTCTA
AAAAATAAGAAGAATATTGACCGTTCCACTATTTTCATATCGAGCAGGGAAAAATGCGCGGAGGAGAGGCAGATATATGTGGGATA
AAAGGGTTAAAAATAGGAGCAGGCACTTTTTCCGATATCGGATCGGTATTTAATGAATTGAATGGTTCTAACAGAAAGGAAAG
GTATTGAGCCTTGGTATGGAACTTACCAAGTGGCAGCTTCCAAATTCAGGGGAACCTTGAATTAACAACAAAAGGTAATCCT
TATGCAAGGCTGGTAAGAGGAGGATAACTATAGAGACTTGGCTTGGCTCTATCAGGAATCCGACGTCAGGACATTTATATGGTT
AAGAATTTAAGGGTTATCTCTGCAAATCTGCCAAGATGACCGATTCTTTTGAAGAGATCAGGTAGAAAAGTTGTTTATTCAGG
TTCAGCTGAGCACCTCAATATTTGATTTATTAAGCGAGGATAAAGATAGAGTCCCCTTCTACCTTGTTAATGACGACAACACAT
TGGGTTTCGAGGACCTCTATTTCCAGGCCAAAAAGTGGACCTGGCCTGTCCTAATTTTTGAATGTTCCAGCACTGCTTTAT
GGTTATTTTGCATTACATAAGTCGATCCTGACTACTTGAGTTGATATTGATATAGGCGAGTGCTAATTCCTGCGCTGACCGGG
ACATTGTCAAGGTGTAATGGTTCTTAATTATTCACGATTGCGATCTGCCAATAATAAACACTAAAGCGTAAGTGAAACCATT
GATCGCCTAATGGTCGGGATAGCTCAGATGGTAGAGCAGGGCGACGGTGATTAGCGTAGTAACAGTTCAAATAA

```

Gambar 3.24 Hasil *consensus*

Setelah mendapatkan *consensus* sekuen, uji coba *in silico* PCR dilakukan, tetapi terlebih dahulu dilakukan desain primer.

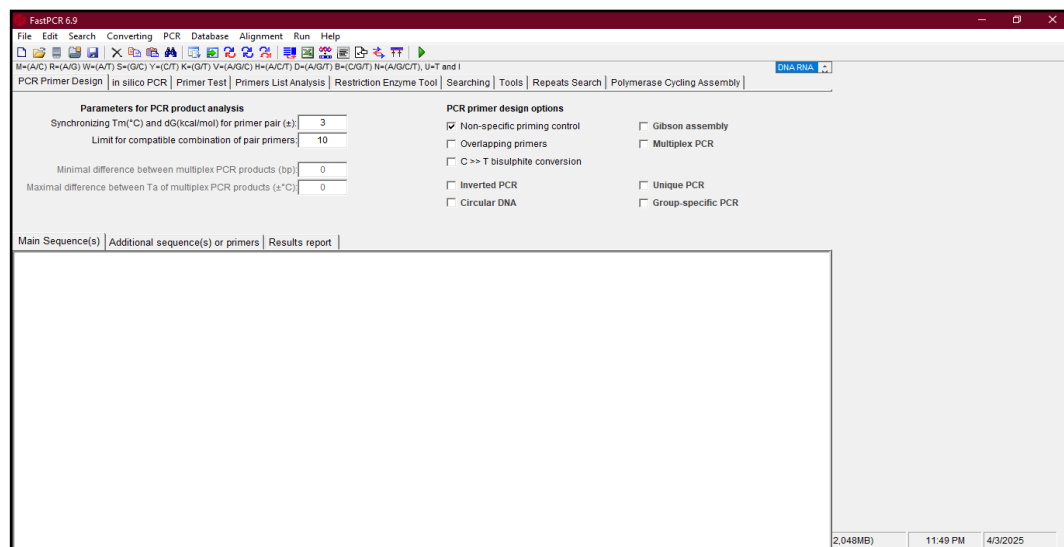
3.4.4 Desain Primer

Menggunakan perangkat lunak FastPCR untuk memilih *consensus* sekuen yang berpotensi untuk dijadikan primer dan mengoptimalkan desain primer untuk urutan DNA atau cDNA target (Kalendar *et al.*, 2017). Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa primer yang akan dibuat selektif dan efisien. Seleksi adalah memastikan bahwa pasangan primer tersebut tepat mengikat targetnya. Perangkat lunak FastPCR juga dapat mengidentifikasi panjang ampikon, orientasi, dan lokasi primer setiap ampikon. Proses mendesain awal menggunakan perangkat lunak FastPCR digambarkan dalam Gambar 3.25:

Proses Desain Primer
mulai 1. Aplikasi FastPCR dibuka 2. Input data yang akan diolah, Klik menu FILE – <i>Open</i> 3. Data hasil <i>consensus</i> dipilih - klik <i>Open</i> 4. Primer dibuat, Klik <i>PCR Primer Design</i> – Klik <i>RUN</i> 5. Data disimpan, Klik menu FILE – <i>Save As</i> dengan format ‘txt’. - Klik OK

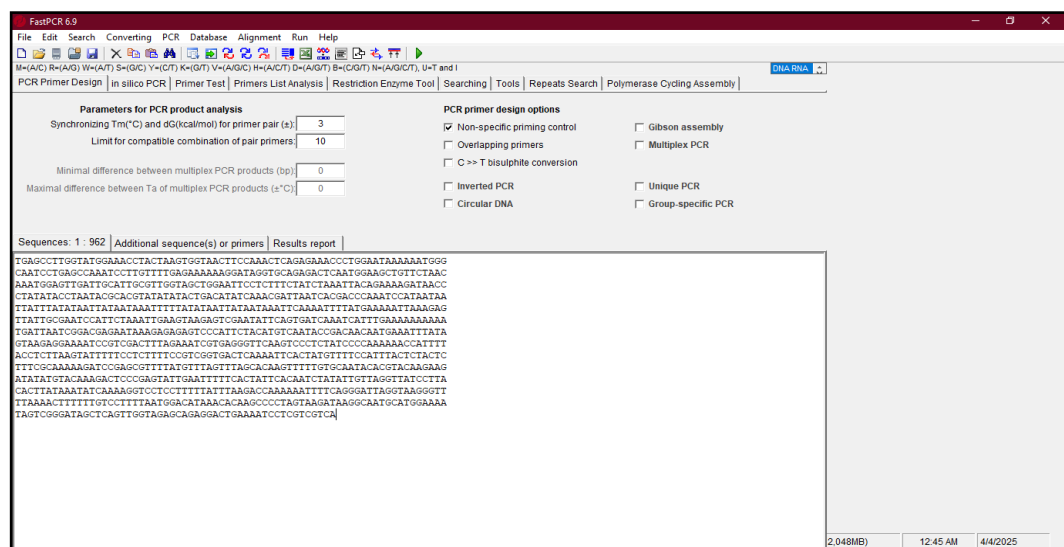
Gambar 3.25 Langkah-langkah mendesain primer menggunakan perangkat lunak FastPCR.

Berikut merupakan ilustrasi langkah-langkah mendesain primer menggunakan perangkat lunak FastPCR :



Gambar 3.26 Perangkat lunak FastPCR

Pengunduhan perangkat lunak FastPCR bisa dilakukan pada laman <https://primerdigital.com/fastpcr.html>.



Gambar 3.27 Consensus sekuen diinput pada FastPCR

Pada FastPCR, desain kandidat primer dilakukan pada bagian "*PCR Primer Design*", kemudian *input consensus* sekuen dalam format FASTA pada bagian "*General sequences*", lalu klik "*RUN*". Pada Gambar 3.28 disajikan hasil kandidat-

kandidat primer dari *consensus* tersebut, untuk mempermudah melakukan uji *in silico* PCR, file disimpan pada *Microsoft Excel* atau *Spreadsheet*.

Sequences: 1 : 1765		Additional sequence(s) or primers		PCR primers design result				
PCR primers and probe design								
PrimerID	Sequence(5'-3')	Length(nt)	Tm(°C)	dG(kcal/mol)	GC(%)	Linguistic_Complexity(%)	Primer_Efficiency(%)	
l:F_29-51	gtgagtagttcagtaagctgct	23	60.5	-27.0	43.5	78	77	
l:F_255-277	agctatccatattgaattgcgga	23	60.1	-26.8	39.1	88	74	
l:F_304-326	ttctgattgaacccaacactggt	23	60.8	-27.0	39.1	83	77	
l:F_343-365	ggtaaaaaatagggaacagcact	23	61.2	-27.2	43.5	80	74	
l:F_1088-1110	cgacaacacatgtcaataccgac	23	62.2	-28.3	47.8	76	78	
l:F_1092-1114	aacacatgtcaataccgacaaca	23	60.7	-27.2	39.1	76	74	
l:R_1089-1111	tgtcgtattgacatgtgtgttc	23	61.2	-27.6	43.5	76	75	
l:R_355-375	atcgaaaaaagtgcctgctc	21	61.8	-26.3	47.6	79	69	
l:R_351-372	ggaaaaaagtgcctgctcctcat	22	61.3	-26.5	45.5	78	68	
l:R_305-327	gaccagtggtttgttcaatcaga	23	61.3	-27.3	43.5	83	73	
l:R_255-277	tcgcgaattcaatggatagct	23	60.1	-26.8	39.1	88	65	
l:R_29-51	agcagcttactgaactaactcac	23	60.5	-27.0	43.5	78	70	
PrimerID	Sequence (5'-3')	Length(nt)	Tm(°C)	dG(kcal/mol)	GC(%)	Linguistic_Complexity(%)	Primer_Efficiency(%)	Fragment_Size(bp)/Tm(°C)
l:F_255-277	agctatccatattgaattgcgga	23	60.1	-26.8	39.1	88	74	
l:R_305-327	gaccagtggtttgttcaatcaga	23	61.3	-27.3	43.5	83	73	73/65 64
l:F_255-277	agctatccatattgaattgcgga	23	60.1	-26.8	39.1	88	74	
l:R_1089-1111	tgtcgtattgacatgtgtgttc	23	61.2	-27.6	43.5	76	75	857/80 67
l:F_29-51	gtgagtagttcagtaagctgct	23	60.5	-27.0	43.5	78	77	
l:R_305-327	gaccagtggtttgttcaatcaga	23	61.3	-27.3	43.5	83	73	299/78 66

Gambar 3.28 Hasil Desain Primer

3.4.5 Uji Coba *In silico* PCR

Pengoptimalan primer yang telah dilakukan menggunakan program Fast PCR *in silico*. Mekanisme kerja program ini mengacu pada alat komputasi yang umum digunakan untuk menghitung hasil reaksi berantai polimerase (PCR). Proses ini dapat menghitung lokasi primer, orientasi, dan panjang setiap ampikon. Dalam penelitian Kalandar *et al.* (2011) mencatat bahwa DNA template diamplifikasi melalui berbagai siklus, termasuk: denaturasi (perombakan DNA *template* untai ganda menjadi tunggal); proses *annealing* (primer pada DNA *template*); dan reaksi ekstensi (pemanjangan primer dengan bantuan DNA polymerase). PCR dilakukan menggunakan perangkat lunak FastPCR setelah tahap pembuatan sekuen dan uji coba primer dengan *in silico*.

Langkah-langkah uji coba primer secara *in silico* dengan perangkat lunak FastPCR dimulai dengan membuka program, memasukkan sekuen DNA target dan primer yang telah dirancang, lalu mengatur parameter seperti suhu *annealing* dan panjang produk. Setelah itu, FastPCR mensimulasikan proses PCR dan menampilkan hasil berupa posisi ikatan primer, ukuran fragmen, dan kemungkinan amplifikasi non-spesifik. Proses ini ditunjukkan pada Gambar 3.29.

Proses Uji Coba *In silico* PCR

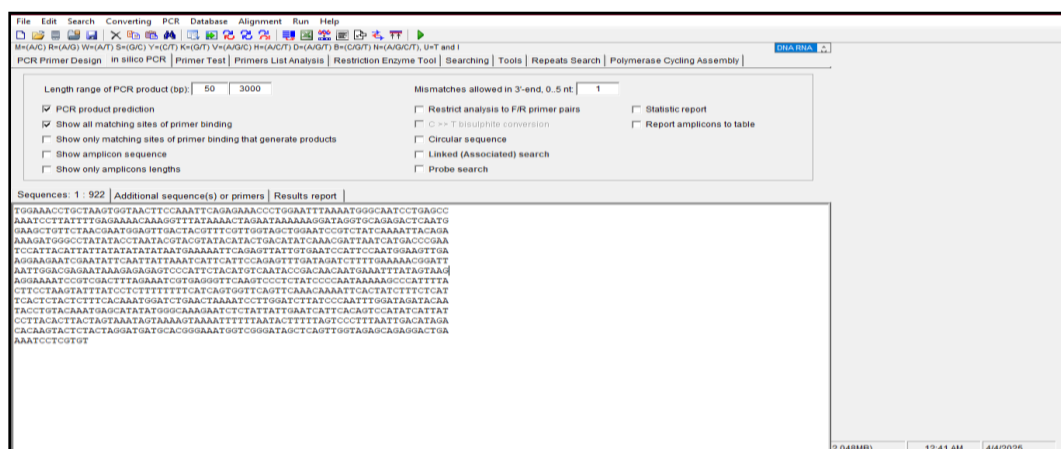
mulai

1. Aplikasi FastPCR dibuka
2. Pilih *In silico* PCR
3. Data hasil desain primer dibuka, kemudian salah satu kandidat primer dipilih untuk diuji coba - *Copy File*
4. File disalin atau Paste pada laman '*Additional Sequences*'
5. Salah satu sekuen DNA dipilih, kemudian *Copy File – Paste* pada laman '*General Sequence*'
6. Klik RUN – Buka laman '*PCR Result*' untuk melihat hasil.

selesai

Gambar 3.29 Langkah-langkah uji coba primer dengan *in Silico* PCR menggunakan perangkat lunak FastPCR.

Berikut merupakan ilustrasi langkah-langkah uji coba *in silico* PCR menggunakan perangkat lunak FastPCR :



Gambar 3.30 FASTA tumbuhan diinput pada FastPCR

Dalam perangkat lunak FastPCR, uji coba *in silico* PCR dilakukan melalui fitur khusus yang tersedia pada bagian "*in silico PCR*". Tahapan pertama dimulai dengan membuka menu tersebut, kemudian memasukkan sekuens DNA target dari tumbuhan yang akan diuji. Sekuens ini dimasukkan ke dalam kolom "Sekuen Umum" sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3.30. Data sekuens ini merupakan urutan nukleotida dari spesies tumbuhan yang menjadi objek analisis dan berfungsi sebagai template untuk proses simulasi PCR.

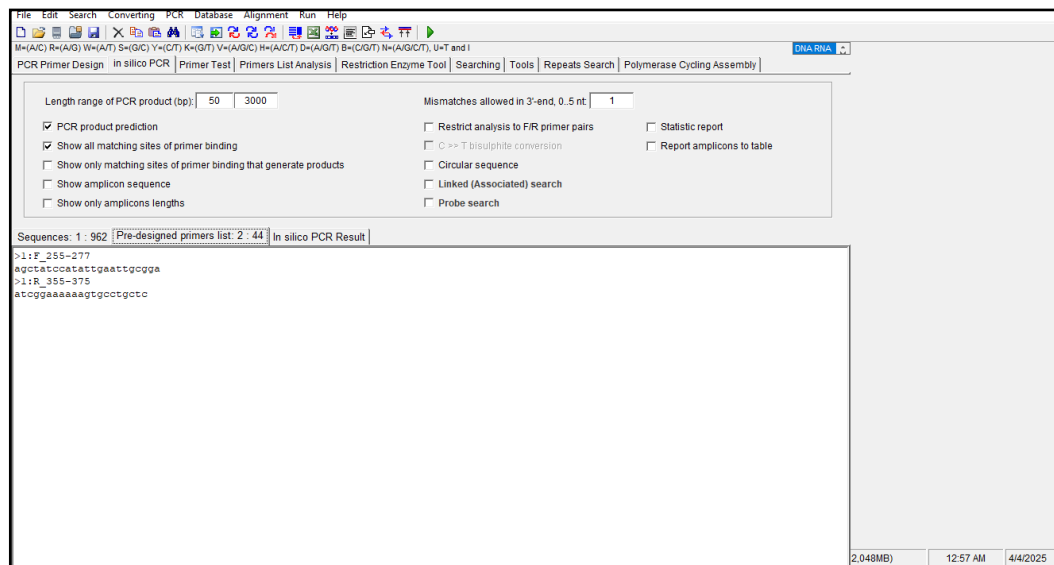
Santana Kocha, 2025

ANALISIS MOLEKULER BERBASIS PENANDA *trnL-F* UNTUK DETEKSI TUMBUHAN LANGKA SECARA *IN SILICO*

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

Setelah sekuens target dimasukkan, langkah berikutnya adalah menginput pasangan primer yang telah dirancang sebelumnya ke dalam kolom "Sekuen Tambahan", seperti yang terlihat pada Gambar 3.31. Pasangan primer ini terdiri dari primer maju (*forward*) dan primer balik (*reverse*) yang berperan penting dalam menginisiasi amplifikasi fragmen DNA pada lokasi yang spesifik.

Setelah kedua komponen sekuens target dan pasangan primer dimasukkan dengan benar. Selanjutnya, proses simulasi dilakukan dengan mengklik tombol "RUN", yang akan memulai analisis *in silico* PCR. Hasil dari proses ini akan menunjukkan apakah amplifikasi berhasil atau tidak, ditandai dengan muncul atau tidaknya produk *amplicon* beserta informasi spesifik seperti lokasi ikatan primer dan panjang fragmen hasil amplifikasi.



Gambar 3.31 Pasangan kandidat primer diinput pada FastPCR

Hasil uji coba primer secara *in silico* menggunakan perangkat lunak FastPCR dapat dibedakan menjadi dua kategori utama, yaitu hasil positif dan hasil negatif. Hasil positif menunjukkan bahwa primer yang diuji mampu mengenali dan mengikat sekuens DNA target dengan tepat, sehingga amplifikasi berhasil terjadi. Hal ini ditandai dengan munculnya nama spesies tumbuhan yang sesuai pada *output* program, serta terbentuknya produk *amplicon* dengan ukuran yang sesuai prediksi desain primer. Kondisi ini menunjukkan bahwa primer tersebut efektif dan spesifik untuk mendeteksi DNA tumbuhan yang dianalisis, seperti terlihat pada Gambar 3.32.

```

Sequences: 1 : 656 | Pre-designed primers list: 2 : 38 | In silico PCR Result

In silico Primer(s) search for: l
l:f_255-277 5'-agctatccatattgaattgcgga
Position: 201->223 100% Tm = 60.1°C

5-agctatccatattgaattgcgga->
|||||
actctcggcaacgcatctcggct

l:r_355-375 5'-atcggaaaaaagtgctgctc
Position: 299<-319 100% Tm = 61.8°C

<-cagaacttgcttcaacg-5
|||||
gagttcttgaacgcaagtgctgccc

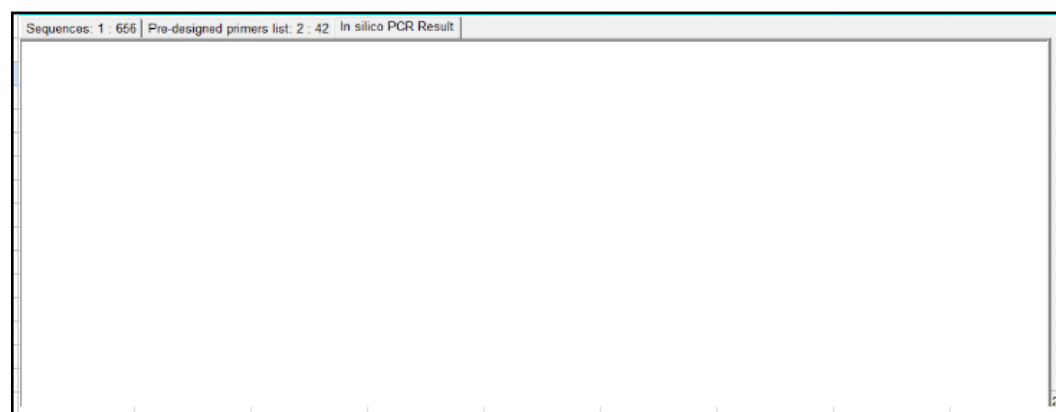
l:f_255-277 201->223
5'-agctatccatattgaattgcgga
>l:r_355-375 299<-319
5'-atcggaaaaaagtgctgctc

Amplicon size: 121bp Tm=59°C

```

Gambar 3.32 Hasil Positif *In silico* PCR

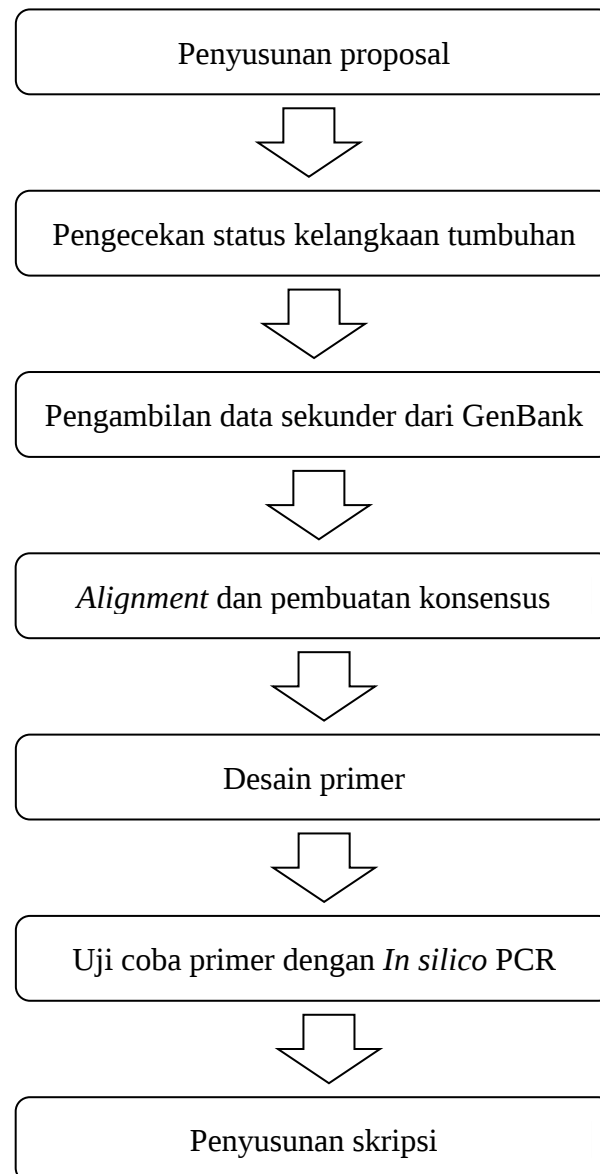
Sebaliknya, hasil negatif menunjukkan kegagalan proses amplifikasi, yang ditandai dengan tidak adanya produk *amplicon* maupun informasi spesies pada hasil simulasi. Primer yang tidak cocok ini mungkin tidak mengenali sekuens target karena perbedaan urutan nukleotida, pengaturan suhu *annealing* yang kurang optimal, atau desain primer yang kurang tepat. Akibatnya, amplifikasi tidak terjadi dan keluaran FastPCR menunjukkan hasil kosong atau nihil, sebagaimana diperlihatkan pada Gambar 3.33.



Gambar 3.33 Hasil Negatif *In silico* PCR

3.4.6 Alur Penelitian

Alur penelitian dalam penelitian ini disusun sebagai berikut



Gambar 3.34 Alur penelitian