

No. Reg: 201050000039555

LAPORAN PENELITIAN



KERAGAMAN GENETIK JAMBLANG (*Syzygium cumini*) DI ACEH BESAR
MENGUNAKAN GEN matK

Ketua Peneliti

Kamaliah, M. Si

NIDN: 2015028401

NIPN: 201502840110000

Klaster	Penelitian Peningkatan Kapasitas/ Pembinaan (PPK)
Bidang Ilmu Kajian	Sains dan Teknologi
Sumber Dana	DIPA UIN Ar-Raniry Tahun 2020

PUSAT PENELITIAN DAN PENERBITAN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI AR-RANIRY BANDA ACEH
OKTOBER 2020

**LEMBARAN IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN PENELITIAN
PUSAT PENELITIAN DAN PENERBITAN LP2M UIN AR-RANIRY
TAHUN 2020**

1. a. Judul : Keragaman Genetik Jamblang (*Syzygium cumini*) di Aceh Besar Menggunakan Gen matK
- b. Klaster : Penelitian Peningkatan Kapasitas/ Pembinaan (PPK)
- c. No. Registrasi : 201050000039555
- d. Bidang Ilmu yang diteliti : Biologi Molekular

2. Peneliti/Ketua Pelaksana
 - a. Nama Lengkap : Kamaliah
 - b. Jenis Kelamin : Perempuan
 - c. NIP : 198402152015032002
 - d. NIDN : 2015028401
 - e. NIPN (ID Peneliti) : 201502840110000
 - f. Pangkat/Gol. : III/b
 - g. Jabatan Fungsional : Lektor
 - h. Fakultas/Prodi : Sains dan Teknologi/ Biologi

3. Lokasi Kegiatan : Aceh Besar dan Banda Aceh
4. Jangka Waktu Pelaksanaan : 7 (Tujuh) Bulan
5. Tahun Pelaksanaan : 2020
6. Jumlah Anggaran Biaya : Rp. 15.000.000
7. Sumber Dana : DIPA UIN Ar-Raniry B. Aceh Tahun 2020
8. *Output* dan *Outcome* : a. Laporan Penelitian; b. Publikasi Ilmiah; c. HKI

Mengetahui,
Kepala Pusat Penelitian dan Penerbitan
LP2M UIN Ar-Raniry Banda Aceh,

Dr. Anton Widyanto, M. Ag.
NIP. 197610092002121002

Banda Aceh, 5 Oktober 2020
Pelaksana,


Kamaliah, M. Si
NIDN: 2015028401

Menyetujui:
Rektor UIN Ar-Raniry Banda Aceh,

Prof. Dr. H. Warul Walidin AK., MA.
NIP. 195811121985031007

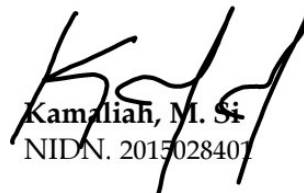
PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah Ini:

Nama : **Kamaliah**
NIDN : 2015028401
Jenis Kelamin : Perempuan
Tempat/ Tgl. Lahir : Banda Aceh/ 15 Februari 1984
Alamat : Lr. Tunggai Teungoh No. 4
Fakultas/Prodi : Sains dan Teknologi/ Biologi

Dengan ini menyatakan dengan sesungguhnya bahwa penelitian yang berjudul: "Keragaman Genetik Jamblang (*Syzygium cumini*) di Aceh Besar Menggunakan Gen matK " adalah benar-benar Karya asli saya yang dihasilkan melalui kegiatan yang memenuhi kaidah dan metode ilmiah secara sistematis sesuai otonomi keilmuan dan budaya akademik serta diperoleh dari pelaksanaan penelitian pada kluster Penelitian Peningkatan Kapasitas/ Pembinaan (PPK) yang dibiayai sepenuhnya dari DIPA UIN Ar-Raniry Banda Aceh Tahun Anggaran 2020. Apabila terdapat kesalahan dan kekeliruan di dalamnya, sepenuhnya menjadi tanggung jawab saya. Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya.

Banda Aceh, 22 September 2020
Saya yang membuat pernyataan,
Ketua Peneliti,


Kamaliah, M. Si
NIDN. 2015028401

KERAGAMAN GENETIK JAMBLANG (*Syzygium cumini*) DI ACEH BESAR MENGGUNAKAN GEN matK

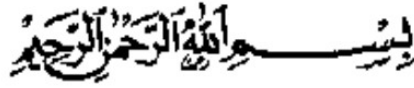
Ketua Peneliti:
Kamaliah

Abstrak

Jamblang merupakan tanaman yang memiliki banyak manfaat. Karakteristik Jamblang intraspesies pada setiap daerah di Aceh Besar secara morfologi mempunyai kesamaan sehingga sulit dilakukan identifikasi karakteristik spesies yang berasal dari daerah yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik gen matK pada Jamblang di Aceh Besar. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan teknik Polymerase Chain Reaction dan dilanjutkan menggunakan metode Sequencing. Analisis data dari hasil sequencing menggunakan program Mega 10. Data dibandingkan dengan urutan basa nukleotida Jamblang dari data Gen Bank. Amplikon hasil Polymerase Chain Reaction menunjukkan pita DNA tunggal dan tebal. Urutan nukleotida Jamblang di Aceh Besar menunjukkan keragaman genetik menggunakan gen matK.

Kata Kunci: *Jamblang; Polymerase Chain Reaction; Sequencing*

KATA PENGANTAR



Syukur Alhamdulillah kepada Allah SWT dan salawat beriring salam penulis persembahkan kepangkuan alam Nabi Muhammad SAW, karena dengan rahmat dan hidayah-Nya penulis telah dapat menyelesaikan laporan penelitian dengan judul “Keragaman Genetik Jamblang (*Syzygium cumini*) di Aceh Besar Menggunakan Gen matK”.

Dalam proses penelitian dan penulisan laporan ini tentu banyak pihak yang ikut memberikan motivasi, bimbingan dan arahan. Oleh karena itu penulis tidak lupa menyampaikan ucapan terima kasih kepada yang terhormat:

1. Bapak Rektor Universitas Islam Negeri Ar-Raniry Banda Aceh;
2. Ibu Ketua LP2M UIN Ar-Raniry Banda Aceh;
3. Bapak Sekretaris LP2M UIN Ar-Raniry Banda Aceh;
4. Bapak Kepala Pusat Penelitian dan Penerbitan UIN Ar-Raniry Banda Aceh;
5. Bapak Kasubbag LP2M UIN Ar-Raniry Banda Aceh;
6. Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Unsyiah Banda Aceh;
7. Bapak Kepala Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Hewan Unsyiah Banda Aceh;
8. Bapak Prof. Yudha Fahrimal Guru Besar Fakultas Kedokteran Hewan Unsyiah Banda Aceh;
9. Laboran Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Hewan Unsyiah Banda Aceh;

Akhirnya hanya Allah SWT yang dapat membalas amalan mereka, semoga menjadikannya sebagai amal yang baik.

Harapan penulis, semoga hasil penelitian ini bermanfaat dan menjadi salah satu amalan penulis yang diperhitungkan sebagai ilmu yang bermanfaat di dunia dan akhirat. *Amin ya Rabbal 'Alamin.*

Banda Aceh, 2 Oktober 2020

Ketua Peneliti,


Kamaliah

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	
HALAMAN PENGESAHAN	
HALAMAN PERNYATAAN	
ABSTRAK.....	iv
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I : PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Rumusan Masalah.....	1
C. Tujuan Penelitian.....	2
BAB II : LANDASAN TEORI	
A. Klasifikasi Jamblang.....	3
B. Morfologi Jamblang.....	3
C. Manfaat Jamblang.....	4
D. Distribusi Jamblang.....	4
E. Variasi Genetik Jamblang.....	5
F. Filogenetik Jamblang.....	7
G. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	9
H. Elektroforesis.....	14
I. Sequencing.....	23
J. DNA Barcoding.....	47
BAB III : METODE PENELITIAN	
A. Tempat Penelitian.....	49
B. Metode Ekstraksi DNA.....	49
C. Visualisasi DNA Hasil Ekstraksi.....	50
D. Amplifikasi DNA.....	50
E. Visualisasi DNA Hasil Amplifikasi.....	51
F. Perunutan Basa Nukleotida.....	51
G. Analisis Data.....	52
BAB IV : HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
A. Visualisasi DNA Hasil Ekstraksi.....	53

B. Visualisasi DNA Hasil Amplifikasi.....	54
C. Filogeni Jamblang (<i>Syzygium cumini</i>) Aceh Besar	55
BAB V : PENUTUP	
A. Kesimpulan.....	57
B. Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN.....	60
BIODATA PENELITI.....	63

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Dendogram filogenetik Jamblang India	7
Gambar 2. Hubungan genetik Jamblang India berdasarkan genotipe	8
Gambar 3. Pengelompokan filogenetik Jamblang yang memiliki morfologi yang sama dengan spesies lain.....	9
Gambar 4. Komponen elektroforesis.....	15
Gambar 5. Visualisasi sampel hasil sequencing.....	34
Gambar 6. Mekanisme automated DNA sequencing	45
Gambar 7. Visualisasi DNA hasil ekstraksi.....	53
Gambar 8. Visualisasi DNA hasil PCR.....	54
Gambar 9. Diagram Filogeni Jamblang Aceh Besar.....	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kesamaan Morfologi Jamblang di Aceh Besar.....	60
--	----

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Jamblang (*Syzygium cumini*) merupakan tanaman langka dimana hampir semua bagian tanaman ini mempunyai banyak manfaat baik bagi kesehatan tubuh maupun fungsi dan struktur ekosistem. Buah dan daun Jamblang digunakan sebagai obat tradisional karena mengandung antioksidan tinggi, anti diabetes, anti bakteri, anti hipertensi, anti alergi, anti kanker, dan sebagai penurun lemak jahat *Low Density Lipoprotein* dalam darah¹. Daun Jamblang juga berperan sebagai kanopi dalam ekosistem karena mempunyai struktur yang rimbun². Struktur batang dan akar Jamblang yang kuat dapat tumbuh di daerah beriklim subtropis dan tropis.

Distribusi Jamblang di daerah beriklim subtropis ditemukan di Amerika Utara, Eropa, Australia, Asia Timur, dan Afrika Bagian Selatan, sedangkan distribusi Jamblang di daerah tropis diantaranya adalah Amerika Selatan, Afrika bagian tengah, India, Bangladesh, Burma, Nepal, Pakistan, Sri Lanka, dan Indonesia³. Salah satu provinsi di Indonesia yang memiliki potensi mengembangkan tanaman jamblang adalah Provinsi Aceh. Jamblang di kawasan kabupaten Aceh Besar mulai dilestarikan. Distribusi Jamblang di kawasan Kabupaten Aceh Besar diantaranya adalah di kawasan Jantho, Krung Raya, Leupung, Kecamatan Masjid Raya dan Ujung

¹ Marliani dkk, 2014, *Aktivitas Antioksidan Daun dan Buah Jamblang*, jurnal

² Silalahi, 2018, *Jamblang dan Bioaktivitasnya*, jurnal

³ Ayyanar dkk, 2012, *Syzygium cumini (L) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses*, jurnal

Pancu⁴. Karakteristik Jamblang intraspesies pada setiap daerah secara morfologi mempunyai kesamaan sehingga sulit dilakukan identifikasi karakteristik spesies yang berasal dari daerah yang berbeda. Identifikasi keanekaragaman intraspesies dapat dilakukan dengan menggunakan penanda genetik DNA *barcoding*. Salah satu DNA *barcoding* yang digunakan adalah gen *matK*⁵.

Gen *matK* merupakan gen kloroplas yang berada pada posisi intron *trnK*. Gen *matK* memiliki laju substitusi tinggi sehingga sangat tepat digunakan sebagai penanda genetik. Penelitian mengenai keanekaragaman genetik jamblang di kawasan Aceh Besar belum pernah dilakukan. Data genetik tanaman jamblang sangat dibutuhkan sebagai informasi dasar untuk mengembangkan dan melestarikan jamblang sebagai tanaman obat dan pendukung data konservasi.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat dirumuskan bahwa bagaimana keragaman genetik Jamblang (*Syzygium cumini*) di Aceh Besar menggunakan gen *matK*?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman genetik Jamblang (*Syzygium cumini*) di Aceh Besar menggunakan gen *matK*.

⁴ Rosannah dkk, 2015, *Distribusi Syzygium cumini (L) Skeels di Aceh Besar*, jurnal

⁵ Irawan dkk, 2016, *Analisis Sekuens dan Filogenetik Beberapa Tumbuhan Syzygium (Myrtaceae) di Sulawesi Utara Berdasarkan Gen matK*, jurnal

BAB II LANDASAN TEORI

A. Klasifikasi Jamblang

Klasifikasi Jamblang adalah sebagai berikut⁶:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Roside
Ordo	: Myrtales
Famili	: Myrtaceae
Genus	: Syzygium
Spesies	: <i>Syzygium cumini</i> (L) Skeels

B. Morfologi Jamblang

Jamblang (*Syzygium cumini*) memiliki ciri-ciri morfologi sebagai berikut:

1. Habitus Pohon
2. Warna cabang berwarna kekuningan hingga abu-abu
3. Panjang daun 7-18 cm dan lebar daun 3-8 cm
4. Morfologi daun oblong-ovate, elips lonjong, apeks runcing.
Pangkal daun cuneate menyempit ke arah tangkai daun, memiliki tepi daun sedikit bergelombang, helaian coriaceous, daun mengkilap.
5. Morfologi bunga berbentuk simosa
6. Morfologi buah oblong hingga oblong elliptic, warna buah ungu hingga hitam, ukuran buah panjang 1,5-2 cm, lebar buah 1-1,5 cm
7. Morfologi biji berbentuk ellipsoid atau lonjong ellipsoid

⁶ Jadhav dkk, 2009, Herbal Medicine: *Syzygium cumini*, jurnal

c. Manfaat Jamblang

Adapun manfaat Jamblang adalah:

1. Anti-diabetes
2. Anti-kanker
3. Anti-oksidan
4. Anti-inflamasi
5. Anti-mikroba
6. Anti Alergi
7. Anti hipertensi
8. Anti Ulser
9. Penurun lemak jahat *Low Density Lipoprotein* dalam darah

D. Distribusi Jamblang

Distribusi Jamblang yang tumbuh di daerah beriklim subtropis:

1. Amerika Utara,
2. Eropa,
3. Australia,
4. Asia Timur,
5. Afrika Bagian Selatan

Distribusi Jamblang yang ditemukan di daerah tropis diantaranya:

1. Amerika Selatan,
2. Afrika bagian tengah,
3. India,
4. Bangladesh,
5. Burma,

- 6 . Nepal,
- 7 . Pakistan,
8. Sri Lanka,
- 9 . Indonesia

Distribusi Jamblang di Indonesia diantaranya adalah

1. Aceh
2. Riau
3. Sulawesi Utara
4. Flores
5. Ternate
6. Bima

Distribusi Jamblang di kawasan Kabupaten Aceh Besar diantaranya⁷

1. Jantho,
2. Krung Raya,
3. Leupung,
4. Ujung Batee
5. Ujung Pancu

E. Variasi Genetik Jamblang

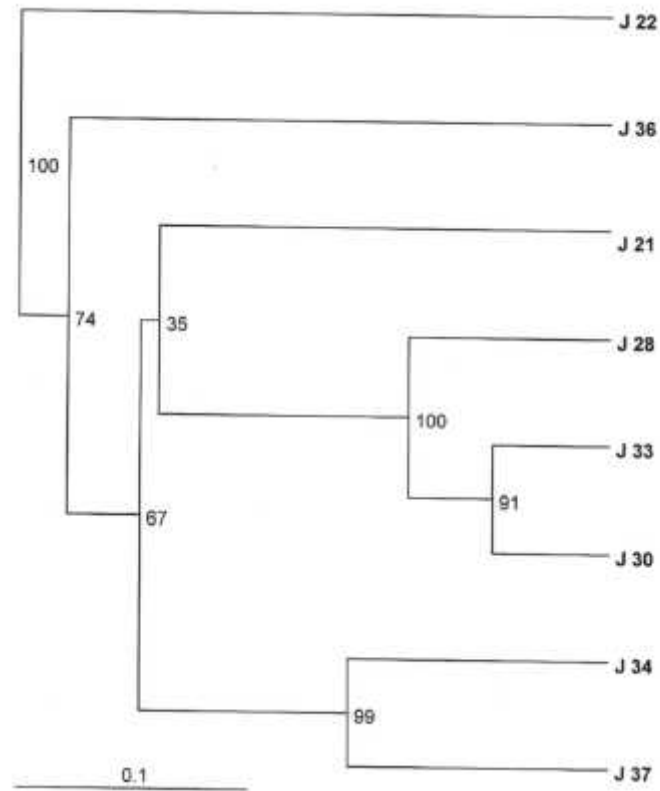
Variasi genetik jamblang Sulawesi Utara yang memiliki perbedaan dengan genetik jamblang dari data Gen Bank⁸

⁷ Rosannah dkk, 2015, *Distribusi Syzygium cumini (L) Skeels di Aceh Besar*, jurnal

⁸ Irawan dkk, 2016, *Analisis Sekuens dan Filogenetik Beberapa Tumbuhan Syzygium (Myrtaceae) di Sulawesi Utara Berdasarkan Gen matK*, jurnal

F. Filogenetik Jamblang

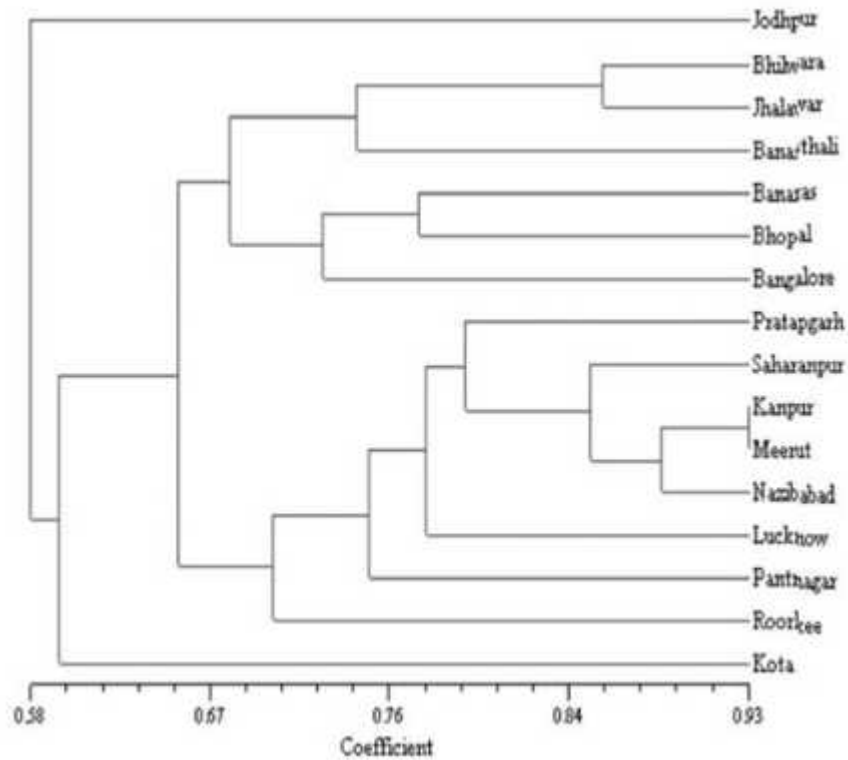
Dendogram filogenetik Jamblang di India menunjukkan pengelompokan jemblang berdasarkan perbedaan wilayah geografi⁹.



Gambar 1. Dendogram Filogenetik Jamblang India: Pengelompokan berdasarkan perbedaan wilayah geografi

⁹ Shakiya dkk, 2010, Molecular Characterization of Jamun (*Syzygium cumini* L. Skeels) Genetic Resources, jurnal

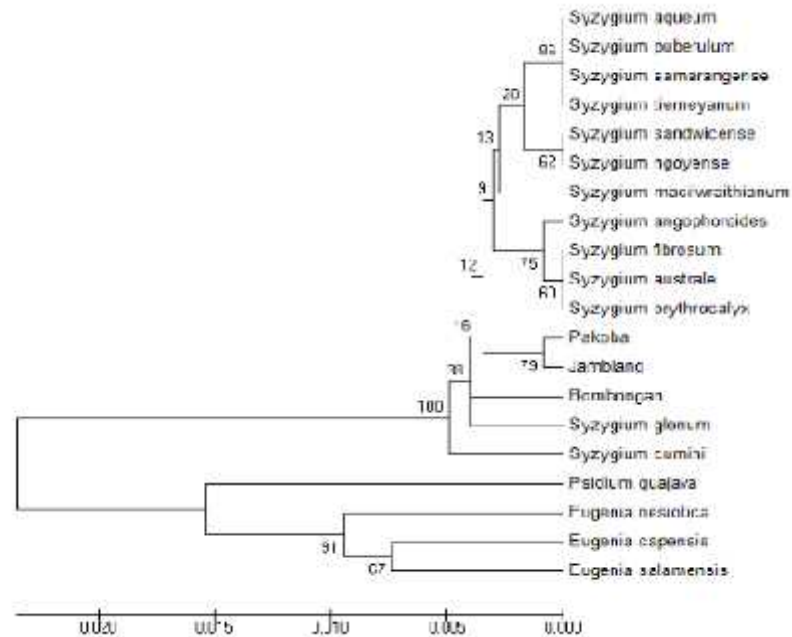
Hubungan genetik Jamblang India berdasarkan genotipe dapat dilihat dari dendogram berikut ini¹⁰:



Gambar 2. Hubungan genetik Jamblang India berdasarkan genotipe

¹⁰ Khan dkk, 2010, Genetic differentiation and diversity analysis of medicinal tree *Syzygium cumini* (Myrtaceae) from ecologically different region of India, jurnal

Filogenetik dapat memisahkan pengelompokan Jamblang dengan spesies lainnya yang memiliki morfologi yang sama¹¹.



Gambar 3. Pengelompokan filogenetik Jamblang yang memiliki morfologi yang sama dengan spesies lain

G. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik laboratorium yang digunakan untuk membuat salinan DNA pada bagian target tertentu dalam jumlah jutaan hingga miliaran. Di dalam tubuh makhluk hidup perbanyakan DNA terjadi melalui proses replikasi. PCR merupakan manipulasi laboratorium untuk memperbanyak jumlah DNA. Tujuan teknik PCR adalah untuk membuat DNA target tertentu menjadi lebih

¹¹ Irawan dkk, 2016, *Analisis Sekuens dan Filogenetik Beberapa Tumbuhan Syzygium (Myrtaceae) di Sulawesi Utara Berdasarkan Gen matK*, jurnal

banyak sehingga data tersebut dapat dianalisis. PCR digunakan pada bidang biologi, kedokteran atau medis, kepolisian yang terkait kriminalitas, pertanian, dan peternakan.

Pada bidang biologi PCR digunakan untuk analisis sebagai berikut:

1. Klasifikasi makhluk hidup
2. Konservasi
3. Melihat sejarah evolusi
4. Variasi genetik dsb

Bahan yang digunakan dalam teknik PCR

1. Enzim *Taq Polymerase*

Enzim DNA polimerase berperan untuk membuat untai DNA baru setelah penempelan primer. *Taq* polimerase yang digunakan adalah bakteri tahan panas yang telah diisolasi (*Thermus aquaticus*). *T. aquaticus* hidup di mata air panas dan ventilasi hidrotermal. Stabilitas tahan panas bakteri ini dapat digunakan dalam PCR untuk mengubah sifat template DNA seperti pemisahan untai ganda DNA menjadi untai tunggal pada saat denaturasi.

2. Primer PCR

Primer PCR merupakan urutan pendek nukleotida yang memberikan titik awal untuk sintesis DNA baru. Primer dirancang oleh peneliti sesuai dengan wilayah target DNA yang akan diteliti. Primer PCR berukuran pendek berupa untai tunggal. Panjang nukleotida primer

umumnya sekitar 20 pasang basa. Jumlah primer yang digunakan setiap reaksi PCR berjumlah dua primer. Peneliti merancang sedemikian rupa sehingga wilayah target DNA diapit oleh sepasang primer. Primer awal menempel pada untaian ujung 5', sedangkan primer akhir menempel pada ujung 3'. Primer awal disebut dengan Primer Forward dan Primer akhir disebut dengan Primer Reverse. Primer menempel pada untaian tunggal DNA setelah untaian ganda terpisahkan melalui proses denaturasi. Primer menempel pada cetakan DNA dengan pasangan basa komplementer. Ketika primer menempel pada cetakan DNA, basa nukleotida baru setelah urutan primer disintesis oleh enzim Taq polimerase sesuai dengan komplementer cetakan sehingga terbentuk cetakan DNA baru.

3. DNA

DNA digunakan sebagai cetakan awal

Tahap PCR

1. Denaturasi, yaitu tahap cetakan untaian ganda DNA dipanaskan bertujuan untuk memisahkan untaian ganda DNA menjadi dua untaian tunggal.
2. Annealing, yaitu tahap ketika suhu diturunkan bertujuan untuk menempelkan primer DNA pada DNA cetakan.
3. Elongasi, yaitu tahap suhu dinaikkan bertujuan untuk sintesis untaian DNA baru yang dibuat oleh enzim Taq polimerase.

Denaturasi

Pada tahap denaturasi reaksi PCR yang berisi cetakan DNA, 2 pasang primer, enzim *Taq Polymerase* dipanaskan hingga 94-95⁰C. Suhu tinggi tersebut menyebabkan ikatan hidrogen lepas yang terletak diantara dua basa dalam dua untai DNA cetakan sehingga dua untai DNA tersebut terpisah.

Denaturasi menghasilkan dua untai DNA tunggal, dimana dua untai tunggal ini yang akan berperan sebagai cetakan untuk memproduksi untai DNA baru.

Pada tahap ini suhu tinggi dipertahankan dalam waktu cukup lama untuk memastikan bahwa untai DNA telah terpisah sepenuhnya. Waktu yang dibutuhkan selama antara 15-30 detik.

Annealing

Selama tahap ini reaksi PCR didinginkan hingga 50-65⁰C. Hal ini memungkinkan primer untuk melekat pada lokasi tertentu pada DNA template untai tunggal melalui ikatan hidrogen. Suhu annealing tergantung pada suhu titik leleh primer yang digunakan.

Primer berfungsi sebagai titik awal untuk memperbanyak cetakan DNA baru. Enzim polimerase hanya dapat menambahkan basa DNA ke untai ganda DNA. Setelah primer menempel, enzim *Taq* polimerase dapat menempel pada cetakan DNA dan memulai membuat untai pelengkap baru DNA dengan menambahkan basa DNA yang lepas pada DNA cetakan komplemen.

Dua untai DNA yang terpisah bersifat komplemen dari pasangannya. *Taq* polimerase berjalan dalam arah yang berlawanan yaitu

dari satu ujung 5' ke ujung akhir 3'. Hal ini mengakibatkan dua primer maju dan primer terbalik. Langkah ini biasanya membutuhkan waktu sekitar 10-30 detik.

Elongasi

Elongasi merupakan langkah akhir dimana suhu ditingkatkan menjadi 72°C untuk memungkinkan DNA baru dibuat oleh enzim polimerase DNA Taq khusus yang menambahkan basa DNA.

Enzim Taq polimerase merupakan bakteri yang sangat stabil pada suhu tinggi, sehingga mampu menahan suhu yang dibutuhkan untuk memecah untai DNA dalam tahap denaturasi PCR.

DNA polimerase dari sebagian besar organisme lain tidak akan mampu menahan suhu tinggi ini, misalnya, polimerase manusia bekerja idealnya pada 37°C (suhu tubuh).

Suhu 72°C adalah suhu optimal untuk Taq polimerase mensintesis untai komplementer. Enzim tersebut menempel pada primer dan kemudian menambahkan basis DNA ke untai tunggal satu per satu dalam arah 5' ke 3'. Hasilnya berupa untai DNA baru dan molekul DNA beruntai ganda.

Durasi langkah ini tergantung pada panjang urutan DNA target. Namun umumnya membutuhkan waktu sekitar satu menit untuk menyalin 1.000 basis DNA (1Kb).

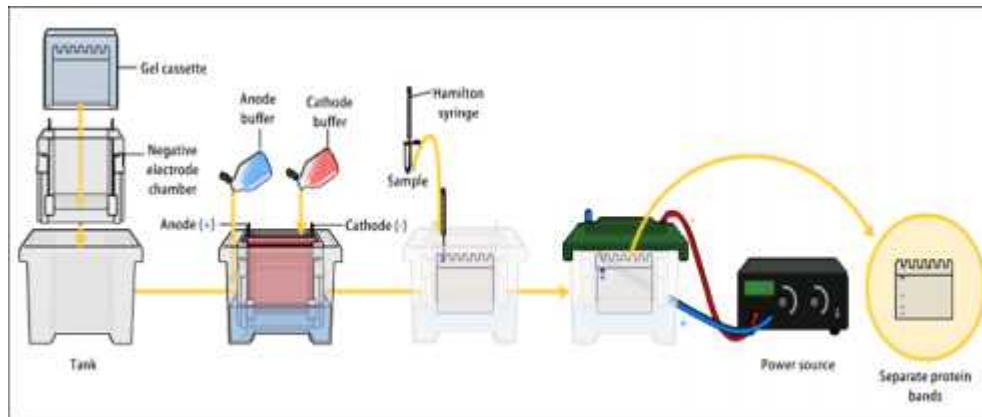
Siklus PCR

Ketiga tahap PCR tersebut dilakukan pengulangan proses yang disebut dengan siklus. Proses siklus diulangi dari 20-40 kali. Fragmen DNA baru

yang dibuat selama PCR juga berfungsi sebagai templet tempat enzim DNA polimerase dapat menempel dan mulai membuat DNA. Hal ini bertujuan untuk menghasilkan salinan dari urutan DNA dalam jumlah yang banyak sehingga hasil amplikon dapat divisualisasikan pada gel elektroforesis. Amplikon tersebut menentukan analisis yang dilakukan oleh peneliti. Hasilnya adalah sejumlah besar salinan dari segmen DNA spesifik yang diproduksi dalam waktu yang relatif singkat.

H. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan teknik yang digunakan untuk memisahkan DNA dengan cara melakukan migrasi DNA menggunakan arus listrik dan memisahkan DNA berdasarkan ukurannya. Ukuran DNA lebih pendek akan bermigrasi terlebih dahulu daripada DNA yang berukuran lebih panjang. Pemisahan DNA ini berdasarkan partikel bermuatan (ion) di bawah pengaruh medan listrik. Elektroforesis terdiri dari dua elektroda dengan muatan yang berlawanan yaitu anoda dan katoda. DNA bermuatan negatif pada gugus pospat yang melekat pada atom C ke 5. Elektroforesis menggunakan media gel sebagai tempat DNA kemudian direndam menggunakan buffer yang bersifat elektrolit. Media gel dan buffer dihubungkan oleh arus listrik. Efek pemisahan pada partikel ionik dihasilkan dari perbedaan kecepatan (v), yang merupakan hasil kali dari mobilitas partikel (m) dan kekuatan medan (E).



Gambar 4. Komponen elektroforesis

(Sumber <https://microbenotes.com/polyacrylamide-gel-electrophoresis-page/>)

Mobilitas partikel ionik ditentukan oleh ukuran partikel, bentuk, muatan, dan suhu selama pemisahan, dan konstan dalam kondisi elektroforesis yang ditentukan.

Ciri kondisi elektroforesis dicirikan oleh parameter listrik seperti arus, tegangan, daya, dan faktor-faktor lain seperti kekuatan ion, nilai pH, viskositas, ukuran pori, dan sebagainya. Elektroforesis menggambarkan media tempat partikel bergerak.

Penghilangan panas yang dihasilkan oleh aliran arus listrik adalah salah satu masalah utama dalam kebanyakan bentuk elektroforesis. Setiap perbedaan suhu menyebabkan variasi tingkat migrasi melalui medium, mengakibatkan distorsi pada pita molekul yang terpisah. Analisis elektroforesis dapat dilakukan pada suhu konstan.

Elektroforesis menggunakan medan listrik yang diterapkan pada media gel. Tujuan elektroforesis adalah untuk memisahkan molekul-molekul besar seperti DNA, RNA, dan protein. Pemisahan molekul berdasarkan muatan dan ukuran.

Prosedur yang dilakukan pada teknik elektroforesis adalah sampel dimasukkan ke dalam sumur pada media gel. Elektroforesis dapat memisahkan molekul berdasarkan ukuran dengan bantuan medan listrik yang dialirkan ke seluruh gel. Medan listrik ini menyebabkan molekul sampel yang bermuatan negatif bergerak menuju elektroda positif. Media gel mengandung serat selulosa berbentuk seperti saringan. Molekul terkecil akan melewati serat dengan cepat, sementara molekul yang lebih panjang bergerak lebih lambat. Sehingga molekul terkecil berada pada bagian bawah gel, sedangkan molekul besar berada pada bagian atas gel. Molekul DNA dan RNA bermuatan negatif. Muatan tersebut berada pada tulang punggung fosfat. Molekul protein memiliki muatan bervariasi.

Jenis gel yang berbeda memiliki ukuran pori yang berbeda pula. Gel berbentuk seperti saringan dengan mata jaring yang lebih halus atau lebih kasar. Jenis gel tertentu melakukan penyaringan yang lebih tepat dalam memisahkan molekul lebih kecil, sementara jenis gel lain berfungsi lebih baik untuk yang molekul lebih besar.

Jenis-jenis Elektroforesis

1. Elektroforesis gel agarosa

Elektroforesis gel agarosa adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan asam nukleat berdasarkan ukurannya. Agarose merupakan polisakarida yang bersumber dari rumput laut. Agarose ini dapat dilarutkan dalam buffer mendidih. Cara pembuatan gel agarose dengan cara memanaskan agar yang dilarutkan dalam buffer. Kemudian

dituangkan ke dalam nampan. Larutan tersebut akan menjadi gel saat mendingin untuk membentuk lempengan. Sebelum mengeras gel agarose ditancapkan sisir untuk membuat sumur tempat sampel DNA atau RNA ditempatkan setelah gel memadat. Gel direndam dalam buffer, kemudian dialirkan arus listrik ke seluruh cetakan. DNA beruntai ganda memiliki muatan negatif seragam yang tidak bergantung pada komposisi urutan molekul. Jika fragmen DNA ditempatkan di medan listrik, mereka akan bermigrasi dari katoda (-) menuju anoda (+). Laju migrasi secara langsung tergantung pada kemampuan setiap molekul DNA untuk menuju jalannya melalui celah-celah selulosa dalam gel sebagai penyaring. Matriks agarosa menyediakan celah untuk makromolekul melewati dan bergerak. Makromolekul terbesar memiliki waktu yang paling sulit untuk menembus gel, sedangkan makromolekul terkecil melewati paling cepat.

Visualisasi dari teknik Elektroforesis digunakan untuk menentukan kualitas asam nukleat setelah dilakukan ekstraksi. Elektroforesis asam nukleat umumnya dilakukan dalam pH yang sedikit basa. pH ini bertujuan untuk mengionisasi semua gugus fosfat di tulang punggung molekul. DNA adalah molekul bermuatan negatif dan karena itu akan bermigrasi menuju anoda positif dengan dialirkan arus listrik dalam larutan elektrolit. Pergerakan molekul ditentukan oleh ukuran. Pewarna interkalasi fluoresen yang ditambahkan dalam larutan, digunakan untuk memvisualisasikan sampel yang disiapkan. Pewarna tersebut diantaranya adalah etidium bromida atau SYBR Green II. Elektroforesis dapat memvisualisasikan sampel dan mengevaluasi

keberadaan DNA dengan berat molekul tinggi setelah dilakukan ekstraksi.

Denaturasi elektroforesis gel poliakrilamida akan memberikan resolusi terbaik dari panjang asam nukleat untuk produk yang dimurnikan lebih kecil, sementara gel agarosa yang tidak mendenaturasi lebih tepat untuk menentukan ukuran produk yang lebih besar.

2. Elektroforesis Gel Poliakrilamid

Elektroforesis gel poliakrilamida akan memberikan resolusi terbaik dari panjang asam nukleat untuk produk yang dimurnikan lebih kecil, sementara gel agarosa yang tidak mendenaturasi lebih tepat untuk menentukan ukuran produk yang lebih besar. Teknik elektroforesis memisahkan molekul yang memiliki muatan dalam medan listrik. Mobilitas suatu molekul berbanding terbalik dengan ukurannya dan berbanding lurus dengan muatannya. Selama elektroforesis, protein bergerak menuju elektroda yang bermuatan berlawanan dalam medan listrik.

Laju pergerakannya dalam sistem elektroforesis diatur oleh beberapa faktor seperti suhu, pH, dan konsentrasi buffer selain sifat intrinsiknya seperti ukuran, muatan, dan bentuk protein. Pemisahan elektroforetik protein secara ketat berdasarkan berat molekulnya hanya mungkin jika muatan semua molekul protein dapat dimanipulasi ke tanda yang sama. Dalam kasus seperti itu, mobilitas molekul protein hanya akan bergantung pada ukurannya.

Elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE) adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan ukurannya. Prinsip

PAGE deterjen anionik yang disebut natrium dodesil sulfat (SDS) digunakan untuk mengikat protein dan memberinya muatan negatif. Protein kemudian dipisahkan secara elektroforesis sesuai dengan ukurannya menggunakan matriks gel yang terbuat dari poliakrilamida dalam medan listrik.

Poliakrilamida dihasilkan sebagai hasil dari reaksi polimerisasi antara akrilamida dan N, N'-metilen-bis-akrilamida (BIS) menggunakan katalis. Derajat polimerisasi atau ikatan silang dapat dikontrol dengan mengatur konsentrasi akrilamida dan BIS. Semakin banyak ikatan silang semakin keras gelnya. Kepadatan gel memodulasi gesekan yang dialami makromolekul saat bergerak melalui gel selama PAGE, sehingga mempengaruhi resolusi pemisahan. Gel lepas (4-8% akrilamida) memungkinkan molekul dengan berat molekul yang lebih tinggi untuk bermigrasi lebih cepat melalui gel sementara gel lebih keras (12-20% akrilamida) membatasi migrasi molekul besar dan secara selektif memungkinkan molekul kecil untuk bergerak melalui gel¹².

Teknik elektroforesis memisahkan molekul yang memiliki muatan dalam medan listrik. Mobilitas suatu molekul berbanding terbalik dengan ukurannya dan berbanding lurus dengan muatannya. Selama elektroforesis, protein bergerak menuju elektroda yang bermuatan berlawanan dalam medan listrik. Lajupergerakannya dalam sistem elektroforesis diatur oleh beberapa faktor seperti suhu, pH, dan konsentrasi buffer selain sifat intrinsiknya seperti ukuran, muatan, dan bentuk protein.

¹² [https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis-\(PAGE\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis-(PAGE).aspx)

Pemisahan elektroforetik protein secara ketat berdasarkan berat molekulnya hanya mungkin jika muatan semua molekul protein dapat dimanipulasi ke tanda yang sama. Dalam kasus seperti itu, mobilitas molekul protein hanya akan bergantung pada ukurannya.

Elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE) adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan protein berdasarkan ukurannya.

Dalam prinsip PAGE, deterjen anionik yang disebut natrium dodesil sulfat (SDS) digunakan untuk mengikat protein dan memberinya muatan negatif. Protein kemudian dipisahkan secara elektroforesis sesuai dengan ukurannya menggunakan matriks gel yang terbuat dari poliakrilamida dalam medan listrik. Poliakrilamida dihasilkan sebagai hasil dari reaksi polimerisasi antara akrilamida dan N, N'-metilen-bis-akrilamida (BIS) menggunakan katalis. Derajat polimerisasi atau ikatan silang dapat dikontrol dengan mengatur konsentrasi akrilamida dan BIS. Semakin banyak ikatan silang semakin keras gelnya. Kepadatan gel memodulasi gesekan yang dialami makromolekul saat bergerak melalui gel selama PAGE, sehingga mempengaruhi resolusi pemisahan.

Gel lepas (4-8% akrilamida) memungkinkan molekul dengan berat molekul yang lebih tinggi untuk bermigrasi lebih cepat melalui gel sementara gel lebih keras (12-20% akrilamida) membatasi migrasi molekul besar dan secara selektif memungkinkan molekul kecil untuk bergerak melalui gel.

Cara Pembuatan Gel Poliakrilamid

Gel biasanya terdiri dari akrilamida, bisakrilamida, denaturant opsional (SDS atau urea), dan buffer dengan pH yang disesuaikan. Perbandingan bisakrilamida dengan akrilamida dapat divariasikan untuk tujuan khusus, tetapi umumnya sekitar 1 bagian dalam 35. Konsentrasi akrilamida dari gel juga dapat divariasikan, umumnya dalam kisaran dari 5% sampai 25%. Gel dengan persentase yang lebih rendah lebih baik untuk menyelesaikan molekul dengan berat molekul yang sangat tinggi, sementara persentase akrilamida yang jauh lebih tinggi diperlukan untuk menyelesaikan protein yang lebih kecil,

Gel biasanya dipolimerisasi di antara dua pelat kaca dalam kastor gel, dengan sisir dimasukkan di bagian atas untuk membuat sumur sampel. Setelah gel dipolimerisasi, sisir dapat dilepas dan gel siap untuk elektroforesis. Gel dengan persentase yang lebih rendah lebih baik untuk menyelesaikan molekul dengan berat molekul yang sangat tinggi, sementara persentase akrilamida yang jauh lebih tinggi diperlukan untuk menyelesaikan protein yang lebih kecil. Gel biasanya dipolimerisasi di antara dua pelat kaca dalam kastor gel, dengan sisir dimasukkan di bagian atas untuk membuat sumur sampel. Setelah gel dipolimerisasi, sisir dapat dilepas dan gel siap untuk elektroforesis.

Berbagai buffer digunakan dalam PAGE tergantung pada sifat sampel dan tujuan eksperimental. Buffer yang digunakan di anoda dan katoda mungkin sama atau berbeda. Medan listrik diterapkan melintasi gel, menyebabkan protein atau asam nukleat bermuatan negatif

bermigrasi melintasi gel menjauh dari negatif dan menuju elektroda positif (anoda).

Bergantung pada ukurannya, setiap biomolekul bergerak secara berbeda melalui matriks gel: molekul kecil lebih mudah masuk melalui pori-pori dalam gel, sedangkan molekul yang lebih besar memiliki lebih banyak kesulitan. Gel biasanya bekerja selama beberapa jam, meskipun ini tergantung pada tegangan yang diterapkan pada gel. Setelah waktu yang ditentukan, biomolekul akan bermigrasi dalam jarak yang berbeda berdasarkan ukurannya. Biomolekul yang lebih kecil bergerak lebih jauh ke bawah gel, sedangkan yang lebih besar tetap lebih dekat ke titik asal. Oleh karena itu, biomolekul dapat dipisahkan secara kasar menurut ukurannya, yang terutama bergantung pada berat molekul dalam kondisi denaturasi.

Akrilamida biasanya dijual dalam bentuk cair, karena bentuk bubuk bersifat neurotoksik dan berbahaya untuk ditangani. Polimerisasi dicapai dengan mencampurkan akrilamida dengan bis-akrilamida, yang memungkinkan ikatan silang terbentuk di antara molekul akrilamida. Bahan kimia tambahan ditambahkan untuk memulai polimerisasi, biasanya amonium persulfat sebagai sumber radikal bebas dan TEMED sebagai penstabil. Setelah polimerisasi dimulai, gel dituangkan di antara 2 pelat kaca dan dibiarkan berpolimerisasi sepenuhnya. Campuran gel tidak dibuat dalam air tetapi dalam buffer elektroforesis (Tris-HCl), yang menyediakan ion-ion untuk elektroforesis. Seringkali, gel dituang menjadi 2 bagian. Bagian pertama adalah gel pemecahan, dengan pH sekitar 8,8 yang memperlambat migrasi protein. Di atas resolving gel dituangkan stacking gel dengan pH 6,8 dan ukuran pori yang lebih besar.

Gel susun ini bekerja untuk memampatkan sampel protein menjadi bagian depan migrasi tipis, sehingga semua protein dalam sampel tiba di gel pemecahan pada saat yang bersamaan, yang mengarah ke migrasi relatif yang akurat¹³.

I. Sequencing

Sequencing adalah proses menentukan urutan basa nukleotida (A, T, C, dan G) dalam sebuah DNA. Saat ini, dengan peralatan dan bahan yang tepat, mengurutkan potongan pendek DNA relatif mudah. Mengurutkan seluruh genom (semua DNA organisme) tetap menjadi tugas yang kompleks. Hal ini membutuhkan pemecahan DNA dari genom menjadi banyak bagian yang lebih kecil, mengurutkan potongan-potongan tersebut, dan menyusun urutan menjadi satu "konsensus" yang panjang. Namun, berkat metode baru yang telah dikembangkan selama dua dekade terakhir, pengurutan genom sekarang jauh lebih cepat dan lebih murah untuk melihat Genom Manusia.

Sejarah sequencing dimulai ketika Watson dan Crick menemukan struktur DNA pada tahun 1953. Pada tahun 1964, Richard Holley yang melakukan sekuensing tRNA adalah upaya pertama untuk mengurutkan asam nukleat. Dengan menggunakan teknik Holley dan Walter Fieser, mereka mengurutkan genom bakteriofag MS2 (sekuensing RNA). Molekul yang diurutkan adalah RNA, namun pengurutan DNA tidak dilakukan.

Pada tahun 1977, Fredrick Sanger mendalilkan metode pertama untuk sekuensing DNA, dinamakan metode terminasi rantai. Pada tahun

¹³ <https://www.cleaverscientific.com/applications/polyacrylamide-gel-electrophoresis>

yang sama, metode kimia sekuensing DNA dijelaskan oleh Allan Maxam dan Walter Gilbert. Genom bakteriofag X174 diurutkan pada tahun yang sama dengan menggunakan metode degradasi kimia.

Karena kurangnya otomatisasi, Kedua metode (degradasi kimiawi dan penghentian rantai) membosankan dan memakan waktu. Metode DNA semi-otomatis pertama dikembangkan oleh Lorey dan Smith pada tahun 1986. Kemudian, pada tahun 1987, Applied Biosystem telah mengembangkan metode sekuensing DNA yang dikendalikan mesin secara otomatis. Setelah pengembangan mesin yang sepenuhnya otomatis, era 2000-an menjadi masa emas bagi platform sequencing.

Selanjutnya, pada tahun 1996, Applied Biosystem mengembangkan platform sekuensing inovatif lainnya yang dikenal sebagai sekuensing DNA kapiler. Setelah itu, proyek genom manusia diselesaikan dengan menggunakan kombinasi metode tersebut pada tahun 2003. Platform sekuensing generasi berikutnya yang cepat, akurat, andal, dan sangat efisien didalilkan pada tahun 2005 oleh Solexa/Illumina. Beberapa tonggak urutan DNA ditunjukkan pada gambar di bawah ini. Mempelajari variasi alel tidak cukup dalam beberapa kasus, lebih lanjut, dengan menggunakan metode seperti reaksi berantai polimerase, polimorfisme baru tidak dapat diidentifikasi. Untuk mengatasi masalah ini, metode sekuensing DNA dikembangkan.

Teknik laboratorium yang digunakan untuk mengetahui urutan DNA yang benar dengan reaksi kimia sekuensial dikenal sebagai sekuensing DNA. Pengolahan laboratorium dan analisis komputasi keduanya adalah proses kunci dalam sekuensing DNA. Setelah reaksi kimia selesai, data yang dihasilkan mesin dikirim ke lab komputer.

Dalam prosesnya, amplifikasi yang dilakukan oleh masing-masing nukleotida direkam dalam bentuk sinyal yang dikumpulkan oleh mesin dan dianalisis di komputer. Ini adalah mekanisme dasar, nukleotida diberi label radio atau fluoresen.

Langkah-langkah yang disebutkan di bawah ini adalah representasi umum dari sekuensing DNA, mungkin berbeda dari platform ke platform.

1. Preparasi sampel (ekstraksi DNA)
2. Amplifikasi PCR dari urutan target
3. Pemurnian amplicon
4. Mengurutkan pra-persiapan
5. Pengurutan DNA
6. Analisis data

DNA adalah bahan utama, oleh karena itu perlu mengisolasi DNA terlebih dahulu. DNA hewan, tumbuhan, bakteri, plasmid, atau lingkungan dapat digunakan untuk itu. Karena kualitas DNA adalah perhatian utama dalam sekuensing, kami merekomendasikan penggunaan metode ekstraksi proteinase K atau DNA spin-column yang memiliki hasil tinggi. Dengan kuantitas, kualitas DNA yang baik juga mengurangi kemungkinan terjadinya kegagalan reaksi. Secara meyakinkan, sampel DNA dengan rasio 260/280 hampir ~ 1,80 (atau 1,7 hingga 1,88) dianggap sebagai DNA murni. Jumlah DNA harus ~ 100ng untuk pengujian ini. Amplifikasi adalah langkah penting dalam pengurutan. di sini hanya gen yang diinginkan atau urutan DNA yang ingin kita pelajari yang pertama kali diamplifikasi, sisa DNA lainnya

dibuang. Meskipun demikian, dalam sekuensing seluruh genom, seluruh genom suatu organisme dapat diurutkan.

Pra-persiapan sampel adalah langkah yang sangat penting selama sekuensing DNA. Selama langkah ini, urutan DNA adaptor diligasi di kedua ujung DNA. Untuk adaptor, anil primer untuk melakukan amplifikasi. Proses amplifikasi dalam sekuensing mirip dengan PCR, namun, di sini nukleotida diberi label radio atau fluoresen.

Tabung reaksi yang disiapkan ditempatkan ke mesin sequencer. Selama, reaksi di sequencer, denaturasi, anil, dan ekstensi terjadi secara bersamaan. Di sini, karena kita menggunakan nukleotida berlabel, sinyal yang dihasilkan selama reaksi dicatat. Sinyal penambahan setiap nukleotida komplementer dicatat oleh mesin dan datanya dikirim ke komputer. Dengan itu, DNA polimerase kesetiaan tinggi dan bahan utama lainnya ditambahkan dalam reaksi.

Setelah seluruh DNA diurutkan, hasilnya disimpan ke dalam satu format file unik. Perangkat lunak bawaan (disediakan oleh pabrikan) memproses data dan membandingkannya dengan data yang tersedia. Data sekuens dibandingkan dengan data lain yang tersedia oleh perangkat lunak untuk mengetahui variasi dan mutasi lain yang ada dalam gen

Para peneliti sekarang dapat membandingkan bentangan besar DNA - 1 juta basa atau lebih - dari individu yang berbeda dengan cepat dan murah. Perbandingan semacam itu dapat menghasilkan banyak sekali informasi tentang peran warisan dalam kerentanan terhadap penyakit dan dalam menanggapi pengaruh lingkungan. Selain itu,

kemampuan untuk mengurutkan genom dengan lebih cepat dan hemat biaya menciptakan potensi besar untuk diagnosis dan terapi.

Meskipun pengurutan DNA rutin di ruang praktik dokter masih beberapa tahun lagi, beberapa pusat kesehatan besar sudah mulai menggunakan pengurutan untuk mendeteksi dan mengobati beberapa penyakit. Pada kanker, misalnya, dokter semakin dapat menggunakan data urutan untuk mengidentifikasi jenis kanker tertentu yang diderita pasien. Ini memungkinkan dokter untuk membuat pilihan yang lebih baik untuk perawatan.

Para peneliti di Program Penyakit Tidak Terdiagnosis yang didukung NHGRI menggunakan pengurutan DNA untuk mencoba mengidentifikasi penyebab genetik penyakit langka. Peneliti lain sedang mempelajari penggunaannya dalam skrining bayi baru lahir untuk penyakit dan risiko penyakit.

Selain itu, proyek The Cancer Genome Atlas, yang didukung oleh NHGRI dan National Cancer Institute, menggunakan sekuensing DNA untuk mengungkap detail genom dari sekitar 30 jenis kanker. Program Institut Kesehatan Nasional lainnya meneliti bagaimana aktivitas gen dikontrol di berbagai jaringan dan peran regulasi gen dalam penyakit. Proyek skala besar yang sedang berlangsung dan terencana menggunakan sekuensing DNA untuk memeriksa perkembangan penyakit umum dan kompleks, seperti penyakit jantung dan diabetes, dan penyakit bawaan yang menyebabkan malformasi fisik, keterlambatan perkembangan, dan penyakit metabolik¹⁴.

¹⁴ <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Fact-Sheet>

Mesin pengurutan tidak dapat melihat DNA secara langsung, jadi para ilmuwan harus menggunakan serangkaian prosedur yang rumit untuk mempersiapkan pengurutan DNA. Ketika DNA akhirnya dalam bentuk yang dapat dibaca mesin, itu telah dipotong, disalin, dimodifikasi secara kimiawi, dan diberi label dengan pewarna fluoresen yang sesuai dengan empat basis DNA yang berbeda, atau huruf genetik.

Sebelum diurutkan, sepotong DNA disalin berkali-kali, kemudian dibagi menjadi empat kelompok sebagai persiapan untuk penyalinan putaran berikutnya. Dalam putaran kedua ini, sejumlah kecil basa yang dimodifikasi secara kimiawi ditambahkan ke setiap batch – yaitu, T dimodifikasi ke satu batch, A ke batch lainnya, dan seterusnya. Ketika salah satu dari basa yang dimodifikasi ini dimasukkan ke dalam molekul DNA, rantai basa berhenti tumbuh. Hasil dari semua ini adalah bahwa satu kumpulan DNA hanya akan berisi potongan yang berakhiran T, yang lain hanya potongan yang berakhiran A, hanya potongan ketiga yang berakhiran G, dan kumpulan keempat hanya potongan yang berakhiran C¹⁵.

Pada putaran kedua penyalinan, pewarna fluoresen yang berbeda juga ditambahkan ke setiap kumpulan DNA. Jadi, setiap potongan DNA yang diakhiri dengan T memiliki tanda pewarna biru, misalnya; yang berakhiran A memiliki tanda pewarna merah; yang berakhiran G memiliki tanda pewarna kuning; dan yang berakhiran C memiliki tanda pewarna hijau.

Misalkan pada urutan DNA ini: TAGACT, Di akhir penyalinan putaran kedua, setiap kumpulan akan berisi potongan DNA berikut:

¹⁵ http://www.genomenewsnetwork.org/resources/whats_a_genome/Chp2_2.shtml

- 1: biru-T, biru-TAGACT
- 2: merah-TA, merah-TAGA
- 3: TAG kuning
- 4: hijau-TAGAC

Ke dalam satu jalur atau kapiler mesin sekuensing mengalir campuran DNA dari keempat batch. Karena molekul yang lebih kecil bergerak melalui gel lebih cepat, potongan DNA melewati gel dengan urutan ukuran yang semakin besar – setiap bagian satu basa lebih panjang dari yang terakhir.

Potongan pertama yang membuatnya menembus gel adalah T yang ditempelkan pada label pewarna biru; potongan berikutnya adalah TA dengan tanda pewarna merah; selanjutnya adalah TAG yang ditempelkan pada tanda pewarna kuning; dan seterusnya.

Saat potongan-potongan tersebut muncul dari gel, mereka bergerak melewati laser yang menyebabkan molekul pewarna berpendar. Detektor membaca warna fluoresensi – biru, merah, kuning... – dan program perangkat lunak mencocokkan warna dengan basis yang sesuai – T, A, G.... Dengan cara ini, urutan tumbuh berdasarkan basis. Setiap urutan dari 500 basis atau lebih yang dihasilkan oleh mesin pengurut dikenal sebagai "pembacaan".

Sebuah mesin pengurut otomatis mengeluarkan apa yang oleh para ilmuwan genom disebut sebagai urutan "mentah". Dalam urutan mentah, urutan bacaan atau DNA pendek semuanya campur aduk, seperti potongan teka-teki gambar di kotak yang baru saja dibuka. Tak pelak lagi, raw sequence juga mengandung sedikit celah, kesalahan, dan ambiguitas.

Proses pemolesan urutan mentah itu mengubah draft kasar yang terfragmentasi menjadi produk akhir yang panjang dan terus menerus tanpa jeda atau kesalahan disebut finishing. Penyelesaian melibatkan kedua perakitan, di mana pembacaan individu dihubungkan bersama dalam urutan yang benar, dan proses yang melelahkan untuk memeriksa ulang dan menyempurnakan urutan untuk menghilangkan kesalahan dan menutup celah. Penyelesaian seringkali membutuhkan waktu lebih lama daripada pengurutan itu sendiri.

Perakitan genom adalah pekerjaan program komputer yang cukup dikenal sebagai "assembler". Program-program ini bekerja dengan menemukan dan menganalisis tumpang tindih, atau urutan DNA identik di kedua ujung dari dua bacaan yang berbeda.

Pada pandangan pertama, orang mungkin berpikir bahwa bacaan yang tumpang tindih itu berada di samping satu sama lain dalam urutan genom terakhir. Namun, genom mengandung lebih dari 30 persen urutan yang diulang beberapa kali, sehingga tumpang tindih berulang juga dapat terjadi antara fragmen yang berjarak jutaan pasangan basa dalam genom.

Tugas assembler adalah membandingkan setiap pembacaan satu sama lain, lalu meletakkan semua pembacaan dalam urutan yang benar berdasarkan bagaimana pembacaan itu tumpang tindih, bukan menggunakan tumpang tindih berulang. Hasil dari perakitan adalah kumpulan genom besar yang disatukan dengan benar.

Perakitan genom adalah pekerjaan program komputer yang cukup dikenal sebagai "assembler". Program ini bekerja dengan

menemukan dan menganalisis tumpang tindih, atau urutan DNA identik di kedua ujung dari dua bacaan yang berbeda.

Prosesnya sangat mirip dengan menyusun teka-teki gambar secara metodis menempatkan potongan teka-teki di samping satu sama lain untuk melihat apakah mereka cocok satu sama lain, lalu menjentikkan potongan-potongan yang cocok ke tempatnya.

Program perakitan terus meningkat sejak perangkat lunak pertama tersebut ditulis pada awal 1980-an. Komputer yang lebih kuat juga membantu para ilmuwan mengumpulkan potongan DNA yang lebih besar lebih cepat dari sebelumnya.

Namun demikian, perangkat lunak perakitan yang paling kuat sekalipun lebih mengandalkan keanggunan dan kesederhanaan daripada kekerasan. Banyak assembler hanya sebagian kecil dari ukuran program pengolah kata pada umumnya – 150.000 hingga 200.000 baris kode dibandingkan dengan beberapa juta. Program yang digunakan untuk merakit genom manusia akan dengan mudah masuk ke hard disk komputer pribadi pada umumnya.

Tapi Anda tidak bisa menjalankan assembler dari komputer di meja Anda. Karena banyaknya jumlah – jutaan triliun – perbandingan yang harus dibuat dan dipantau, assembler membutuhkan banyak memori untuk dijalankan – ribuan kali RAM yang dibutuhkan untuk menjalankan program pengolah kata dan lebih banyak dari yang mungkin Anda miliki di komputer desktop Anda.

Kesalahan dapat muncul pada setiap tahap proses saat DNA dipotong, saat disalin, saat melewati mesin sekuensing, atau saat disatukan. Beberapa urutan sangat sulit untuk disalin atau diurutkan dan

ditinggalkan. Dalam data dapat menyebabkan kesalahan dapat diidentifikasi atau diabaikan. Kombinasi dari redundansi dan pemeriksaan yang cermat membantu memastikan bahwa kesalahan dalam pengurutan genom dapat dilakukan seminimal mungkin.

Salah satu cara untuk menghilangkan atau meminimalkan kesalahan adalah dengan mengurutkan genom lebih dari satu kali. Artinya, para ilmuwan memotong banyak salinan genom sedemikian rupa sehingga setiap basis diurutkan beberapa kali rata-rata 6 hingga 10 kali, bergantung pada proyek tertentu. Dengan begitu, jika mesin pengurutan mendapatkan basis yang salah, atau jika sepotong DNA hilang dari celah dan tidak berhasil diurutkan, kemungkinan ada pembacaan lain yang benar yang akan memberikan urutan.

Selain mengidentifikasi basis DNA, perangkat lunak pada mesin sekuensing otomatis dapat mengevaluasi kemungkinan bahwa basis tersebut benar-benar basis yang terlihat. Probabilitas kesalahan untuk semua pangkalan dalam pembacaan ditambahkan bersama untuk perkiraan jumlah kesalahan dalam urutan.

Bacaan yang tidak benar atau bagian dari bacaan yang memiliki banyak kesalahan dapat diabaikan bahkan sebelum data tersebut mencapai tahap selanjutnya. Dengan mesin slab-gel, sebagian dari kontrol kualitas ini dilakukan oleh manusia, sedangkan dengan pengurut kapiler secara eksklusif merupakan bagian dari komputer.

Selain itu, perangkat lunak assembler membandingkan semua bacaan berbeda yang mencakup bentangan DNA yang sama dan menghasilkan apa yang dikenal sebagai urutan "konsensus". Misalnya, jika basis tertentu keluar sebagai A sembilan kali dan C kesepuluh, maka

kemungkinan basis tersebut benar-benar A. Seorang assembler dirancang untuk menyaring informasi yang saling bertentangan dan memutuskan urutan mana yang mungkin benar.

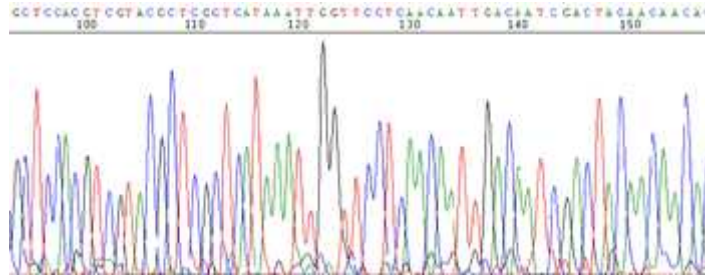
Setelah urutan tersusun, ada beberapa cara untuk memastikannya telah disatukan dengan benar. Urutan ini dapat diperiksa terhadap bagian kecil dari genom yang sebelumnya telah diurutkan dan dirakit atau terhadap berbagai penanda pada peta genom. Dengan kata lain, jika suatu assembly konsisten dengan bit informasi yang diketahui tersebar, itu pertanda benar secara keseluruhan.

Meskipun program komputer dapat membantu menyelesaikan kesenjangan dan ketidakpastian dalam urutan genom, banyak pemolesan akhir masih dilakukan oleh orang-orang yang dikenal sebagai finishers. Para pekerja ahli ini mengidentifikasi celah dalam urutan, merancang eksperimen untuk mengisi celah tersebut, dan menentukan cara mengumpulkan informasi tambahan yang diperlukan.

Tidak ada pengganti mekanis untuk intuisi dan kecerdasan finisher berpengalaman, jadi penyelesaian saat ini menjadi hambatan dalam proses sekuensing DNA. Mesin pengurutan otomatis dapat menghasilkan urutan mentah jauh lebih cepat daripada yang dapat dianalisis dan dipoles oleh manusia.

Banyak ilmuwan meramalkan suatu hari ketika pengurutan genom akan menjadi rutin ketika pengurutan genom dari banyak spesies yang berbeda akan membantu ahli biologi memahami pola evolusi, atau ketika pengurutan genom manusia akan membantu dokter merancang obat yang dibuat khusus. Tetapi sampai mesin yang cepat menjadi

penuntas sekaligus pengurut, skenario itu akan tetap menjadi fiksi ilmiah.



Gambar 5. Visualisasi sampel hasil sequencing

(Sumber: http://www.genomenetwork.org/resources/whats_a_genome/Chp2_3.shtml)

Berbagai metode sequencing DNA:

1. Metode Maxam dan Gilbert
2. Metode penghentian rantai
3. Metode semi otomatis
4. Metode otomatis
5. Pyrosequencing
6. Metode pengurutan senapan seluruh genom
7. Kloning dengan metode pengurutan klon
8. Metode pengurutan generasi berikutnya
9. Metode Sanger

Metode Maxam dan Gilbert

Metode Maxam dan Gilbert dikembangkan pada tahun 1977. Ini juga disebut sebagai metode pembelahan kimiawi. Dengan

menggunakan metode ini, mereka hanya mengurutkan 24 nukleotida. Namun, metode mereka diterbitkan setelah dua tahun metode Sanger.

Ekstraksi DNA adalah langkah pertama. Setelah itu, DNA didenaturasi menggunakan metode denaturasi panas dan DNA untai tunggal dihasilkan. Ujung fosfat (5 'P) dari DNA dihilangkan dan diberi label oleh P32 berlabel radiol. Enzim bernama fosfatase menghilangkan fosfat dari DNA dan secara bersamaan, kinase menambahkan 32P ke ujung 5'. Empat bahan kimia yang berbeda digunakan untuk memisahkan DNA di empat posisi berbeda; hidrazin dan hidrazin NaCl secara selektif menyerang nukleotida pirimidin sedangkan dimetil sulfat dan piperidin menyerang nukleotida purin.

Hidrazin: T + C

Hidrazin NaCl: C

Dimetil sulfat: A + G

Piperidine: G

Volume yang sama dari 4 sampel ssDNA berbeda diambil ke dalam 4 tabung berbeda yang masing-masing berisi 4 bahan kimia berbeda. Sampel diinkubasi dan dielektroforesis dalam elektroforesis gel poliakrilamida. Autobiografi digunakan untuk memvisualisasikan pemisahan fragmen DNA. Karena ujung DNA 32P yang diberi label radiol, pita DNA divisualisasikan melalui autoradiografi. Metode ini lebih akurat daripada pengurutan Sanger. Ini paling cocok untuk jejak DNA dan studi struktur DNA. Daerah DNA dengan panjang sekitar 900 pasangan basa secara rutin diurutkan menggunakan metode yang disebut sekuensing Sanger atau metode penghentian rantai. Pengurutan

sanger dikembangkan oleh ahli biokimia Inggris Fred Sanger dan rekan-rekannya pada tahun 1977.

Dalam Proyek Genom Manusia, sekuensing Sanger digunakan untuk menentukan sekuens banyaknya fragmen DNA manusia yang relatif kecil. Fragmen-fragmen tersebut disejajarkan berdasarkan bagian yang tumpang tindih untuk menyusun urutan wilayah DNA yang lebih besar dan seluruh kromosom.

Meskipun genom sekarang biasanya diurutkan menggunakan metode lain yang lebih cepat dan lebih murah, pengurutan Sanger masih digunakan secara luas untuk pengurutan potongan-potongan DNA individu, seperti fragmen yang digunakan dalam kloning DNA atau dihasilkan melalui reaksi rantai polimerase (PCR).

Pengurutan sanger melibatkan pembuatan banyak salinan dari wilayah DNA target. Bahan-bahannya mirip dengan yang dibutuhkan untuk replikasi DNA dalam suatu organisme, atau untuk polymerase chain reaction (PCR), yang menyalin DNA secara *in vitro*. Mereka termasuk:

1. Enzim DNA polimerase
2. Primer, yang merupakan potongan pendek DNA untai tunggal yang mengikat DNA cetakan dan bertindak sebagai "starter" untuk polimerase
3. Empat nukleotida DNA (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
4. DNA template yang akan diurutkan

Namun, reaksi sekuensing Sanger juga mengandung bahan unik: Dideoksi, atau penghentian rantai, versi keempat nukleotida (ddATP,

ddTTP, ddCTP, ddGTP), masing-masing diberi label dengan warna pewarna yang berbeda.

Nukleotida diidoksi mirip dengan nukleotida biasa, atau deoksi, tetapi dengan satu perbedaan utama: mereka tidak memiliki gugus hidroksil pada karbon 3 'pada cincin gula. Dalam nukleotida biasa, gugus hidroksil 3 'bertindak sebagai "pengait", yang memungkinkan nukleotida baru ditambahkan ke rantai yang ada.

Setelah nukleotida dideoksi ditambahkan ke rantai, tidak ada hidroksil yang tersedia dan tidak ada lagi nukleotida yang dapat ditambahkan. Rantai diakhiri dengan nukleotida dideoksi, yang ditandai dengan warna pewarna tertentu tergantung pada basa (A, T, C atau G) yang dibawanya.

D Sampel DNA yang akan diurutkan digabungkan dalam sebuah tabung dengan primer, DNA polimerase, dan nukleotida DNA (dATP, dTTP, dGTP, dan dCTP). Keempat nukleotida dideoksi yang diberi label pewarna dan pemutusan rantai ditambahkan juga, tetapi dalam jumlah yang jauh lebih kecil daripada nukleotida biasa.

Campuran pertama-tama dipanaskan untuk mengubah sifat DNA cetakan (memisahkan untai), kemudian didinginkan sehingga primer dapat mengikat ke cetakan untai tunggal. Setelah primer terikat, suhu dinaikkan lagi, memungkinkan DNA polimerase untuk mensintesis DNA baru mulai dari primer. DNA polimerase akan terus menambahkan nukleotida ke rantai sampai terjadi penambahan nukleotida dideoksi, bukan yang normal. Pada saat itu, tidak ada lagi nukleotida yang dapat ditambahkan, sehingga untaianya akan berakhir dengan nukleotida dideoksi.

Proses ini diulangi dalam beberapa siklus. Pada saat siklus selesai, hampir dijamin bahwa nukleotida dideoksi akan tergabung di setiap posisi DNA target dalam setidaknya satu reaksi. Artinya, tabung akan berisi fragmen dengan panjang berbeda, berakhir di setiap posisi nukleotida dalam DNA asli (lihat gambar di bawah). Ujung fragmen akan diberi label pewarna yang menunjukkan nukleotida akhirnya.

Setelah reaksi selesai, fragmen-fragmen tersebut dijalankan melalui tabung tipis panjang yang berisi matriks gel dalam proses yang disebut elektroforesis gel kapiler. Fragmen pendek bergerak cepat melalui pori-pori gel, sementara fragmen panjang bergerak lebih lambat. Saat setiap fragmen melewati "garis akhir" di ujung tabung, itu diterangi oleh laser, memungkinkan pewarna yang menempel untuk dideteksi.

Fragmen terkecil (diakhiri hanya satu nukleotida setelah primer) melewati garis akhir terlebih dahulu, diikuti oleh fragmen terkecil berikutnya (mengakhiri dua nukleotida setelah primer), dan seterusnya. Jadi, dari warna pewarna yang terdaftar satu demi satu pada detektor, urutan potongan DNA asli dapat dibangun satu nukleotida pada satu waktu. Data yang direkam oleh detektor terdiri dari serangkaian puncak intensitas fluoresensi, seperti yang ditunjukkan pada kromatogram di atas. Urutan DNA dibaca dari puncak di kromatogram.

Pengurutan sanger memberikan urutan berkualitas tinggi untuk rentang DNA yang relatif panjang (hingga sekitar 900 pasangan basa). Ini biasanya digunakan untuk mengurutkan potongan DNA individu, seperti plasmid bakteri atau DNA yang disalin dalam PCR.

Namun, pengurutan Sanger mahal dan tidak efisien untuk proyek skala besar, seperti pengurutan seluruh genom atau metagenom ("genom

kolektif" dari komunitas mikroba). Untuk tugas-tugas seperti ini, teknik pengurutan skala besar baru lebih cepat dan lebih murah.

Kemajuan terbaru dalam pengurutan membuatnya mudah dan cepat untuk digunakan adalah metode pengurutan semi-otomatis didasarkan pada prinsip metode Sanger dengan beberapa variasi kecil.

Dalam 4 reaksi berbeda, pengurutan DNA otomatis dilakukan dalam tabung tunggal. Yang berarti pada gel, DNA berjalan dalam satu jalur. Di sini, dalam sekuensing DNA semi-otomatis, rangkaian primer berlabel fluoresen digunakan, bukan ddNTP. Jadi empat primer yang berbeda memberikan empat puncak yang berbeda.

Metode PAGE tidak mampu memisahkan semua fragmen dalam satu reaksi. Oleh karena itu, sebagai alternatif, metode elektroforesis gel kapiler dipraktikkan. Metode ini memisahkan setiap fragmen secara tepat dengan menggunakan primer berlabel atau dNTP, mesin membaca urutan secara akurat, pada elektroforesis kapiler jalur tunggal. Kami dapat mengurutkan lebih dari 300 sampel dalam sekali proses pada platform pengurutan DNA otomatis.

Elektroforesis kapiler yang digunakan untuk memisahkan molekul DNA berdasarkan ukurannya, cukup kuat untuk memisahkan fragmen basepair tunggal. Kromatogram yang dihasilkan melalui C.E mengirimkan keluaran sebagai puncak fluoresen.

Metode Pyrosequencing

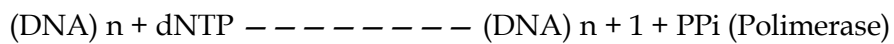
Pada tahun 1993, Bertil Pettersson, Mathias Uhlen dan Pål Nyren mengembangkan metode pyrosequencing. Metode ini didasarkan pada deteksi pirofosfat yang dilepaskan selama reaksi berantai penambahan

nukleotida. Di sini urutan nukleotida ditentukan oleh PPi yang dilepaskan selama penggabungan dua nukleotida yang berdekatan (3'OH- 5'P).

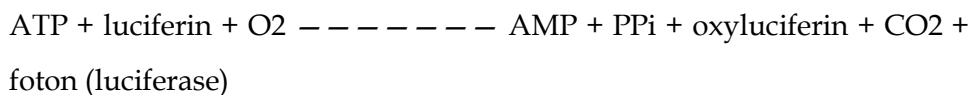
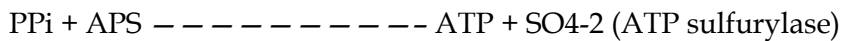
Berbeda dengan metode lain, polimerase tunggal, dua enzim tambahan diperlukan dalam metode pyrosequencing. Ketiga enzim tersebut adalah:

1. DNA polimerase (tanpa aktivitas eksonuklease)
2. Luciferase
3. Sulfurylase

Ketiga enzim bekerja secara berurutan untuk mendeteksi PPi. Pemantauan aktivitas polimerase memungkinkan deteksi pirofosfat yang dilepaskan dalam kaskade reaksi enzimatik,



Penambahan satu dNTP menghilangkan satu pirofosfat dari DNA.



Di sini reaksi diselesaikan menjadi tiga langkah:

Enzim polimerase menambahkan dNTP ke DNA untai tunggal. Jika basa pelengkap yang benar ditambahkan, pirofosfat dilepaskan.

Enzim sulfurylase mengubah PPi menjadi ATP (energi) dengan bantuan APS (adenosine 5' phosphosulfate).

ATP bertindak sebagai substrat untuk aktivitas luciferase (lebih khusus lagi "firefly luciferase"). Dengan bantuan substrat ATP, luciferase mengubah luciferin menjadi oxyluciferin dengan adanya oksigen dan foton cahaya dilepaskan.

Setelah nukleotida yang benar ditambahkan, jumlah cahaya yang dilepaskan oleh reaksi enzimatik dideteksi oleh perangkat yang diisi dengan kamera, fotodiode, atau tabung pengganda foto. Ini adalah dasar dari pengaturan pyrosequencing.

Berdasarkan substrat yang digunakan dalam teknik ini, tersedia dua jenis metode pyrosequencing: pyroseq fasa padat dan pyroseq fasa cair. Kita akan membahas setiap jenis pyrosequencing di beberapa artikel lainnya. Metode pyrosequencing lebih akurat daripada Sanger sequencing yang memiliki kapasitas untuk menjumlahkan hingga 500 nukleotida. Keuntungan utama dari pyrosequencing adalah kecepatan reaksi.

Namun, metode tersebut membutuhkan lebih banyak langkah kimia daripada metode terminasi rantai yang membuatnya lebih kompleks. Selain itu, panjang pembacaan terlalu pendek dibandingkan dengan pengurutan otomatis.

Metode whole gun-genom

Modifikasi lain dari metode penghentian rantai Sanger adalah pengurutan whole gun-genom. Satu gen atau beberapa pasangan basa, pada metode ini cukup kuat untuk mengurutkan seluruh genom suatu organisme.

Prinsip shotgun sama dengan metode Sanger, satu langkah tambahan fragmentasi DNA memungkinkan untuk membaca banyak fragmen. Seluruh genom organisme terfragmentasi dengan bantuan enzim endonuklease atau dengan teknik mekanis. Setelah itu, fragmen DNA yang lebih kecil diurutkan secara individual ke dalam mesin.

Perangkat lunak berbasis komputer menganalisis setiap fragmen yang tumpang tindih dan dipasang kembali untuk menghasilkan urutan lengkap dari seluruh genom. Fragmentasi DNA: dengan bantuan restriksi endonuklease atau metode fisik. Pembentukan pustaka subfragmen: fragmen diligasi dalam vektor dan seluruh pustaka untuk berbagai vektor dihasilkan. Mengurutkan subfragmen: setiap perpustakaan diurutkan secara individual. Menghasilkan dan membaca contig: fragmen yang tumpang tindih yang disebut contig dibaca oleh komputer. Fragmen yang dihasilkan oleh lisis atau pencernaan restriksi berukuran sekitar 2 hingga 20kb. Yang penting, pengurutan senapan membaca kedua urutan (urutan DNA untai ganda) berdasarkan data contig itu, mengidentifikasi celah yang tetap tidak diurutkan.

Cara ini lebih cepat dan lebih murah dibandingkan dengan teknik sebelumnya. Teknik ini menjadi lebih agresif jika urutan referensi tersedia untuk diselaraskan (ini dapat mengetahui celah dan mutasi secepat mungkin). Pemetaan gen atau kromosom dan langkah-langkah

reaksi enzimatik yang membosankan tidak diperlukan dalam metode sekuensing shotgun.

Metode ini memiliki kekuatan untuk mengurutkan seluruh genom organisme (lebih banyak waktu yang dibutuhkan untuk mengurutkan genom kompleks seperti manusia dan hewan).

Bagian utama dari genom manusia terdiri dari DNA repetitif non-fungsional sehingga sangat sulit bagi sekuens senapan untuk menyusun sekuens DNA berulang. Dan hampir tidak mungkin jika genom referensi tidak tersedia. Tekniknya hanya bergantung pada analisis komputasi. Superkomputer yang besar dan bertenaga dibutuhkan untuk bekerja secara efisien.

Untuk mengurutkan seluruh genom, metode klon dengan klon juga digunakan sebagai pengganti sekuensing senapan tembak genom secara keseluruhan. Khususnya, metode ini telah membantu menyelesaikan proyek genom manusia dengan sukses.

Metode saat ini kurang lebih mirip dengan metode sebelumnya dengan satu langkah tambahan. pertama, fragmen yang lebih kecil, gumpalan besar fragmen DNA dibangun melalui pemetaan gen, lokasi setiap fragmen dicatat.

Dengan menggunakan kromosom buatan bakteri BAC, beberapa salinan dari setiap fragmen dihasilkan untuk pengurutan yang akurat. Pada langkah berikutnya, setiap fragmen yang disalin difragmentasi menjadi bagian yang lebih kecil dan dimasukkan ke dalam vektor. Pengurutan dilakukan saat senapan dan fragmen yang tumpang tindih dirakit oleh komputer. Pada langkah terakhir, data pemetaan gen atau

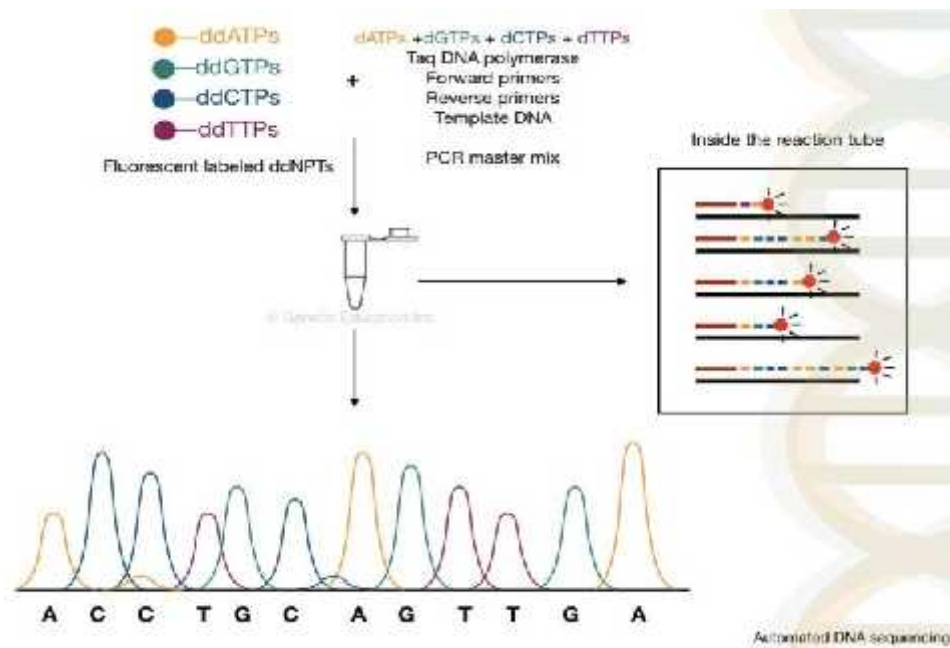
kromosom yang dihasilkan sebelumnya digunakan untuk merakit sekuens. urutannya diatur pada setiap kromosom berdasarkan lokasinya.

Automated DNA Sequencing

Kemajuan terbaru dalam pengurutan membuatnya mudah dan cepat untuk digunakan. Metode pengurutan Sanger semi-otomatis didasarkan pada prinsip metode Sanger dengan beberapa variasi kecil menggunakan 4 reaksi berbeda, pengurutan DNA otomatis dilakukan dalam tabung tunggal. Yang berarti pada gel, DNA berjalan dalam satu jalur. Di sini, dalam sekuensing DNA semi-otomatis, rangkaian primer berlabel fluoresen digunakan, bukan ddNTP. Jadi empat primer yang berbeda memberikan empat puncak yang berbeda.

Metode PAGE tidak mampu memisahkan semua fragmen dalam satu reaksi. Oleh karena itu, sebagai alternatif, metode elektroforesis gel kapiler dipraktikkan. Metode ini memisahkan setiap fragmen secara tepat. Dengan menggunakan primer berlabel atau dNTP, mesin membaca urutan secara akurat, pada elektroforesis kapiler jalur tunggal. Kami dapat mengurutkan lebih dari 300 sampel dalam sekali proses pada platform pengurutan DNA otomatis.

Elektroforesis kapiler yang digunakan untuk memisahkan molekul DNA berdasarkan ukurannya, cukup kuat untuk memisahkan fragmen basepair tunggal. Kromatogram yang dihasilkan melalui C.E mengirimkan keluaran sebagai puncak fluoresen.



Gambar 6. Mekanisme automated DNA sequencing

(Sumber: <https://geneticeducation.co.in/dna-sequencing-history-steps-methods-applications-and-limitations>)

Next Generation Sequencing

Platform sekuensing generasi berikutnya berbeda dari teknik Sanger atau metode penghentian rantai sekuensing DNA. Hal ini memperkuat jutaan salinan dari fragmen tertentu secara paralel besar-besaran dan "bacaan" dianalisis oleh program komputasi.

Proses NGS agak rumit, namun dapat dibagi menjadi 4 langkah berbeda:

1. Persiapan
2. Pembuatan cluster
3. Pengurutan DNA

4. Analisis data

Aplikasi Sequencing

Dalam ilmu kedokteran, sekuensing DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi gen yang bertanggung jawab atas kelainan keturunan. Mutasi baru juga dapat dideteksi dengan bantuan sekuensing DNA. Dalam ilmu forensik, ini digunakan untuk verifikasi orang tua, penyelidikan kriminal dan identifikasi individu melalui sampel yang tersedia seperti rambut, kuku, darah atau jaringan. Dalam industri pertanian, identifikasi spesies GMO dapat dilakukan dengan bantuan metode pengurutan DNA. Setiap variasi kecil dalam genom tanaman dapat dideteksi dengan bantuan sekuensing DNA.

Ini digunakan untuk membuat peta seperti peta seluruh kromosom, peta pencernaan restriksi, dan peta genom. Baca lebih lanjut tentang pemetaan: Pengantar Singkat tentang "Pemetaan Gen".

Bingkai bacaan terbuka, bingkai bacaan tidak terbuka dan urutan DNA pengkode protein dapat diidentifikasi dengan metode ini. Pengurutan DNA digunakan dalam exon / intron, pengulangan urutan dan tandem pengulangan identifikasi dan deteksi.

Selanjutnya, metode ini digunakan dalam manipulasi gen dan pengeditan gen. Variasi baru di alam juga dapat ditentukan melalui pengurutan. Studi metagenomik saat ini dimungkinkan dengan metode sekuensing seperti pyrosequencing. Ini lebih lanjut digunakan dalam identifikasi dan studi mikroba spesies bakteri baru. Teknik pengurutan memajukan identifikasi mikroba dengan menghilangkan metode kultur tradisional dan memakan waktu. Saat ini identifikasi dan karakterisasi

mikroba semakin cepat dan akurat dilakukan dengan menggunakan sekuensing. Dengan membandingkan urutan mikroba target dengan data yang tersedia, para ilmuwan dapat mengidentifikasi mutasi baru dan strain baru.

Secara khusus teknik pengurutan, NGS memiliki aplikasi yang bagus dalam studi onkologi dan kanker. berbagai gen penyebab kanker diidentifikasi dan dikarakterisasi dengan metode saat ini. Kemajuan dalam studi evolusi hanya mungkin karena sekuensing DNA. Dengan membandingkan berbagai gen dan urutan, peta evolusi dapat dibuat. Juga, variasi baru melalui evolusi dapat ditemukan.

Sequencing membantu dalam mempelajari populasi penyakit berisiko tinggi tanpa gejala, sebelum terjadinya penyakit. Dan dengan demikian langkah preventif bisa dilakukan lebih dini. Platform sekuensing adalah teknik bantuan berbasis algoritma komputer yang bergantung pada pemrosesan data komputasi. Untuk itu, dibutuhkan superkomputer berkecepatan tinggi yang sangat besar.

Beberapa urutan seperti pengulangan tandem, DNA berulang, gen terfragmentasi, dan daerah duplikat lainnya tidak dapat dipelajari dengan baik. Peluang kesalahan dalam pemrosesan pra-sampel dapat menyebabkan kerugian ekonomi yang besar, keduanya merupakan batasan utama dari metode sekuensing DNA.

J. DNA Barcoding

Gen adalah unit fisik dan fungsional dasar dari keturunan. Beberapa gen berperan sebagai instruksi untuk membuat molekul yang disebut protein. Namun, banyak gen tidak mengkode protein. Pada

manusia, ukuran gen bervariasi dari beberapa ratus basis DNA hingga lebih dari 2 juta basis. Proyek Genom Manusia memperkirakan bahwa manusia memiliki antara 20.000 dan 25.000 gen.

Setiap orang memiliki dua salinan dari setiap gen, satu diwarisi dari setiap orang tua. Kebanyakan gen sama pada semua orang, tetapi sejumlah kecil gen (kurang dari 1 persen dari total) sedikit berbeda di antara manusia. Alel adalah bentuk gen yang sama dengan perbedaan kecil dalam urutan basa DNA-nya. Perbedaan kecil ini berkontribusi pada ciri fisik unik setiap orang.

Barcode DNA telah muncul sebagai standar global untuk identifikasi spesies genetik hewan, tumbuhan dan jamur yang cepat dan andal. Urutan DNA pendek dari gen tertentu, misalnya gen COI mitokondria, memungkinkan identifikasi semua spesies hewan (yaitu burung, kupu-kupu, ikan, lalat, dll.) Di Bumi. Identifikasi spesies tanaman darat dimungkinkan oleh kombinasi dua wilayah gen kloroplas yang berbeda - *matK* dan *rbcL*. Jenis jamur dapat ditentukan oleh wilayah ITS. Tujuan akhir dari barcode DNA adalah untuk membangun database referensi yang dapat diakses publik dengan urutan barcode DNA spesifik spesies. Kode batang DNA sangat efektif untuk mengidentifikasi kelompok kaya spesies, kompleks spesies samar, tahap perkembangan spesifik (mis. Spora, telur atau larva), dan bahkan bagian dan fragmen organisme (yaitu kaki lalat, akar tanaman, hifa atau rambut jamur). Pustaka referensi barcode DNA yang mapan bahkan menawarkan alat yang cepat, andal, dan hemat biaya untuk identifikasi spesies dengan berbagai aplikasi, bahkan bagi non-spesialis¹⁶.

¹⁶ <https://www.bolgermany.de/wp/home/dna-barcoding/what-is-dna-barcoding>

BAB III METODE PENELITIAN

A. Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala.

B. Metode Ekstraksi DNA

Sampel daun Jamblang diambil di kawasan Kabupaten Aceh Besar yaitu di kawasan Jantho, Krung Raya, Leupung, Kecamatan Masjid Raya dan Ujung Pancu. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan produk komersial KIT prosedur jaringan (Tiangen Extraction KIT). Daun yang diambil adalah daun muda. Tahapan metode ekstraksi DNA mengikuti prosedur dari perusahaan. Daun dipotong dengan ukuran kecil. Kemudian ditimbang 100 mg. Sampel daun digerus hingga halus dan ditambahkan 700 μ l 65 ° C GP1 yang telah dipanaskan kemudian divortex selama 10-20 detik. Larutan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 65 °C, tube dibolak balikkan beberapa kali. Kemudian ditambahkan 700 μ l kloroform dan dilanjutkan dengan membalik tabung selama beberapa kali. Larutan dilakukan sentrifuge pada 12.000 rpm selama 5 menit. Bagian supernatan yang diambil adalah fase air dan dipindahkan ke dalam tabung baru. Supernatan ditambahkan 700 μ l buffer GP2, dilakukan homogenisasi dengan membolak balik tabung selama beberapa kali. Pindahkan semua sampel ke dalam Spin Column. Dilakukan sentrifuge selama 30 detik pada 12.000 rpm. Buang filtrat dan tempatkan spin kolom CB3 ke dalam tabung koleksi. Tambahkan 500 μ l Buffer GD dan dilakukan sentrifuge pada 12000 rpm

selama 30 detik kemudian buang filtratnya dan tempatkan Spin Column CB3 kembali ke tabung koleksi. Tambahkan 600 µl PW ke Spin Column CB3, dan dilakukan sentrifuge selama 30 detik pada 12.000 rpm. Tempatkan Spin Column CB3 kembali ke tabung koleksi. Ulangi langkah 7. Tempatkan Kolom Spin CB3 dalam tabung koleksi, dilakukan sentrifuge selama 2 menit pada 12.000 rpm. Buka tutup CB3 dan letakkan tube pada suhu kamar Tempatkan Spin Column CB3 ke tabung centrifuge baru, dan tambahkan 200 µl buffer TE langsung ke membran CB3, diinkubasi untuk 2-5 menit pada suhu kamar (15-25 ° C), lalu dilakukan sentrifuge selama 2 menit pada 12.000 rpm.

C. Visualisasi DNA Hasil Ekstraksi

Produk Amplifikasi dimigrasikan menggunakan teknik Elektroforesis Gel Agarose dengan konsentrasi bufer 1X TBE (Tris-HCl 0,5; Asam Borat 0,65; EDTA 0,02 M). Kemudian DNA dilakukan visualisasi menggunakan sinar UV dan dilakukan dokumentasi.

D. Amplifikasi DNA

Gen yang diamplifikasi pada penelitian ini adalah gen *matK* dengan pasangan primer Forward 5'-CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G-3' dan primer Revers 5'-ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3' yang dirancang oleh Ki-Joong Kim¹⁷. Total volume PCR 20 µl terdiri dari 0.8 µl masing-masing primer *forward* dan primer *revers*, 2 µl cetakan DNA, dan 10 µl Taq DNA Polymerase Ready Mix (0.05 U / ml, 25 mM Mg

¹⁷ Kuzmina dkk. 2012, Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library, jurnal

polymerase buffer, dan masing-masing dNTP 4 mM). Kondisi PCR yang digunakan adalah tahap denaturasi pada 94°C selama 4 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus terdiri dari tahap denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, annealing pada suhu 58°C selama 1 menit 30 detik, dan elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit. Tahap akhir elongasi 72°C selama 7 menit.

E. Visualisasi DNA Hasil Amplifikasi

Produk Amplifikasi dimigrasikan menggunakan teknik Elektroforesis Gel Agarose 2 % dengan konsentrasi bufer 1X TBE (Tris-HCl 0,5; Asam Borat 0,65; EDTA 0,02 M). Kemudian DNA dilakukan visualisasi menggunakan sinar UV dan dilakukan dokumentasi.

F. Perunutan Basa Nukleotida

Produk amplifikasi dilakukan perunutan basa nukleotida menggunakan metode sekuensing dari jasa pelayanan perusahaan sekuensing *First BASE* Singapore. Primer yang digunakan untuk metode sekuensing sama dengan primer yang digunakan pada tahap amplifikasi, yaitu primer Forward 5'-CGT ACA GTA CTT TIG TGT TTA CGA G-3' dan primer Revers 5'-ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC-3' yang dirancang oleh Ki-Joong Kim. Jumlah Sampel yang dianalisis menggunakan sequencing berjumlah 5 sampel yang mewakili masing-masing lokasi penelitian.

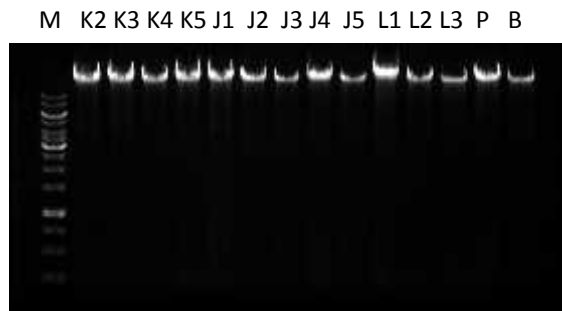
G. Analisis Data

Data dalam bentuk urutan basa nukleotida diedit menggunakan program BioEdit versi 7.0.9.0 dan dianalisis menggunakan program Mega 10. Sekuen nukleotida disejajarkan dengan data pembandingan dari data *GenBank*. Rekonstruksi pohon filogeni dilakukan menggunakan metode Maksimum Likelihood.

BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Visualisasi DNA Hasil Ekstraksi

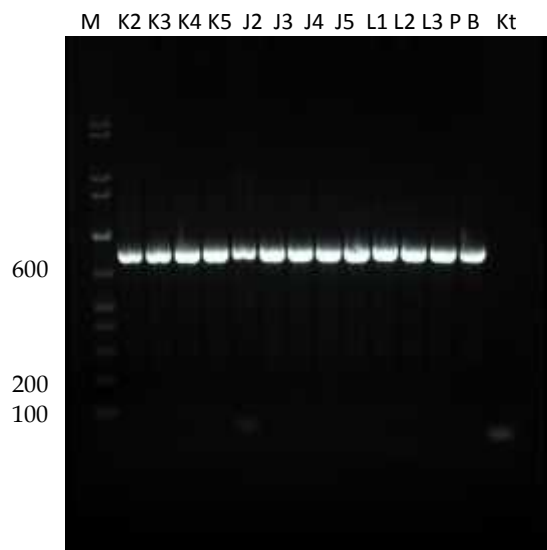
Ekstraksi DNA dari Daun Jamblang setelah dilakukan ekstraksi menunjukkan pita DNA pada 5 sampel Krung Raya, 5 sampel Jantho, 3 sampel Leupung, 1 sampel Ujung Pancu, dan 1 sampel Ujung Batee (Gambar 7). Sampel daun yang berasal dari Krung Raya dan Jantho diperoleh sampel daun yang muda sehingga mudah dilakukan ekstraksi, sedangkan sampel yang berasal dari Leupung, Ujung Pancu, dan Ujung Batee tidak ditemukan daun yang muda. Perbedaan usia daun yang diambil sebagai sumber DNA dari kelima kawasan tersebut karena adanya perbedaan musim buah Jemblang. Pohon Jemblang dikawasan Krung Raya dan Jantho pada saat pengambilan sampel sedang berbuah, sedangkan pohon jamblang di kawasan Leupung, Ujung Pancu, dan Ujung Batee belum mengalami musim buah. Daun muda tumbuh di bawah pucuk sebelum bunga tumbuh sebagai bakal buah.



Gambar 7. Visualisasi DNA hasil ekstraksi: Marker (M), Jemblang Krung Raya sampel ke-2(K2), Krung Raya sampel ke-3 (K3), Krung Raya sampel ke-4 (K4), Krung Raya sampel ke-5 (K5), Jahtho 1(J1), Jantho 2(J2), Jantho 3 (J3), Jantho 4 (J4), Jantho 5 (J5), Leupung 1(L1), Leupung 2 (L2), Leupung 3 (L3), Ujung Pancu, Ujung Batee.

B. Visualisasi DNA Hasil Amplifikasi

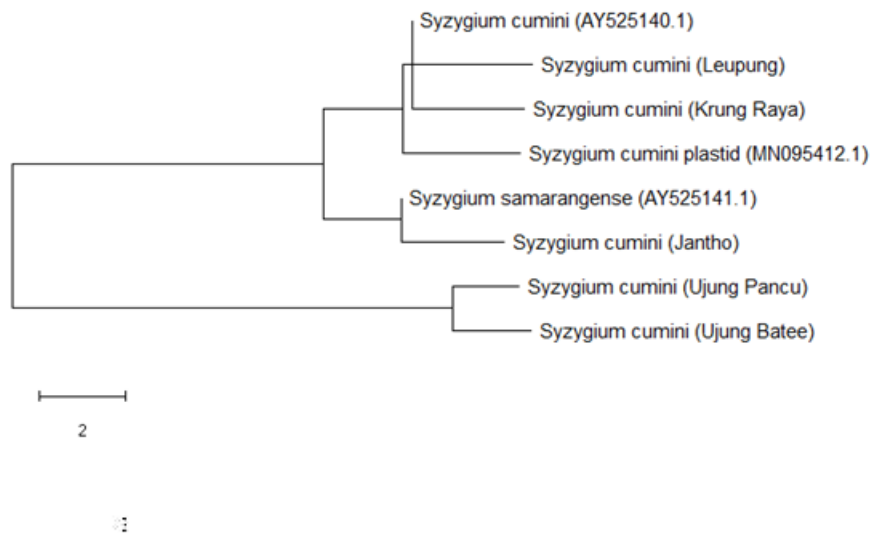
Visualisasi DNA dari hasil amplifikasi menunjukkan pita DNA target pada 650 bp. Semua sampel teramplifikasi dengan baik. Pita DNA yang diperoleh tunggal, tebal, dan berada pada marker target 650 bp. Pada semua sampel tidak menunjukkan inhibitor PCR. Kontrol negatif juga tidak menunjukkan pada ukuran target. Selain itu pada ukuran marker di bawah 100 tidak menunjukkan kelebihan primer yang digunakan (Gambar 8).



Gambar 8. Visualisasi DNA hasil ekstraksi: Marker (M), Jemblang Krung Raya sampel ke-2(K2), Krung Raya sampel ke-3 (K3), Krung Raya sampel ke-4 (K4), Krung Raya sampel ke-5 (K5), Jahtho 1(J1), Jantho 2(J2), Jantho 3 (J3), Jantho 4 (J4), Jantho 5 (J5), Leupung 1(L1), Leupung 2 (L2), Leupung 3 (L3), Ujung Pancu, Ujung Batee. Kontrol negatif (Kt).

C. Filogeni Jamblang (*Syzygium cumini*) Aceh Besar

Rekonstruksi Filogeni Jamblang (*Syzygium cumini*) di Aceh Besar menunjukkan bahwa Jamblang Leupung dan Jamblang Krung Raya memiliki kemiripan *sequence* DNA sehingga berada dalam satu klaster pengelompokan yang sama, sedangkan Jamblang Ujung Batee dan Jamblang Ujung Pancu menunjukkan pada percabangan pengelompokan yang sama. Jamblang Jantho berada pada klaster yang berbeda dengan Jamblang Leupung, Krung Raya, Ujung Pancu, dan Ujung Batee. Jamblang Leupung dan Krung Raya memiliki kemiripan dengan *Syzygium cumini* (AY525140.1) dan *Syzygium cumini* (MN095412.1) dari data Gen Bank, sedangkan Jamblang Jantho memiliki satu klaster dengan *Syzygium samarangense* (AY525141.1) dari data Gen Bank (Gambar 9).



Gambar 9. Diagram Filogeni Jamblang Aceh Besar

Lokasi Jamblang di Aceh Besar memiliki perbedaan secara ekogeografi. Jamblang Ujung Batee, Ujung Pancu, Leupung, dan Krung Raya berada pada wilayah pesisir, sedangkan Jamblang Jantho sangat jauh dengan pesisir dan berada pada perbukitan. Lokasi Jamblang Krung Raya berada pada perbukitan di wilayah pesisir. Keragaman genetik menggunakan gen *matK* sangat tinggi pada interspesies Jamblang (*Syzygium cumini*) di Aceh Besar.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini dapat di simpulkan bahwa Gen matK memiliki keragaman genetik yang tinggi sehingga dapat dijadikan sebagai DNA barcoding untuk membedakan intraspesies Jamblang (*Syzygium cumini*) di Aceh Besar.

B. Saran

Penelitian ini perlu dilanjutkan menggunakan DNA barcode lainnya untuk memetakan genetik spesies khas Aceh.

DAFTAR PUSTAKA

Ayyanar, M, Subash-Babu, P. 2012. *Syzygium cumini (L) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses.*

http://www.genomenetwork.org/resources/whats_a_genome/Chapter2_3.shtml

<https://geneticeeducation.co.in/dna-sequencing-history-steps-methods-applications-and-limitations>

<https://www.bolgermany.de/wp/home/dna-barcoding/what-is-dna-barcoding>

<https://microbenotes.com/polyacrylamide-gel-electrophoresis-page/>

Irawan, PD, Tallei, TE, Kolondam, BJ. 2016. *Analisis Sekuens dan Filogenetik Beberapa Tumbuhan Syzygium (Myrtaceae) di Sulawesi Utara Berdasarkan Gen matK.*

Jadhav, VM, Kamble, SS, Kadam, VJ. 2009. Herbal medicine: *Syzygium cumini*. Journal of Pharmacy Research 2(8).

Khan, S, Vaishall, Sharma, V. 2010. Genetic differentiation and diversity analysis of medicinal tree *Syzygium cumini* (Myrtaceae) from ecologically different region of India. *Physiol Mol. Biol.* 16(2).

Kuzmina, ML, Johnson, KL, Barron, HR, Hebert, PDN. 2012. Identification of the vascular plants of Churchill, Manitoba, using a DNA barcode library. *BMC Ecology* 12(25).

Marliani, L, Kusriani, H, Sari, NI. 2015. *Aktivitas Antioksidan Daun dan Buah Jamblang.*

Rosannah, AF, Pasaribu, N, Hannum, S. 2014. *Distribusi Syzygium cumini (L) Skeels di Aceh Besar.*

Shakiya, R, Siddiqui, SA, Srivatawa, N, Bajpai, A. 2010. Molecular Characterization of Jamun (*Syzygium cumini* L. Skeels) Genetic Resources. *International Journal of Fruit Science* 29-39(10).

Silalahi, M. 2018. *Jamblang dan Bioaktivitasnya*.

Lampiran 1. Kesamaan Morfologi Jamblang di Aceh Besar



Jamblang di Wilayah Perbukitan (Jantho)



Jamblang di Wilayah Pesisir (Ujung Batee)



BIODATA PENELITI
PUSAT PENELITIAN DAN PENERBITAN LP2M
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI AR-RANIRY BANDA ACEH

A. Identitas Diri

1.	Nama Lengkap	Kamaliah, M. Si
2.	Jenis Kelamin L/P	Perempuan
3.	Jabatan Fungsional	Lektor
4.	NIP	19840215 2015 03 2 002
5.	NIDN	2015028401
6.	NIPN	201502840110000
7.	Tempat dan Tanggal Lahir	Banda Aceh/ 15 Februari 1984
8.	E-mail	dyahelmy@gmail.com/ kamaliah@ar-raniry.ac.id
9.	Nomor Telepon/HP	085218209889
10.	Alamat Kantor	Jl. Syekh Abdul Rauf Kopelma Darussalam Banda Aceh
11.	Nomor Telepon/Faks	0651-7552921 - 7551857
12.	Bidang Ilmu	Genetika
13.	Program Studi	Biologi
14.	Fakultas	Sains dan Teknologi

B. Riwayat Pendidikan

No.	Uraian	S1	S2	S3
1.	Nama Perguruan Tinggi	Unsyiah	IPB	-
2.	Kota dan Negara PT	Banda Aceh, Indonesia	Bogor, Indonesia	-
3.	Bidang Ilmu/ Program Studi	Pendidikan Biologi	Biosains Hewan	-
4.	Tahun Lulus	2007	2012	-

C. Pengalaman Penelitian dalam 3 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Penelitian	Sumber Dana
1.	2017	Perbandingan Metode Ekstraksi DNA <i>Phenol-Chloroform</i> dan <i>KIT Extraction</i> pada Sapi Aceh dan Sapi Madura	Mandiri
2.	2017	Perbandingan Deteksi DNA Menggunakan Gen <i>D-Loop</i> dan Gen <i>Diacylglycerol Acyltransferase 1</i>	Mandiri

		(DGAT 1) pada Susu Pasteurisasi	
3.	2018	Modifikasi Metode Ekstraksi DNA pada Susu Pasteurisasi	Mandiri

D. Pengalaman Pengabdian Kepada Masyarakat dalam 3 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Pengabdian	Sumber Dana
1.	2017	Pelatihan Pembuatan Minuman Ferment Yogurt	Mandiri
2.	2017	Kampanye Penggunaan Masker dan Edukasi Bahaya Polutan Udara	Mandiri
3.	2018	Pelatihan pembuatan nuget sehat	Mandiri
4.	2018	Pelatihan pengolahan kertas bekas menjadi barang berguna	Mandiri
5.	2019	Gampong Iboih Kecamatan Sukakarya Kota Sabang	Prodi Biologi FST
6.	2020	Sosialisasi Pengolahan Sampah Organik	Prodi Biologi FST

E. Publikasi Artikel Ilmiah dalam Jurnal dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume/Nomor/Tahun/Url
1.	Perbandingan Metode Ekstraksi DNA <i>Phenol-Chloroform</i> dan <i>KIT Extraction</i> pada Sapi Aceh dan Sapi Madura	Biotik	Vol.5, No. 1 ISSN: 2337-9812
2.	Perbandingan Deteksi DNA Menggunakan Gen <i>D-Loop</i> dan Gen <i>Diacylglycerol Acyltransferase 1</i> (DGAT 1) pada Susu Pasteurisasi	Bioleuser	Vol.1, No.3 ISSN: 2597-6753
3.	Modifikasi Metode Ekstraksi DNA pada Susu Pasteurisasi	Bioleuser	Vol.2, No.1 ISSN: 2597-6753

F. Karya Buku dalam 5 Tahun Terakhir

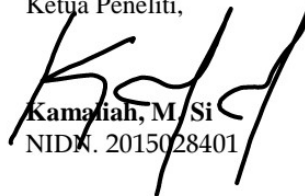
No.	Judul Buku	Tahun	Tebal Halaman	Penerbit
1.	-	-	-	-
2.	-	-	-	-
dst.				

G. Perolehan HKI dalam 10 Tahun Terakhir

No.	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID
1.				
2.				
dst.				

Demikian biodata ini saya buat dengan sebenarnya.

Banda Aceh, 19 September 2020
Ketua Peneliti,



Kamaliah, M/Si
NIDN. 2015028401