BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui keberadaan variabel (Sugiyono, 2015). Data sekunder berupa sekuen diperoleh dari *GenBank*, kemudian dilakukan analisis hubungan kekerabatan secara fenetik dan mencari konsensus sekuen pada tanaman timun apel.

3.2 Alat dan Bahan

Daftar alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini tertera pada Lampiran 1. Alat serta bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat di Laboratorium Riset Bioteknologi FPMIPA UPI.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengambilan Data

Data yang digunakan pada penelitian ini merupakan beberapa data sekuen DNA tanaman timun apel, tanaman familia Cucurbitaceae, dan tanaman familia Begoniaceae sebagai *outgroup*. Sampel utama untuk dilakukan pengujian yaitu pada tanaman timun apel, sedangkan pada familia Cucurbitaceae sebagai pembanding dengan tanaman timun apel. Familia Begoniaceae dipilih menjadi *outgroup* dikarenakan familia Begoniaceae *sister group* dari familia Cucurbitaceae Data sekunder sekuen DNA tanaman terdiri dari 8 data sekunder sekuen DNA tanaman timun apel, 99 data sekunder sekuen DNA tanaman familia Cucurbitaceae, dan 4 data sekunder sekuen *outgroup* dari genus *Begonia*. Nomor akses ITS adalah nomor yang digunakan untuk memudahkan pencarian sekuen pada halaman https://www.ncbi.nlm.nih.gov/.

Pada Tabel 3.1 merupakan kumpulan data sekunder berupa informasi dari tanaman timun apel. Pada tabel tersebut terdapat informasi berupa data nama latin dari tanaman

tersebut, jumlah pasang basa dan nomor akses ITS untuk memudahkan pencarian sekuen DNA pada situs penyedia sekuen DNA dan ukuran dari sekuen tersebut.

No	Nama Spesies	No Akses	Jumlah
		ITS	pasang basa
			(bp)
1.	Apple cucumber A	LC435064.1	612 bp
2.	Apple cucumber B	LC435065.1	614 bp
3.	Apple cucumber C	LC435066.1	599 bp
4.	Apple cucumber D	LC435067.1	616 bp
5.	Apple cucumber E	LC435068.1	618 bp
6.	Apple cucumber F	LC435069.1	618 bp
7.	Apple cucumber G	LC435070.1	617 bp
8.	Apple cucumber H	LC435071.1	618 bp

Tabel 3.1 Data sekunder tanaman Timun Apel

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Pada Tabel 3.2 menunjukkan data sekunder tanaman familia Cucurbitaceae. Pada tabel ini terdapat nama latin tanaman dari familia Cucurbitaceae, jumlah pasang basa, dan nomor akses ITS untuk memudahkan pencarian tanaman familia Cucurbitaceae pada situs penyedia sekuen DNA dan ukuran dari sekuen tersebut. Data sekunder tanaman familia Cucurbitaceae terdapat sebanyak 99 spesies familia Cucurbitaceae.

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa
			(bp)
1.	Cucumis melo	EU312159.1	615 bp
2.	Cucumis sativus	KX231334.1	617 bp
3.	Citrulus lanatus	FJ915098.1	617 bp
4.	Cucumis zeyheri	EF093523.1	621 bp
5.	Cucumis metuliferus	EF093517.1	618 bp
6.	Cucumis zambianus	KY434630.1	613 bp
7.	Cucumis rigidus	KY434625.1	624 bp

Tabel 3.2 Data sekunder macam-macam tanaman familia Cucurbitaceae

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
8.	Cucumis maderaspatanus	KY434573.1	615 bp
9.	Cucumis anguria	AJ488210.1	623 bp
10.	Cucumis africanus	AJ488209.1	624 bp
11.	Cucumis trigonus	AJ488234.1	618 bp
12.	Sechium edule	KF815741.1	617 bp
13.	Sechium mexicanum	HQ201993.1	624 bp
14.	Sechium hintonii	MT112278.1	632 bp
15.	Sechium compositum	MT112270.1	643 bp
16.	Sechium chinantlense	MT112275.1	641 bp
17.	Cucurbita moschata	FJ915109.1	597 bp
18.	Cucurbita pepo	FJ915103.2	628 bp
19.	Cucurbita maxima	AF013332.1	607 bp
20.	Citrullus amarus	KY613612.1	615 bp
21.	Citrullus naudinianus	KT757533.1	611 bp
22.	Benincasa hispida	JX073081.1	618 bp
23.	Benincasa fistulosa	KU358563.1	625 bp
24.	Lagenaria siceraria	KJ026937.1	614 bp
25.	Momordica cymbalaria	KX786115.1	652 bp
26.	Luffa acutungula	KF487353.1	610 bp
27.	Luffa graveolens	KX786101.1	645 bp
28.	Luffa aegyptiaca	KX786100.1	642 bp
29.	Dactyliandra welwitschii	HQ201973.1	634 bp
30.	Gymnostemma pentaphyllum	KF269125.1	657 bp
31.	Schizocarpum palmeri	HQ201991.1	615 bp
32.	Cucurbita ficifolia	FJ915115.2	612 bp
33.	Cionosicyos excisus	HQ201966.1	615 bp
34.	Cayaponia prunifera	MF785329.1	632 bp

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
35.	Calycophysum weberbaueri	JX505458.1	631 bp
36.	Abobra tenuifolia	JX505456.1	617 bp
37.	Indofevillea khasiana	JX505443.1	618 bp
38.	Sicyos cucumerinus	JN560229.1	645 bp
39.	Sechium hintonii	MT112278.1	634 bp
40.	Sechiopsis triquerter	JN560205.1	632 bp
41.	Parasicyos maculatus	JN560200.1	642 bp
42.	Microsechium ruderale	JN560196.1	613 bp
43.	Marah macrocarpus	JN560192.1	621 bp
44.	Frantzia talamancensis	JN560187.1	623 bp
45.	Echinopepon paniculatus	JN560183.1	634 bp
46.	Cyclanthera carthagenensis	JN560181.1	613 bp
47.	Zygosicyos tripartitus	HQ202010.1	639 bp
48.	Melothria domingensis	JX505467.1	615 bp
49.	Wilbrindia verticillata	JX505464.1	642 bp
50.	Tricosanthes papuana	MH710708.1	632 bp
51.	Tricosanthes cucumerina	GQ845144.1	634 bp
52.	Thladiantha dubia	HQ202000.1	601 bp
53.	Siraitia grosvenorii	HQ201999.1	643 bp
54.	Fevillea cordifolia	HQ201975.1	614 bp
55.	Siolmatra brasiliensis	HQ201998.1	643 bp
56.	Sicana odorifera	HQ201994.1	645 bp
57.	Ibervillea sonorae	KJ531873.1	613 bp
58.	Gymnopetalum scabrum	HQ201979.1	643 bp
59.	Dendrosicyos socotranus	HQ201974.1	622 bp
60.	Cucurbita palmata	HQ201971.1	641 bp
61.	Corallocarpus welwitschii	HQ201969.1	645 bp

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
62.	Coccinia barteri	HQ201968.1	613 bp
63.	Citrullus ecirrhosus	HQ201967.1	642 bp
64.	Brandegea bigelovii	HQ201963.1	646 bp
65.	Apodanthera sagittifolia	HQ201962.1	612 bp
66.	Coccinia trilobata	HQ608222.1	611 bp
67.	Coccinia adoensis	HQ608200.1	604 bp
68.	Coccinia sessilifolia	HQ608220.1	617 bp
69.	Ecballium elaterium	EU102747.1	642 bp
70.	Bryonia verrucosa	EU102739.1	614 bp
71.	Bryonia syriaca	EU102734.1	642 bp
72.	Bryonia monoica	EU102729.1	642 bp
73.	Bryonia melanocarpa	EU102724.1	621 bp
74.	Bryonia marmorata	EU102718.1	615 bp
75.	Oreosyce africana	EF595907.1	617 bp
76.	Myrmecosicyos messorius	EF093527.1	619 bp
77.	Mukia maderaspatana	EF093526.1	671 bp
78.	Muellerargia timorensis	HM596952.1	614 bp
79.	Cucumis sagittatus	EF093521.1	616 bp
80.	Cucumis sacleuxii	EF093520.1	598 bp
81.	Cucumella bryoniifolia	EF091851.1	595 bp
82.	Selysia cordata	HM104679.1	641 bp
83.	Cayaponia triangularis	HM057412.1	614 bp
84.	Mukia javanica	EF174484.1	618 bp
85.	Austrobryonia pilbarensis	EF487547.1	602 bp
86.	Momordica charantia	HQ201988.1	619 bp
87.	Neoalsomitra integrifoliola	EF621642.1	618 bp
88.	Telfairia pedata	FJ389512.1	619 bp

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
89.	Telfairia occidentalis	AM981085.1	620 bp
90.	Trichosanthes cordata	KT347517.1	632 bp
91.	Tricosanthes wallichiana	KT347527.1	634 bp
92.	Tricosanthes lepiniana	KT347519.1	632 bp
93.	Muellerargia timorensis	HM596952.1	597 bp
94.	Hemsleya amabilis	EF424066.1	643 bp
95.	Hemsleya lijiangensis	EF424065.1	623 bp
96.	Thladiantha villosula	JF978975.1	634 bp
97.	Thladiantha oliveri	JF978969.1	615 bp
98.	Psiguria racemosa	GQ490093.1	634 bp
99.	Psiguria warscewiczii	GQ490145.1	623 bp

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Pada Tabel 3.3 menunjukkan data sekunder berupa informasi tanaman *Begonia* sebagai *outgroup*. Tabel berisi nama latin dan jumlah pasang basa dari tanaman genus *Begonia* tersebut, dan nomor akses ITS untuk memudahkan pencarian tanaman genus *Begonia* pada situs penyedia sekuen DNA dan ukuran dari sekuen tersebut.

Fabel 3.3 Data Sekunde	er Tanaman Bego	mia
------------------------	-----------------	-----

No	Nama Spesies	No Akses ITS	Jumlah pasang basa (bp)
1.	Begonia odorata	AF485168.1	764 bp
2.	Begonia minor	AF485171.1	721 bp
3.	Begonia obliqua	AF485170.1	710 bp
4.	Begonia cubensis	AF485169.1	732 bp

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Pada Gambar 3.1 menunjukkan halaman pada situs NCBI, untuk mendapatkan data sesuai pada Tabel 3.1, 3.2, maupun 3.3 dengan cara memasukan nomor akses ITS

pada tabel lalu disisipkan pada kolom pencarian yang ada pada Gambar 3.1 kemudian klik *search*.

SNCBI National Center for Biotechnology Information	Databases •			Search
NCBI Home	Welcome to NCBI			Popular Resources
Resource List (A-Z)	The National Center for Biotechno	logy Information advances science an	d health by providing access to	PubMed
All Resources	biomedical and genomic information. Bookshelf			
Chemicals & Bioassays	About the NCBI Mission Orga	nization NCBI News & Blog		PubMed Central
Data & Software				BLAST
DNA & RNA	Submit	Download	Learn	Nucleotide
Domains & Structures	Deposit data or manuscripts	Transfer NCBI data to your	Find help documents, attend a	Genome
Genes & Expression	into NCBI databases	computer	class or watch a tutorial	SNP
Genetics & Medicine				Gene
Genomes & Maps	· · · ·			Protein
Homology				PubChem
Literature				
Proteins				NCBI News & Blog
Sequence Analysis	Develop	Analyze	Research	First annotation of Pacific white shrimp
Taxonomy	Use NCBI APIs and code	Identify an NCBI tool for your	Explore NCBI research and	14 Feb 20
Training & Tutorials	libraries to build applications	data analysis task	collaborative projects	100 of the Pacific white shrimp (Penaeu vannamei) genome in RefSeg, based of
41140.011		888	les .	GenBank reaches over 4 terabytes of data in release 229
			and the second se	GenBank release 229.0 (12/15/201

Gambar 3.1 Laman NCBI

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)



Gambar 3.2 Laman hasil pencarian

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Pada Gambar 3.2 akan ditemukan data yang berada pada posisi pencarian paling atas, kemudian pilih data tersebut. Setelah terbuka maka dapat dilihat semua informasi mengenai data tersebut pada contoh seperti berikut.

LOCUS	LC435071	618 bp DNA linear PLN 18-JAN-2019		
DEFINITION	Cucumis #	elo H gene for ITS1, 5.85 rRNA and ITS2, complete		
ACCESSTON	1C435071			
VERSION	LC435071.	1		
KEYWORDS				
SOURCE	Cucumis m	Cucumis melo (muskmelon)		
ORGANISM	Cucumis n	elo		
	Eukaryota	; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;		
	Spermatop	nyta; Magnollophyta; eudicotyledons; Gunneridae;		
	Renincase	cae, fostas, fabias, cucurbitates, cucurbitateae,		
REFERENCE	1	de, cucumis.		
AUTHORS	Hidavat.T	Insanie.A.M. and Saputro.N.W.		
TITLE	Phylogene	tic Treatment of Apple Cucumber Based on the ITS Region		
	Sequence			
JOURNAL	Unpublish	ed		
REFERENCE	2 (bases	1 to 618)		
AUTHORS	Hidayat,T	., Insanie,A. and Saputro,W.		
TITLE	Direct Su	bmission		
JUURNAL	Submitted	(26-NUV-2018) Contact: Topik Hidayat Universitas		
	West Java	A ANSA Indonesia		
FFATURES	west sove	location/Qualifiers		
source 1618		1618		
		/organism="Cucumis melo"		
		/mol_type="genomic DNA"		
		/cultivar="Aceh"		
		/isolate="H"		
		/db_xref="taxon: <u>3656</u> "		
10-10-10	-	/tissue_type="Leaf"		
misc	RNA.	1217 (meduat_Histores) tessessibad season 10		
PDNA		/product="internal transcribed spacer 1"		
1 DUM		/product="5.85 ribosomal RNA"		
misc	RNA	381618		
		/product="internal transcribed spacer 2"		
ORIGIN		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		
1	tcgatgccta	aacatcaaac gacccgcgaa cgcgtttaaa aacaaactgt tcgcgttagg		
61	ggcgggggga	agcatgetet tiggetgeet eeteete caaegegitt aaacaaaaee		
121	ccggcgcagg	tcgcgccaag gaacttgaaa tgaattcgcc tgtcccctgc cccggcctcg		
181	gcgtgcgggg	gatggagcat tctagtcgta ttactaacaa cgactctcgg caacggatat		
241	ctcggctctc	gcatcgatga agaacgtagc gaaatgcgat acttggtgtg aattgcagga		
301	teccgcgaac	caccgagtet tigaacgeaa gitgegeeeg gageettetg geegagggea		
421	ttataaaaac	appoaranan antopycty cotanonan attoteccea tgeggggteg		
421	tcoantcotc	astacticate attacaacae tacaataatt aatteaacet contaacee		
541	tetenarete	parotroact tracopacte entracoare ettenaarne correcttaa		
681	aannacoaco	ctctcoac		
001	anganchard	receiger		

Gambar 3.3 Informasi data Cucumis melo

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Informasi data pada Gambar 3.3 merupakan isi informasi dari file secara *default*, file tersebut diunduh dengan format '.TXT' atau '.FASTA'. Dari contoh informasi data tersebut dapat dilihat pada baris pertama terdapat judul 'LOCUS' diikuti dengan deskripsi 'LC435071' yang merupakan nomor akses sekuen tersebut. Informasi selanjutnya '618 bp' yang berarti pada file tersebut memiliki 618 pasang basa atau panjang karakter dari sekuen tersebut. Informasi tanggal '18-JAN-2019' merupakan tanggal publikasinya yaitu 18 Januari 2019. Informasi lainnya terdapat beberapa keterangan yang menjelaskan bahwa data tersebut adalah data sekuen dari '*Cucumis melo* H' serta terdapat beberapa komentar pada judul 'COMMENT'. Untuk sekuen DNA-nya sendiri terbagi menjadi enam kolom dimana setiap kolom berisi sebelas baris sekuen dengan panjang karakter sepuluh. Pada awal baris sekuens terdapat angka 1

yang menunjukkan indeks awal mula karakter tersebut dan indeks lainnya dapat dilihat pada kolom sebelah kiri pada isi file. Inti atau isi dari file yang berupa sekuen DNA tersebut dimulai setelah kata 'ORIGIN' dan tanda '//' pada bagian paling bawah merupakan penutup atau akhir dari sekuen tersebut. Hal ini dapat memudahkan ketika file ingin langsung di proses tanpa merubah isi terlebih dahulu.

Jika hanya ingin mengambil sekuennya saja tanpa perlu ada informasi- informasi lain terkait dengan sekuen tersebut kita dapat melakukannya dengan cara klik pada tulisan "FASTA" seperti yang ada pada Gambar 3.2, maka akan muncul seperti pada Gambar 3.4 informasi data sekuen beserta namanya tanpa ada informasi lain diluar informasi tersebut.

Pada Gambar 3.4 terlihat isi dari data sekuen yang ingin dicari, data tersebut dapat kita unduh dengan berbagai macam format, pada umumnya menggunakan format fasta, atau langsung dapat kita salin dan masukan ke dalam *text editor* semacam aplikasi *notepad* yang kemudian dapat kita simpan dalam format .txt.

GenBank: LC435071.1

GenBank Graphics

Gambar 3.4 Contoh Isi Data Sekuen

(Sumber : National Center for Biotechnology Information)

Pada Gambar 3.5, data satu sekuen telah disimpan dengan format .txt, data diawali dengan tanda '<' dan dilanjut dengan nama dari sekuen tersebut, jika nama sekuen lebih dari satu kata, maka dapat disambung dengan simbol '_' jika tidak menggunakan simbol tersebut maka nama yang akan terbaca adalah kata pertama dari nama sekuen tersebut.

TIMUN APEL - Notepad

Gambar 3.5 Contoh Isi Data Sekuen

Pada penelitian ini dibutuhkan lebih dari satu sekuen, maka data sekuen lainnya dapat disimpan dibawah sekuen yang telah ada seperti pada Gambar 3.6.

TIMUN APEL - Notepad File Edit Format View Help >A1 (LC435064.1 Cucumis melo A gene for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, complete sequence) CTCTTTGGCTGCCTCCCCCCTTCCAACGCGTTTAAACAAAACCCCGGCGCAGGTCGCGCCAAGGAACTT ACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACTTGG TGTGAATTGCAGGATCCCGCGAACCACCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGGAGCCTTCTGGCCGAG GGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCCCACCACACACTCTCCCCATGCGGGGTCGTTGTGA AGGCAGGGACACACACTGGCCTCCCGTACGCACCGTCGTGCGGATGGCTTAAATTCGAGTCCTCGATGCT CGTCGTCGCGACACTACGGTGGTTGATTCAACCTCGGTGACGCGTCTCGACCTCGACGTCGACGTCACGG ACTCCTTCACGACCCTTCGAACGCCGCCCCTTAAAAGGACGACGCTCTCGAC >A2 (LC435065.1 Cucumis melo B gene for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, complete sequence) CATGCTCTTTGGCTGCCTCCCCCTTCCACGCGTTTAAACAAAACCCCGGCGCAGGTCGCGCCAAGGTT ACAACGACTCTTGGCAACGAATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCCGAAATGCGATACTTG GGGTGAATTGCAGGATCCCGCGAACCACCGAGTCTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGGAGCCTTCTGGCCG AGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCCCACCACACACTCTCCCCATGCGGGGTCGTTGT GAAGGCAGGGACACACACTGGCCTCCCGTACGCACCGTCGTGCGGATGGCTTAAATTCGAGTCCTCGATG CTCGTCGTCGCGACACTACGGTGGTTGATTCAACCTCGGTGACGCGTCTCGACCTCGACGTCGACGTCGACTTCAC GGACTCCTTCACGACCCTTCAGAACGCCGCCCCTAAAAGGACGACGCTCTCGAC >A3 (LC435066.1 Cucumis melo C gene for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, complete sequence) TCGATGCCTAAACATCAAACGACCGGGGAACGGGTTTAAAAACAAATTGTTTGCGTTAGGGGCGGGGGGA AGCATGCTCTTTGGCTGCCTCCCCCTTCCAACGCGTTTAAACAAAACCCCGGCGCAGGTCGCGCCAAG GAACTTGAAATGAATTCGGCTGTCCCCTGCCCCGGCCTCGGCGTGCGGGGGATGGAGCATTCTAGTCGTA TTACTAACAACGACTCTGGGCAACGGATATCTCGGGTCTCGCATCGAAGAACGTAGCGAAATGCGAT ACTTGGTGTGAATTGCAGGATCCCGCGAACCACCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGGGCCCGGAGCCTTCTG AGGCAGGGAAACACACTGGCCTCCCGTACGCACCGTCGTGCGGATGGCTTAAATTCGAGTCCTCGATGCT CGTCGTCGCGACACTACGGTGGTTGATTCAACCTCGGTGACGCGTCTCGACCTCGACGTCGACGTCACGG ACTTCTTCACGACCTTTTGAACGGCCCCCCTTAAAAGG

Gambar 3.6 Data Sekuen Lebih dari Satu

3.3.2 Sequence Alignment

Data sekuen DNA yang sudah disiapkan masih bersifat mentah, tidak dapat langsung digunakan untuk mencari *barcode*. Terdapat dua proses yang harus dilakukan hingga data siap digunakan untuk penelitian ini, yaitu proses *sequence alignment* dan *sequence trimming*. Untuk mencari sebuah *barcode* dari suatu spesies dibutuhkan lebih dari satu sekuen yang sejenis, oleh karena itu diperlukan proses *sequence alignment* atau penjajaran sekuen. Selanjutnya adalah *trimming sequence* atau pemotongan, yaitu proses yang dilakukan untuk membuat panjang antar sekuen menjadi sama, awal dan akhir sekuen sejajar atau sama, tujuannya untuk mengambil inti dari sekuen tersebut. Kedua proses *sequence alignment* dan *trimming sequence* dilakukan untuk membuat persamaan antar sekuen.

Untuk melakukan proses *sequence alignment* dibutuhkan bantuan perangkat lunak lainnya bernama clustalX, perangkat lunak ini dapat mudah didapatkan karena gratis dan semua pihak dapat menggunakannya. Aplikasi dapat diunduh pada halaman http://www.clustal.org/download/current/. Pada halaman tersebut dapat memilih versi berapa dan sistem operasi yang digunakan. Pada penelitian ini menggunakan clustalX versi 2.1 dan pilihan sistem operasi *windows*. Untuk memudahkan memahami proses dari *sequence alignment* ini menggunakan clustalX dapat melihat langkah berikut ini.

Preprocessing Data – Sequence Alignment		
begin		
1. Jalankan aplikasi ClustalX		
2. Pilih menu FILE - Load Squences		
3. Pilih file mentah yang akan dimasukan, Klik Open		
4. Pilih menu ALIGNMENT - Do Complete Alignment		
5. Beri nama untuk file yang akan menjadi output, pilih OK		
6. Untuk menyimpan ke dalam format FASTA, pilih menu FILE -		
Save Sequences As, Centang pada Fasta Format, pilih OK		
End		

Gambar 3.7. Langkah proses data sequence alignment

Pada Gambar 3.7, jika file sekuen tersebut dimasukan kedalam program perangkat lunak ClustalX maka akan seperti pada Gambar 3.8. Terlihat pada gambar terdiri dari beberapa sekuen dengan panjang sekuen yang berbeda satu dengan lainnya.



Gambar 3.8. Program ClustalX

Proses selanjutnya adalah mengikuti langkah demi langkah seperti pada Gambar 3.7. Jika sudah dilakukan semua langkah maka hasil *file* tersebut dapat dilihat pada Gambar 3.9. Terlihat perbedaannya sekuen sebelum dilakukan proses *alignment* dengan yang sudah.



CLUSTAL-Alignment file created [D:/BIOLOGI/SKRIPSI/data/DATA AKHIR FIX/DATA_SAMPEL_FIX.aln]

Gambar 3.9. Sekuen DNA setelah proses Alignment

Setelah melakukan *sequence alignment* langkah selanjutnya adalah melakukan *sequence trimming*. Proses ini dapat mengikuti seperti pada langkah di atas. Seperti pada contoh sebelumnya, setelah proses *sequence alignment* selesai, maka terdapat dua *file* output, yaitu *file* dengan format 'aln' dan *file* dengan format 'dnd'. Buka *file* dengan format 'aln' tersebut menggunakan aplikasi teks editor semacam *notepad*. Proses *sequence trimming* atau pemotongan sekuen DNA dilakukan pada bagian depan atau awal dan belakang atau akhir dari sekuen DNA. Berikut ini merupakan *sequence trimming* dari sekuen seperti pada contoh sebelumnya, dapat dilihat pada Gambar 3.10 dan Gambar 3.11.

DATA_SAMPEL_FIX - Notepad	
File Edit Format View Help	
CApple_cucumberH	TACTAACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Apple_cucumberE	TACTAACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Apple_cucumberA	TACTAACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Apple_cucumberF	TACTAACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Apple_cucumberG	TACTAACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Apple_cucumberD	TACTAACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Apple_cucumberB	TACAACGACTCTTGGCAACGAATATCTCGGCTCTCGCA
Cucumis_sativus	TACTAACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Oreosyce_africana	TACTCACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Cucumella_bryoniifolia	TACTCACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Myrmecosicyos_messorius	TACTCACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Cucumis_sagittatus	TACTCACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Mukia_maderaspatana	TACTCACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Cucumis_sacleuxii	TACTCACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Muellerargia_timorensis	TATTCACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Mukia_javanica	TACTCATAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Citrullus_lanatus	TATTCACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Citrullus_ecirrhosus	TACTCACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA
Citrullus_amarus	TATTCACAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCA

Gambar 3.10. Proses *sequence trimming* bagian depan

DATA_SAMPEL_FIX - Notepad	
File Edit Format View Help	
Apple_cucumberC	CCGAGGGCCCCTCTGCCTGGGGGTCATGCC
Cucumis_Melo	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
CApple_cucumberH	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Apple_cucumberE	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Apple_cucumberA	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Apple_cucumberF	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Apple_cucumberG	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Apple_cucumberD	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Apple_cucumberB	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Cucumis_sativus	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Oreosyce_africana	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Cucumella_bryoniifolia	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Myrmecosicyos_messorius	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCCCCCC
Cucumis_sagittatus	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGC
Mukia_maderaspatana	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGC
Cucumis_sacleuxii	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Muellerargia_timorensis	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCC
Mukia_javanica	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCC
Citrullus_lanatus	CCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCCCCT

Gambar 3.11. Proses *sequence trimming* bagian belakang

Seperti yang terlihat pada Gambar 3.10 bagian depan antar sekuen disamakan awalnya dengan basa DNA 'C'. Terlihat pada Gambar 3.10 keseluruhan sekuen dimulai dengan basa DNA'C', sehingga dari sekuen yang terdapat kotak merah

dihapus. Pada bagian belakang dilakukan penyejajaran seperti pada Gambar 3.10, namun bedanya jika pada bagian akhir atau belakang, indeks selanjutnya hingga akhir yang dihapus seperti pada Gambar 3.11. Tanda kotak merah pada Gambar 3.10 dan Gambar 3.11 merupakan sekuen DNA yang akan dipotong atau dibuang. Setelah karakter dari seluruh sekuen dihapus sesuai dengan Gambar 3.10 dan 3.11, maka file dapat di simpan. *File* tersimpan dengan format *default* seperti sebelumnya yaitu 'aln'. *File* tersebut dapat dibuka kembali dengan perangkat lunak clustalX dan dapat dikonversi menjadi format 'FASTA' menggunakan perangkat lunak clustalX.

3.3.3 Analisis Fenetik

Proses selanjutnya setelah dilakukan proses *sequences alignment* dan *sequences trimming* dilakukan proses analisis fenetik dengan merekonstruksi pohon fenetik dengan *Unweighted Pair Group Method With Averages* (UPGMA). Proses pembuatan pohon fenetik ini menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionery Genetics Analysis* (MEGA) seperti pada Gambar 3.12.



Gambar 3.12. Laman Perangkat Lunak MEGA

```
Preprocessing Data - Analisis fenetik
begin
1. Jalankan aplikasi MEGA X
2. Pilih menu ALIGN - Edit/build alignment
3. Pilih create a new aligment, Klik Ok
4. Pilih DNA - lalu pilih edit
5. Pilih insert sequence from file - pilih hasil alignment
   dengan format 'aln'
6. Setelah muncul file alignment tersebut - pilih Data
7. Pilih Export Alignment - klik export MEGA
8. Kembali ke menu utama MEGA - Pilih Phylogeny
9. Pilih Construct/Test UPGMA Tree
10.Pilih file yang sudah di export menjadi format mega
11.Pilih open - klik ok - muncul hasil rekonstruksi pohon
   UPGMA
12.Simpan hasil rekonstruksi pohon UPGMA
End
```

Gambar 3.13 Langkah proses data analisis fenetik

Pada Gambar 3.13, jika file hasil *alignment* dan *trimming* tersebut dimasukan kedalam program MEGA maka akan seperti pada Gambar 3.14. Terlihat pada gambar terdiri dari beberapa spesies dengan berbagai sekuen seperti pada Gambar 3.14.



Gambar 3.14. Program MEGA

Proses selanjutnya adalah mengikuti langkah demi langkah seperti yang telah dijelaskan pada Gambar 3.13. Jika sudah mengikuti semua langkah maka hasil *file* tersebut dapat membentuk sebuah rekonstruksi pohon UPGMA.

3.3.4 Membuat Konsensus Sekuen

Proses selanjutnya setelah dilakukan proses analisis fenetik menggunakan perangkat lunak MEGA dilakukan proses membuat konsensus sekuen dengan menentukan subsekuen dari sekuen DNA timun apel. Pada proses pembuatan konsensus sekuen yang dilibatkan dalam hal ini hanya sekuen dari tanaman timun apel saja karena yang difokuskan untuk pembuatan DNA *Barcode* pada penelitian ini. Konsensus sekuen dilakukan dengan perangkat lunak lainnya dengan menggunakan BioEdit *Sequence Alignment Editor* seperti pada Gambar 3.15.



Gambar 3.15. Laman Perangkat Lunak BioEdit

```
Preprocessing Data - Membuat Konsensus Sekuen
begin
1. Jalankan aplikasi BioEdit
2. Pilih menu File - klik open
3. Pilih daftar sekuen tanaman timun apel dengan format
    'txt.'
4. Pilih Alignment - klik Create Consensus Sequences
5. Untuk menyimpan file, pilih menu FILE - Save As, pilih
    OK, file akan tersimpan dengan format FASTA
End
```

Gambar 3.16. Langkah proses data konsensus sekuen

Pada Gambar 3.16, file sekuen DNA timun apel diinput ke dalam perangkat lunak BioEdit akan terlihat seperti pada Gambar 3.17. Terlihat pada gambar terdiri dari sekuen tanaman timun apel dengan berbagai sekuen seperti pada Gambar 3.17.



Gambar 3.17. Input data sekuen DNA tanaman timun apel

Proses selanjutnya adalah mengikuti langkah demi langkah seperti pada Gambar 3.16. Jika sudah dilakukan semua langkah maka hasil *file* tersebut dapat dilihat seperti Gambar 3.18, terlihat dengan kotak berwarna hitam hasil dari konsensus sekuen dari tanaman timun apel.



Gambar 3.18. Hasil dari membuat konsensus sekuen

Hasil dari membuat konsensus sekuen yang berupa deretan subsekuen dari beberapa spesies tanaman timun apel tersebut disimpan dengan format 'doc.' Untuk dilakukan proses selanjutnya berupa uji coba sekuen tersebut dengan proses *in-silico PCR*, namun dilakukan terlebih dahulu desain primer.

3.3.5 Desain Primer

Pada proses desain primer ini menggunakan perangkat lunak *FastPCR* dengan melibatkan data hasil konsensus sekuen pada proses sebelumnya seperti pada Gambar 3.19. Proses pembuatan desain primer tersebut untuk mengetahui daerah mana saja pada konsensus sekuen tersebut yang dapat dijadikan target untuk menghasilkan kandidat-kandidat primer. Perangkat lunak *FastPCR* ini digunakan untuk mengoptimalkan desain primer untuk urutan DNA atau cDNA target. Optimalisasi primer memiliki dua tujuan: efisiensi dan selektivitas. Selektivitas primer mensyaratkan bahwa pasangan primer tidak secara kebetulan mengikat ke lokasi acak selain dari target tanaman itu sendiri. Desain pasangan primer pendek atau panjang yang sesuai hanya satu tujuan dari prediksi produk PCR. Informasi lain yang disediakan oleh perangkat lunak *FastPCR* dalam *in-silico* dapat mencakup penentuan lokasi primer, orientasi, panjang setiap amplicon.

FastPCR 6.6				- 1	6	×
File Edit Search Converting PCR Database Alignment Run Help						
		014 014 0				
M=(A/C) R=(A/G) W=(A/T) S=(G/C) Y=(C/T) K=(G/T) V=(A/G/C) H=(A/C/T) D=(A/G/T) S=(C/G/T) N=(PCR Primer Design is allog DCD. Drimer Test. Drimers List Applicate Destriction	(A/G/C/1), U=1 and I Clustering Concelling LTD Search MITE Search	DNARNA				
For thine besign [in slice FCR Filmer Test Filmers List Analysis Resulction	Clustering Searching LTR Search MITE Search	SSR Search Tools Polymerase Cycling .	1			
Parameters for PCR product analysis	PCR primer design options					
Synchronizing Tm(*C) and dG(kcal/mol) for primer pair (±): 3	✓ The secondary (non-specific) binding test	Inverted PCR				
Limit for compatible combination of pair primers: 10	Linguistic complexity control	Circular DNA				
E Delumerace extension clearing (OE DCD)	Overlapping primers					
Polymerase extension cloning (OE-PCR) Multiplex DCP	C >> T bisulphite conversion	Unique PCR				
		Group-specific PCR				
Minimal difference between multiplex PCR products (bp): 0						
Maximal difference between Ta of multiplex PCR products (±°C):						
General Sequence(s) Additional sequence(s) or pre-designed primers (probes) list	t Results report					
			.			
			21:49	12/03/	2020	

Gambar 3.19 Laman Perangkat Lunak FastPCR

Preprocessing Data – Desain Primer
begin
1. Jalankan aplikasi FastPCR
2. Pilih menu File - klik open file
3. Pilih file hasil konsensus sekuen – klik open
4. Pilih PCR Primer Design - klik RUN
5. Untuk menyimpan file, pilih menu FILE - Save As, pilih OK, file akan tersimpan dengan format 'txt.'
End

Gambar 3.20. Langkah proses Desain Primer

Pada Gambar 3.20, file konsensus sekuen timun apel diinput ke dalam perangkat lunak FastPCR akan terlihat seperti pada Gambar 3.21. Terlihat pada Gambar 3.21 terdiri dari kandidat-kandidat primer yang memiliki kriteria baik pada primer tersebut. Setelah melakukan desain primer kandidat-kandidat dari primer tersebut disimpan menjadi sebuah *file* dengan format 'doc.' untuk dilakukan proses berikutnya uji coba *in-silico* PCR.

Ella Esta C	the Computing DCD Data	AL	cont C										37	- 6	ı ×
Eile Edit Searc	Ch Converting PCK Database		hent Ku			-	•								
		007			E 19 4	• ++	P								
M=(A/C) R=(A/G) W	V=(A/T) S=(G/C) Y=(C/T) K=(G/T) V=(A/G/C) H=((A/C/T) D=I	(A/G/T) B=	(C/G/T) N	=(A/G/C/T), U=T and	1	(DNA RNA			
PCR Primer Des	sign in silico PCR Primer Test	Primers	s List Ana	lysis R	striction	Cluste	ring Se	arching	LTR Search MITE Search	h SS	R Search Tools Polymerase C	Cycling			
Pr	arameters for PCR product anal	ysis				PCR	primer d	esign op	tions						
Synchron	nizing Tm(*C) and dG(kcal/mol) fo	or primer p	pair (±):	3		E T	hesecon	dany (not	-specific) hinding test	100	Inverted DCP				
	timit for some effets combined			40		10-1	ne secon	uary (noi	r-specific) billoning test		inverted PCK				
	Limit for compandie combinatio	n of pair p	nmers.	10		₽ L	inguistic	complexi	ty control	E	Circular DNA				
			DCP)			Г	verlappin	a primer	s						
	- Polymerase extension c	oning (Of	-PCNJ			-	This	debile		Г	Unique PCR				
	Multiplex PCR					L C	>> f bis	uipnite ci	onversion	-	Come analis DCD				
Minima	al difference between multiplex PC	R produc	ts (bp):	0						- 1	Group-specific PCK				
Manipus di Mana				0	-										
Maximal differe	ence between 1a of multiplex PCI	< products	s (±°C)[0											
Commenter de	coal additional annual (a) a				hard for	DCD	nimare e	lacian ra	eut l						
Sequences: 1 :	624 Additional sequence(s) o	r pre-desi	igned prir	mers (pro	Des) lis	PUR	primers c	iesign re	suit						
			-									1			
PrimerID	Sequence (5'-3') Lengt	h(nt)	Tm(°C)	dG (kca	1/mol)	Tm_3'	end("C)	CG (%)	Linguistic_Complexit	y(\$)	Primer_Quality(%)	^			
PrimerID 1	Sequence (5'-3') Lengt	th (nt)	Tm(*C)	dG (kca	1/mol)	Tm_3'	end("C)	CG(%)	Linguistic_Complexit	Y(\$)	Primer_Quality(%)	^			
PrimerID 1 1F1_1_2-24	Sequence(5'-3') Lengt cgatgcctaaacatcaaacgacc	23	Tm(*C) 56,8	dG (kca	1/mol) 34,3	Tm_3'	end (*C)	CG(%)	Linguistic_Complexit	.γ(≹)	<pre>Primer_Quality(%)</pre>	^			
PrimerID 1 1F1_1_2-24 1F2_1_95-116	Sequence(5'-3') Lengt cgatgcctaaacatcaaacgacc cccttccaacgcgtttaaacaa	23 22	Tm(°C) 56,8 56,3	dG (kca -28,4 -27,5	1/mol) 34,3 31,2	Tm_3*	end (*C) 83 82	CG(%) 80 76	Linguistic_Complexit	τy(ŧ)	<pre>Primer_Quality(%)</pre>	^			
PrimerID 1 1F1_1_2-24 1F2_1_95-116 1F3_1_143-165	Sequence(5'-3') Lengt cgatgcctaaacatcaaacgacc cccttccaacgcgtttaaacaa actgaaatgaattcgcctgtcc	23 22 23	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8	dG (kca -28,4 -27,5 -27,8	1/mol) 34,3 31,2 39,6	Tm_3* 47,8 45,5 43,5	end (*C) 83 82 83	CG(%) 80 76 79	Linguistic_Complexit	:γ(t)	Primer_Quality(%)	^			
PrimerID 1 1F1_1_2-24 1F2_1_95-116 1F3_1_143-165 1F4_1_190-210	Sequence (5'-3') Lengt cgatgcctaaacatcaaacgacc cccttccaacgcgtttaaacaa acttgaaatgaatcgcotgcc ggcatggagcatttagtcgt	23 22 23 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8 56,4	dG (kca -28,4 -27,5 -27,8 -26,6	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7	Tm_3' 47,8 45,5 43,5 52,4	end (*C) 83 82 83 87	CG(%) 80 76 79 87	Linguistic_Complexit	:γ(%)	Primer_Quality(%)	^			
PrimerID 1 1F1_1_2-24 1F2_1_95-116 1F3_1_143-165 1F4_1_190-210 1F5_1_192-216 1F5_1_22216	Sequence (5'-3') Lengt cgatgcctaaacatcaaacgacc cccttccaacgcgtttaacaa actggaatgaattcgctgtcc ggcatggagcattctagtcgt catggagcattctagtcgtattact	23 22 23 21 25	Tm(°C) 56,8 56,3 55,8 56,4 54,1	dG (kca -28,4 -27,5 -27,8 -26,6 -28,3	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5	Tm_3', 47,8 45,5 43,5 52,4 40,0	end (*C) 83 82 83 87 91 75	CG(%) 80 76 79 87 87	Linguistic_Complexit	:γ(%)	Primer_Quality(%)	^			
PrimerID 1 1F1_1_2-24 1F2_1_95-116 1F3_1_143-165 1F4_1_190-210 1F5_1_192-216 1F6_1_213-234 1F7_1_222-249 1F7_1_222-259 1F7_1_222-259 1F7_1_222-259 1F7_1_222-259 1F7_1_222-259 1F7_1_222-259 1F7_1_222-259 1F7_1_222-259 1F7_1_222-25	Sequence (5'-3') Lengt cgatgcctaaacatcaaacgcg cccttccaacgcgtttaaacaa actgaaatgaattcgcctgtcc ggcatggagcattctagtcgt tactacaacgactctcggcaa actgaactccagtcgttatact	ch (nt) 23 22 23 21 25 22 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8 56,4 54,1 55,3 55,3	dG (kca -28,4 -27,5 -27,8 -26,6 -28,3 -27,0 -26,2	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2	Tm_3* 47,8 45,5 43,5 52,4 40,0 45,5	end (*C) 83 82 83 87 91 75 75	CG(%) 80 76 79 87 87 87 75 75	Linguistic_Complexit	.γ(∦)	<pre>Primer_Quality(%)</pre>	^			
PrimerID 1 1F1_1_2-24 1F2_1_95-116 1F3_1_143-165 1F4_1_190-210 1F5_1_192-216 1F6_1_213-234 1F7_1_223-243 1F7_1_223-243	Sequence (5'-3') Lengt cyatycotaaacatcaaacgacc cottocaacgogtttaaacaa acttgaaatgaattogoctgocc ggoatggagcattotagtogt catggagcattotagtogtattatt tactaacaacgattoggcaa gacttoggcaacggtattot	ch (nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8 56,4 54,1 55,3 55,6 55,6	dG (kca -28,4 -27,5 -27,8 -26,6 -28,3 -27,0 -26,3 -26,3	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 29,7	Tm_3' 47,8 45,5 43,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6	end (*C) 83 82 83 87 91 75 79 82	CG(%) 80 76 79 87 87 87 75 75	Linguistic_Complexit	:γ(\$)	<pre>Primer_Quality(%)</pre>	^			
PrimerID 1 1F1_1_2-24 1F2_1_95-116 1F3_1_143-165 1F4_1_190-210 1F5_1_213-234 1F7_1_223-243 1F8_1_255-275 1F8_1_255-275	Sequence (5'-3') Lengt cyatycctaaacatcaaacgacc cccttccaacgogtttaaacaa acttgaagaattcgoctgtcc ggcatygagcattctagtogt catggagcattctagtogt actggagcattctagtogtattact tactaacaacgactctogcaa gacttcggacaacggattact	ch (nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8 56,4 54,1 55,3 55,6 55,5 55,5	dG (kca -28,4 -27,5 -27,8 -26,6 -28,3 -27,0 -26,3 -26,3 -26,5	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 38,7 26,6	Tm_3* 47,8 45,5 43,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6 47,6	end (*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 82	CG(%) 80 76 79 87 87 87 75 75 82 82	Linguistic_Complexit	:γ(\$)	Frimer_Quality(%)	^			
PrimerID 1 IF1_1_2-24 IF2_1_95-116 IF3_1_143-165 IF4_1_190-210 IF5_1_192-216 IF6_1_213-234 IF7_1_223-243 IF8_1_255-275 IF9_1_255-275 IF9_1_255-275	Sequence (5'-3') Lengt cgatgoctasacaccasacgacc actigasacgagttasacca actigasacgagttasacca actigasacgattocgoctgtoc catggagattocagtogt tactasacgactocggca gactocggocacggattatt togatgaagaacgtagcoga togagaagtagcoga	ch (nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8 56,4 54,1 55,3 55,6 55,5 55,5 55,5 55,5	dG (kca -28,4 -27,5 -27,8 -26,6 -28,3 -27,0 -26,3 -26,3 -26,5 -26,4	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 38,7 36,9 -25,2	Tm_3' 47,8 45,5 43,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6 47,6 21,2	end (*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 82 82 47 6	CG(%) 80 76 79 87 87 87 75 75 82 82 82 82	Linguistic_Complexit	:γ(#)	Primer_Quality(%)	^			
PrimerID 1 IF1_1_2-24 IF2_1 95-116 IF3_1_143-165 IF4_1 190-210 IF5_1 192-216 IF6_1_213-234 IF7_1_223-243 IF8_1_255-275 IF9_1_255-275 IF10_1_266-286 IF1_1_266-286 IF1_1_26-286	Sequence (5'-3') Lengt cgatgoctaaacatcaaacgaco cottocaacgogtttaaacaa actigaacgatctagocottoc ggoctgggagattctagtogat tactaacaacgatctcggroaa gactcoggaagatctagogaa togatgaagaacgaaggatact togatgaagaacgaaggatact	ctt	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8 56,4 54,1 55,3 55,6 55,5 55,5 21	dG (kca -28,4 -27,5 -27,8 -26,6 -28,3 -27,0 -26,3 -26,5 -26,4 55,2	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 38,7 36,9 -26,2 -26	Tm_3' 47,8 45,5 43,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6 47,6 31,2 25,7	end("C) 83 82 83 87 91 75 79 82 82 47,6 47,6	CG(1) 80 76 79 87 87 75 82 82 90 82	Linguistic_Complexit	:γ(#)	Primer_Quality(%)	^			
FrimerID 1 IFI_12-24 IFI_15-116 IF3_143-165 IF4_1190-210 IF5_1192-216 IF5_123-234 IF7_1223-243 IF7_1223-243 IF7_1255-275 IF10_1266-286 IF11_265-285 IF10_1265-285 IF10_1265-286 IF11_265-286 IF11_265-286 IF11_265-286 IF11_265-286 IF11_265-286 IF12_1272-296 IF12_1272-296 IF12_1272-296 IF12_1272-296 IF12_1272-296 IF12_1272-296 IF12_1572-296	Sequence (5'-3') Lengt cgatgoctaaactcaacguco cocttocacgottaaacta actguaatgaactcaactguco ggatguagactcaatcagtoc ggatguagactcaatcagtoc gatguagactcaatcagtoc actoccagoaacggatatca tacacacaggatguagact tgatgaagacgtagocgaatgocga tgatguagacgtagocgaatgoc s cgocgaatgocgatatto s cgocgaatgocgatatto s cgocgaatgocgatatto	th(nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21 21 21 21 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8 56,4 54,1 55,3 55,6 55,5 55,5 21 21 24	dG (kca -28,4 -27,5 -27,0 -26,6 -28,3 -27,0 -26,3 -26,5 -26,4 55,2 56,3 56,1	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 38,7 36,9 -26,2 -26,6 -28,6	Tm_3' 47,8 45,5 43,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6 31,2 35,7 31,9	end(*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 82 47,6 47,6 41,7	CG(%) 80 76 79 87 87 87 75 82 82 90 92 81	90 87 75	:Y(\$)	Primer_Quality(%)	~			
PrimerID 1 1F1_1_2-24 1F2_1_95-116 1F3_1_143-165 1F4_1_190-210 1F5_1_192-216 1F6_1_213-234 1F7_1_223-243 1F7_1_223-243 1F10_1_265-275 1F10_1_265-275 1F10_1_265-285 1F11_1_272-295 1F12_1_272-275 1F12_1_272-275 1F12_1_272-275 1F12_1_272-275 1F12_1_772-275 1F12_1_772-27	Sequence (5'-3') Lengt cgatgoctaascatcaasgacc cocttocasgguttaasca actugaastgaatcagoctgocg gocatgogocatcagtogt catgogagatctogtogt gactocogocacggatatct tacaasacgguttoggaa gactocogocacggatatct tgatgaagaactagocgaa tgagaacgtagocgaa sgcogaatcgogtact s gacggaatcgogtactt	:h(nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21 21 21 21 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8 56,4 55,6 55,5 55,5 55,5 55,5 21 21 24 22	dG (kca -28,4 -27,5 -27,6 -26,6 -28,3 -27,0 -26,3 -26,5 -26,4 55,2 56,3 56,1 56,0	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 38,7 36,9 -26,2 -26,8 -28,9 -27,3	Tm_3' 47,8 45,5 43,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6 31,2 35,7 31,9 34,0	end(*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 82 47,6 41,7 45,5	CG(%) 80 76 79 87 87 87 75 82 82 90 92 81 88	SO 87 75	.γ(<i>\$</i>)	Primer_Quality(%)	^			
PrimerID 1 1 1 171 1 2-24 172 1 95-116 173 1 143-165 174 1 190-210 175 1 192-216 176 1 123-234 178 1 255-275 1710 1 266-286 1711 1 266-286 1711 266-285 1712 1 272-255 1713 1 278-299 1710 1 2	Sequence (5'-3') Lengt cgatgoctaaactcaacguco cocttocacgottaaacta actuguaatgaactcaacguco ggatgugaactcatcagtoog ggatgugaactcagtoog actuguaactcagtoog actuguaactcagtoog actuguaactcagtoog actuguaactcagtoog actuguaactuguaacgu actuguaacgu ageogaactgoguaat 9 ageogaactgogutactu 9 ageogaactgogutactu 9 gogtaactuguguaat	:h(nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21 21 21 21 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8 56,4 55,3 55,4 55,3 55,5 55,5 55,5 21 21 24 22 23	dG (kca -28,4 -27,5 -27,8 -26,6 -28,3 -26,3 -26,5 -26,4 55,2 56,3 56,1 56,0 54,6	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 36,9 -26,2 -26,8 -28,9 -27,3 -27,3	Tm_3' 47,8 45,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6 47,6 31,2 35,7 31,9 34,5	end(*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 82 47,6 41,7 45,5	CG(%) 80 76 79 87 87 87 75 82 82 90 92 81 88 88	Linguistic_Complexit 50 87 75 75 82	£γ(\$)	Primer_Quality(%)				
PrimerID 1 1 172_1_95-116 173_1_143-165 174_1_195-110 175_1_192-216 176_1_213-23 176_1_223-243 177_1_223-243 178_1_225-275 179_1_225-275 179_1_265-275 171_265-265 171_265-265 171_272-255 172_272-25	Sequence (5'-3') Lengt cgatpoctaaacatcaacgacc cocttocaacgucttaaacaa actugaaatgaatcagoctgtoo ggactgagogatctoagtogt catggagoatctoagtogt tactaaacaggatctoagtogt gactocogoaacggatatct togatgaagaactgacggaa tgaagaacgtagocgaa sgocgaaatgogtaactg s ggatatctggtotgaat s ggatatctggtotgaat s ggatatctggtotgaat	:h(nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21 21 21 21 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,8 54,1 55,3 55,6 55,5 55,5 21 21 21 24 22 23 22	dG (kca -28,4 -27,5 -27,6 -26,6 -28,3 -27,0 -26,3 -26,5 -26,4 55,2 56,3 56,1 56,0 54,9 56,2	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 38,7 36,9 -26,2 -26,8 -28,9 -27,3 -27,3 -27,1	Tm_3', 47,8 45,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6 31,2 35,7 31,9 34,0 34,5 35,0	end(*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 47,6 41,7 45,5 43,5 50,0	CG(%) 80 76 79 87 87 87 75 82 82 90 92 81 88 88 88	90 87 75 82 84	-γ(#)	Primer_Quality(%)				
PrimerID 1 1 1F1 1.2-24 1F2 1.95-116 1F3 1.143-165 1F5 1.192-216 1F5 1.192-216 1F7 1.223-243 1F7 1.255-275 1F10 1.265-265 1F11 1.265-265 1F12 1.272-295 1F12 1.272-295 1F14 1.200-302 1F14 1.200-302 1F16 1.300-328	Sequence (5'-3') Lengt cgatgoctamactcamacguco cocttocampost actiguatigamatigantcoptage actiguatigamacticoptage gatgatgamacticoptage actiguatigamacticoptage actiguatigamacticoptage tactamacange tactamacange tactamacange tactamacange tactamacange tactamacange tactamacange tactamacange tactamacange tactamacange tactamacange contamacange second se	th (nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21 21 21 21 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,6 56,4 54,1 55,3 55,5 55,5 55,5 21 21 22 22 23 22 22 21	dG (kca -28,4 -27,5 -27,6 -26,6 -28,3 -27,0 -26,3 -26,5 -26,4 55,2 56,3 56,1 56,0 54,9 56,2 55,0	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 38,7 36,9 -26,2 -26,8 -28,9 -27,3 -27,3 -27,1 -26,1 -26,2 -27,3 -27,1 -26,5 -26,2 -27,3 -27,3 -27,3 -27,1 -26,5 -26,5 -26,5 -27,3 -27,5 -27	Tm_3* 47,8 45,5 43,5 52,4 40,0 52,4 47,6 47,6 31,7 31,9 34,0 34,5 35,0 8 35,0 8 34,0 34,5 35,0 8 34,0 34,5 35,0 8 34,0 35 35,0 34,0 35 35,0 35,0 35,0 35,0 35,0 35,0 35,0	end(*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 82 47,6 41,7 45,5 43,5 50,0 47,6	CG(%) 80 76 79 87 87 87 87 87 82 82 90 92 81 88 88 88 88 87 97	50 87 75 75 82 84 79	-Υ (#)	Primer_Quality(%)				
PrimerID 1 1 172_1_2-24 172_1_95-116 174_1_95-116 174_1_95-116 175_1_192-216 175_1_192-216 176_1_213-234 177_1_223-243 178_1_225-275 178_1_225-275 171_1_255-275 171_25-269 171_2-1278-269 171_4_28-305 171_6_1_28-305 171_6_1_35-336 171_5-326 171_31-336 175_328 171_31-336 175_328 175_358 175_58 175_58	Sequence (5'-3') Lengt cgatpoctaaacatcaacgacc cocttocaacgucttaaacaa actugaaatgaatcagoctgtoo ggactgagoatctoagtogt catggagoatctagtogtaatact tactaaacaggactctoggcaa gactocogcaacggatact tgagaacgtagocgaatggota 5 cgaacggaatggotactt 5 cgaacggaatggotactt 5 cgaacggaatggotactt 5 cgaacggaatggotactt 5 cgaacggaatggotactt 6 cgagocgaatggotactt 6 cgaacggaatggotactt 6 cgaacggaatggotactt	th (nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21 21 21 21 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,6 56,4 55,5 55,5 55,5 21 21 24 22 23 22 21 22	dG (kca -28,4 -27,5 -27,6 -26,6 -26,3 -27,0 -26,3 -26,4 55,2 56,3 56,1 56,0 54,9 56,2 55,0 56,1	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 39,5 38,7 36,9 -26,2 -26,8 -28,9 -27,3 -27,3 -27,1 -26,0 -27,4	Tm_3', 47,8 45,5 43,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6 47,6 31,2 35,7 31,9 34,0 34,5 35,8 36,5	end(*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 47,6 47,6 41,7 45,5 50,0 47,5 50,0	CG(%) 80 76 79 87 87 87 87 82 90 92 81 88 88 88 88 88 88 88 88 88 88 88 88	90 87 75 82 84 79 88	-Υ (#)	Primer_Quality(%)				
PrimerID 1 172_1_2-24 172_1_95-116 174_1_95-216 175_1_190-210 175_1_190-210 176_1_210-23 178_1_210-23 178_1_210-23 178_1_250-275 171_2_10-25 171_2_10-20 171_2_10-302 171_2_10-302 171_2_10-302 171_10-31 176_1_30-322 171_3_1-35-336 171_10-32 171_10-33 171_10-32 171_	Sequence (5'-3') Lengr cgatgoctaasctcaasgucc occticcaagouctaasctcaasgucc occticcaagouctaasctaa atgraatgaastcascogucc gatggaagoatcictaatog tactaacaagouctaagouga tactaacaagouctaagouga tactaacaagouctaagouga tagaagaagougaasgugatactu 5 cgaasgogatactug 9 cgatactuggugaatggaatactu 9 cgatactuggugaatggatactu 9 cgatactuggugaatggatactu 9 cgatactuggugaatggatactu 9 cgatactuggugaatgugaa 9 cgatactuggugaatgugaa 9 cgatactuggugaatgugaa 9 cgatactuggugaatgugaa	th (nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,3 55,6 55,4 55,5 55,5 55,5 55,5 21 24 22 21 22 22 21 22 21	dG (kca -28,4 -27,5 -27,6 -26,3 -27,0 -26,3 -26,3 -26,4 55,2 56,3 56,1 56,0 54,9 56,2 55,0 56,2 55,0 56,1 55,8	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 38,7 -26,2 -26,8 -26,8 -26,9 -27,3 -27,1 -26,0 -27,4 -26,0 -27,4 -26,2 -27,4 -26,5 -27,4 -26,5 -26,5 -27,4 -26,5 -27,4 -26,5 -26,5 -27,4 -26,5 -27,4 -26,5 -27,4 -26,5 -27,4 -26,5 -27,4 -26,5 -27,4 -26,5 -27,4 -26,5 -27,5 -2	Tm_3", 47,8 45,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6 31,2 35,7 31,9 34,0 27,8 36,5 27,8 36,5 27,1	end(*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 82 47,6 41,7 45,5 43,5 50,0 47,6 45,5 43,5 50,0 47,6 45,5 43,5 50,0 47,6 45,5 43,5 50,0 47,6 45,5 50,0 47,6 45,5 50,0 47,6 45,5 50,0 47,6 45,5 50,0 47,6 45,5 50,0 47,6 45,5 50,0 47,6 45,5 50,0 47,6 45,5 47,6 47,6 47,6 45,5 47,6 47,6 45,5 47,6 47,6 45,5 47,6 45,5 47,6 47,6 45,5 47,6 47,6 47,6 47,6 47,6 45,5 47,6 47,	CG(%) 80 76 79 87 87 87 87 87 82 82 90 92 81 88 88 88 88 88 79 88 90	90 87 75 75 82 84 80	-Υ (#)	Primer_Quality(%)				
PrimerID 1 172_1_2-24 172_1_95-116 173_1_143-165 174_1_190-210 176_1_123-216 176_1_23-234 178_1_23-234 178_1_235-275 1710_1_265-265 1711_1_265-265 1712_1_272-255 1713_1_276-259 1714_1_20-305 1715_1_243-305 1715_1_36-336 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_36-365 1715_1_56	Sequence(5'-3') Lengt cgatgoctaaacatcaacgacc cocttocaacgucttaaacaa actugaaatgaatcagoctgacc gactocogocatcagtogt catggagaatctagtogtaatact tactaaacaggactctoggcaa gactocogocacggatact tgaagaacgtagocgaa tgaagacgtagocgaatggc 5 cgaaacgogatactu 9 ggatactuggtogaat 9 ggatactuggtogaat	th (nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21 21 21 21 21 21 21	Tm(*C) 56,8 56,8 56,4 54,1 55,3 55,5 55,5 55,5 21 21 22 22 23 22 21 22 21 22 21 22 23	dG (kca -28,4 -27,5 -27,6 -26,3 -27,0 -26,3 -26,3 -26,3 56,2 56,3 56,1 56,0 54,9 56,2 55,0 56,1 55,0 56,1 55,7	1/mol) 34,3 31,2 39,6 30,7 28,5 39,2 30,5 39,2 30,5 38,7 -26,2 -26,8 -28,9 -27,3 -27,1 -26,0 -27,4 -26,5 -28,5 -27,4 -26,5 -28,5 -28,5 -27,4 -26,5 -28,5 -28,5 -27,4 -28,5 -27,3 -27,1 -26,6 -27,4 -28,5 -28,5 -28,5 -27,3 -27,5 -26,5 -27,4 -26,5 -28,5 -28,5 -27,5 -27,5 -27,5 -27,5 -27,5 -26,5 -27,5 -27,5 -26,5 -27,5 -27,5 -26,5 -27,5 -26,5 -27,5 -27,5 -26,5 -27,5 -26,5 -27,5 -26,5 -27,5 -26,5 -27,5 -26,5 -27,5 -26,5 -27,5 -26,5 -27,5 -26,5 -27,5 -26,5 -27,5 -28,5 -28,5 -27,5 -27,5 -28,5 -28,5 -28,5 -27,5 -28,5 -28,5 -28,5 -28,5 -27,5 -28,	Tm_3", 47,8 45,5 52,4 40,0 45,5 52,4 47,6 31,2 35,7 31,9 34,0 34,0 35,0 27,8 36,5 27,1 33,1	end(*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 82 47,6 47,6 41,7 45,5 43,5 50,0 47,6 45,5 47,6 47,6 47,6 47,6 47,6 47,6 47,7 8,5 47,6 47,8	CG(%) 80 76 87 87 87 82 82 90 92 81 88 88 88 88 88 88 79 88 95	50 50 87 75 75 82 84 85 80 93	ΥΥ (\$)	Primer_Quality(%)				
PrimerID 1 172_1_2-24 172_1_95-116 173_1_143-165 174_1_190-210 175_1_192-216 176_1_212-243 177_1_223-243 178_1_225-275 1710_1_265-286 1711_265-285 1711_265-285 1711_265-285 1712_1_272-295 1712_1_272-295 1713_272-295 1714_1_280-302 1715_1_315-336 1716_1_308-322 1717_1_315-336 1716_1_472-494 1716_1_472-500 1716_1_1_1_1_1_1_1_1_	Sequence (5'-3') Leng cgatgoctaasctcaasgucc occticcaagocttaascta atgraatgaastcatcatagucc atgraatgagocttcaatca atgraatgagocttcaatca tactaacaagocttcagtoc gatgagagocttcagtoc atgraagagocttcagtoc atgraagagocttcagtoc atgraagagocttaacoc tactaacaagoctaacoc atgraagagoctaacoc	th (nt) 23 22 23 21 25 22 21 21 21 21 21 21 21 21 21 ctt ggg atcc gga atcc gga att gtcct gtct att gtcct gtcc	Tm(*C) 56,8 56,3 55,6 56,4 54,1 55,6 55,5 55,5 21 21 24 22 21 22 21 23 22 21 23 23	dG (kca -28,4 -27,5 -27,6 -26,6 -28,3 -26,3 -26,3 -26,4 55,2 56,3 56,1 56,2 56,1 56,2 56,1 55,8 56,1 55,8 56,4	1/mol) 34,3 31,2 39,6 28,5 39,2 30,7 28,5 39,2 30,5 38,7 36,9 -26,2 -26,8 -27,3 -27,3 -27,3 -27,1 -26,5 -27,4 -26,5 -28,4 -28,5 -28,4 -28,5 -27,3 -27,3 -27,4 -26,5 -28,5 -28,5 -28,5 -28,5 -27,3 -27,4 -26,5 -28,5 -28,5 -28,5 -28,5 -27,3 -27,4 -26,5 -28,5	Tm_3', 47,8 45,5 52,4 43,5 52,4 47,6 31,2 35,7 31,9 34,0 34,5 35,0 34,5 36,5 27,1 33,1 8,8	end(*C) 83 82 83 87 91 75 79 82 82 82 87,6 47,6 41,5 50,0 47,6 43,5 50,0 47,6 47,6 47,6 47,7 43,5 50,0 47,6 47,8	CG(%) 80 76 79 87 87 87 75 82 82 90 92 81 88 88 88 88 88 88 88 88 88 88 88 88	90 87 75 75 82 84 99 93 77	ΥY(\$)	Primer_Quality(%)				

Gambar 3.21 Hasil Desain Primer

3.3.6 Uji Coba In-silico PCR

In silico PCR mengacu pada alat komputasi yang digunakan untuk menghitung hasil reaksi berantai polimerase (PCR). Alat ini digunakan untuk mengoptimalkan desain primer untuk sekuens DNA atau cDNA target. Desain pasangan primer pendek atau panjang yang sesuai hanyalah salah satu tujuan prediksi produk PCR. Informasi lain yang disediakan oleh alat PCR in silico dapat mencakup penentuan lokasi primer, orientasi, panjang setiap amplikon. Template DNA diamplifikasi dengan siklus berulang dua atau tiga langkah termasuk suhu (1) denaturasi panas (denaturasi template DNA untai ganda menjadi untaian tunggal), (2) annealing (annealing primer pada DNA *template*), dan (3) reaksi ekstensi (perpanjangan primer dengan DNA polimerase) (Kalendar et al., 2011). Pada tahap ini kandidat-kandidat primer yang baik di uji coba pada beberapa spesimen yang akan menjadi target, namun dalam pemilihan spesimen tidak semuanya melainkan beberapa spesimen yang mewakili pada genus nya, seperti pada genus Cucumis, Cucurbita, Sechium, Citrullus, Benincasa, Coccinia, dan outgroup dari penelitian ini genus Begonia. Pada proses uji coba in-silico ini tetap menggunakan perangkat lunak FastPCR seperti pada Gambar 3.22, karena pada perangkat lunak FastPCR ini bisa digunakan untuk desain primer dan in-silico PCR



Gambar 3.22. Laman Perangkat Lunak FastPCR

```
Preprocessing Data - In-silico PCR
begin
1. Jalankan aplikasi FastPCR
2. Pilih in - silico PCR - klik in-silico PCR
3. Buka File hasil desain primer - pilih salah satu kandidat
primer untuk di uji coba - lakukan copy file
4. Paste file tersebut pada laman 'additional sequences'
5. Pilih salah satu sekuen DNA - lakukan copy file pada
salah satu sekuen DNA
6. Paste file pada laman 'general sequence'
7. Pilih RUN - hasil akan muncul pada laman 'PCR result'
End
```

Gambar 3.23. Langkah proses in-silico PCR

Pada Gambar 3.23, file desain pimer dipilih salah satu kandidat primer yang akan diuji coba dimasukan ke dalam perangkat lunak FastPCR pada laman '*additional sequences*' akan terlihat seperti pada Gambar 3.23. Terlihat pada Gambar 3.24 merupakan salah satu kandidat primer.

Ø FastPCR 6.6			_	٥	×
File Edit Search Converting PCR Database Alignment Run Help					
PCR Primer Design In Silico PCR Primer Test Primers List Analysis Restriction	Clustering Searching I TR Search MITE Search SSR Search Tools Polymerase Cycling 4				
Length range of PCR product (bp): 30 10000	Mismatches allowed in 3'-end, 05 nt. 0				
PCR product prediction	C Restrict analysis to F/R primer pairs				
✓ Show all matching sites of primer binding	C >> T bisulphite conversion				
Show only matching sites of primer binding that generate products	Circular sequence				
Show amplicon sequence	Linked (Associated) search				
Show only amplicons lengths	Probe search				
IIII_I_SIL-532 ttgaatcaaccogtagtgtc 54,7 87 61/72 5	19	2234	12/0	13/2020	

Gambar 3.24. Salah Satu Kandidat Primer

Pada tahap berikutnya dilakukan pemasukan data sekuen DNA dari salah satu spesies Cucurbitaceae sebagai target untuk melihat hasil *in-silico* PCR seperti pada Gambar 3.24. Setelah dilakukan pemasukan data, data tersebut dijalankan dengan melakukan '*RUN*' pada program tersebut, setelah program tersebut dijalankan akan muncul sebuah primer yang terdapat pada laman 'PCR *primer design result*' seperti pada gambar 3.25.

PCR 6.6 Edit <u>S</u> earch C <u>o</u> nverting <u>P</u> CR <u>D</u> atabase <u>A</u> lignment <u>R</u> un <u>H</u> elp			-
📒 🔐 🖌 🕆 🍋 🚳 🖊 🗔 된 🗶 🛠 🦊 📑 🔜 🎬 🖻 🤅	\$ TT >		
) R=(A/G) W=(A/T) S=(G/C) Y=(C/T) K=(G/T) V=(A/G/C) H=(A/C/T) D=(A/G/T) B=(C/G/T) I	J=(A/GIC/T), U=T and I		
Primer Design In silico PCR Primer Test Primers List Analysis Restriction	1 Clustering Searching LTR Search MITE Search SSR Search Tools Polymerase Cycling		
Length range of PCR product (bp): 30 10000	Mismatches allowed in 3'-end, 05 nt		
PCR product prediction	Restrict analysis to F/R primer pairs		
Show all matching sites of primer binding	C >> T bisulphite conversion		
F Show only matching sites of primer binding that generate products	Circular sequence		
Show amplicon sequence	Linked (Associated) search		
Show only amplicons lengths	Probe search		
CATCGCTGCCCCCCCCCCCCCCCCCCGCTGGTGGCGGGGGGCACACGCTG ISOSGACGGTGGCGGGATGGCTAAATTCGAGTCCCCGGGCCTGTGGTGGGGAACTACG ICCAACTCGGTACCGGTGCGGACCTCAGCCGGGTCCTCCCCCGGGACGACGAGG	ICT ITGG 467		
CTCCTAIGICGACCCTCTGARCGTCGTCCCCAAAGACGATGCTCTCGACGCGACCCC			
		22:41	12/03

Gambar 3.25. Pemasukan Data salah satu Sekuen DNA



Gambar 3.26. Hasil Running In-silico Positif PCR

Pada proses *running in-silico* PCR hasil dapat berupa negatif dan positif, hasil negatif itu apabila seperti pada gambar 3.27. Hasil yang positif ditandai dengan adanya hasil primer yang menempel pada target sekuen seperti pada Gambar 3.26. Pada Gambar 3.27, tersebut tidak ada hasil apapun yang artinya bahwa kandidat primer yang diuji coba berhasil tidak menempel pada target atau tidak ada yang sama dengan target, namun kandidat primer itu sendiri akan sama pada target yang sesuai.

$R_{A}(A/G) \; \forall w(A/T) \; S_{A}(G/C) \; \forall w(C/T) \; K_{A}(G/T) \; \forall w(A/G/C) \; H_{A}(A/C/T) \; D_{A}(A/G/T) \; B_{A}(C/G/T) \; H_{A}(A/C/T) \; D_{A}(A/G/T) \; H_{A}(A/C/T) \; D_{A}(A/G/T) \; H_{A}(A/C/T) \; H_{A}(A/C/C) \; H_{A}(A/C/C) \; H_{A}(A/C/C) \; H_{A}(A/C/C) \; H_{A}(A/C/C) \; H_{A}(A/C/C) \; H_{A}(A/C) \; H(A/C) \; H_{A}(A/C) \; H_{A}(A/C$	N=(A/G/C/T), U=T and I	RNA 💼	
imer Design in silico PCR Primer Test Primers List Analysis Restriction	n Clustering Searching LTR Search MITE Search SSR Search Tools Polymerase Cycling		
ength range of PCR product (bp): 30 10000	Mismatches allowed in 3'-end, 05 nt		
PCR product prediction	C Restrict analysis to F/R primer pairs		
Show all matching sites of primer binding	C >> T bisulphite conversion		
Show only matching sites of primer binding that generate products	Circular sequence		
Show amplicon sequence	Linked (Associated) search		
Show only amplicons lengths	C Probe search		
Show only amplicons lengths	Probe search		

Gambar 3.27 Hasil Negatif In-silico PCR

3.4 Alur Penelitian



Bagan alir 3.1 Bagan alir penelitian