

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Dalam penelitian ini, jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian deskriptif untuk membuat suatu gambaran atau deskripsi mengenai fakta dan hubungan fenomena yang diselidiki yaitu pengembangan diagnostik primer secara *in silico* untuk deteksi kelangkaan jenis tumbuhan menggunakan penanda *rbcL* dari genom kloroplas.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari hingga April 2022 dan dilakukan di tempat tinggal mahasiswa yaitu Jalan Cibangkong/Laswi Gg. Babakan Garut No. 382/120, Kelurahan Cibangkong, Kecamatan Batununggal, Kota Bandung, 40273.

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 VivoBook 14 (A407MA), Intel(R) Celeron(R) N4000 CPU	Perangkat untuk mengolah dan menganalisis data.
2	Kuota	-	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 50 sampel tumbuhan langka (Tabel 3.3) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)	Sampel yang digunakan untuk penelitian.
2	IUCN Red List (https://www.iucnredlist.org/search)	Mencari status kelangkaan tumbuhan.
3	Program Microsoft Excel	Membuat tabel data sekuen DNA tumbuhan langka dan hasil analisis.
4	Program NotePad	Membuat FASTA format.
5	Program ClustalX 2.1	Menjajarkan (<i>alignment</i>) sekuen DNA.
6	Program BioEdit	Membuat konsensus sekuen DNA.
7	Program FastPCR 6.8	Mendesain primer, menguji coba kandidat primer tumbuhan langka, dan <i>in silico</i> PCR

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengambilan Data

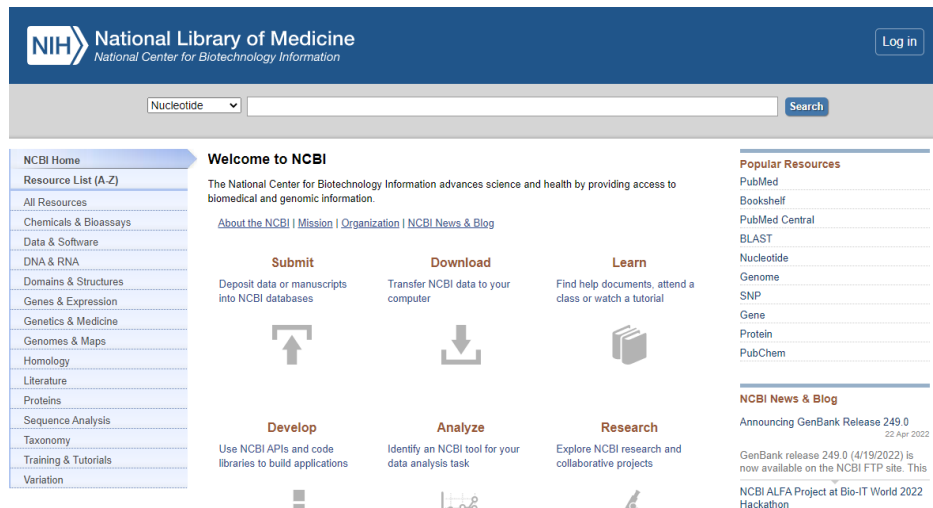
Data yang digunakan pada penelitian ini merupakan data sekunder sekuen DNA tumbuhan langka dari berbagai kelompok tumbuhan berdasarkan penanda *rbcL* yang terdapat pada laman <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pada Tabel 3.3 merupakan kumpulan data sekunder tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL*, yang terdapat informasi mengenai data *spesies*, nomor aksesi, jumlah pasang basa, dan status IUCN. Nomor aksesi dapat digunakan untuk mengakses informasi dari setiap spesies tumbuhan langka dan sekuen DNA nya melalui *Genbank* NCBI sehingga memudahkan pencariannya.

Tabel 3.3
Data sekunder sekuen DNA tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL*

No	Nama Spesies	Nama Daerah	Nomor Aksesi <i>rbcL</i>	Jumlah Pasang Basa	Status IUCN	Daerah Distribusi
1	<i>Agathis borneensis</i>	Damar	AB027310.1	1.332 bp	EN	Borneo, Sumatra
2	<i>Agathis dammara</i>	Damar	U96477.1	1.322 bp	VU	Maluku, Sulawesi
3	<i>Agathis lenticula</i>	Tanggilan	MH069521.1	1.291 bp	VU	Kalimantan
4	<i>Alocasia sanderiana</i>	Alokasia	EU193192.1	1.242 bp	CR	Sumatra
5	<i>Amorphophallus titanium</i>	Bunga Bangkai	AF497102.1	1.466 bp	EN	Sumatra
6	<i>Anisoptera marginata</i>	Mersawa Tenam/ Meranti	Y15144.1	1.408 bp	VU	Sumatra
7	<i>Araucaria heterophylla</i>	Cemara Norflok	U96462.1	1.322 bp	VU	Jawa
8	<i>Aquilaria beccariana</i>	Gaharu	Y15149.1	1.377 bp	VU	Kalimantan, Sumatra
9	<i>Aquilaria malaccensis</i>	Gaharu	LC383712.1	1.203 bp	CR	Kalimantan, Sumatra
10	<i>Bentinckia nicobaria</i>	Palm	AY012499.1	1.428 bp	EN	Jawa, Surabaya
11	<i>Borassus flabellifer</i>	Lontar	AY012469.1	1.495 bp	EN	Jawa, Sulawesi
12	<i>Canarium sarawakanum</i>	Kenari	KT698532.1	1.311 bp	VU	Kalimantan
13	<i>Canarium zeylanicum</i>	Kenari	FJ466642.1	1.362 bp	VU	Jawa
14	<i>Cedrela odorata</i>	Cedar Merah	AY128220.1	1.387 bp	VU	Jawa
15	<i>Cycas circinalis</i>	Pakis Haji	L12674.1	1.428 bp	EN	Jawa
16	<i>Cycas riuminiana</i>	Pakis	MH069545.1	1.294 bp	EN	Jawa
17	<i>Dioon spinulosum</i>	Palm	AF394351.1	1.354 bp	EN	Jawa
18	<i>Diospyros celebica</i>	Kayu Hitam	EU980664.1	1.456 bp	VU	Sulawesi
19	<i>Diospyros maritima</i>	Eboni	EU980710.1	1.432 bp	CR	Jawa
20	<i>Hopea beccariana</i>	Merawan	EF660047.1	1.023 bp	VU	Kalimantan, Sumatra
21	<i>Hopea ferruginea</i>	Merawan	EF660049.1	1.023 bp	CR	Kalimantan, Sumatra
22	<i>Hopea mengarawan</i>	Merawan Benar	EF660044.1	1.023 bp	CR	Sumatra
23	<i>Hopea nervosa</i>	Merawan	EF660034.1	1.023 bp	CR	Borneo
24	<i>Hopea nutans</i>	Merawan	EF660042.1	1.022 bp	CR	Kalimantan

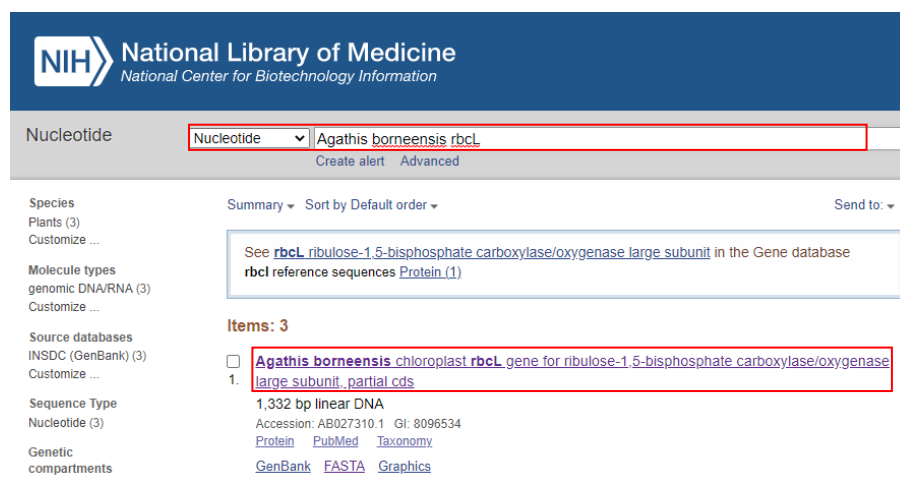
No	Nama Spesies	Nama Daerah	Nomor Aksesori <i>rbcL</i>	Jumlah Pasang Basa	Status IUCN	Daerah Distribusi
25	<i>Hopea sangal</i>	Merawan Hitam	EF660036.1	1.023 bp	VU	Bali, Jawa, Kalimantan, Sumatra
26	<i>Joannesia princeps</i>	Kacang Arara	AJ418808.1	1.408 bp	VU	Jawa
27	<i>Khaya ivorensis</i>	Mahogani	KX000324.1	1.315 bp	VU	Jawa
28	<i>Knema latericia</i>	Kumpang	L12653.2	1.400 bp	VU	Borneo, Sumatra
29	<i>Latania lontaroides</i>	Palma Latania	AM903210.1	1.413 bp	EN	Jawa
30	<i>Macadamia ternifolia</i>	Kacang Bafa	U79172.1	1.428 bp	EN	Jawa
31	<i>Merrillia caloxylon</i>	Kemuning Gajah	AB505907.1	1.311 bp	VU	Sumatra
32	<i>Paphiopedilum primulinum</i>	Anggrek	JN181468.1	1.266 bp	CR	Sumatra
33	<i>Pericopsis mooniana</i>	Kayu Kuku	U74210.1	1.462 bp	VU	Sumatra, Sulawesi
34	<i>Pinus merkusii</i>	Pinus	AY497251.1	1.442 bp	VU	Sumatra
35	<i>Podocarpus neriifolius/ridleyi</i>	Ki Putri	AF249618.1	1.317 bp	VU	Kalimantan
36	<i>Podocarpus polystachyus</i>	Jati Bukit	AF249626.1	1.344 bp	VU	Kalimantan, Maluku, Papua, Sumatra
37	<i>Podocarpus laubenfelsii</i>	Jati	MH069517.1	1.262 bp	EN	Kalimantan
38	<i>Pongamia pinnata</i>	Malapari	AY289676.1	1.197 bp	EN	Bali, Jawa
39	<i>Psilotum nudum</i>	Paku Purba	MK167465.1	1.248 bp	CR	Jawa
40	<i>Pterocymbium beccarii</i>	Amberoi	FJ976169.1	1.386 bp	VU	Papua
41	<i>Rhopaloblaste augusta</i>	Palem	MG437758.1	1.359 bp	VU	Jawa
42	<i>Santalum album</i>	Cendana	L26077.1	1.419 bp	VU	Maluku, Jawa, Sulawesi, Sumatra
43	<i>Santalum macgregorii</i>	Sandalwood Papua	EF584607.1	1.408 bp	CR	Papua
44	<i>Santiria rubiginosa</i>	Kedondong	KT698528.1	1.338 bp	VU	Kalimantan
45	<i>Shorea faguetiana</i>	Meranti	DQ157311.1	1.019 bp	EN	Borneo, Sumatra
46	<i>Shorea guiso</i>	Beraja	DQ157309.1	1.081 bp	VU	Kalimantan, Sumatra
47	<i>Symplocos costata</i>	Ki Gledog	Z80192.1	1.377 bp	VU	Sumatra
48	<i>Swietenia macrophylla</i>	Mahoni	U39080.2	1.408 bp	VU	Jawa
49	<i>Taxus wallichiana</i>	Kayu Taji	KJ616597.1	1.299 bp	EN	Sulawesi, Sumatra
50	<i>Terminalia ivorensis</i>	Ketapang	FJ381813.1	1.436 bp	VU	Jawa

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



Gambar 3.1 Laman situs NCBI (Sumber: *National Center for Biotechnology Information*)

Pada Gambar 3.1 menunjukkan laman situs NCBI untuk mendapatkan data sekuen DNA dan informasi suatu organisme dengan panjang nukleotidanya. Dilengkapi nomor akses untuk mengetahui dan membedakan publikasi dari setiap spesies tumbuhan langka (Sindiya *et al.*, 2018). Untuk mencari sekuen DNA tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL*, maka pilih opsi *nucleotide*. Pada kolom pencarian ketik nama spesies tumbuhan langka yang ingin dicari dan diikuti dengan penandanya (Contoh: *Agathis borneensis rbcL*) seperti pada Gambar 3.2 kemudian klik *search*.



Gambar 3.2. Hasil pencarian data salah satu tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL* (Sumber: *National Center for Biotechnology Information*)

Pada Gambar 3.2 didapatkan hasil pencarian data salah satu tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL*. Pilih data hasil pencarian pada posisi paling atas.

Setelah terbuka, semua informasi mengenai tumbuhan langka tersebut dapat dilihat seperti pada Gambar 3.3.

Agathis borneensis chloroplast *rbcl* gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds

GenBank: AB027310.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS AB027310 1332 bp DNA linear PLN 26-JUL-2016
 DEFINITION Agathis borneensis chloroplast *rbcl* gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds.
 ACCESSION AB027310
 VERSION AB027310.1
 KEYWORDS .
 SOURCE chloroplast Agathis borneensis
 ORGANISM *Agathis borneensis*
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Pinopsida; Pinidae; Conifers II; Araucariales; Araucariaceae; Agathis.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Chaw,S.-M., Parkinson,C.L., Cheng,Y., Vincent,T.M. and Palmer,J.D.
 TITLE Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97 (8), 4086-4091 (2000)
 PUBMED 10760277
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1332)
 AUTHORS Chaw,S.-M., Parkinson,C.L., Cheng,Y., Vincent,T.M. and Palmer,J.D.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (17-MAY-1999) Contact:Shu-Miaw Chaw Institute of Botany, Academia Sinica, Nankang, Taipei, Taiwan 115, R.O.C
 FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..1332
 /organism="Agathis borneensis"
 /organeller="plastid:chloroplast"
 /mol_type="genomic DNA"
 /db_xref="taxon:54794"

Gambar 3.3 Informasi data salah satu tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcl* (Sumber: *National Center for Biotechnology Information*)

Untuk mendapatkan sekuen DNA tanpa informasi lain, maka klik “FASTA” pada bagian atas sisi kiri seperti yang terdapat pada Gambar 3.3. Akan muncul informasi sekuen dari salah satu spesies tumbuhan langka beserta nomor akses seperti pada Gambar 3.4

Agathis borneensis chloroplast *rbcl* gene for ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds

GenBank: AB027310.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>AB027310.1 Agathis borneensis chloroplast rbcl gene for ribulose-1,5-bisphosphate
carboxylase/oxygenase large subunit, partial cds
AGGTGTTGGATTTAAAGCTGGTGTAAAGATTATAGATTAACCTATTATACCCGGAATATCAGACCAA
GATACGATATCTTGGCAGCATCCGAGTTACTCTCAACCAGGAGTCCGCCAGGAAAGCAGGAGCAG
CAGTAGCGGCTGAATCTCACCGGTACATGGACAACCTGTTGGACCGATGGACTACCAAGCTTGATCG
TTACAAGGGGCGATGCTATGGCATTGAGCCTGCTCCCTGGAGAGAACTCAATTTATGGCTATGAGCT
TACCCCTTAGACCTTTTGAAGAAGGTTCTGTACCAACCTGTTCACTCCATTGGGGTAAATGATTTG
GATTCAAAGCCCTACGAGCTACGCTCTGGAAGATCTACGAATTCCTCTTATACCAAACTTCCCA
GGGTCACCCCAAGGATTCAGGTTGAAAGAGATAAATTAACAATATGGCCCTCCCTGTGGGGGTG
ACTATCAACCAAAATGGGCTATCTGCCAAGAAATTTGGTAGAGCAGTTACGAATGTCTCCGCGGGT
GACTTGATTTTACCAAGGATGATGAAACCTGAAATTCACCACTTACGCGTGGAGAGATCGTTTGT
TTTTTGGCAGAAGCAATTTATAAAGCTCAAGCAGAAACGGGTGAAATTAAGGGCATTACTTGAATGCT
ACTGCAAGTACATGTGAAGAAATGATGAAAAGAGTAAATGTTCCCTATGAAATGGAGTTCCCATAGTCA
TGATGACTATCTGACGGAGGTTTTACGGCAAACTCTGTTGGCTCATTATGGCCGAGACCATGGCCCT
ACTTCTCATATTCACCCGCAATGTCAGTCTTGGACAGACAAAATTCATGGTATGCACTTTCGT
GTGCTGGCTAAAGCATTGGCTCTGCTGGCAGGATCATGTTCCACGCTGGTACTGTAGTGGTAAACCTG
AAGGTGACAGGAGCTCACCTTAGGTTTTGTGATCTACTACGATGATGATATTTGAAAAGACCGAAG
TCGTSGTGTTATTTTACTCAAGATTGGATATATSCAGGTTTTCCTGATGCTCAGGSGGATTT
CACGTTGGCATTATGCTGCTGCTGACGAGATCTTGGGATGATCTGTATTACAGTTGGTGGGAA
CTTTGGGACCCCTTGGGAAATGACCTGGTGAAGTAACTAATCGGTCGCTTTAGAAGCTGTGTACA
AGCTGTAATGAAGGACGTGATCTGCTGGTGAAGTAAATGATATATCCGTGAAGCAGCTAAATGGAGT
CC
```

Gambar 3.4 Contoh data sekuen salah satu tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcl* (Sumber: *National Center for Biotechnology Information*)

Data sekuen tersebut dapat kita unduh dalam bentuk format FASTA atau disalin secara langsung dan dimasukkan ke dalam aplikasi notepad yang dapat disimpan dalam format .txt. FASTA format digunakan karena dapat mewakili urutan asam nukleat seperti urutan nukleotida (DNA) dan urutan asam amino

Dennisa Ameria Sendjaya, 2022

PENGEMBANGAN DIAGNOSTIK PRIMER SECARA IN SILICO UNTUK DETEKSI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA MENGGUNAKAN PENANDA *RBCL*

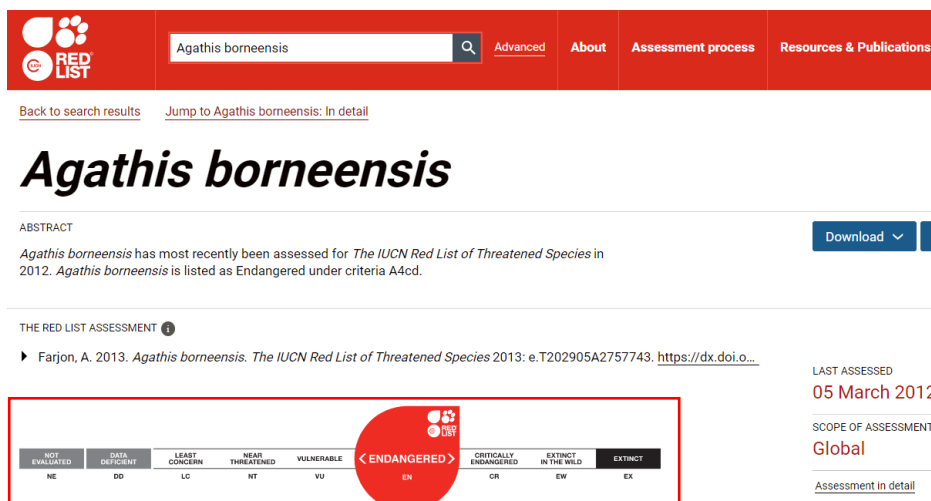
Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

(protein) menggunakan kode satu huruf. Notepad salah satu aplikasi yang dapat digunakan untuk menyimpan urutan tersebut. FASTA format menjadi standar dalam bidang bioinformatika karena sederhana dan mudah digunakan. Semua sekuen DNA spesies tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL* yang diperoleh disusun dalam aplikasi notepad. Setiap sekuen diawali tanda '>' lalu dilanjutkan dengan nama atau judul dari sekuen tersebut yang disambung dengan simbol '_' seperti pada Gambar 3.5., sehingga data akan mudah terbaca dan didapatkan FASTA format yang akan dianalisis menggunakan program ClustalX.



Gambar 3.5 Contoh Penyusunan sekuen DNA pada aplikasi Notepad

Status kelangkaan dari setiap spesies tumbuhan di cek pada IUCN *Red List* (<https://www.iucnredlist.org/search>) dengan menuliskan nama spesies tumbuhan pada kolom pencarian lalu klik search seperti pada Gambar 3.6., sehingga didapatkan informasi mengenai spesies tersebut dan status kelangkaannya.



Gambar 3.6 Laman IUCN *Red List* untuk mengetahui status kelangkaan tumbuhan (Sumber: International Union for Conservation of Nature)

3.4.2 Pensejajaran Sekuen DNA (*Sequence Alignment*)

Proses pensejajaran sekuen DNA ini menggunakan ClustalX (Perwitasari *et al.*, 2020). Format FASTA yang berisi sekuen DNA tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL* yang sudah disusun sebelumnya dimasukkan kedalam program ClustalX. Proses pensejajaran sekuen DNA pada ClustalX, dapat dilihat sebagai berikut.

Proses Pensejajaran Sekuen DNA (*Sequence Alignment*)

1. Jalankan aplikasi ClustalX.
2. Pilih menu *File*, lalu *Load Sequences*.
3. Pilih *file* Fasta Format sampel, klik *Open*.
4. Pilih menu *Alignment*, lalu *Do Complete Alignment*.
5. Beri nama file sebagai output, klik OK. Program ClustalX langsung memproses pensejajaran tersebut.
6. Hasil pensejajaran sekuen dapat dilihat dan disimpan dalam format (.aln), klik OK.

Setelah dilakukan proses *alignment*, maka terlihat perbedaan sekuennya seperti pada Gambar 3.7 dan diperoleh data hasil pensejajaran dalam bentuk file aln (.aln).



Gambar 3.7 Hasil proses *alignment* pada program ClustalX

3.4.3 Membuat Konsensus Sekuen DNA

Proses dalam membuat sekuen konsensus pada tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL* dapat dilakukan dengan menggunakan program BioEdit (Gambar 3.8). (Triesita, N. I. P., Masruroh, I. H., & Sulistiono, 2018). File sekuen DNA tumbuhan langka yang sudah disejajarkan dimasukkan kedalam program BioEdit. Proses pembentukan konsensus pada program BioEdit, dapat dilihat sebagai berikut.

Proses Pembuatan Konsensus Sekuen DNA
1. Jalankan aplikasi BioEdit.
2. Pilih menu <i>File</i> , lalu <i>Open</i> .
3. Pilih file hasil penasejajaran sekuen format (.aln), klik <i>Open</i> .
4. Pilih menu <i>Alignment</i> , lalu <i>Create Consensus Sequence</i> .
5. Klik hasil <i>Consensus</i> , pilih menu <i>Edit</i> , lalu <i>Copy Sequences to Clipboard</i> (Fasta Format).
6. Jalankan aplikasi Notepad. <i>Paste</i> hasil konsensus sekuen pada aplikasi Notepad. Pilih menu <i>Edit</i> , lalu <i>Save</i> .
7. Hasil konsensus sekuen dapat dilihat dan disimpan dalam bentuk fasta format (.txt).

Hasil pembentukan konsensus sekuen diperoleh konsensus tumbuhan langka berupa sub sekuen seperti pada Gambar 3.9. Hasil tersebut dapat digunakan untuk proses selanjutnya yaitu desain primer serta uji coba *in silico* PCR.

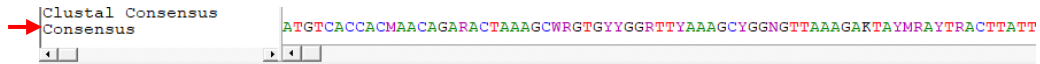


Gambar 3.8 Laman program BioEdit

Dennisa Ameria Sendjaya, 2022

PENGEMBANGAN DIAGNOSTIK PRIMER SECARA IN SILICO UNTUK DETEKSI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA MENGGUNAKAN PENANDA RBCL

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



Gambar 3.9 Hasil pembuatan konsensus sekuen pada program BioEdit berupa sub sekuen.

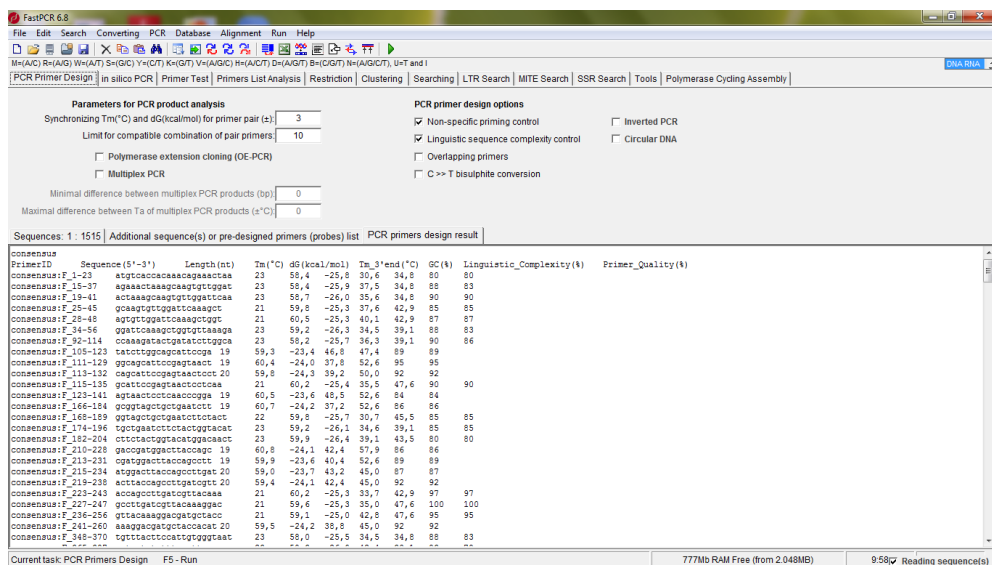
3.4.4 Desain Primer

Desain primer tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL* ini dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan program FastPCR (Kalendar, Khassenov, *et al.*, 2017). Konsensus sekuen yang didapat dimasukan pada program FastPCR. Parameter untuk desain primer sesuai dengan bawaan program FastPCR. Proses desain primer pada program FastPCR, dapat dilihat sebagai berikut.

Proses Desain Primer

1. Jalankan aplikasi FastPCR.
2. Pilih menu *PCR Primer Design*, lalu menu *File*, klik *Open File*.
3. Pilih *file* hasil pembuatan konsensus dalam bentuk fasta format, klik *Open*. Konsensus akan muncul pada menu *General Sequence*.
4. Pilih menu *Run*. Hasil desain primer akan muncul pada menu *Result Report*.
5. Pilih menu *File*, lalu *Save As*, klik OK. File hasil desain primer akan tersimpan dalam bentuk fasta format (.txt).

Desain primer pada program FastPCR akan menghasilkan primer *forward* dan *reverse*, serta pasangan primer *forward* dan *reverse* seperti pada Gambar 3.10. Primer yang dihasilkan diharapkan dapat mengikat lokasi target pada sampel tumbuhan langka dan di uji coba dengan *in silico* PCR.



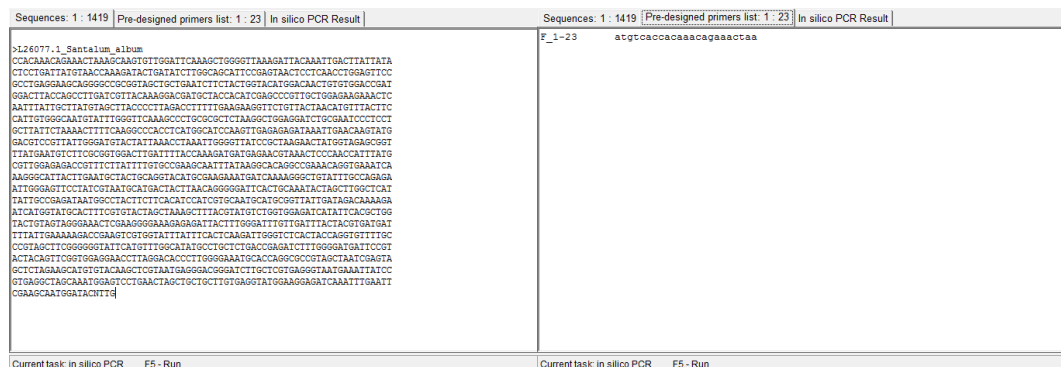
Gambar 3.10 Hasil desain primer pada program FastPCR

3.4.5 Uji Coba *In Silico* PCR

Program yang digunakan untuk uji *in silico* PCR ini adalah FastPCR (Hidayat *et al.*, 2020). Primer yang didapat hasil desain primer di uji coba pada semua sampel tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL* pada program FastPCR. Proses uji coba *in silico* PCR pada program FastPCR, dapat dilihat sebagai berikut.

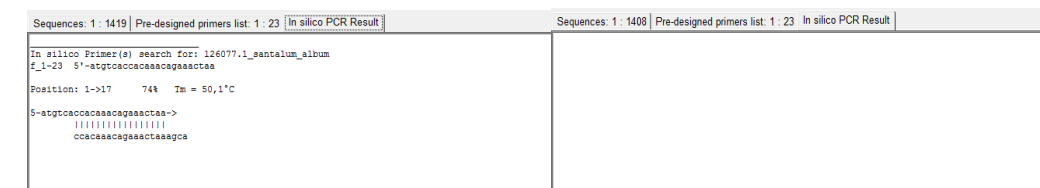
Proses Uji Coba *In Silico* PCR

1. Jalankan aplikasi FastPCR.
2. Pilih menu *In silico* PCR, lalu menu *File*, klik *Open File*.
3. Pilih *file* Fasta Format sampel, klik *Open*. Sekuen sampel tumbuhan langka akan muncul pada menu *General Sequence*.
4. Buka *file* hasil desain primer dalam bentuk fasta format (.txt). *Copy* salah satu primer yang akan di uji coba.
5. *Paste* primer tersebut pada menu *Additional Sequences*.
6. Pilih menu *Run*. Hasil uji coba akan muncul pada menu *Result Report*.
7. Pilih menu *File*, lalu *Save As*, klik OK. File hasil uji coba *in silico* PCR akan tersimpan dalam bentuk fasta format (.txt).



Gambar 3.11 Proses pemasangan sekuen sampel dan salah satu primer dalam proses uji coba *in silico* PCR

Hasil uji *in silico* PCR ini terdapat pada kolom *result*, yang ditandai dengan muncul atau tidak munculnya fragmen DNA target tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL* seperti pada Gambar 3.12.



Gambar 3.12 Hasil positif (kiri) dan negatif (kanan) uji coba *in silico* PCR

Primer yang memiliki hasil positif terbanyak di uji coba kembali secara berpasangan (*forward* dan *reverse*) terhadap sampel tumbuhan langka dengan *in silico* PCR. Pasangan primer yang berhasil mengamplifikasi sampel tumbuhan langka terbanyak seperti pada Gambar 3.13., maka primer tersebut yang akan di uji coba pada tumbuhan langka dan non langka untuk mengetahui efektivitas dari primer tersebut.

```

Sequences: 50 65390 | Pre-designed primers list: 2 46 | In silico PCR Result
In silico Primer(s) search for: ab027310.1_ngathia_borneensis
f1_174-194 5'-tgctgaattctctactcctgtaaat-3
Position: 148-170 91% Tm = 42.1°C
5'-tgctgaattctctactcctgtaaat-3
|||||
gggggtgattctctctcctgtaaatggaac

r2_656-678 5'-caaaataagaagaaggtctctctca
Position: 614-636 91% Tm = 45.2°C
<-aacctctctggaagaagaataaaa-5
|||||
gctggagagatggttctctctctctctgca

f1_174-194 148-170
5'-tgctgaattctctactcctgtaaat
>r2_656-678 614-636
5'-caaaataagaagaaggtctctctca
Amplicon size: 498bp Tm=65°C

Current task: in silico PCR F5 - Run 1.501MB RAM Free (from 2.04MB) 10.1% Reading sequences

```

Gambar 3.13 Hasil *in silico* PCR menggunakan kandidat pasangan primer

In silico PCR pada aplikasi FastPCR dapat mengetahui spesifisitas primer hasil desain yang optimal terhadap DNA target, dengan memperhatikan beberapa syarat proses PCR, yaitu suhu leleh terdenaturasinya DNA (*temperature melting*), suhu penempelan primer (*annealing*), komposisi basa guanin dan sitosin, dan struktur primer (Aicha *et al.*, 2021).

3.4.6 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan melihat hasil dari uji *in silico* PCR. Apabila terdapat primer yang menempel pada sekuen target salah satu tumbuhan langka atau terdapat amplicon (pita), maka tumbuhan tersebut masuk kedalam kategori langka dan terancam punah sedangkan, apabila tidak terdapat hasil atau pita maka kandidat primer tersebut tidak berhasil menempel pada sekuen target tumbuhan langka yang di uji cobakan artinya tumbuhan tersebut tidak terancam (Gambar 3.12). Hasil uji coba dari masing masing kandidat primer yang didapat di masukan pada tabel program *Excel*. Kandidat primer yang berhasil diberi tanda positif (+), sedangkan yang tidak berhasil diberi tanda negatif (-). Hasil uji coba *in silico* PCR positif (+) dihitung dan diubah dalam bentuk persentase untuk mengetahui keberhasilan amplifikasi primer terhadap tumbuhan langka berdasarkan penanda *rbcL*. Kandidat pasangan primer yang didapat di uji kembali pada beberapa tumbuhan di luar sampel penelitian yaitu tumbuhan langka dan *non* langka untuk mengetahui apakah primer tersebut efektif atau tidak.

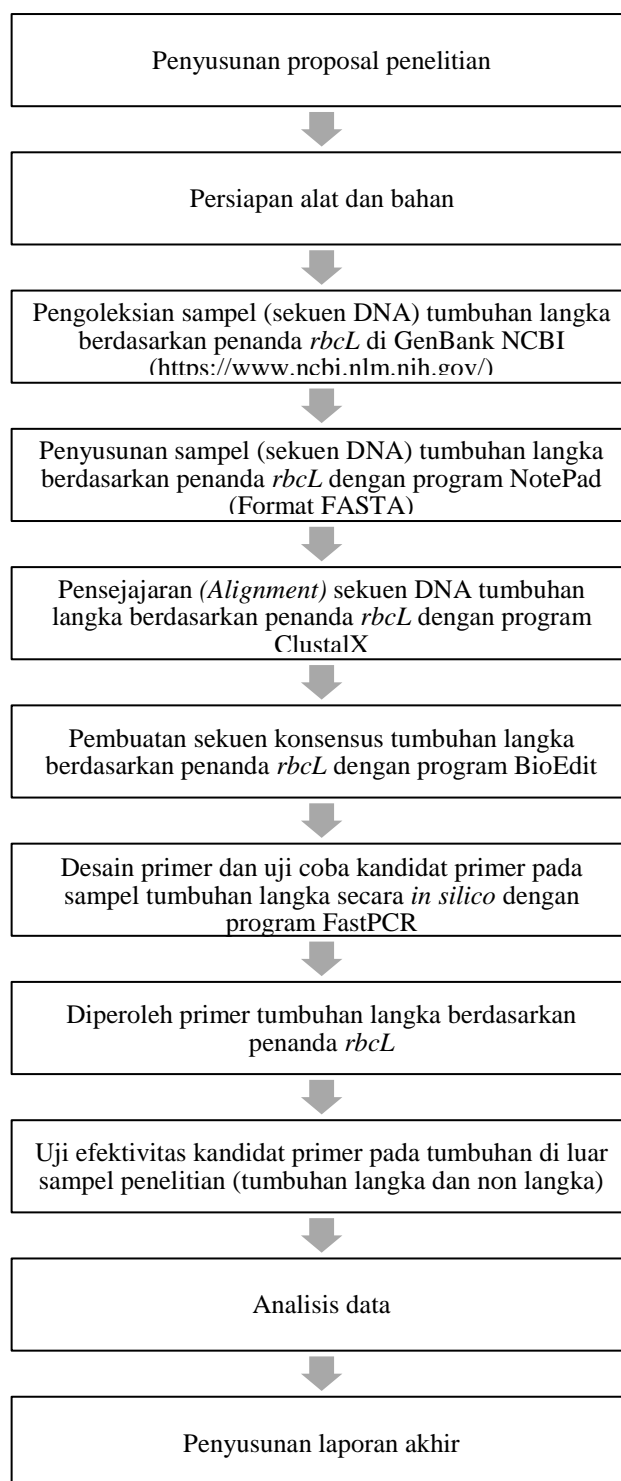
Dennisa Ameria Sendjaya, 2022

PENGEMBANGAN DIAGNOSTIK PRIMER SECARA IN SILICO UNTUK DETEKSI KELANGKAAN JENIS TUMBUHAN DI INDONESIA MENGGUNAKAN PENANDA RBCL

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

3.5 Alur Penelitian

Alur penelitian dalam penelitian ini disusun sebagai berikut (Gambar 3.14.).



Gambar 3.14. Bagan alur penelitian