



GENETIKA MOLEKULER

untuk KEDOKTERAN HEWAN



Penulis :

Siti Gusti Ningrum

GENETIKA MOLEKULER
untuk KEDOKTERAN HEWAN

Siti Gusti Ningrum

UWKSPRESS



PENERBIT
UWKS PRESS

GENETIKA MOLEKULER

untuk KEDOKTERAN HEWAN

ISBN

Ukuran buku 14 & 21 cm

97 hlm

Cetakan ke -1, Bulan Januari Tahun 2025

Penulis:

Siti Gusti Ningrum

Editor:

Jarmani

Penerbit:

UWKS PRESS

Anggota IKAPI No.206/Anggota Luar Biasa/JTI/2018

Anggota APPTI No.002.071.1.12019

Jl. Dukuh Kupang XXV/54 Surabaya Jawa Timur 60225

Telp. (031) 5677577

Hp. 085745182452 / 081703875858

Email : uwkspress@gmail.com / uwkspress@uwks.ac.id

**Dilarang mengutip sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara apapun,
termasuk dengan penggunaan mesin fotokopi, tanpa izin sah dari penerbit**

SINOPSIS

Genetika Molekuler untuk Kedokteran Hewan adalah buku referensi yang mengulas penerapan ilmu genetika molekuler dalam bidang kedokteran hewan. Buku ini menyajikan pengetahuan dasar hingga aplikasi praktis, menjadikannya relevan bagi mahasiswa, praktisi veteriner, peneliti, dan profesional di bidang kesehatan hewan. Topik utama buku ini meliputi dasar-dasar genetika molekuler seperti konsep DNA, RNA, dan protein serta mekanisme replikasi, transkripsi, dan translasi. Selain itu, buku ini juga mencakup metode dan teknik genetika molekuler seperti teknik PCR dan sekuensing serta aplikasi dalam penelitian dan diagnosis genetik. Dengan pendekatan mendalam dan berbasis informasi terkini, buku ini bertujuan membantu pembaca memahami kompleksitas genetika molekuler serta aplikasinya dalam meningkatkan kesehatan dan kesejahteraan hewan.

KATA PENGANTAR

Genetika Molekuler untuk Kedokteran Hewan adalah sebuah buku referensi yang mendalami penerapan ilmu genetika molekuler dalam bidang kedokteran hewan. Buku ini mencakup berbagai topik penting seperti dasar-dasar genetika molekuler yang menjelaskan konsep dasar DNA, RNA, dan protein serta mekanisme replikasi, transkripsi, dan translasi. Selain itu buku ini juga mengupas metode dan teknik genetika molekuler yang mencakup teknik PCR dan sekuensing yang digunakan dalam penelitian dan diagnosa genetika.

Buku ini dirancang untuk mahasiswa kedokteran hewan, praktisi veteriner, peneliti, dan profesional di bidang kesehatan hewan. Dengan informasi yang mendalam dan terkini, buku ini dapat membantu pembaca memahami kompleksitas genetika molekuler dan bagaimana ilmu ini dapat diterapkan untuk meningkatkan kesehatan dan kesejahteraan hewan.

Surabaya, 1 Maret 2025

Siti Gusti Ningrum
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

"Allah berfirman: Janganlah kamu berdua khawatir, sesungguhnya Aku beserta kamu berdua, Aku mendengar dan melihat." (Q.S Thaha: 46)

Dedicated to K.H.

UWKSPress

DAFTAR ISI

Dasar-Dasar Genetika Molekuler	1
DNA	1
Struktur DNA	1
Fungsi DNA	3
Replikasi DNA	4
RNA	5
Struktur RNA	6
Jenis-Jenis RNA dan Fungsinya	10
Fungsi RNA	11
Peran DNA dan RNA dalam Kedokteran Hewan	13
Peran DNA dalam Kedokteran Hewan	13
Peran RNA dalam Kedokteran Hewan	13
Protein	14
Struktur Protein	15
Fungsi Protein	17
Sintesis Protein	18
Enzim dan Protein dalam Replikasi DNA	22
Kepentingan Replikasi DNA	23
Transkripsi	24
Jenis RNA yang Dihasilkan	26
Proses Penyuntingan RNA (Pada Eukariota)	27
Translasi	28

Komponen-Komponen dalam Translasi	31
Metode dan Teknik Genetika Molekuler	34
PCR	36
Komponen PCR	39
Komponen PCR Tambahan	42
Langkah-Langkah PCR	44
Pengaturan Siklus PCR	45
Cara Membuat PCR Mix	46
Troubleshooting PCR	50
Produk PCR dengan Sekuen Error	52
Jenis-jenis PCR	54
Aplikasi PCR	61
Diagnosis Medis	61
Forensik	66
Penelitian Genetik	67
Bioteknologi	71
Sekuensing DNA	75
Identifikasi Bakteri menggunakan Sekuensing DNA	77
Masa Depan Genetika Molekuler dalam Kedokteran Hewan	90
DAFTAR PUSTAKA	94

Dasar-Dasar Genetika Molekuler

DNA

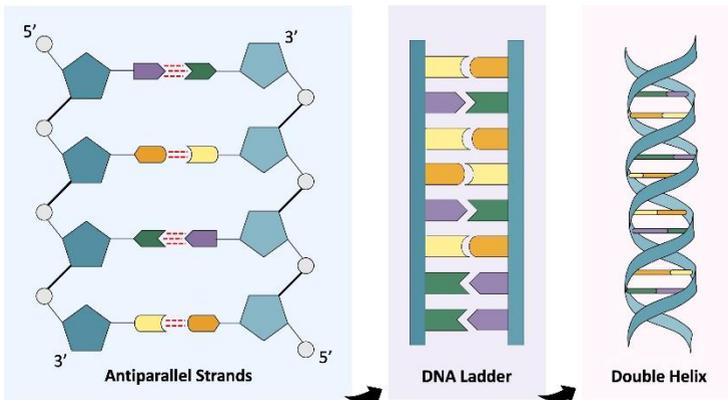
DNA (*Deoxyribonucleic Acid* atau Asam Deoksiribonukleat) adalah molekul yang mengandung instruksi genetik yang diperlukan untuk perkembangan, fungsi, pertumbuhan, dan reproduksi semua organisme hidup dan banyak virus. DNA adalah materi genetik yang diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya.

Struktur DNA

DNA memiliki struktur ganda heliks (*double helix*) yang terdiri dari dua untai nukleotida yang saling berpilin. Setiap nukleotida terdiri dari tiga komponen:

1. Gula Deoksiribosa: Gula dengan lima atom karbon.
2. Fosfat: Menghubungkan gula deoksiribosa dari satu nukleotida ke gula deoksiribosa nukleotida lainnya.
3. Basa Nitrogen: Ada empat jenis basa nitrogen dalam DNA: Adenin (A), Timin (T), Sitosin (C), dan Guanin (G). Adenin berpasangan dengan Timin (A-T), dan Sitosin berpasangan dengan Guanin (C-G).

DNA adalah asam nukleat yang digunakan untuk meneruskan informasi hereditas (gen) antar generasi sel. DNA juga berisi serangkaian instruksi yang digunakan untuk menghasilkan protein melalui RNA ('cetak biru' sel). Tidak seperti RNA, molekul DNA terdiri dari dua untai yang disatukan oleh ikatan hidrogen antar pasangan basa. Adenin berpasangan dengan timin melalui dua ikatan hidrogen, sedangkan guanin dan sitosin berpasangan melalui tiga ikatan hidrogen. Untuk memastikan alasnya saling berhadapan dan dapat berpasangan, kedua untai tersebut harus berjalan berlawanan arah (antiparalel). Molekul DNA membentuk struktur tangga (*ladder*) – dua *backbones* (Gambar 1) membentuk penyangga dan pasangan basa bertindak sebagai anak tangga. Ketika rantai antiparalel memanjang, untai tersebut akan mengatur dirinya sendiri ke dalam konfigurasi energi yang paling stabil. Hal ini menghasilkan DNA beruntai ganda membentuk heliks ganda (~10 – 15 basa per putaran). *Double strand* membantu menjaga rangkaian basa selama replikasi, karena satu untai bertindak sebagai templat untuk untai lainnya.



Gambar 1 Struktur DNA (Sumber gambar: www.ib.bioninja.com)

Fungsi DNA

Secara umum, DNA memiliki empat fungsi utama yaitu:

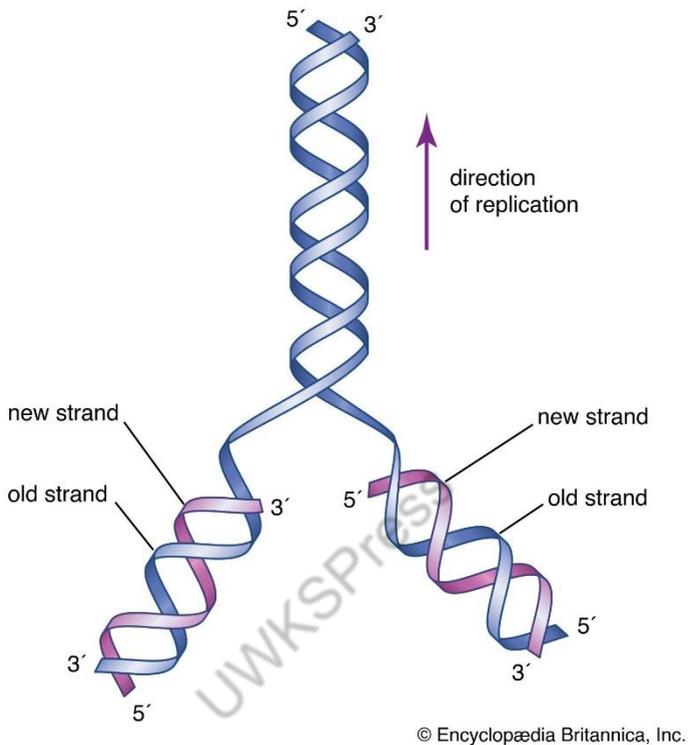
1. Penyimpanan Informasi Genetik: DNA menyimpan informasi genetik dalam urutan basa nitrogennya. Informasi ini menentukan karakteristik biologis organisme.
2. Replikasi: DNA dapat membuat salinan dirinya sendiri melalui proses replikasi, yang penting untuk pembelahan sel dan reproduksi.
3. Transkripsi: DNA berfungsi sebagai *template* untuk sintesis RNA dalam proses yang disebut transkripsi.
4. Translasi: RNA yang disintesis dari DNA kemudian digunakan untuk membentuk protein dalam proses yang disebut translasi. Protein adalah molekul yang menjalankan sebagian besar fungsi dalam sel.

Replikasi DNA

Replikasi DNA adalah proses di mana DNA membuat salinan dirinya sendiri. Proses ini melibatkan enzim seperti DNA polimerase dan berlangsung dalam tiga langkah:

1. Inisiasi: Heliks ganda DNA diurai menjadi dua untai tunggal oleh enzim helikase.
2. Elongasi: DNA polimerase menambahkan nukleotida komplementer ke masing-masing untai template.
3. Terminasi: Replikasi berakhir ketika seluruh molekul DNA telah disalin.

Usulan awal tentang struktur DNA diajukan oleh James Watson dan Francis Crick, yang disertai dengan usulan tentang cara replikasi (Gambar 2). DNA bereplikasi dengan memisahkan menjadi dua untai tunggal, yang masing-masing berfungsi sebagai cetakan untuk untai baru. Untaian baru tersebut disalin dengan prinsip yang sama yaitu pasangan ikatan hidrogen antara basa yang ada dalam heliks ganda. Dua molekul DNA beruntai ganda baru dihasilkan, masing-masing mengandung satu untai asli dan satu untai baru. Replikasi “semikonservatif” ini adalah kunci pewarisan sifat genetik yang stabil.



Gambar 2 Replikasi DNA (sumber: <https://www.britannica.com>)

RNA

RNA (*Ribonucleic Acid* atau Asam Ribonukleat) adalah molekul yang berperan penting dalam berbagai proses biologis, terutama dalam sintesis protein. RNA adalah molekul asam nukleat seperti DNA, tetapi memiliki beberapa perbedaan struktural dan fungsional.

Struktur RNA

RNA biasanya terdiri dari satu untai nukleotida, meskipun dalam beberapa virus RNA bisa memiliki struktur ganda. Nukleotida RNA mengandung gula ribosa, yang berbeda dari deoksiribosa dalam DNA. RNA memiliki empat basa nitrogen: Adenin (A), Urasil (U), Sitosin (C), dan Guanin (G). Berbeda dengan DNA, yang memiliki Timin (T) sebagai pasangan Adenin, RNA menggunakan Urasil.

DNA dan RNA adalah dua molekul terpenting dalam biologi sel, tapi apa perbedaan utama di antara keduanya? Perbedaan DNA dengan RNA ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 3.

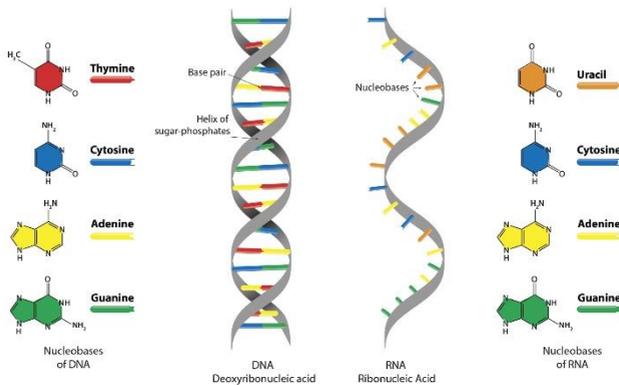
Tabel 1 DNA vs. RNA

Perbedaan	DNA	RNA
Fungsi	DNA mereplikasi dan menyimpan informasi genetik. DNA adalah cetak biru untuk semua informasi genetik yang terkandung	RNA mengubah informasi genetik yang terkandung dalam DNA ke format yang digunakan untuk membangun

	dalam suatu organisme.	protein, dan kemudian memindahkannya ke pabrik protein ribosom.
Struktur	DNA terdiri dari dua untai, tersusun dalam heliks ganda. Untaian ini terdiri dari subunit yang disebut nukleotida. Setiap nukleotida mengandung fosfat, molekul gula 5 karbon, dan basa nitrogen.	RNA hanya memiliki satu untai, tetapi seperti DNA, terdiri dari nukleotida. Untaian RNA lebih pendek dari untai DNA. RNA terkadang membentuk struktur heliks ganda sekunder, tetapi hanya intermiten.
Ukuran	DNA adalah polimer yang jauh	Molekul RNA memiliki panjang

	<p>lebih panjang daripada RNA. Kromosom, misalnya, adalah molekul DNA tunggal yang panjang, yang jika diurai akan menjadi beberapa sentimeter panjangnya.</p>	<p>yang bervariasi, tetapi jauh lebih pendek dibandingkan polimer DNA yang panjang. Molekul RNA yang besar mungkin hanya memiliki panjang beberapa ribu pasangan basa.</p>
Gula penyusun	<p>Gula dalam DNA adalah deoksiribosa, yang mengandung satu gugus hidroksil lebih sedikit dibandingkan ribosa RNA.</p>	<p>RNA mengandung molekul gula ribosa, tanpa modifikasi hidroksil deoksiribosa.</p>
Basa	<p>Basa dalam DNA adalah Adenin ('A'), Timin ('T'),</p>	<p>RNA berbagi Adenin ('A'), Guanin ('G') dan</p>

	Guanin ('G') dan Sitosin ('C').	Sitosin ('C') dengan DNA, tetapi mengandung Urasil ('U') dan bukan Timin.
Pasangan basa	Pasangan Adenin dengan Timin (A-T) Pasangan sitosin dengan Guanin (C-G)	Pasangan Adenin dengan Urasil (A-U) Pasangan sitosin dengan Guanin (C-G)
Lokasi	DNA ditemukan di dalam nukleus, dan sejumlah kecil DNA juga terdapat di mitokondria.	RNA terbentuk di nukleolus, dan kemudian berpindah ke daerah khusus di sitoplasma tergantung pada jenis RNA yang terbentuk.



Gambar 3 Perbandingan heliks dan struktur dasar RNA dan DNA. Sumber: Technology Networks.

Jenis-Jenis RNA dan Fungsinya

Terdapat lima jenis RNA antara lain:

1. mRNA (Messenger RNA): Mengandung instruksi genetik dari DNA dan membawa pesan ini dari inti sel ke ribosom, tempat sintesis protein berlangsung.
2. tRNA (Transfer RNA): Membawa asam amino ke ribosom selama proses translasi dan memastikan asam amino ditempatkan pada posisi yang tepat sesuai dengan kode mRNA.
3. rRNA (Ribosomal RNA): Komponen struktural dan fungsional dari ribosom, membantu dalam pembentukan ikatan peptida antara asam amino selama sintesis protein.

4. snRNA (Small Nuclear RNA): Terlibat dalam proses penyuntingan mRNA (splicing) dalam inti sel.
5. miRNA (Micro RNA) dan siRNA (Small Interfering RNA): Berperan dalam regulasi gen ekspresi dengan mengganggu mRNA dan mencegah translasi atau menyebabkan degradasi mRNA.

Fungsi RNA

Secara umum, ada tiga fungsi RNA antara lain:

1. Transkripsi: Proses di mana informasi genetik dari DNA disalin ke mRNA. RNA polimerase membaca untai DNA dan menyintesis untai komplementer RNA.
2. Translasi: Proses di mana mRNA diterjemahkan menjadi urutan asam amino untuk membentuk protein. Ini melibatkan ribosom, tRNA, dan rRNA.
3. Regulasi Gen: miRNA dan siRNA berperan dalam pengaturan ekspresi gen dengan cara memotong atau menghambat mRNA.

RNA berperan penting dalam proses sintesis protein. Dalam proses transkripsi, ada 3 tahapan yaitu (1) Inisiasi: RNA polimerase mengikat promotor pada DNA dan mulai memisahkan untai DNA; (2) Elongasi: RNA polimerase menambahkan nukleotida RNA komplementer ke untai DNA

template; dan (3) Terminasi: RNA polimerase mencapai urutan terminasi dan melepaskan RNA yang baru disintesis.

Selanjutnya, translasi yang terdiri dari 3 tahapan antara lain (1) Inisiasi: mRNA mengikat ribosom, dan tRNA membawa asam amino pertama; (2) Elongasi: Ribosom bergerak sepanjang mRNA, tRNA membawa asam amino sesuai dengan kodon mRNA, dan rRNA membantu pembentukan ikatan peptida; dan (3) Terminasi: Ribosom mencapai kodon stop, dan protein yang baru disintesis dilepaskan.

UWKS Press

Peran DNA dan RNA dalam Kedokteran Hewan

Peran DNA dalam Kedokteran Hewan

Dalam kedokteran hewan, pemahaman tentang DNA dan genetika sangat penting untuk berbagai aplikasi, termasuk:

1. **Diagnosis Genetik:** Identifikasi kelainan genetik dan predisposisi penyakit pada hewan.
2. **Terapi Genetik:** Pendekatan inovatif untuk mengobati penyakit genetik.
3. **Pemuliaan Selektif:** Memilih hewan dengan sifat genetik yang diinginkan untuk reproduksi.

DNA merupakan inti dari ilmu genetika dan memainkan peran fundamental dalam kehidupan semua organisme. Dalam kedokteran hewan, pemahaman yang mendalam tentang DNA memungkinkan penerapan teknologi genetik untuk meningkatkan kesehatan dan kesejahteraan hewan.

Peran RNA dalam Kedokteran Hewan

Dalam kedokteran hewan, pemahaman tentang RNA sangat penting untuk:

1. **Diagnosis dan Pengobatan:** RNA dapat digunakan sebagai biomarker untuk berbagai penyakit dan kondisi genetik.
2. **Vaksin RNA:** Penggunaan teknologi mRNA dalam pengembangan vaksin untuk penyakit hewan.
3. **Penelitian Genetik:** Studi tentang ekspresi gen dan regulasi gen pada hewan untuk memahami mekanisme penyakit dan pengembangan terapi.

RNA adalah molekul utama dalam proses ekspresi gen dan sintesis protein, serta memainkan peran vital dalam berbagai fungsi seluler dan mekanisme genetik. Pemahaman tentang RNA memungkinkan penerapan ilmu genetika dan bioteknologi dalam bidang kedokteran hewan.

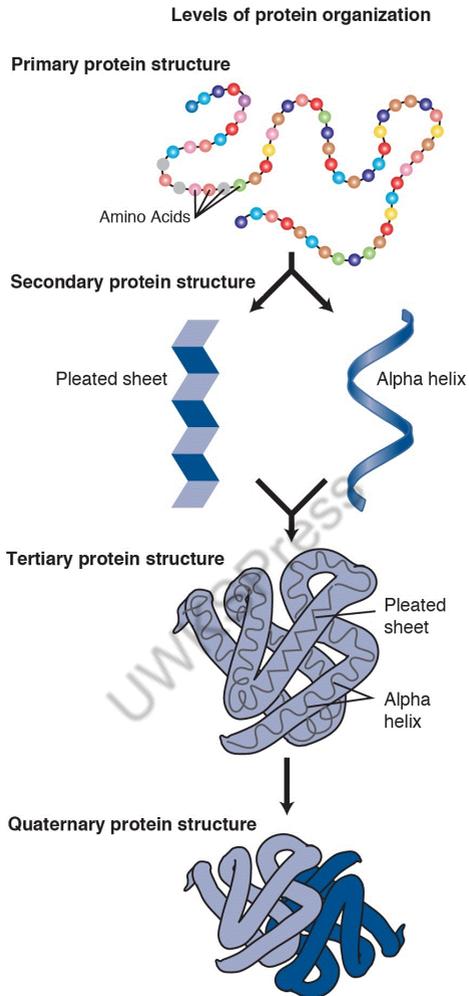
Protein

Protein adalah molekul besar dan kompleks yang memainkan banyak peran penting dalam tubuh makhluk hidup. Mereka terdiri dari rantai panjang asam amino yang dilipat menjadi struktur tiga dimensi tertentu, yang menentukan fungsi spesifiknya.

Struktur Protein

Protein terdiri dari 20 jenis asam amino yang berbeda. Setiap asam amino memiliki gugus amino (NH_2), gugus karboksil (COOH), dan rantai samping (R) yang unik. Struktur protein (Gambar 4) dapat diklasifikasikan menjadi:

1. Struktur Primer: Urutan linear asam amino yang ditentukan oleh kode genetik.
2. Struktur Sekunder: Lipatan awal dari rantai asam amino, yang biasanya membentuk heliks alfa atau lembar beta.
3. Struktur Tersier: Struktur tiga dimensi dari seluruh rantai asam amino yang terlipat, yang ditentukan oleh interaksi antara rantai samping asam amino.
4. Struktur Kuartener: Beberapa rantai polipeptida yang bergabung membentuk satu unit fungsional, seperti dalam hemoglobin.



Gambar 4 Struktur protein. Sumber: <https://openbooks.lib.msu.edu>

Fungsi Protein

Protein memiliki tujuh fungsi utama di dalam tubuh antara lain:

1. Enzim: Katalisator biologis yang mempercepat reaksi kimia dalam tubuh tanpa ikut berubah. Contohnya adalah amilase, yang membantu dalam pencernaan karbohidrat.
2. Struktur: Protein struktural seperti kolagen dan keratin memberikan kekuatan dan dukungan pada jaringan dan organ.
3. Transportasi: Protein transportasi seperti hemoglobin mengangkut molekul penting, seperti oksigen, ke seluruh tubuh.
4. Sinyal: Protein sinyal, seperti hormon insulin, mengatur berbagai proses fisiologis dengan mengirimkan sinyal antar sel.
5. Pertahanan: Antibodi adalah protein yang berfungsi dalam sistem kekebalan tubuh untuk mengenali dan menetralkan patogen seperti bakteri dan virus.
6. Regulasi: Protein pengatur seperti faktor transkripsi mengendalikan ekspresi gen dan aktivitas seluler lainnya.
7. Pergerakan: Protein kontraktile seperti aktin dan miosin memungkinkan pergerakan otot dan sel.

Sintesis Protein

Proses sintesis protein melibatkan dua tahap utama: transkripsi dan translasi.

1. Transkripsi: DNA di dalam inti sel disalin menjadi mRNA.

- ❖ Inisiasi: RNA polimerase mengikat promotor DNA dan mulai membuka untai DNA.
- ❖ Elongasi: RNA polimerase menambahkan nukleotida RNA komplementer ke untai DNA template.
- ❖ Terminasi: RNA polimerase mencapai urutan terminasi dan mRNA yang baru disintesis dilepaskan.

2. Translasi: mRNA diterjemahkan menjadi rantai polipeptida (protein) di ribosom.

- ❖ Inisiasi: Ribosom mengikat mRNA dan tRNA membawa asam amino pertama.
- ❖ Elongasi: Ribosom bergerak sepanjang mRNA, dan tRNA membawa asam amino sesuai dengan kodon mRNA, membentuk rantai polipeptida.
- ❖ Terminasi: Ribosom mencapai kodon stop, dan rantai polipeptida yang terbentuk dilepaskan dan dilipat menjadi struktur fungsionalnya.

Dalam kedokteran hewan, protein memiliki peran yang krusial, antara lain:

1. Diagnostik: Enzim dan protein tertentu digunakan sebagai biomarker untuk diagnosis penyakit.
2. Terapi: Protein terapeutik, seperti hormon dan antibodi monoklonal, digunakan dalam pengobatan berbagai penyakit.
3. Nutrisi: Protein adalah komponen penting dalam diet hewan, penting untuk pertumbuhan, perbaikan jaringan, dan fungsi tubuh lainnya.
4. Penelitian: Studi tentang protein membantu memahami mekanisme penyakit dan mengembangkan perawatan baru.

Protein merupakan komponen vital dari semua sel dan organisme hidup, memainkan peran esensial dalam hampir semua proses biologis. Dalam kedokteran hewan, pemahaman tentang protein membantu dalam diagnosis, perawatan, dan penelitian penyakit, serta dalam perbaikan kesehatan dan kesejahteraan hewan.

Mekanisme Replikasi DNA

Replikasi DNA adalah proses di mana molekul DNA membuat salinan identik dari dirinya sendiri. Proses ini sangat penting untuk pertumbuhan, perbaikan, dan reproduksi sel.

Tahap-Tahap Replikasi DNA

1. Inisiasi

- ❖ Pemisahan Untai DNA: Proses dimulai pada titik spesifik yang disebut origin of replication. Enzim helikase membuka heliks ganda DNA dengan memutuskan ikatan hidrogen antara pasangan basa nitrogen, menghasilkan dua untaian tunggal DNA yang disebut untaian template.
- ❖ Pembentukan Bubble Replikasi: Proses pembukaan ini menciptakan struktur yang disebut bubble replikasi dengan dua fork replikasi di setiap ujungnya.
- ❖ Stabilisasi Untai Tunggal: Protein pengikat untaian tunggal (single-strand binding proteins, SSB) menempel pada untaian tunggal DNA untuk mencegah untaian tersebut berikatan kembali dan menjaga kestabilannya.

2. Elongasi

- ❖ Sintesis Primer RNA: Primase, sebuah enzim, mensintesis primer RNA pendek yang komplementer dengan untai DNA template. Primer ini menyediakan ujung 3'-OH yang diperlukan untuk inisiasi sintesis DNA.
- ❖ Sintesis DNA oleh DNA Polimerase: DNA polimerase menambahkan nukleotida deoksiribonukleotida (dNTPs) ke ujung 3'-OH primer RNA, memperpanjang rantai DNA baru dalam arah 5' ke 3'. Pada untai leading, sintesis berlangsung terus menerus, sedangkan pada untai lagging, sintesis berlangsung dalam fragmen pendek yang disebut fragmen Okazaki.
- ❖ Penggantian Primer RNA dengan DNA: Enzim DNA polimerase I menghapus primer RNA dan menggantinya dengan DNA.
- ❖ Ligasi Fragmen Okazaki: Enzim DNA ligase menghubungkan fragmen Okazaki pada untai lagging dengan membentuk ikatan fosfodiester antara fragmen-fragmen tersebut, menghasilkan untai DNA yang kontinu.

3. Terminasi

- ❖ **Penyelesaian Replikasi:** Ketika dua fork replikasi bertemu atau mencapai ujung kromosom, replikasi selesai. Pada bakteri, terminasi terjadi pada situs terminasi tertentu, sementara pada eukariota, terminasi sering terjadi secara spontan ketika dua replikasi bertemu.
- ❖ **Pemisahan Molekul DNA Baru:** Pada beberapa organisme, topoisomerase membantu memisahkan molekul DNA yang saling terkait setelah replikasi.

Enzim dan Protein dalam Replikasi DNA

- ❖ **Helikase:** Membuka heliks ganda DNA dengan memutus ikatan hidrogen antar basa.
- ❖ **Primase:** Mensintesis primer RNA yang diperlukan untuk inisiasi sintesis DNA.
- ❖ **DNA Polimerase III:** Enzim utama yang menambahkan nukleotida ke primer RNA untuk memperpanjang rantai DNA baru.
- ❖ **DNA Polimerase I:** Menghapus primer RNA dan menggantinya dengan DNA.

- ❖ DNA Ligase: Menghubungkan fragmen Okazaki pada untai lagging untuk menghasilkan untai DNA yang kontinu.
- ❖ Topoisomerase: Mengurangi ketegangan torsional yang dihasilkan selama pembukaan heliks ganda DNA dengan memutus dan menyambung kembali untai DNA.

Kepentingan Replikasi DNA

Replikasi DNA sangat penting untuk:

1. Pertumbuhan dan Perkembangan: Membantu dalam pembelahan sel, yang penting untuk pertumbuhan dan perbaikan jaringan.
2. Reproduksi: Memastikan bahwa informasi genetik diwariskan dari satu generasi ke generasi berikutnya.
3. Stabilitas Genetik: Kesalahan dalam replikasi DNA dapat menyebabkan mutasi yang berpotensi menyebabkan penyakit genetik atau kanker.

Replikasi DNA adalah proses kompleks dan terkoordinasi dengan baik yang memastikan setiap sel baru menerima salinan lengkap dan akurat dari materi genetik. Pemahaman mendalam

tentang mekanisme ini sangat penting dalam berbagai bidang ilmu biologi dan kedokteran hewan, termasuk dalam pengembangan terapi gen dan perawatan kanker.

Transkripsi

Transkripsi adalah proses di mana informasi genetik yang terdapat dalam DNA disalin menjadi molekul RNA. Ini adalah langkah pertama dalam ekspresi gen, yang pada akhirnya menghasilkan protein yang diperlukan untuk fungsi dan struktur sel.

Tahap-Tahap Transkripsi

Transkripsi terjadi dalam tiga tahap utama: inisiasi, elongasi, dan terminasi.

1. Inisiasi

- ❖ **Pengikatan RNA Polimerase:** Proses transkripsi dimulai ketika enzim RNA polimerase mengikat daerah spesifik pada DNA yang disebut promotor. Promotor adalah urutan DNA yang menandai awal gen dan mengatur ekspresi gen tersebut.

- ❖ Pembukaan Heliks DNA: RNA polimerase membuka heliks ganda DNA untuk membentuk gelembung transkripsi, di mana dua untai DNA dipisahkan untuk memungkinkan sintesis RNA.

2. Elongasi

- ❖ Sintesis RNA: RNA polimerase bergerak sepanjang untai DNA template (anti-sense strand) dan menambahkan ribonukleotida komplementer (Adenin, Uracil, Sitosin, Guanin) ke ujung 3' dari rantai RNA yang sedang tumbuh. Ribonukleotida ini berpasangan dengan basa komplementernya pada untai DNA template (A dengan U, T dengan A, C dengan G, dan G dengan C).
- ❖ Pembentukan RNA: RNA yang disintesis memiliki urutan basa yang komplementer dengan untai DNA template dan hampir identik dengan untai sense DNA, kecuali bahwa RNA mengandung Uracil (U) sebagai pengganti Timin (T).

3. Terminasi

- ❖ Penghentian Sintesis RNA: Proses transkripsi berakhir ketika RNA polimerase mencapai urutan terminasi pada DNA. Urutan terminasi adalah sinyal yang memberitahu RNA polimerase untuk berhenti menyalin DNA.
- ❖ Pelepasan RNA: RNA yang baru disintesis, disebut RNA transkrip, dilepaskan dari kompleks DNA-RNA polimerase. RNA polimerase juga dilepaskan dari DNA, yang kemudian kembali ke heliks ganda.

Jenis RNA yang Dihasilkan

1. mRNA (Messenger RNA): RNA yang membawa informasi genetik dari DNA di inti sel ke ribosom di sitoplasma, di mana protein disintesis.
2. tRNA (Transfer RNA): RNA yang membawa asam amino ke ribosom selama translasi untuk membentuk rantai polipeptida.
3. rRNA (Ribosomal RNA): Komponen utama ribosom, yang berperan dalam proses translasi.
4. snRNA (Small Nuclear RNA): Terlibat dalam penyuntingan mRNA di dalam inti sel.

Proses Penyuntingan RNA (Pada Eukariota)

Setelah transkripsi, pra-mRNA (pre-mRNA) pada eukariota mengalami beberapa tahap pemrosesan sebelum menjadi mRNA matang:

1. Penambahan Cap 5': cap 7-metilguanosisin ditambahkan ke ujung 5' pre-mRNA untuk melindunginya dari degradasi dan membantu pengikatan ribosom.
2. Penambahan Poli-A Tail: Sekuens poliadenin (poli-A) ditambahkan ke ujung 3' pre-mRNA untuk stabilitas dan translasi efisien.
3. Splicing: Intron (urutan non-coding) dipotong dari pre-mRNA, dan ekson (urutan coding) disambungkan bersama untuk membentuk mRNA matang.

Kepentingan Transkripsi

Transkripsi merupakan langkah krusial dalam ekspresi gen, yang memungkinkan informasi genetik di dalam DNA diubah menjadi molekul RNA yang fungsional. RNA ini kemudian dapat:

- ❖ Ditranlasikan menjadi Protein: mRNA berfungsi sebagai template untuk sintesis protein, yang menjalankan berbagai fungsi seluler.
- ❖ Berperan dalam Regulasi Gen: Beberapa RNA, seperti miRNA dan siRNA, terlibat dalam regulasi ekspresi gen melalui mekanisme interferensi RNA.

Transkripsi menjadi proses fundamental yang memungkinkan sel untuk mengekspresikan gen-gen tertentu saat diperlukan, menjaga fungsi seluler yang tepat, dan merespon terhadap perubahan lingkungan.

Translasi

Translasi adalah proses di mana informasi genetik yang dibawa oleh mRNA (messenger RNA) digunakan untuk mensintesis protein. Ini adalah tahap kedua dalam ekspresi gen setelah transkripsi. Translasi berlangsung di ribosom, yang berada di sitoplasma sel.

Tahap-Tahap Translasi

Translasi terdiri dari tiga tahap utama: inisiasi, elongasi, dan terminasi.

1. Inisiasi

- ❖ Pembentukan Kompleks Inisiasi: Proses translasi dimulai dengan pembentukan kompleks inisiasi. Subunit kecil ribosom mengikat mRNA pada urutan yang disebut urutan Shine-Dalgarno (pada prokariota) atau cap 5' (pada eukariota).
- ❖ Pengikatan tRNA Inisiator: tRNA inisiator yang membawa asam amino metionin (pada eukariota) atau formil-metionin (pada prokariota) mengikat kodon start AUG pada mRNA.
- ❖ Asosiasi Subunit Besar Ribosom: Setelah tRNA inisiator mengikat mRNA, subunit besar ribosom bergabung dengan subunit kecil untuk membentuk kompleks ribosom lengkap.

2. Elongasi

- ❖ Pengikatan tRNA Baru: tRNA yang sesuai dengan kodon berikutnya pada mRNA masuk ke situs A (aminoasil) ribosom, membawa asam amino yang sesuai.
- ❖ Pembentukan Ikatan Peptida: Ribosom mengkatalisis pembentukan ikatan peptida antara asam amino pada tRNA di situs P (peptidil) dan asam amino pada tRNA di

situs A. Enzim peptidil transferase, yang merupakan bagian dari rRNA ribosom, melakukan katalisis ini.

- ❖ Translokasi Ribosom: Setelah pembentukan ikatan peptida, ribosom bergerak sepanjang mRNA, memindahkan tRNA dari situs A ke situs P dan tRNA dari situs P ke situs E (exit). tRNA di situs E kemudian dilepaskan dari ribosom.
- ❖ Pengulangan Proses: Siklus pengikatan tRNA baru, pembentukan ikatan peptida, dan translokasi ribosom berulang hingga seluruh urutan mRNA diterjemahkan.

3. Terminasi

- ❖ Kodon Stop: Translasi berakhir ketika ribosom mencapai kodon stop (UAA, UAG, atau UGA) pada mRNA. Tidak ada tRNA yang mengenali kodon stop ini.
- ❖ Faktor Terminasi: Protein yang disebut faktor terminasi mengikat kodon stop dan mengkatalisis pelepasan polipeptida yang telah disintesis dari ribosom.
- ❖ Disosiasi Ribosom: Setelah pelepasan polipeptida, subunit ribosom besar dan kecil serta mRNA terpisah, siap untuk memulai siklus translasi baru dengan mRNA dan tRNA lainnya.

Komponen-Komponen dalam Translasi

- ❖ mRNA (Messenger RNA): Membawa kode genetik dari DNA yang menentukan urutan asam amino dalam protein.
- ❖ tRNA (Transfer RNA): Membawa asam amino spesifik ke ribosom berdasarkan kodon pada mRNA. Setiap tRNA memiliki antikodon yang berpasangan dengan kodon pada mRNA.
- ❖ Ribosom: Mesin molekuler yang terdiri dari rRNA dan protein ribosom, tempat sintesis protein berlangsung. Ribosom memiliki tiga situs penting: situs A, P, dan E.
- ❖ Faktor Inisiasi, Elongasi, dan Terminasi: Protein yang membantu mengatur dan mengkatalisis berbagai tahapan translasi.

Kepentingan Translasi

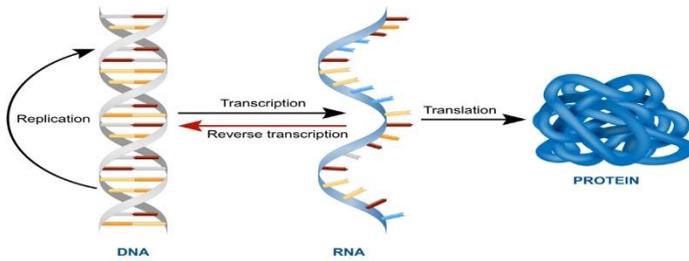
Translasi adalah proses esensial untuk:

- ❖ Sintesis Protein: Menghasilkan protein yang menjalankan berbagai fungsi struktural dan fungsional dalam sel.
- ❖ Ekspresi Genetik: Mengonversi informasi genetik dalam DNA menjadi produk fungsional (protein).

- ❖ Pertumbuhan dan Perbaikan: Memungkinkan pertumbuhan, pembelahan sel, dan perbaikan jaringan dengan menghasilkan protein baru.
- ❖ Respons Seluler: Memungkinkan sel untuk merespons sinyal lingkungan dan stres dengan mensintesis protein yang sesuai.

Translasi adalah langkah krusial dalam aliran informasi genetik dari DNA ke RNA ke protein, yang dikenal sebagai dogma sentral biologi molekuler. Proses ini memastikan bahwa sel dapat memproduksi protein yang diperlukan untuk menjalankan dan mengatur fungsi-fungsi kehidupannya. Sintesis protein mengacu pada pembangunan protein oleh sel hidup yang terdiri dari dua bagian utama (transkripsi dan translasi) (Gambar 5). Proses sintesis protein melibatkan asam ribonukleat (RNA), asam deoksiribonukleat (DNA), enzim, dan ribosom. Secara keseluruhan, proses sintesis protein melibatkan transkripsi DNA menjadi mRNA, yang kemudian diterjemahkan menjadi protein. Proses ini membutuhkan koordinasi RNA, DNA, enzim, dan ribosom yang tepat.

Transcription and Translation



Gambar 5 Sintesis protein. Sumber: <https://biologywise.com/protein-synthesis-process>

UWKSpress

Metode dan Teknik Genetika Molekuler

Metode dan teknik dalam genetika molekuler mencakup berbagai pendekatan yang digunakan untuk menganalisis dan memodifikasi DNA, RNA, dan protein dalam organisme. Beberapa metode dan teknik utama dalam genetika molekuler antara lain Polymerase Chain Reaction (PCR), elektroforesis Gel, sekuen DNA, kloning DNA, rekayasa genetik dan CRISPR-Cas9, *Northern Blotting*, *Southern Blotting*, *Western Blotting*, RT-PCR *Reverse Transcription PCR* (RT-PCR), *in situ hybridization*, dan *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) (Garibyan & Avashia 2013). PCR merupakan teknik untuk mengamplifikasi fragmen DNA tertentu dari sampel kecil, memungkinkan analisis lebih lanjut. PCR digunakan untuk kloning DNA, analisis mutasi, forensik, dan diagnosis penyakit genetik. Elektroforesis gel digunakan untuk memisahkan fragmen DNA, RNA, atau protein berdasarkan ukuran dan muatan. Gel agarosa digunakan untuk DNA dan RNA, sedangkan gel poliakrilamida digunakan untuk protein.

Sekuen DNA merupakan teknik untuk menentukan urutan nukleotida dalam fragmen DNA. Sekuensing adalah metode modern termasuk sekuensing Sanger dan Next-

Generation Sequencing (NGS). Kloning DNA adalah proses memasukkan fragmen DNA ke dalam vektor (misalnya plasmid) untuk penggandaan dan analisis. Kloning DNA digunakan untuk produksi protein rekombinan, gen reporter, dan penelitian genetik. Rekayasa genetik dan CRISPR-Cas9 adalah teknik untuk memodifikasi gen dalam organisme. CRISPR-Cas9 memungkinkan pengeditan gen yang presisi dan efisien dengan menggunakan RNA pemandu untuk memotong DNA pada lokasi spesifik (Potapov & Ong 2017).

Northern Blotting adalah teknik untuk mendeteksi RNA tertentu dalam sampel. *Northern Blotting* melibatkan pemisahan RNA melalui elektroforesis gel, transfer ke membran, dan deteksi dengan probe berlabel. *Southern Blotting* adalah teknik untuk mendeteksi fragmen DNA tertentu dalam sampel. *Southern Blotting* melibatkan pemisahan DNA melalui elektroforesis gel, transfer ke membran, dan deteksi dengan probe berlabel. *Western Blotting* adalah teknik untuk mendeteksi protein tertentu dalam sampel. *Western Blotting* melibatkan pemisahan protein melalui elektroforesis gel, transfer ke membran, dan deteksi dengan antibodi berlabel.

Microarray DNA adalah teknik untuk menganalisis ekspresi gen dari ribuan gen sekaligus. Microarray DNA

melibatkan hibridisasi cDNA dengan probe pada slide mikroarray. RT-PCR digunakan untuk mengamplifikasi dan mendeteksi RNA dengan mengubahnya menjadi DNA komplementer (cDNA) sebelum PCR. *In Situ Hybridization* adalah teknik untuk mendeteksi lokasi spesifik DNA atau RNA dalam jaringan atau sel. *In Situ Hybridization* menggunakan probe berlabel yang hibridisasi dengan target sekuen in situ. FISH adalah varian dari *in situ hybridization* yang menggunakan probe berfluoresensi untuk mendeteksi dan memvisualisasikan lokasi spesifik DNA atau RNA dalam sel (Chakrabarti & Schutt 2001).

Teknik-teknik ini memungkinkan peneliti untuk memahami fungsi gen, mengidentifikasi mutasi yang terkait dengan penyakit, dan mengembangkan terapi genetik serta produk bioteknologi.

PCR

PCR adalah teknik biologi molekuler yang digunakan untuk mengamplifikasi (memperbanyak) fragmen DNA spesifik dari sampel kecil. PCR memungkinkan peneliti untuk menghasilkan jutaan hingga miliaran salinan dari sekuen DNA tertentu, membuatnya cukup untuk dianalisis lebih lanjut. Teknik ini

sangat penting dalam berbagai aplikasi, termasuk penelitian genetik, diagnosis penyakit, forensik, dan bioteknologi.

PCR adalah alat yang sangat serbaguna dan esensial dalam biologi molekuler modern, memungkinkan amplifikasi cepat dan spesifik dari DNA untuk berbagai aplikasi ilmiah dan klinis. Mesin PCR—atau *thermal cycler*—adalah instrumen yang memperkuat rangkaian asam nukleat target menjadi jutaan salinan melalui reaksi berantai polimerase. *Thermal cycler* mengandung blok logam yang diatur secara termal. Karena protokol PCR memerlukan suhu yang berbeda pada waktu yang berbeda, *thermal cycler* mengatur pertukaran panas yang cepat selama protokol PCR (Aslanzadeh 2004).

Thermal cycler saat ini dirancang untuk memudahkan pemrograman protokol PCR. Protokol PCR seringkali bervariasi berdasarkan target DNA, urutan primer, DNA polimerase yang digunakan, dan tujuan percobaan. Oleh karena itu, *thermal cycler* yang dilengkapi dengan antarmuka pengguna yang intuitif, seperti layar sentuh dan fitur pemrograman yang mudah, membantu memungkinkan pengaturan protokol lebih cepat dan efisien (Gambar 6).



Gambar 6 Evolusi Thermal cycler sejak tahun 1980an. Sumber: <https://www.thermofisher.com>

Kemajuan terkini juga memungkinkan akses mudah ke *thermal cycler* kapan saja dan dari mana saja menggunakan perangkat seluler atau komputer desktop. Konektivitas cloud menawarkan peningkatan aksesibilitas di ujung jari Anda dan kebebasan untuk membuat dan berbagi protokol serta menjadwalkan, memulai/menghentikan, dan memantau proses PCR.

Singkatnya, *thermal cycler* telah berevolusi dalam teknologi dan desain PCR sejak diperkenalkan pada tahun 1980an. Inovasi terus memfasilitasi peningkatan PCR dan kemajuan dalam penelitian biologi molekuler.

Komponen PCR

Beberapa komponen PCR antara lain template DNA, primer forward dan reverse, enzim DNA polimerase, dan buffer reaksi. Para ilmuwan harus memastikan bahwa semua reagen dalam reaksi berada pada konsentrasi dan rasio yang optimal. Selain itu, mengoptimalkan kondisi siklus termal dan menggunakan berbagai aditif dapat meningkatkan hasil PCR (Ricardo et al. 2019).

1. Template DNA: Fragmen DNA yang mengandung sekuen target yang akan diamplifikasi. Jumlah templat, sumber, dan struktur sekunder atau daerah kaya GC dapat mempengaruhi reaksi. Jumlah template tergantung pada nomor salinan DNA. Untuk reaksi PCR standar dengan 25-30 siklus, sekitar 10⁴ salinan DNA cetakan sudah cukup untuk menghasilkan sejumlah produk PCR yang dapat dideteksi. DNA yang diperlukan untuk reaksi tertentu juga bergantung pada sumbernya. Biasanya, 20-50ng DNA genom bakteri merupakan jumlah optimal untuk sebagian besar reaksi PCR. Untuk gen yang lebih banyak tersedia seperti gen housekeeping, 10ng sudah cukup. Kompleksitas template penting untuk dipertimbangkan sebelum menyiapkan reaksi. Untuk template dengan kandungan guanin dan sitosin (GC) yang tinggi, para

ilmuwan menggunakan Temperature melting (T_m) yang tinggi untuk memisahkan struktur sekunder. Aditif seperti gliserol, dimetilsulfoksida (DMSO), dan albumin serum sapi (BSA) juga dapat membantu mencegah struktur sekunder.

2. Primer: Oligonukleotida pendek yang berfungsi sebagai titik awal bagi sintesis DNA. Dua primer digunakan: primer forward dan primer reverse, yang masing-masing mengikat pada ujung 3' dari sekuen target yang berlawanan. Desain primer sangat penting untuk keberhasilan reaksi PCR. Panjang primer optimal berada pada kisaran 15-30 nukleotida. Konten GC harus hampir 40-60 persen. T_m harus antara 52-58°C. Perbedaan T_m untuk primer forward dan primer reverse tidak boleh lebih dari 5°C. Ujung 3' dari setiap primer sebaiknya berupa basa G atau C untuk ikatan hidrogen yang kuat dan annealing yang lebih baik. Namun, hal ini juga meningkatkan suhu annealing. Dimer primer adalah masalah umum pada PCR. Dimer primer terbentuk melalui pengikatan primer primer komplementer dan bukannya diannealing ke templat. Memastikan ujung primer 3' non-komplementer membantu mencegah pembentukan dimer. Kisaran konsentrasi primer optimal adalah

0,1-1 μ M. Konsentrasi yang lebih tinggi dapat menyebabkan dimer primer atau pengikatan template yang tidak spesifik.

Tabel 2 Primer dan sekuen (Ningrum et al. 2022)

Target gene	Size (bp)	Primer	Sequence
<i>rfbE</i>	292	RfbF	5'-GTGTCCATTTATACGGACATCCATG-3'
		RfbR	5'-CCTATAACGTCATGCCAATATTGCC-3'
<i>fliC</i>	625	FLICh7-F	5'-GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC-3'
		FLICh7-R	5'-CAACGGTGACTTATCGCCATTCC-3'
<i>stx1</i>	210	SLT-IF	5'-TGTAACCTGGAAAGGTGGAGTATAC-3'
		SLT-IR	5'-GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC-3'
<i>stx2</i>	484	SLT-IIIF	5'-GTTTTTCTTCGGTATCCATTCCG-3'
		SLT-IIIR	5'-GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC-3'

3. DNA Polymerase: Enzim yang mensintesis DNA baru dari nukleotida bebas. Enzim yang sering digunakan adalah Taq polymerase, yang tahan panas dan berasal dari bakteri *Thermus aquaticus*. DNA polimerase adalah reagen dasar untuk PCR. Enzim DNA polimerase Taq, yang pertama kali diperoleh para peneliti dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*, telah memainkan peran penting dalam standarisasi reaksi PCR. Karena sifatnya yang termostabil, Taq dapat menahan suhu denaturasi yang tinggi dan tetap aktif dalam inkubator sepanjang siklus reaksi. Selama bertahun-tahun, para ilmuwan telah menciptakan beberapa DNA polimerase rekombinan lainnya dan mengeksplorasi berbagai sumber enzim polimerase untuk meningkatkan fitur tertentu guna hasil PCR yang optimal. Stabilitas termal: Archaea dan bakteri yang bertahan hidup pada suhu ekstrim (di atas 80°C) disebut hipertermofil. DNA

polimerase yang berasal dari hipertermofil sangat stabil pada suhu denaturasi tinggi. Misalnya, Pfu polimerase yang berasal dari archaea *Pyrococcus furiosus* lebih stabil dibandingkan Taq polimerase konvensional (Cline et al. 1996). Beberapa DNA polimerase dengan aktivitas optimal pada suhu tinggi masih dapat berfungsi pada suhu lebih rendah, sehingga dapat menyebabkan amplifikasi non-spesifik. Para ilmuwan mencegah hal ini dengan menambahkan antibodi spesifik yang tidak tahan panas yang mengikat polimerase dan menghambat aktivitasnya pada suhu rendah. Hal ini juga disebut sebagai PCR hot-start. Modifikasi kimia yang peka terhadap panas pada situs aktif enzim juga dapat memiliki efek serupa (Ishino & Ishino 2014).

Komponen PCR Tambahan

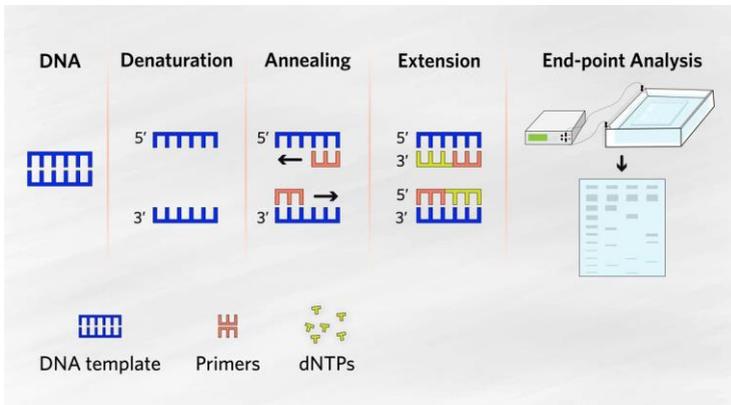
PCR mix juga mengandung berbagai komponen lain yang berperan penting dalam memastikan reaksi optimal antara lain (1) garam magnesium (Mg^{2+}) yang merupakan kofaktor penting untuk DNA polimerase termotabil. Konsentrasi akhir Mg^{2+} dalam campuran reaksi PCR biasanya berkisar antara 0,5-5,0mM. (2) Deoksinukleotida 5'-trifosfat (dNTPs), bahan penyusun reaksi. Idealnya, keempat dNTP harus ada dalam

konsentrasi yang setara, biasanya dalam kisaran masing-masing 20-200 μ M. (3) DMSO dapat membantu menurunkan suhu leleh (T_m) dan mengoptimalkan reaksi yang melibatkan templat kaya GC (biasanya kandungan GC >60 persen). Konsentrasi akhir yang disarankan adalah 1-10 persen. (4) Formamida melemahkan pasangan basa dan meningkatkan spesifisitas annealing primer, sehingga meningkatkan amplifikasi PCR untuk templat dengan kandungan GC tinggi. Biasanya ilmuwan menggunakan rentang konsentrasi 1,25-10 persen. (5) BSA dapat mengurangi efek penghambatan garam besi dan ekstrak organik yang ada di sumber air dan sampel biologis tertentu, seperti kotoran. Konsentrasi optimal dalam campuran reaksi adalah sekitar 400ng/ μ L. (6) Deterjen non-ionik seperti NP-40, Tween 20, atau Triton X-100 (0,1-1 persen) dapat menstabilkan DNA polimerase dan mencegah pembentukan struktur sekunder templat.

Langkah-Langkah PCR

PCR terdiri dari tiga tahap utama yang diulang dalam siklus berulang, biasanya antara 20-40 kali, antara lain:

1. Denaturasi (94-98°C): Pemanasan sampel DNA untuk memisahkan kedua untai DNA, menghasilkan dua untai tunggal.
2. Annealing (50-65°C): Penurunan suhu memungkinkan primer untuk hibridisasi (mengikat) dengan sekuen komplementer pada untai tunggal DNA template.
3. Elongasi (72°C): Suhu optimal untuk Taq polymerase untuk mensintesis DNA baru dengan menambahkan dNTPs ke primer, memperpanjang untai DNA baru.



Gambar 7 Langkah-langkah PCR. Sumber: <https://www.the-scientist.com>

Pada analisis titik akhir, para ilmuwan akan menganalisis produk PCR yang biasanya menggunakan elektroforesis gel agarosa.

Pengaturan Siklus PCR

Langkah-langkah PCR terjadi pada suhu yang berbeda. Thermal cycler mampu melakukan siklus suhu tinggi dan rendah untuk mendorong reaksi ini.

Tabel 3 Sekuens primer oligonukleotida dan pengaturan PCR (Ningrum et al 2017)

Oligonucleotide primers	Sequences	Program*	Size of PCR product (bp)	References
16S rDNA UNI-L	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'	1	1352	9
16S rDNA UNI-R	5'-GTGTGACGGGCGGTGTGTAC-3'			
<i>rpoB</i> -F	5'-CGWATGAACATYGGBCAGGT-3'	2	406	24
<i>rpoB</i> -R	5'-TCCATYTCRCCRAARCCTG-3'			
<i>gap</i> -F	5'-TCGAAGTTGTTGCAGTTAACGA-3'	3	784	20
<i>gap</i> -R	5'-CCAATCCGTTGTCGTACCAAG-3'			
<i>tuf</i> -F	5'-GGACGGTAGTTGGAGAAGAATGG-3'	4	796	25
<i>tuf</i> -R	5'-CCAGGTTGATAACGCTCCAGAAGA-3'			
<i>pla</i> -F	5'-GTTGATCTACCAGGATTGACGC-3'	5	283	3
<i>pla</i> -R	5'-TTGTCGGGGTGTCCATTGCC-3'			

*PCR program:

- 1: x1 (10 min at 95°C), x30 (30 s at 95°C, 60 s at 58°C, 60 s at 72°C), x1 (7 min at 72°C),
- 2: x1 (10 min at 95°C), x35 (30 s at 94°C, 30 s at 37°C, 120 s at 72°C), x1 (10 min at 72°C),
- 3: x1 (3 min at 94°C), x30 (30 s at 94°C, 40 s at 50°C, 60 s at 72°C), x1 (5 min at 72°C),
- 4: x1 (3 min at 94°C), x30 (45 s at 94°C, 40 s at 57°C, 60 s at 72°C), x1 (7 min at 72°C),
- 5: x1 (3 min at 94°C), x30 (45 s at 94°C, 30 s at 57°C, 60 s at 72°C), x1 (7 min at 72°C).

Extension time tergantung pada panjang amplicon dan DNA polimerase. Para ilmuwan memodifikasi kondisi siklus di setiap langkah untuk mengatasi tantangan seperti amplifikasi nonspesifik dan hasil yang rendah, sehingga meningkatkan hasil reaksi. Salah satu perbaikannya adalah dengan memperpanjang fase denaturasi hingga 5 menit jika konsentrasi DNA awal rendah, sehingga membantu mencegah annealing di luar target. Memasukkan DNA polimerase ketika campuran reaksi dipanaskan hingga suhu denaturasi, seperti pada PCR hot-start, adalah salah satu cara untuk memperpanjang fase ini.

Cara Membuat PCR Mix

Ada beberapa hal yang perlu diperhatikan saat menyusun PCR mix, seperti komponen larutan stok, konsentrasi reagen akhir yang optimal, dan urutan pipeting ke dalam tabung reaksi.

Tabel 4 PCR Mix dengan konsentrasi akhir 30 μL (Ningrum et al. 2023)

	Volume per reaksi (konsentrasi akhir)	Master Mix untuk N=5
PCR gradient water	10,0 μL	50,0 μL
2 x Master Mix (SYBR green)	15,0 μL	75,0 μL
Primers F (10pmol/ μL)	1,0 μL (0,4 μM)	5,0 μL
Primers R (10pmol/ μL)	1,0 μL (0,4 μM)	5,0 μL
DNA	3,0 μL	
Total volume	30 μL	

Tempatkan tabung PCR dalam thermocycler dan lakukan program *thermocycling* berikut:

Preincubation : 95°C 10 min.

Step Amplification: 95°C 30 sec.

(30 cycles) 58°C 60 sec.

72°C 60 sec.

Final elongation: 72°C 5 min.

+Melting 95°C 10 sec

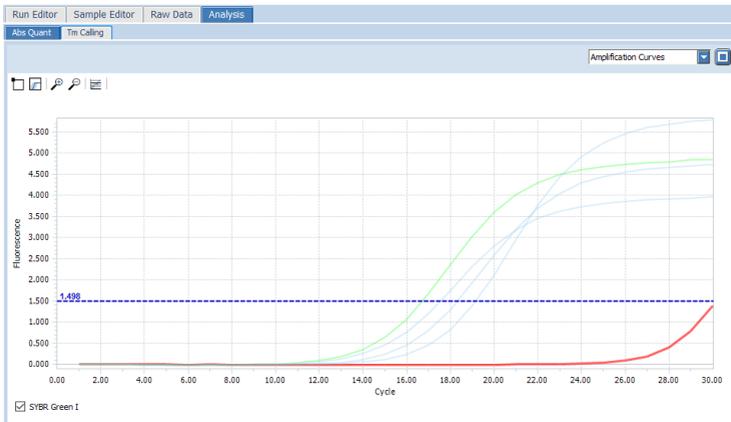
65°C 60 sec

97°C 1 sec

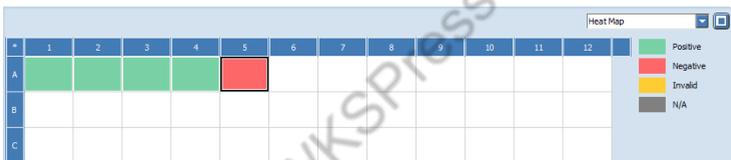
Contoh format pelaporan hasil PCR:

Number	1	2	3	4	5
Sample name	<i>A. canis</i> M214/96/1	<i>A. canis</i> P5197/15	<i>A. canis</i> ZT11003002	<i>A. canis</i> DSM 25104 (Kontrol +)	Nuclease free Water (NFW) (Kontrol -)
Results (796) bp size					
Titer (nanodrop)					

Hasil Real-time PCR



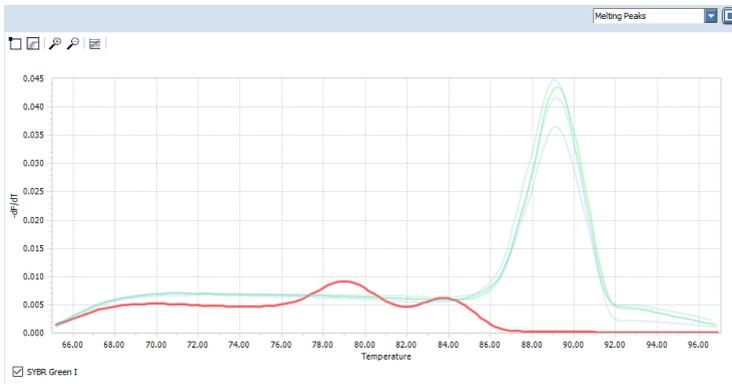
Gambar 8 Hasil analisis Real Time PCR terhadap gen 16S rDNA



Gambar 9 Hasil heat map

All Data		Statistic Data		Result Table									
Color	Position	Sample Name	Gene Name	Cq	Concentration	Call	Excluded	Sample Type	Standard	Cq Mean	Cq Error	Conc	
Blue	A1	M21496/1 A.canis	16S	14.85	-	Positive	<input type="checkbox"/>	Unknown	-	14.85	0.00		
Blue	A2	PS197/15 A.canis	16S	13.65	-	Positive	<input type="checkbox"/>	Unknown	-	13.65	0.00		
Blue	A3	ZT11003002 A.canis	16S	15.79	-	Positive	<input type="checkbox"/>	Unknown	-	15.79	0.00		
Green	A4	DSM 25104 A.canis	16S	13.17	-	Positive	<input type="checkbox"/>	Positive control	-	13.17	0.00		
Red	A5	NTC	16S	-	-	Negat...	<input type="checkbox"/>	Negative control	-	-	-	-	

Gambar 10 Hasil data statistik



Gambar 11 Hasil melting peaks

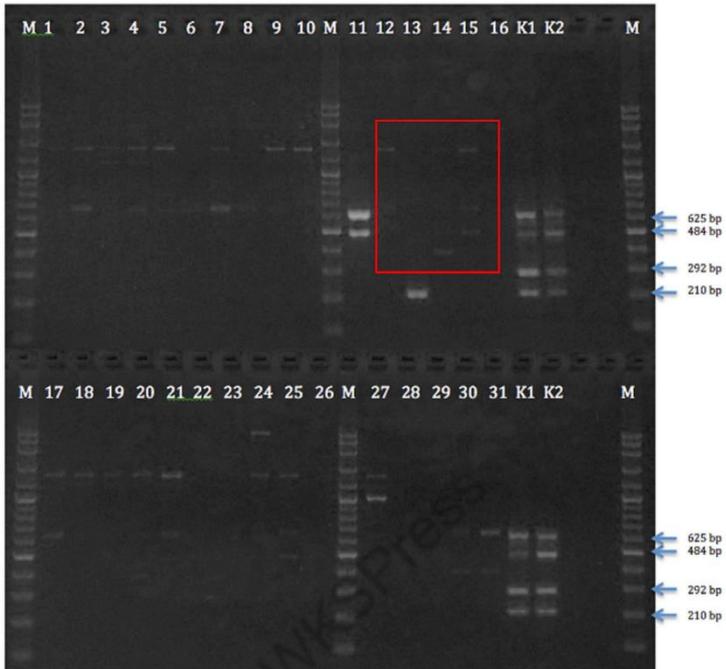
Troubleshooting PCR

Amplifikasi rendah atau tidak ada sama sekali

Hasil PCR dapat rendah atau tidak ada sama sekali karena berbagai faktor seperti konsentrasi reagen yang salah, kondisi siklus yang tidak tepat, atau kesalahan pipet. Untuk meningkatkan amplifikasi, para ilmuwan menambahkan reagen baru, menyiapkan pengenceran baru, menyiapkan kontrol yang sesuai, dan menyesuaikan kondisi siklus PCR yang disebutkan di atas. Dalam beberapa kasus, templatnya mungkin sudah tua dan mungkin mengandung inhibitor yang menghambat reaksi. Hal ini dapat diatasi dengan memasukkan bahan tambahan seperti BSA (Lorenz 2012).

Primer dimers dan amplifikasi nonspecific PCR

Primer dimers terbentuk melalui pengikatan primer primer komplementer. Cara sederhana untuk mengurangi dimer primer adalah dengan memodifikasi rasio primer terhadap template. Aktivitas polimerase yang kurang optimal pada suhu rendah dapat menyebabkan amplifikasi nonspesifik. PCR hot-start memodifikasi kondisi siklus untuk membantu mencegah dimer dan amplifikasi non-spesifik. Amplifikasi nonspesifik dari DNA genom panjang seringkali dapat menyebabkan pembentukan noda pada produk PCR, yang dapat diatasi dengan melakukan PCR pada plasmid dengan urutan target.



Gambar 12 Primer dimers and produk nonspecific PCR (band yang terbentuk dalam kotak merah) (Ningrum et al 2017)

Produk PCR dengan Sekuen Error

Para ilmuwan perlu mempertimbangkan sekuen eror untuk aplikasi hilir PCR, seperti kloning dan NGS. Kerusakan DNA, ketidakcocokan pasangan basa, atau DNA polimerase dengan proses yang rendah dapat menyebabkan sekuen eror pada produk PCR. Para peneliti dapat menggunakan single-molecule

DNA sequencing untuk mendeteksi dan mengatasi kesalahan ini.

UWKSPress

Jenis-jenis PCR

Ada berbagai jenis reaksi PCR berdasarkan sifat amplifikasi dan metode deteksinya (Tabel 4)

Tabel 5 Tipe PCR

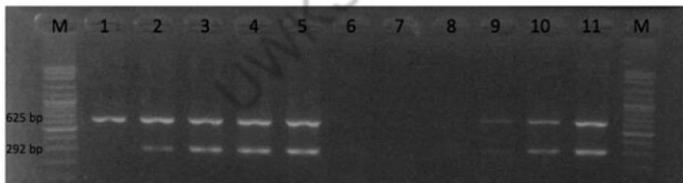
Tipe PCR	Deskripsi	Keuntungan
<i>Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)</i>	PCR real-time mendeteksi dan mengkuantifikasi DNA seiring berlangsungnya reaksi.	RT-qPCR mengkuantifikasi jumlah spesifik DNA yang ada dalam sampel. Prosedur ini memerlukan thermal cycler khusus dengan fluorimeter.
<i>Multiplex PCR</i>	PCR Multipleks menggunakan banyak primer untuk memperkuat	Teknik ini menghemat waktu dan reagen dengan mendeteksi

	target yang berbeda dalam satu reaksi (Markoulatos et al. 2002).	beberapa target dalam satu reaksi.
<i>Low copy number PCR</i>	<p>PCR dengan jumlah salinan rendah mengamplifikasi DNA dalam jumlah rendah (biasanya <100-200pg).</p> <p>Meningkatkan jumlah siklus amplifikasi menjadi 34, bukan 28, membantu meningkatkan sensitivitas.</p> <p>Variasi tambahan</p>	<p>Metode ini sangat berguna untuk mendeteksi sejumlah kecil DNA, sehingga dapat diterapkan dalam penyelidikan forensik.</p>

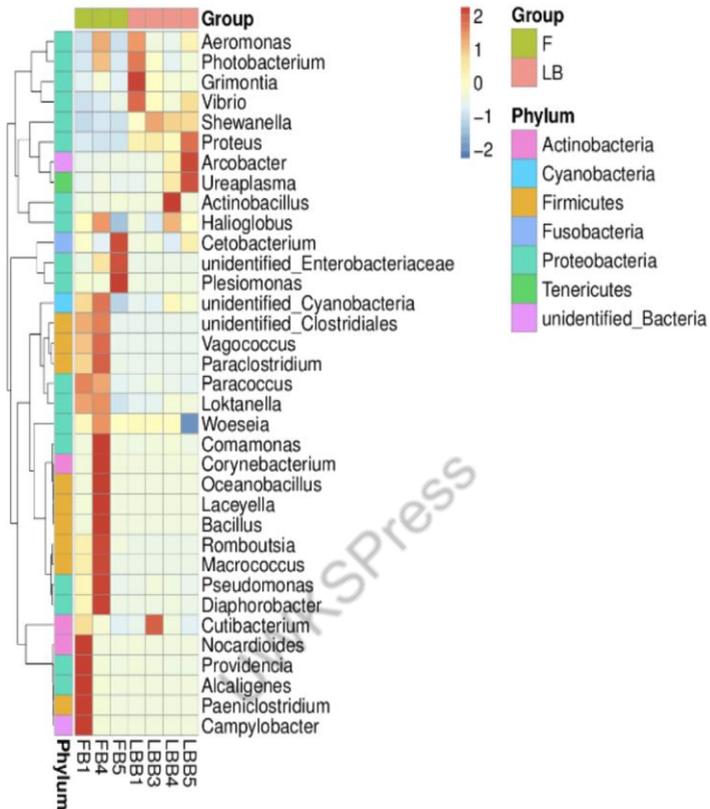
	<p>pada kondisi siklus atau campuran PCR juga dapat membantu deteksi.</p>	
<i>Long-range PCR</i>	<p>DNA genom kompleks (hingga 20kb) dan templat DNA pengkode protein (30kb atau lebih) dapat diamplifikasi menggunakan PCR jarak jauh.⁶ Kombinasi DNA polimerase termostabil yang sangat prosesif dan polimerase fidelitas tinggi</p>	<p>Long-range PCR memungkinkan terjadinya amplifikasi molekul DNA panjang yang tidak dapat diamplifikasi dengan PCR biasa, terutama DNA genom (Kee et al. 2023).</p>

	<p>dengan eksonuklease 3'- 5' aktivitas membantu mencapai PCR jangka panjang (Keeney 2011).</p>	
<i>PCR for cloning</i>	<p>PCR untuk kloning memperkuat fragmen DNA untuk ligasi menjadi vektor, baik melalui ligasi basa tunggal atau ligasi ujung tumpul.</p>	<p>Metode ini memungkinkan kloning dengan jumlah DNA yang rendah dan untuk aplikasi throughput yang tinggi.</p>
<i>PCR for next-generation sequencing (NGS)</i>	<p>Amplifikasi PCR memungkinkan pembuatan <i>multiple NGS libraries</i></p>	<p>Metode ini memfasilitasi pengurutan beberapa wilayah yang diminati</p>

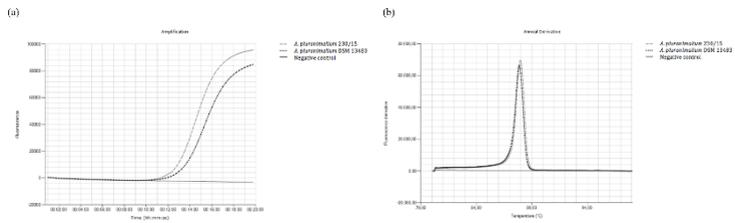
		secara bersamaan.
<i>Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)</i>	Teknik amplifikasi asam nukleat isothermal	Amplifikasi isothermal dilakukan pada suhu konstan, dan tidak memerlukan siklus termal (Kreitlow et al. 2023).



Gambar 13 Penentuan gen *rfbE* (O157) dan *fliC* (H7) *E. coli* O157:H7 dengan PCR multipleks. Jalur M: Penanda(100~3,000 bp), Jalur 1: ~ 0 sel *E. coli* O157:H7, Jalur 2: ~ 1 sel *E. coli* O157:H7, Jalur 3: ~ 10 sel *E. coli* O157:H7, Jalur 4: ~ 100 sel *E. coli* O157:H7, Jalur 5 & 11: kontrol positif, Jalur 6: kontrol negatif, Jalur 7: 10^5 sel *E. coli* O157:H7, Jalur 8: 10^6 sel *E. coli* O157:H7, Jalur 9: 10^7 sel *E. coli* O157:H7, Jalur 10: 10^8 sel *E. coli* O157:H7. Sumber: Ningrum et al 2017



Gambar 14 Hasil *Taxonomic abundance cluster heatmap* dengan menggunakan NGS (Agustin et al. 2023)



Gambar 15 (a) Deteksi sinyal amplifikasi LAMP terhadap isolat *A. pluranimalium* 230/15, *A. pluranimalium* DSM 13483 sebagai kontrol positif dan kontrol negatif; (b). Kurva leleh dari amplicon yang sama (Ningrum et al. 2017)

UWKSPress

Aplikasi PCR

Diagnosis Medis

PCR digunakan untuk tujuan diagnostik karena memungkinkan untuk mendeteksi agen infeksi dalam waktu yang jauh lebih singkat dibandingkan dengan kultur. Selain itu, PCR dapat mendeteksi virus dan bakteri dalam sampel klinis. Keunggulan ini merupakan faktor penting dalam diagnosis penyakit hewan (terutama disebabkan oleh virus) karena diagnosis laboratorium yang cepat akan memungkinkan tindakan pengendalian penyakit segera dilakukan. PCR secara rutin digunakan untuk mendeteksi virus *African swine fever*, *classical swine fever virus*, *foot and mouth disease virus*, *Aujeszky's disease virus*, *porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, dan *Newcastle disease virus*. Isolat tersebut selanjutnya dapat dikarakterisasi dengan pengurutan nukleotida (sekuensing) langsung dari DNA yang diamplifikasi. Karena keandalan hasil serta pencegahan kontaminasi sangat penting dalam PCR, metode ini harus dilakukan oleh personel yang terlatih. Selain itu, memerlukan infrastruktur teknis tingkat tinggi di laboratorium. Oleh sebab itu, peneguhan diagnosa menggunakan PCR pada umumnya jarang dilakukan. Akan

tetapi, pada masa pandemi Covid-19, individu yang dinyatakan positif pada hasil uji skrining, harus dilanjutkan pada uji PCR untuk mendapatkan hasil konfirmasi. Semenjak saat itu, PCR kini makin mudah ditemukan dan menjadi uji primadona khususnya untuk pengujian Covid-19. Tidak hanya Covid-19, uji PCR untuk diagnosis juga lebih dikembangkan untuk mendeteksi penyakit-penyakit klinis di hewan. Beberapa serangkaian pengujian dilakukan untuk meneguhkan diagnosa dimulai dengan pengambilan sampel, kultur, dan ekstraksi DNA. Di Jerman, pengambilan spesimen dari pasien di klinik hewan adalah hal yang wajib dilakukan untuk mendapatkan hasil diagnosa yang akurat. Dengan mendapatkan *informed consent* dari klien si pemilik hewan. Dokter hewan bisa mengambil spesimen dari hewan yang sakit. Beberapa jenis sampel yang umum diambil dari hewan sakit antara lain seperti feses, serum, darah, swab vagina, swab kulit, dll. Spesimen-spesimen ini akan diproses lebih lanjut untuk kultur bakteri agar dapat ditemukan etiologi penyakitnya. Setelah bakteri berhasil diisolasi maka bakteri tersebut diuji menggunakan serangkaian uji biokimia. Pada umumnya tes biokimia menggunakan *API-Coryne test* (BioMerieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Germany). Tes API Coryne adalah sistem identifikasi biokimia yang digunakan

untuk mengidentifikasi bakteri. Tes API Coryne adalah prosedur standar untuk mengidentifikasi bakteri melalui serangkaian tes enzimatis dan biokimia. Metode ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi mikroorganisme bahkan hingga tingkat spesies dilengkapi dengan sistem yang menawarkan database yang besar dan kini dapat diakses melalui layanan APIWEB™ berbasis Internet.

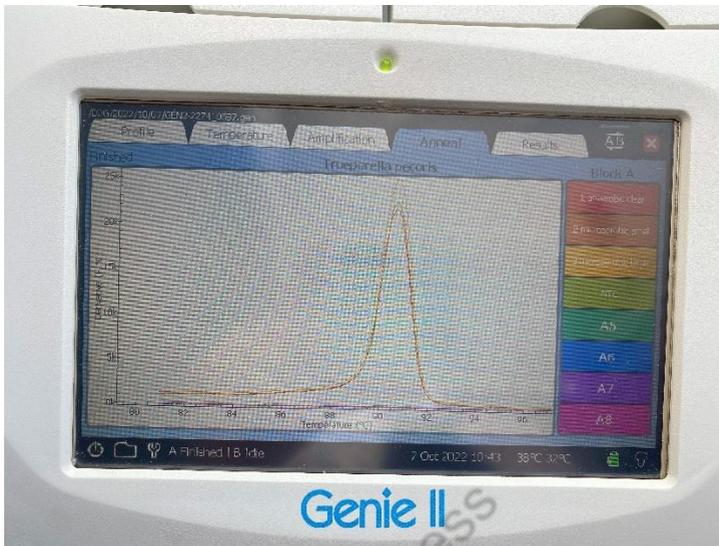


Gambar 16 Hasil Tes API CORYNE pada uji bakteri *Arcanobacterium canis* (Ningrum et al. 2023).

Hasil dari uji tes API CORYNE dapat menunjukkan jenis bakteri berdasarkan data di APIWEB™. Akan tetapi, seringkali hasil dari web ini kurang valid sehingga perlu untuk dikonfirmasi menggunakan PCR. Oleh sebab itu, sel kultur bakteri yang dicurigai dapat diekstrak menggunakan DNeasy *blood and*

tissue kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). DNA yang berhasil diekstrak kemudian dipurifikasi dan diukur menggunakan NanoDrop®2000c *spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Germany). Perhitungan kemurnian yang paling umum adalah rasio absorbansi pada 260nm dibagi dengan hasil pembacaan pada 280nm. DNA berkualitas baik akan memiliki rasio A_{260} / A_{280} sebesar 1,8–2,0. Jika rasio $A_{260}/280$ lebih besar dari 2,0, ini menunjukkan bahwa RNA telah terdegradasi. Sedangkan, jika rasio $A_{260}/280$ kurang dari 1,8, ini menunjukkan sampel mengandung protein atau pengotor lainnya seperti polisakarida dan polifenol. Tingkat kemurnian, konsentrasi, dan kualitas produk DNA sangat ditentukan oleh metode isolasi DNA dan mempengaruhi analisis selanjutnya. Setelah diperoleh DNA yang murni, PCR dapat dilakukan dengan menggunakan metode PCR konvensional atau advance seperti real-time PCR. Perbedaan yang mendasar pada kedua jenis PCR ini adalah penggunaan gel yang memakan banyak waktu pada PCR konvensional. Akan tetapi, PCR model ini lebih banyak ditemukan karena lebih murah dibandingkan dengan real-time PCR. Selain PCR konvensional, ada juga teknik amplifikasi DNA yang sifatnya *portable* sehingga mudah untuk dibawa kemana-mana tanpa

harus menggunakan thermal cycler. Metode ini dikenal dengan sebutan *Loop-mediated isothermal amplification* (LAMP). LAMP adalah metode amplifikasi gen sederhana di mana reaksi dapat dilakukan pada suhu konstan. Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Notomi et al. (2000). LAMP sangat berguna terutama sebagai teknik diagnostik atau deteksi dan murah, tetapi tidak berguna untuk kloning atau aplikasi biologi molekuler lainnya yang dimungkinkan oleh PCR. Meskipun demikian, LAMP masih menjadi primadona untuk deteksi penyakit dan terus dikembangkan. Kreitlow et al (2013) bahkan mengembangkan metode ini untuk mendeteksi *novel species*, *Trueperella pecoris*, yang kerap menyebabkan infeksi pada babi di Jerman.



Gambar 17 Genie® II adalah sistem amplifikasi DNA - RNA isothermal menggunakan teknologi tercanggih. Deteksi/diagnosis agen penyakit ditunjukkan dengan sampel yang diuji memiliki melting curve yang sama dengan kontrol positif.

Forensik

DNA profiling (DNA typing, genetic fingerprinting, DNA testing) adalah teknik yang digunakan oleh ilmuwan forensik untuk mengidentifikasi seseorang berdasarkan profil DNA mereka. PCR dapat digunakan sebagai alat dalam menyelidiki sidik jari secara genetik. Teknologi ini dapat mengidentifikasi seseorang dari jutaan orang lainnya. Misalnya, sampel kecil DNA yang diisolasi dari TKP dapat dibandingkan dengan DNA tersangka, atau dibandingkan dengan database DNA. Prosedur tersebut

dapat mengidentifikasi atau mengesampingkan tersangka selama penyelidikan polisi. Sidik jari DNA berbasis PCR juga dapat digunakan dalam pengujian orang tua di mana seseorang dibandingkan dengan kerabat dekatnya dan ayah kandung sebenarnya dari seorang anak sehingga dapat dikonfirmasi atau dikesampingkan. Tes DNA juga dapat memastikan orang tua kandung dari anak angkat. Reaksi berantai polimerase kuantitatif (qPCR) berbasis fluoresensi real-time telah menjadi teknologi patokan untuk mendeteksi asam nukleat di setiap bidang mikrobiologi, penelitian biomedis, bioteknologi, dan aplikasi forensik (Kubista et al. 2006).

Penelitian Genetik

Kloning PCR berbeda dari kloning tradisional karena fragmen DNA yang diinginkan, dan bahkan vektornya, dapat diamplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan diikat bersama, tanpa menggunakan enzim restriksi. Kloning PCR adalah metode cepat untuk mengkloning gen, dan sering digunakan untuk penelitian yang memerlukan hasil lebih tinggi daripada yang dapat diakomodasi oleh metode kloning tradisional. Hal ini memungkinkan terjadinya kloning fragmen DNA yang tidak tersedia dalam jumlah besar.

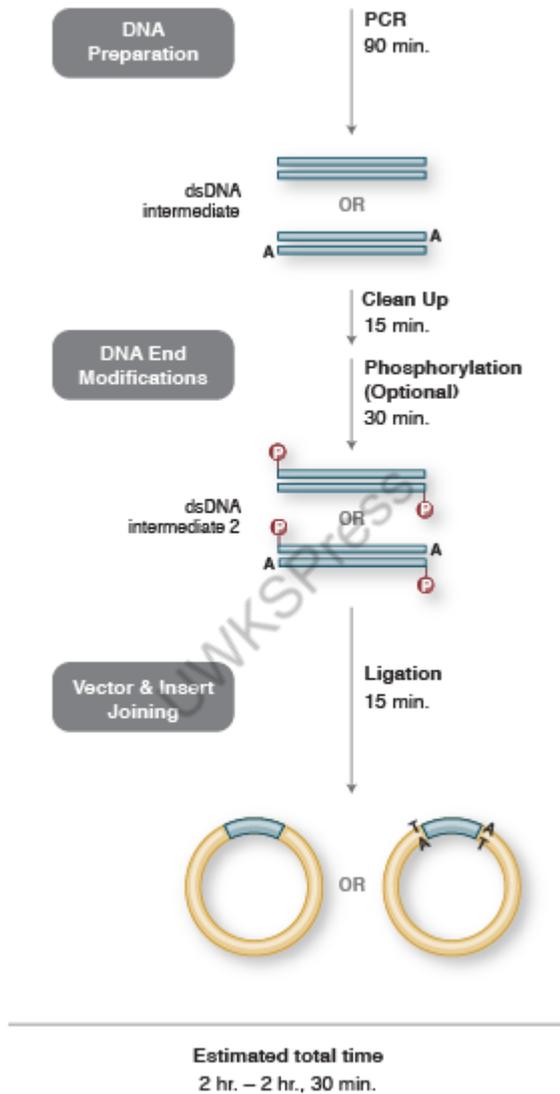
Biasanya, reaksi PCR dilakukan untuk memperkuat urutan yang diinginkan, dan kemudian digabungkan ke vektor melalui ligasi overhang tumpul atau basa tunggal sebelum transformasi. Kloning PCR awal sering menggunakan Taq DNA Polymerase untuk memperkuat gen. Hal ini menghasilkan produk PCR dengan penambahan basa tunggal yang tidak bergantung pada templat dari residu adenin (A) ke ujung 3' produk PCR, melalui kerja normal polimerase. Produk "berekor A" ini kemudian diikat ke vektor berekor T komplementer menggunakan ligase DNA T4, diikuti dengan transformasi (Wu et al. 2017).

Polimerase DNA dengan ketelitian tinggi juga sekarang secara rutin digunakan untuk memperkuat urutan dengan produk PCR yang tidak mengandung ekstensi 3'. Fragmen ujung tumpul digabungkan ke vektor plasmid melalui reaksi ligasi yang khas atau melalui aksi vektor "aktif" yang mengandung enzim yang terikat secara kovalen, biasanya Topoisomerase I, yang memfasilitasi penggabungan vektor: sisipan. Beberapa sistem kloning PCR mengandung rekayasa vektor "bunuh diri" yang mencakup gen beracun sehingga produk PCR harus

berhasil diikat untuk memungkinkan penyebaran strain yang mengambil molekul rekombinan selama transformasi.

Kelemahan khas yang umum pada banyak metode kloning PCR adalah vektor khusus yang harus digunakan. Vektor-vektor ini biasanya dijual oleh pemasok, seperti NEB, dalam format linierisasi siap pakai dan dapat menambah biaya yang signifikan terhadap total biaya kloning. Selain itu, penggunaan vektor tertentu membatasi pilihan peneliti mengenai resistensi antibiotik, identitas promotor, mitra fusi, dan elemen regulasi lainnya (Wang et al. 2004).

UWKSPress



Gambar 18 PCR cloning. Sumber: <https://www.neb.com>.

Bioteknologi

Metode untuk memurnikan beberapa protein dikembangkan pada awal abad ke-20, dan beberapa eksperimen pada struktur gen (kolinearitas gen dan protein untuk *trpA* dan triptofan sintase) menggunakan genetika mikroba dan pengurutan protein. Namun, metode untuk mengisolasi gen baru dikembangkan pada tahun 1960-an dan hanya dapat diterapkan pada beberapa gen saja.

Semua ini berubah pada akhir tahun 1970-an dengan berkembangnya teknologi DNA rekombinan, atau kloning molekuler. Teknik ini memungkinkan para peneliti untuk mengisolasi gen apa pun dari organisme apa pun yang dapat digunakan untuk mengisolasi DNA (atau RNA) utuh. Potensi penuh untuk menyediakan akses ke semua gen organisme kini terwujud seiring dengan pengurutan genom lengkap. Salah satu hasil sampingan dari penyelidikan intensif terhadap molekul DNA individu setelah munculnya DNA rekombinan adalah prosedur untuk mengisolasi DNA apa pun yang urutannya diketahui. Teknik ini, yang disebut dengan PCR, jauh lebih mudah dibandingkan metode kloning molekuler

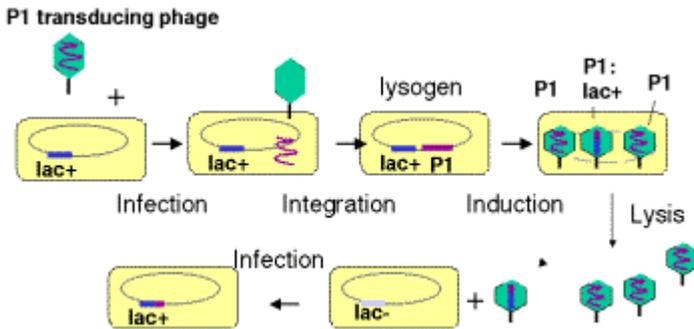
tradisional, dan telah menjadi kebutuhan pokok di banyak laboratorium dalam ilmu kehidupan.

Seperti banyaknya kemajuan dalam genetika molekuler, teknologi DNA rekombinan berakar pada genetika bakteri. Gen pertama yang diisolasi adalah gen bakteri yang dapat diambil oleh bakteriofag. Dengan mengisolasi bakteriofag hibrida ini, DNA untuk gen bakteri dapat diperoleh kembali dalam bentuk yang sangat diperkaya. Inilah prinsip dasar di balik teknologi DNA rekombinan.

Beberapa bakteriofag dapat berintegrasi ke dalam kromosom bakteri dan berada dalam keadaan tidak aktif (Gambar 17). DNA fag yang terintegrasi disebut profag, dan bakteri tersebut menjadi lisogen. Fag yang mampu melakukan hal ini bersifat lisogenik. Induksi lisogen akan mengakibatkan eksisi profag dan memperbanyak sehingga menghasilkan banyak keturunan, yaitu memasuki fase litik dimana bakteri dipecah dan dimusnahkan. Bakteri yang membawa profag tidak menunjukkan tanda-tanda fag yang jelas), namun ketika diinduksi (misalnya melalui stres atau radiasi UV) bakteri tersebut akan menghasilkan keadaan litik, oleh karena itu bakteri tersebut bersifat litik, disebut lisogen. Lisogen yang

diinduksi membuat fag dari profag yang terintegrasi. Fag yang selalu berkembang biak ketika menginfeksi suatu sel disebut litik.

Eksisi profag dari lisogen tidak selalu tepat. Biasanya hanya DNA fag yang dipotong dari kromosom bakteri, tetapi kadang-kadang beberapa DNA inang yang berdekatan disertakan dengan DNA fag yang dipotong dan dienkapsulasi dalam keturunannya. Fag transduksi ini biasanya tidak aktif secara biologis karena potongan kromosom bakteri menggantikan sebagian kromosom fag; dan dapat diperbanyak dengan adanya fag pembantu yang menyediakan gen yang hilang ketika koinfeksi ke bakteri yang sama. Ketika DNA dari fag transduksi dimasukkan ke dalam sel yang baru terinfeksi, gen bakteri dapat bergabung kembali ke dalam kromosom inang, sehingga membawa alel baru atau bahkan gen baru dan mengubah sel yang terinfeksi secara genetik. Proses ini disebut transduksi.



Gambar 19 Proses transduksi fag dengan metode rekombinan. Sumber: www.bx.psu.edu

UWKSPress

Sekuensing DNA

Urutan DNA atau sekuensing DNA adalah proses menentukan urutan asam nukleat – urutan nukleotida dalam DNA mencakup metode atau teknologi apa pun yang digunakan untuk menentukan urutan empat basa: adenin, guanin, sitosin, dan timin. Munculnya metode pengurutan DNA yang cepat telah mempercepat penelitian dan penemuan biologi dan medis. Pengetahuan tentang urutan DNA menjadi sangat diperlukan untuk penelitian biologi dasar, Proyek Genografi DNA dan dalam berbagai bidang terapan seperti diagnosis medis, bioteknologi, biologi forensik, virologi dan sistematika biologi. Dengan membandingkan urutan DNA yang sehat dan bermutasi dapat mendiagnosis berbagai penyakit termasuk berbagai jenis kanker, mengkarakterisasi repertoar antibodi, dan dapat digunakan untuk memandu pengobatan pasien. Dengan adanya cara cepat untuk mengurutkan DNA memungkinkan pemberian perawatan medis yang lebih cepat dan lebih individual, serta lebih banyak organisme yang dapat diidentifikasi (Sharkey et al. 1994).

Kecepatan pengurutan yang cepat yang dicapai dengan teknologi pengurutan DNA modern berperan penting dalam

pengurutan rangkaian DNA lengkap, atau genom, dari berbagai spesies. Urutan DNA pertama diperoleh pada awal tahun 1970-an oleh para peneliti akademik menggunakan metode yang melelahkan berdasarkan kromatografi dua dimensi. Dengan mengikuti perkembangan metode pengurutan berbasis fluoresensi dengan pengurut DNA, pengurutan DNA kini menjadi lebih mudah dan lebih cepat.

Sekuensing DNA dapat digunakan untuk menentukan urutan gen individu, wilayah genetik yang lebih besar (yaitu kelompok gen atau operon), kromosom lengkap, atau keseluruhan genom organisme apa pun. Pengurutan DNA juga merupakan cara paling efisien untuk mengurutkan RNA atau protein secara tidak langsung (melalui kerangka pembacaan terbuka). Faktanya, pengurutan DNA telah menjadi teknologi utama di banyak bidang biologi dan ilmu pengetahuan lain seperti kedokteran, forensik, dan antropologi. Sekuensing juga digunakan dalam biologi molekuler untuk mempelajari genom dan protein yang dikodekannya. Informasi yang diperoleh dengan menggunakan pengurutan memungkinkan peneliti untuk mengidentifikasi perubahan pada gen dan DNA nonkode, hubungan dengan penyakit dan fenotipe, dan mengidentifikasi target obat potensial.

Identifikasi Bakteri menggunakan Sekuensing DNA

Metode pengurutan DNA bakteri, seperti pengurutan komparatif gen 16S ribosomal RNA (rRNA) pada bakteri, telah terbukti menjadi metode yang paling akurat dan dapat direproduksi untuk mengidentifikasi organisme yang tidak diketahui (Gill et al. 2000). Jika kita ingin mengidentifikasi banyak organisme maka identifikasi fenotipik tradisional merupakan masalah karena memerlukan banyak waktu, dan dapat mengakibatkan interpretasi subyektif terhadap hasil identifikasi bakteri. Tidak semua strain dalam spesies bakteri tertentu secara konsisten menunjukkan karakteristik tertentu, sehingga metode identifikasi fenotipik saja tidak cukup. Selain itu, database perpustakaan yang digunakan untuk mendukung identifikasi fenotipik terbatas.

Urutan DNA bakteri dari urutan 16s rRNA dikenal sebagai gold standar untuk identifikasi bakteri. Urutan komparatif gen 16S ribosomal RNA (rRNA) pada bakteri telah terbukti menjadi metode yang paling akurat dan dapat direproduksi untuk mengidentifikasi organisme yang tidak diketahui. Teknologi pengurutan DNA Bakteri pada dasarnya stabil, sehingga memungkinkan data yang dapat direproduksi untuk identifikasi. Metode lain yang cocok untuk identifikasi bakteri adalah

spektrometri massa desorpsi/ionisasi laser berbantuan matriks (MALDI-TOF). Proses pengujian MALDI-TOF menghasilkan sidik jari spektral protein unik dapat dibandingkan dengan database bakteri untuk identifikasi.



Gambar 20 Microflex® MALDI-TOF MS

Nilai skor untuk spektrometri massa (MS) MALDI-TOF menunjukkan keakuratan identifikasi bakteri atau jamur:

> 2.3 : *Highly probable species identification*

> 2 dan < 2.299 : *Secure genus identification, probable species identification*

> 1,7 dan <1,999 : *Probable genus identification*

< 1.7 : *Unreliable identification*

Sistem MALDI-TOF MS membandingkan daftar puncak sampel dengan database spektrum yang diketahui untuk menghasilkan skor kecocokan. Skor tersebut merupakan ukuran akurasi identifikasi yang kuat karena mencerminkan jumlah puncak yang cocok, serta intensitas dan simetrinya. Karena database ini sangat terbatas, menyebabkan hasil MALDI-TOF MS masih kurang akurat. Berbagai metode identifikasi fenotipik juga tersedia untuk identifikasi bakteri, namun tes biokimia dan metabolik ini bersifat subjektif dan tidak memberikan diskriminasi yang cukup untuk memberikan hasil identifikasi yang akurat.

Sekuensing DNA dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dengan metode sidik jari DNA untuk identifikasi bakteri berpusat terutama pada penggunaan reaksi berantai polimerase (PCR). Elemen berulang-PCR, misalnya, menargetkan segmen DNA spesifik yang diulang secara acak dalam genom bakteri. Gen universal yang dapat digunakan adalah 16s rRNA karena urutan 16s rRNA ada di mana-mana pada bakteri dan archaea, urutan ini dapat digunakan untuk

mengidentifikasi keragaman mikroba dalam satu sampel dan alur kerja tunggal.

Kita dapat menggunakan jenis PCR apapun untuk mendapatkan *genomic DNA*. Real-time PCR kini semakin disukai karena menghemat waktu pengerjaan. Real-time PCR biasanya sudah dilengkapi dengan *software* untuk analisis hasil PCR-nya. Contohnya LightCycler®96 system (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany).



Gambar 21 LightCycler®96

Instrumen LightCycler® 96 adalah PCR *real-time* dengan siklus yang cepat dan bisa digunakan hingga 96 sampel dalam satu kali pemakaian. Aplikasinya mencakup *absolute* dan *relative quantification*, *qualitative detection*, *melting curve analysis*, *high resolution melting* dan *endpoint genotyping*. LightCycler® 96 dapat memberikan hasil yang akurat dalam waktu yang singkat. LightCycler® 96 memiliki sistem deteksi optik yang secara fleksibel mendeteksi probe yang bergantung pada urutan, seperti probe hidrolisis dan pewarna yang tidak bergantung pada urutan (contohnya SYBR *Green I*). Kemampuan multipleks dan multiwarna memungkinkan penggunaan hingga empat pewarna fluoresen berbeda. Perangkat Lunak Aplikasi dan Instrumen LightCycler® 96 juga menciptakan alur kerja analisis yang sederhana dengan tambahan fungsi impor dan ekspor data yang mudah, pemberitahuan melalui email setelah setiap kali *running* PCR, dan kita dapat memantau proses amplifikasi secara online dan *real-time*.

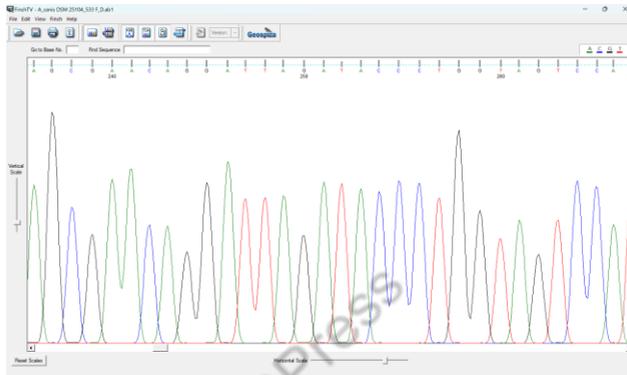
Hasil amplifikasi berupa genomic DNA dapat disekuensing dengan metode Sanger. Sekuensing Sanger adalah metode yang menghasilkan informasi tentang identitas dan urutan keempat basa nukleotida dalam segmen DNA.

Sekuensing umumnya dilakukan oleh pihak ketiga seperti perusahaan 1st BASE yang berlokasi di Singapura atau eurofins yang tersebar di seluruh dunia. Setelah sekuensing selesai, raw data akan dikirimkan ke peneliti untuk dianalisis menggunakan perangkat lunak seperti *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA) atau DNASTAR Lasergene. MEGA sering digunakan oleh peneliti karena perangkat lunak ini dapat diakses secara gratis dan cukup membantu dalam melakukan analisis statistik evolusi molekuler dan untuk membangun pohon filogenetik. Akan tetapi, MEGA memiliki banyak kelemahan antara lain kurang sensitif dan sering *error*. DNASTAR Lasergene memiliki fitur yang sangat lengkap dan cocok untuk penelitian yang spesifik seperti karakterisasi gen. Akan tetapi, produk ini hanya tersedia dalam opsi lisensi sehingga tidak gratis alias kita harus membayar dengan jumlah yang sangat mahal untuk membeli perangkat lunak ini.

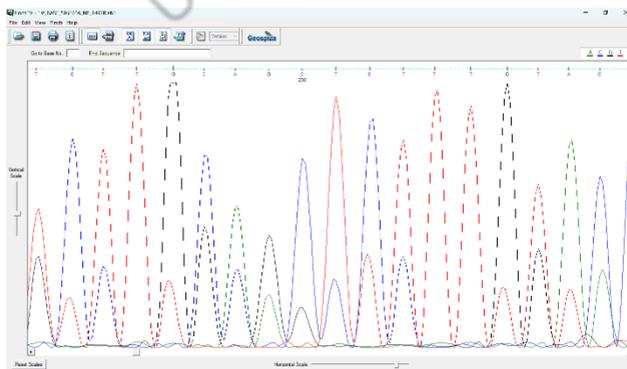
Berikut langkah-langkah analisis data sekuensing menggunakan DNASTAR Lasergene:

1. Raw data (ABI Format) sebaiknya diperiksa terlebih dahulu kualitasnya menggunakan aplikasi Finch TV. Jika raw data menunjukkan *double peak*, hal ini

mengindikasikan bahwa hasil sekuensing gagal dan analisis tidak dapat dilanjutkan. Sedangkan, jika *raw data* menunjukkan *single peak* maka sekuensing dinyatakan berhasil dan analisis dapat dilanjutkan.

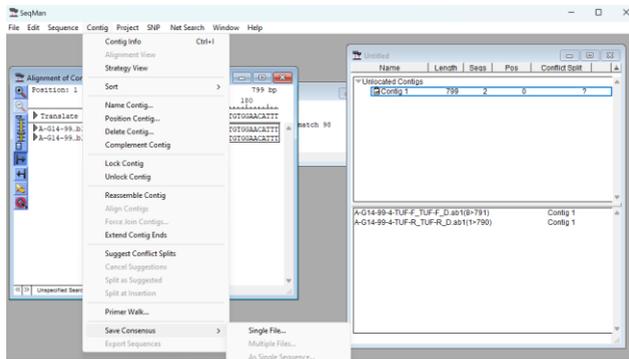


Gambar 22 Hasil sekuensing yang baik dengan adanya *single peak*.



Gambar 23 Hasil sekuensing yang buruk ditunjukkan dengan banyaknya *double peak*.

2. Sekuen *raw data forward* dan *reverse* yang bagus bisa dilakukan *assemble* sekuen. *Assemble* sekuen atau perakitan sekuens DNA adalah proses menyelaraskan dan menggabungkan fragmen sekuens DNA untuk merekonstruksi struktur asli DNA. Proses ini merupakan langkah penting dalam analisis genom. Kita bisa menggunakan fitur SeqMan Pro pada aplikasi DNASTAR Lasergene. Jika proses penggabungan ini berhasil maka *contig* dapat dilakukan. *Contig* adalah sekumpulan segmen DNA yang tumpang tindih yang bersama-sama mewakili wilayah konsensus DNA. Konsensus DNA ini kemudian disimpan dalam *single file* dan proses *assemble* selesai. *Assemble* DNA sangat diperlukan untuk mendapat *single file* sekuen DNA (SEQ file) untuk pembuatan pohon filogenetik dan submit DNA ke Genbank atau Bankit dalam bentuk FASTA file.



Gambar 24 Fitur SeqMan untuk assemble DNA menjadi single file.

3. *Single file* yang sudah jadi bisa diekspor dalam bentuk FASTA file untuk memudahkan dalam pencarian spesies yang diinginkan dalam fitur Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) di NCBI. BLAST akan menemukan wilayah kesamaan antara sekuen biologis. Program ini membandingkan sekuen nukleotida atau protein dengan database sekuen dan menghitung signifikansinya secara statistik. Nilai-nilai yang perlu diperhatikan dalam membaca hasil BLAST antara lain nilai *Query Cover*, *E value*, dan *Persentase Identity*. Nilai *Query Cover* yang baik adalah 100%. Semakin dekat nilai *Query Cover* dan *Percent Identity* ke 100%, semakin besar keyakinan terhadap kecocokan urutan Anda dengan urutan basis data. Sedangkan nilai *E value*

yang baik adalah 0.0 yang artinya sampel memiliki perbandingan spesies yang identik. Semakin dekat nilai- E ke 0, semakin baik penyesuaian. Persentase identity menunjukkan persentase kesamaan antar sekuen yang dimiliki dengan sekuen target. Nilai identitas yang tinggi umumnya berada dalam kisaran 98-100% kesamaan sekuens. Di bawah 98%, perlu dipertimbangkan sebagai *novel species* atau spesies baru. Untuk membuktikan bahwa spesies tersebut adalah spesies baru perlu diuji lebih lanjut dengan menggunakan *whole genome sequencing*.

The screenshot shows a BLAST search interface with the following details:

- Job Title:** Nucleotide Sequence
- RID:** KKS9WE7012
- Program:** BLASTN
- Database:** core_nt
- Query ID:** lclQuery_4058083
- Description:** None
- Molecule type:** dna
- Query Length:** 1348

The **Filter Results** section includes options for Organism, Percent Identity, E value, and Query Coverage.

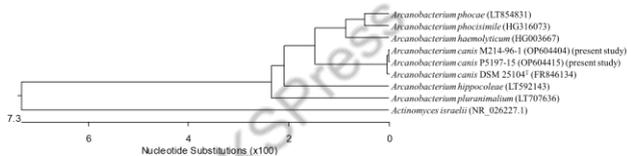
The **Sequences producing significant alignments** table is as follows:

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Acetobacterium obsoletum strain P. s. 8562_168 (ribosomal RNA gene, partial sequence)	Acetobacterium obsoletum	2490	2490	100%	0.0	100.0%	1348	MF621326.1
Acetobacterium obsoletum strain H. s. 8510_168 (ribosomal RNA gene, partial sequence)	Acetobacterium obsoletum	2490	2490	100%	0.0	100.0%	1348	MF621326.1
Acetobacterium obsoletum strain P. s. 20313_168 (ribosomal RNA gene, partial sequence)	Acetobacterium obsoletum	2490	2490	100%	0.0	100.0%	1348	MF621326.1
Acetobacterium obsoletum strain H. s. 21058_168 (ribosomal RNA gene, partial sequence)	Acetobacterium obsoletum	2490	2490	100%	0.0	100.0%	1348	MF621346.1

Gambar 25 Hasil BLAST akan menunjukkan kecocokan data sekuen yang diuji dengan data yang ada di NCBI.

- Setelah kita mengetahui spesies yang diuji, tahap berikutnya adalah membuat pohon filogenetik dengan

dibandingkan dengan referensi strain dari NCBI. Pohon filogenetik adalah diagram yang menunjukkan hubungan evolusi antara spesies berdasarkan kemiripan dan perbedaan karakteristik fisik dan/atau genetik. Pohon filogenetik juga dikenal sebagai filogeni atau pohon evolusi. Dalam pembuatan pohon filogenetik, kita bisa menggunakan fitur MegAlign yang ada pada software DNASTAR Lasergene.



Gambar 26 Pohon filogenetik sekuen gen 16S rRNA *Arcanobacterium canis* and spesies penting lainnya dari Genus *Arcanobacterium* and *Actinomyces* yang ada di NCBI GenBank.

5. Jika isolat yang kita miliki adalah strain baru, kita bisa mendaftarkan isolat tersebut ke Genbank. GenBank adalah basis data publik yang berisi urutan nukleotida dan protein dari berbagai organisme. GenBank merupakan salah satu basis data nukleotida internasional terbesar yang dikelola oleh National Center for Biotechnology Information (NCBI) di Amerika Serikat. Selain Genbank, kita bisa submit ke

domain lain seperti DNA Data Bank of Japan (DDJB). Pertama-tama, kita bisa membuat akun dengan menggunakan akun google kita dan mengisi registrasi beserta alamat laboratorium kita. Jika registrasi telah berhasil, kita bisa teruskan untuk submit data-data spesies yang ingin didaftarkan berupa jenis organisme, data isolasi, sekuen dalam FASTA file yang sudah *assemble*, data *authors*, data publikasi, dan nama *strain* yang ingin didaftarkan.

UWKSPress

GenBank

Send to

Aspergillus fumigatus isolate EBN1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: OM663752.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

```

LOCUS       OM663752                260 bp    DNA     linear   PLN 18-FEB-2022
DEFINITION  Aspergillus fumigatus isolate EBN1 small subunit ribosomal RNA
             gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete
             sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   OM663752
VERSION     OM663752.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Aspergillus fumigatus
            ORGANISM  Aspergillus fumigatus
                    Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;
                    Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;
                    Aspergillus; Aspergillus subgen. Fumigati.
REFERENCE   1 (bases 1 to 260)
AUTHORS     Ningrum,S.G.
TITLE       Development of a cleaning method for nitrite removal in edible bird
            nest contaminated by Aspergillus fumigatus
JOURNAL     Unpublished
REFERENCE   2 (bases 1 to 260)
AUTHORS     Ningrum,S.G.
TITLE       Direct Submission
JOURNAL     Submitted (13-FEB-2022) Veterinary Medicine, Universitas Wijaya
            Kusuma Surabaya, Jl. Dukuh Kupang XXV No. 54, Dukuh Kupang, KOTA
            SURABAYA, JAWA TIMUR 60225, Indonesia
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..260
                       /organism="Aspergillus fumigatus"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /isolate="EBN1"
                       /db_xref="taxon:746128"
     misc_RNA          1..260
                       /note="contains small subunit ribosomal RNA, internal
                       transcribed spacer 1, and 5.8S ribosomal RNA"
ORIGIN          1  aagtgtaac  aaagtctccg  taggtgaacc  tgcggaagga  tcattaccga  gtgaggcccc
                61  tctgggtcca  acctcccacc  cgtgtctatc  gtacctgttt  gcttcggcgg  gcccgcggtt
                121  tcgacggccg  ccgggagggc  cttgcgcccc  cggcccgcg  cccgcgag  accccaacat
                181  gaacgctgtt  ctgaagtat  gcagctggag  ttgattatcg  taatcagtta  aaactttca
                241  caacgatct  cttggttccg
//

```

Gambar 27 Nukleotida yang berhasil disubmit ke Genbank.

Masa Depan Genetika Molekuler dalam Kedokteran Hewan

Penerapan genetika molekuler dalam Kedokteran Hewan semakin meningkat sesuai perkembangan zaman. Kini, penggunaan *Next-Generation Sequencing* (NGS) sudah masif di dunia Kedokteran Hewan. NGS merupakan teknologi revolusioner dalam bidang genetika molekuler yang memungkinkan kita dapat menganalisis DNA dan RNA dalam skala besar, akurasi tinggi, dan waktu yang lebih cepat dibandingkan metode sekuensing Sanger. Dalam konteks kedokteran hewan, teknologi ini memberikan kontribusi besar pada identifikasi penyakit baru, pemetaan genetik, dan pengelolaan populasi hewan ternak, satwa akuatik serta satwa liar. Karena kemampuannya yang sangat luas, NGS telah menjadi alat yang sangat efektif dalam mendeteksi patogen yang belum teridentifikasi atau penyakit baru yang muncul. Dengan analisis metagenomik, NGS dapat mengidentifikasi patogen dalam spesimen kompleks tanpa perlu isolasi kultur, seperti dalam kasus virus Nipah, Hendra, atau strain bakteri baru. Selain itu, NGS membantu mengidentifikasi mutasi genetik pada patogen yang menyebabkan resistensi terhadap obat antimikroba. Dalam situasi wabah, NGS dapat memetakan

genom patogen secara cepat untuk melacak sumber dan penyebaran penyakit.

NGS berperan penting dalam memahami genom hewan ternak untuk meningkatkan kualitas dan kesehatan hewan. Dengan NGS, marker genetik untuk sifat unggul seperti produktivitas susu, daging, atau ketahanan terhadap penyakit dapat diidentifikasi dan dimanfaatkan dalam program pemuliaan. Pemetaan genetik juga membantu memahami bagaimana gen tertentu mempengaruhi adaptasi hewan terhadap lingkungan yang keras, seperti toleransi panas pada sapi Kalteng di daerah tropis seperti Kalimantan Tengah.

Untuk satwa liar, NGS membantu dalam konservasi genetik. Analisis genom individu membantu mengidentifikasi tingkat keragaman genetik dalam populasi yang kecil dan berisiko punah. DNA barcoding berbasis NGS juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies, bahkan dari spesimen yang rusak atau fosil. NGS memungkinkan penelusuran sejarah evolusi spesies untuk memahami adaptasi genetik terhadap perubahan lingkungan. Dalam hubungan genetik antar individu dalam populasi, baik pada hewan ternak maupun satwa liar. NGS dapat dimanfaatkan untuk memastikan keberlanjutan program pemuliaan tanpa inbreeding dan

Memahami dinamika genetik patogen yang dapat berpindah dari satwa liar ke populasi domestik atau manusia.

Meskipun sangat menjanjikan, infrastruktur dan analisis data NGS memerlukan investasi awal yang besar. Selain itu, analisis data NGS memerlukan keterampilan bioinformatika yang mendalam. Penggunaan data genetik dari hewan ternak dan satwa liar juga harus memperhatikan aspek privasi data dan hak intelektual. Sebagai peneliti, kita harus fokus pada terapi genetik hewan yang lebih terjangkau dan efektif. Oleh sebab itu, kemampuan analisis data harus ditingkatkan. Melalui genetika molekuler, kedokteran hewan telah melampaui batas tradisional, memberikan dampak signifikan pada kesehatan hewan, manusia, dan lingkungan. Teknologi ini terus menjadi landasan inovasi untuk menciptakan dunia yang lebih sehat dan berkelanjutan. Genetika molekuler memiliki potensi luar biasa untuk menciptakan perubahan positif di masa depan, tidak hanya dalam meningkatkan kesehatan hewan tetapi juga dalam memperkuat hubungan antara manusia, hewan, dan lingkungan melalui pendekatan holistik *One Health*. Dengan kata lain, genetika molekuler memegang kunci untuk masa depan yang lebih sehat dan berkelanjutan. Dengan pendekatan berbasis ilmu pengetahuan, kita dapat menciptakan solusi yang

tidak hanya memperbaiki kesehatan hewan tetapi juga membangun hubungan harmonis antara manusia, hewan, dan lingkungan. Harapan ini mengarahkan kita pada dunia yang lebih baik, di mana kemajuan teknologi berjalan seiring dengan kesejahteraan bersama semua makhluk hidup.

UWKSPress

DAFTAR PUSTAKA

1. Aslanzadeh J. [Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory](#). *Ann Clin Lab Sci*. 2004;34(4):389-396.
2. Chakrabarti R, Schutt CE. [The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides](#). *Nucleic Acids Res*. 2001;29(11):2377-2381.
3. Cline J, et al. [PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases](#). *Nucleic Acids Res*. 1996;24(18):3546-3551.
4. Garibyan L, Avashia N. [Polymerase chain reaction](#). *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):1-4.
5. Gill P, et al. [An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA](#). *Forensic Sci Int*. 2000;112(1):17-40.
6. Indrawati, A., Safika, S., Ningrum, S., Aulia, K., Maheshwari, H., & Andriyono, S. (2023). Fecal and gastric fluid microbiome profiles in the indopacific bottlenose dolphins (*Tursiops aduncus*). *Journal of Veterinary Sciences*, 37(1).

7. Ishino S, Ishino Y. [DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - the history of developmental research in the field.](#) *Front Microbiol.* 2014;5:465.
8. Kee PS, et al. [Long-range polymerase chain reaction.](#) *Methods Mol Biol.* 2023;2967:181-192.
9. Keeney S. [Long-PCR amplification of human genomic DNA.](#) *Methods Mol Biol.* 2011;688:67-74.
10. Kreitlow, A., Ningrum, S. G., Lämmler, C., Erhard, M., Hoffmann, C., Plötz, M., & Abdulmawjood, A. (2023). Identification of the novel potential pathogen *Trueperella pecoris* with interspecies significance by LAMP diagnostics. *Scientific reports*, *13*(1), 14005.
11. Kubista M, et al. [The real-time polymerase chain reaction.](#) *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.
12. Lorenz TC. [Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies.](#) *J Vis Exp.* 2012;(63):e3998.
13. Markoulatos P, et al. [Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach.](#) *J Clin Lab Anal.* 2002;16(1):47-51.
14. Ningrum, S. G., Khaerunnisa, I., Supriyono, & Wibawan, I. W. T. (2022). Molecular detection and phylogenetic

analysis of a Shiga toxin-producing strain *Escherichia coli* (partial *rfbE* and *fliCh7* gene), serotype O157: H7 isolated from a living chicken of a traditional market in Indonesia. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 25, No 3, 500-506. DOI: 10.15547/bjvm.2020-0070.

15. Ningrum, S. G., Kreitlow, A., Lämmmler, C., Prenger-Berninghoff, E., Ewers, C., Foster, G., ... & Abdulmawjood, A. (2023). Identification and Characterization of *Arcanobacterium canis* from Companion Animals in Germany and The United Kingdom. *Progress in Microbes and Molecular Biology*, 6(1), a0000391.
16. Ningrum, S. G., Timke, M., Prenger-Berninghoff, E., Lammler, C., Hassan, A. A., Wickhorst, J. P., ... & Abdulmawjood, A. (2017). Phenotypic and genotypic analysis of an *Arcanobacterium pluranimalium* isolated from a muskox (*Ovibos moschatus*). *Veterinaria*, 66(1), 28-35.
17. Ningrum, S., Arnafia, W., Adji, R., Latif, H., Soejoedono, R., & Wibawan, I. Development of Crystal Violet Coagglutination for Detection of *Escherichia coli* O157: H7 In Ground Beef. *Asian Journal of Microbiology*

Biotechnology and Environmental Sciences. Vol. 19,
No. (2) : 2017 : 11-17.

18. Potapov V, Ong JL. [Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing](#). *PLoS One*. 2017;12(1):e0169774.
19. Ricardo PC, et al. [Fidelity of DNA polymerases in the detection of intraindividual variation of mitochondrial DNA](#). *Mitochondrial DNA B Resour*. 2019;5(1):108-112.
20. Sharkey D, et al. [Antibodies as thermolabile switches: High temperature triggering for the polymerase chain reaction](#). *Biotechnology (N Y)*. 1994;12(5):506-509.
21. Wang Y, et al. [A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro](#). *Nucleic Acids Res*. 2004;32(3):1197-1207.
22. Wu J, et al. [DNA binding strength increases the processivity and activity of a Y-Family DNA polymerase](#). *Sci Rep*. 2017;7(1):4756.