

LIFE SCIENCE GAZETTE



GENE EXPRESSIONS

How RNA Shapes Us

2025



LIFE SCIENCE GAZETTE

Gene Expressions

How RNA Shapes Us

2025

PT. Genetika Science Indonesia

Rukan Great Wall Blok C No. 19-21
Green Lake City, Kel. Petir, Kec. Cipondoh,
Kota Tangerang, Banten 15147, Indonesia.

+62 21 5433 2034

+62 21 5433 2425

+62 21 5433 2701

www.ptgenetika.com

www.instagram.com/genetikascience

www.linkedin.com/company/genetikascience/

www.facebook.com/GenetikaScience/

Editor

Jenney Chen

Writers

Marvel Lewi Santoso, Nisrina Thufailah Hakim,
Yonadita Pramesti & Nurina Indirayati

Graphic Designer & Layouter

Owen Distyan Pusponegoro

Editor Message

Salam sejahtera.

Genetika Science *Life Science Magazine Catalogue* hadir kembali di tahun kedua sejak edisi pertama yaitu tahun 2024.

Edisi kedua tahun 2025 mengambil tema RNA (*Ribonucleic Acid*).

RNA adalah perantara molekuler yang membawa informasi genetik dari DNA ke ribosom, tempat protein disintesis.

Secara alamiah, RNA bersifat dinamis. RNA terus menerus dibuat, dimodifikasi, dan didegradasi di dalam sel. Molekul RNA spesifik yang ada dalam sel pada waktu tertentu bergantung pada aktivitas sel, lingkungannya, dan tahap perkembangannya.

Sifat alami inilah yang membuat RNA sangat unik dan berharga untuk selalu dipelajari oleh para peneliti yang menyukai pengamatan perubahan.

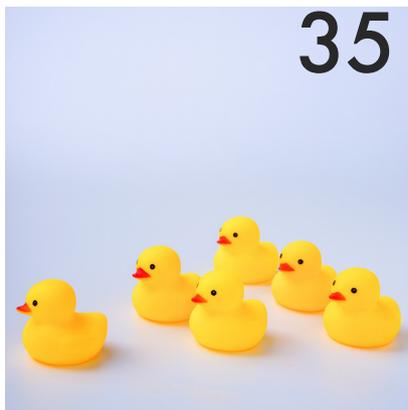
Kami berharap tema RNA yang disajikan di edisi kedua ini, dapat memberikan inspirasi bagi para pembaca bagaimana molekul yang ringkih dan kecil namun sangat adaptif, ternyata memiliki peran signifikan bagi kehidupan.

Selamat membaca.

Jenney Chen

TABLE OF CONTENT

- 03 Degradasi RNA dan Preservasi Sample RNA
- 05 Kenapa RNA-mu Perlu untuk dilakukan QC?
- 11 Memilih Metode Purifikasi RNA dengan Cermat
- 19 mRNA Sequencing dan Tahapan mRNA Sequencing
- 21 Aplikasi mRNA Sequencing
- 23 Kedalaman & Replikasi Sekuensing RNA



- 25 Menjelajahi Potensi RNA-Seq dalam Riset di Indonesia
- 29 Evolusi Modern dari PCR Konvensional ke *Real-Time* PCR
- 32 Dua Metode Pengerjaan qPCR
- 33 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pemilihan Metode
- 35 Replikasi Biologi vs Teknik
- 37 Validasi Hasil RNA-Seq dengan qPCR

HOW RNA

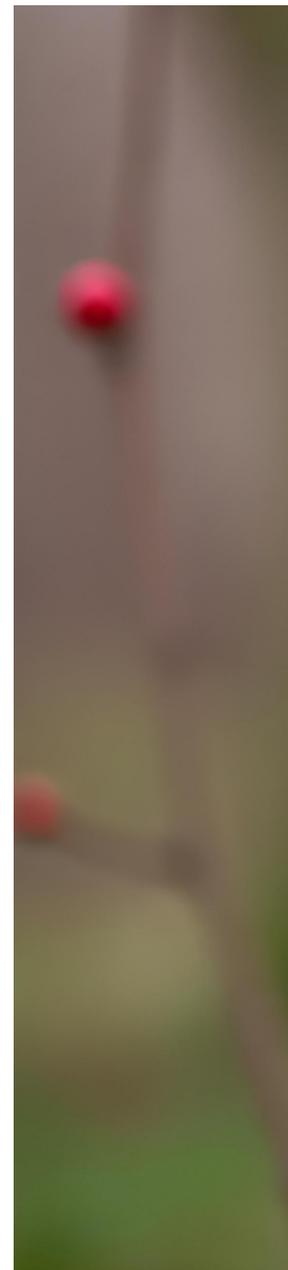
RNA adalah molekul penting dalam sel yang memiliki banyak peran, diantaranya adalah dalam ekspresi dan regulasi gen. Ekspresi gen adalah proses di mana informasi yang terkandung dalam gen diterjemahkan menjadi produk fungsional yang diperlukan untuk berbagai fungsi seluler. Ekspresi gen berperan untuk mengatur aktivitas sel dan memungkinkan sel untuk beradaptasi dengan perubahan kondisi.

Salah satu contoh peran ekspresi gen adalah dalam proses diferensiasi jaringan dan organ. Setiap tahap perkembangan melibatkan regulasi ekspresi gen yang tepat untuk memastikan pembentukan jaringan dan organ yang tepat. Ekspresi gen juga memainkan peran kunci dalam adaptasi terhadap lingkungan. Contohnya adalah tanaman yang akan merubah ekspresi gen mereka untuk merespons stres abiotik maupun biotik, seperti kekeringan atau infeksi patogen, untuk meningkatkan daya tahan hidup mereka.

Salah satu tujuan dari studi ekspresi gen adalah untuk memahami bagaimana gen berfungsi dalam berbagai kondisi. Studi ekspresi gen dapat memberikan informasi mengenai profil/pola ekspresi gen, waktu dan tempat ekspresi, serta regulasi yang mempengaruhi ekspresi tersebut. Pemahaman ini penting untuk mengungkap mekanisme molekuler yang mengatur berbagai proses biologis dalam tubuh.

Aplikasi dari studi ekspresi gen sangat luas. Dalam bidang medis, informasi yang diperoleh dari penelitian ini dapat digunakan untuk mengembangkan obat-obatan yang lebih efektif, terapi gen, atau pengembangan vaksin. Selain itu, dalam bidang agrikultur, studi ekspresi gen juga dapat membantu dalam pengembangan tanaman yang memiliki sifat yang unggul, seperti ketahanan terhadap hama. Dengan demikian, studi ekspresi gen tidak hanya penting dalam memahami dasar-dasar mekanisme molekuler dari proses biologis, tetapi juga dapat menjadi solusi untuk menjawab permasalahan yang ada di masyarakat.

Pada edisi kali ini, kami akan mengupas berbagai aspek mengenai RNA, mulai dari proses ekstraksi RNA sebagai langkah awal dalam berbagai analisis molekuler, hingga teknik canggih seperti qPCR dan RNA-Seq, yang memungkinkan kita untuk menggali informasi mendalam mengenai regulasi ekspresi gen dalam sel.



SHAPES US



Degradasi RNA pada Sampel

Menjaga kualitas RNA pada sampel merupakan salah satu tantangan dalam penelitian molekuler

Tantangan terbesar bekerja dengan RNA adalah mudahnya RNA terdegradasi. Secara kimiawi, RNA tersusun dari gula ribosa yang lebih rentan terhidrolisis dibandingkan gula deoksiribosa pada DNA. Selain itu, RNA hanya memiliki satu untai tidak seperti DNA yang beruntai ganda. Hal ini juga yang menyebabkan RNA menjadi lebih rapuh dan rentan terhadap kerusakan. Ketika bekerja dengan RNA di laboratorium, menciptakan area kerja yang bebas RNase menjadi tantangan tersendiri. Enzim yang mendegradasi RNA, Ribonuklease (RNase) sangat tangguh dan dapat ditemukan dimana-mana; menghilangkan RNase dapat dikatakan hampir mustahil [1]. RNase mudah ditemukan pada kulit dan keringat manusia. Bekerja tanpa menggunakan sarung tangan dapat dengan mudah menyebarkan RNase pada area kerja dan peralatan lab yang digunakan. Partikel debu yang beterbangan di udara sering kali mengandung bakteri atau jamur; RNase dari mikroorganisme ini dapat menetap di manapun partikel debu ini hinggap. Bahkan, kontaminasi RNase juga dapat muncul dari sampel karena jaringan dan sel sendiri mengandung RNase [1]. Untuk menghindari kontaminasi

RNase, pastikan untuk selalu menjaga area kerja dan peralatan lab bebas dari RNase. Gunakan sarung tangan sekali pakai yang steril dan ganti sarung tangan secara berkala saat berpindah dari menangani sampel mentah ke asam nukleat murni. Ganti air bebas nuklease biasa dengan DEPC-treated water. Biasakan bekerja secara aseptis dan selalu gunakan reagen, mikropipet, dan peralatan plastik yang steril dan bebas RNase. Larutan dekontaminator komersil dapat digunakan untuk mendekontaminasi area kerja, mikropipet, serta wadah plastik dan kaca [1]. (NT)

RNase sangat tangguh dan dapat ditemukan dimana-mana; menghilangkan RNase dapat dikatakan hampir mustahil

Metode Preservasi Sampel RNA



Cryopreservation dilakukan dengan menyimpan sampel pada suhu sangat rendah, umumnya di dalam nitrogen cair atau di suhu -80°C .



Snap freezing adalah membekukan sampel secara instan dan cepat umumnya dengan cara mencelupkan sampel pada nitrogen cair atau es kering.



Fiksasi menggunakan bahan formaldehida atau paraformaldehida. Kedua senyawa kimia ini mampu mengikat silang RNA dengan protein, sehingga menstabilkan sampel.



Buffer Preservasi mampu menstabilkan RNA dalam sampel biologis dengan mencegah degradasi RNA melalui penghambatan RNase di suhu ruang untuk jangka waktu lama.

Mencegah degradasi RNA diazali dari memilih metode preservasi sampel yang tepat

Referensi:

[1] P. Dabrowski, M. Rasmus, A. Jundzill, T. Drewa, and M. Pokrywczynska, "A comparison of five methods to maximize RNA and DNA isolation yield from adipose tissue," PeerJ, vol. 12, p. e17071, 2024, doi: 10.7717/peerj.17071.



Kenapa RNA-mu Perlu Dilakukan QC?



BERIKUT ALASAN UTAMANYA:

Mencegah Kesalahan Eksperimen

RNA berkualitas buruk atau terkontaminasi dapat menghasilkan data yang tidak akurat atau bias. Misalnya, dalam RNAseq atau qPCR, RNA yang rusak dapat menyebabkan gen tertentu terlihat lebih banyak atau lebih sedikit dari yang sebenarnya.

Mendeteksi Kontaminasi

RNA sering kali terkontaminasi oleh DNA genom atau senyawa lain (seperti protein atau fenol). Kontaminasi ini dapat mengganggu reaksi hilir, seperti sintesis cDNA serta memengaruhi hasil analisis. Dengan melakukan QC, keberadaan kontaminasi bisa dideteksi dan diatasi lebih awal. Ada tidaknya kontaminasi protein pada larutan RNA dapat ditentukan dengan mengukur absorbansi pada 260 dan 280 nm. Rasio A260/280 untuk RNA dengan kemurnian tinggi harus sekitar 2,0. Adapun pengukuran pada rasio A260/230 dapat digunakan untuk mengetahui kontaminasi oleh zat yang menyerap pada 230 nm, misalnya fenol atau guanidine. Nilai yang ideal untuk rasio A260/230 yaitu antara 2,0 dan 2,2 dianggap murni untuk RNA dan DNA [1]. Visualisasi hasil ekstraksi menggunakan gel elektroforesis atau instrumen mikrofluidik seperti *Bioanalyzer* (Agilent) dapat membantu mendeteksi keberadaan kontaminasi DNA genom. DNA genom perlu dihilangkan untuk memastikan bahwa gen yang terkuantifikasi hanya berdasarkan gen yang benar-benar telah terekspresi. Perlakuan dengan DNase I, baik saat maupun setelah proses ekstraksi RNA, dapat digunakan untuk menghilangkan kontaminasi DNA genom tersebut [2].

RNA YANG BERKUALITAS TINGGI DICIRIKAN OLEH TINGKAT KEMURNIAN YANG BAIK DAN MINIM DEGRADASI

Memastikan Integritas RNA

Sebagian besar aplikasi berbasis RNA, seperti qPCR atau RNA-seq, membutuhkan sintesis cDNA. RNA yang rusak dapat menghasilkan cDNA yang tidak lengkap, sehingga target gen mungkin tidak terdeteksi dengan baik. QC membantu memastikan RNA tidak terfragmentasi sehingga hasil eksperimen dapat lebih dipercaya. Pada gel elektroforesis, RNA yang utuh akan memiliki pita rRNA 28S dan 18S yang tajam dan jernih (sampel eukariotik). Pita rRNA 28S umumnya sekitar dua kali lebih tebal dari pita rRNA 18S. Sementara elektroforesis mikrofluidik memberikan gambaran integritas RNA yang utuh melalui skor RIN (*RNA Integrity Number*), kromatogram yang menunjukkan integritas peak 28S dan 18S rRNA, dan tidak adanya *smear*.

Efisiensi Waktu dan Biaya

Menggunakan RNA berkualitas rendah meningkatkan risiko kegagalan eksperimen, yang berarti waktu, tenaga, dan biaya terbuang percuma. QC membantu memastikan eksperimen berjalan lancar sejak awal (NT).

Referensi:

[1] P. Dabrowski, M. Rasmus, A. Jundzill, T. Drewa, and M. Pokrywczynska, "A comparison of five methods to maximize RNA and DNA isolation yield from adipose tissue," *PeerJ*, vol. 12, p. e17071, 2024, doi: 10.7717/peerj.17071.

[2] Z. Huang, M. J. Fasco, and L. S. Kaminsky, "Optimization of DNase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR," *England, Jun. 1996*. doi: 10.2144/96206st02.

Catalog Product

Solusi Preservasi & QC RNA

Genetika Science menyediakan rangkaian produk berkualitas tinggi untuk memastikan integritas RNA Anda. Mulai dari solusi preservasi sampel yang melindungi RNA dari degradasi hingga reagen dan bahan pendukung untuk analisis QC RNA yang presisi.

Dengan produk-produk pilihan seperti RNase *decontaminator*, air bebas RNase (DEPC-treated), buffer elektroforesis, pewarna DNA, serta RNA *ladder* berkualitas tinggi, kami hadir untuk mendukung setiap langkah penelitian Anda. Pastikan hasil maksimal dengan kontaminasi minimal hanya dengan solusi dari Genetika Science!

Hasil Maksimal, Kontaminasi Minimal!



RNase Decontaminator

Produk ini mengandung formulasi optimal yang dapat melindungi sampel RNA yang berharga dari kontaminasi RNase.

Informasi Produk:

RND015 - Ukuran 15ml

RND250 - Ukuran 250ml



IDT
INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

11-05-01-01

Nuclease Decontamination

Pipette tips filter dengan ukuran 0.2-10 μ L. Dengan filter, tips ini mencegah kontaminasi silang dan degradasi RNA karena RNase.



1st BASE
www.1stbase.com

BUF-1170

DEPC Treated Water

DEPC-treated Water adalah air deionisasi yang telah diperlakukan dengan DEPC. Produk ini ideal untuk aplikasi yang melibatkan RNA.



Thermo
SCIENTIFIC
Authorized Distributor

R0601

DEPC Treated water

DEPC-treated Water adalah air deionisasi yang telah diperlakukan dengan DEPC. Produk ini ideal untuk aplikasi yang melibatkan RNA.

QC RNA Tanpa Kompromi

Solusi QC Terbaik



Agarose

Media berkualitas tinggi untuk pemisahan DNA, RNA, dan protein dengan elektroforesis. Memiliki kemurnian tinggi.

Informasi Produk:

- BIO-1000-100g** - Ukuran 100g
- BIO-1000-500g** - Ukuran 500g
- BIO-1000-1kg** - Ukuran 1kg



10X Tris-Borate-EDTA (TBE) Buffer, pH 8.3, Ultra Pure Grade

Buffer berkualitas tinggi yang digunakan dalam elektroforesis dan poliakrilamida untuk analisis DNA dan RNA. Dengan pH 8.3 dan tingkat kemurnian yang tinggi.

Informasi Produk:

- BUF-3010-10X1L** - Ukuran 1L
- BUF-3010-10X4L** - Ukuran 4L



10X Tris-Acetate-EDTA (TAE) Buffer, pH 8.0, Ultra Pure Grade

Buffer berkualitas tinggi yang digunakan dalam elektroforesis dan poliakrilamida untuk analisis DNA dan RNA. Dengan pH 8.0 dan tingkat kemurnian yang tinggi.

Informasi Produk:

- BUF-3000-10X1L** - Ukuran 1L
- BUF-3000-10X4L** - Ukuran 4L



BIO-5170-1ml

FloroSafe DNA Stain

Pewarna DNA non-karsinogenik yang aman digunakan sebagai pengganti EtBr (Etidium Bromida). Dengan sensitivitas tinggi.



R0641

RNA Gel Loading Dye (2X)

Produk ini merupakan RNA loading Dye yang direkomendasikan untuk elektroforesis pada agarose gel atau poliakrilamida.



SM1821

RiboRuler High Range RNA Ladder

Produk ini dirancang untuk menghasilkan pita yang tajam dengan intensitas seragam, memudahkan penentuan ukuran dan kuantifikasi RNA.



R1090

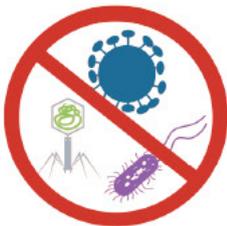
ZR small-RNA Ladder

ZR small-RNA Ladder adalah Ladder untuk mikroRNA yang terdiri dari empat oligonukleotida RNA dengan panjang 17, 21, 25, dan 29 basa.

Accommodates Any Sample



Pathogen Inactivation



Inactivates viruses, bacteria, yeast & protists

DNA/RNA Shield™



Break the Cold Chain Not the bank!

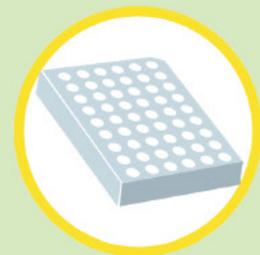


Transport at ambient temperatures

Streamlined Purification of DNA & RNA



No reagent removal
Compatible with all purification kits (including Quick-RNA™, Quick-DNA™, etc.)
Fully automatable



Ready for all downstream applications

NGS

ARRAYS

(RT)PCR



DNA/RNA Shield™

DNA/RNA Shield™ adalah solusi preservasi sampel yang melindungi DNA dan RNA dari degradasi tanpa perlu penyimpanan beku. Dengan kemampuan menonaktifkan patogen secara instan, produk ini ideal untuk transportasi dan penyimpanan sampel biologis seperti swab, saliva, darah, serta jaringan. Cocok untuk aplikasi penelitian genomik, diagnostik molekuler, dan biobank.

Informasi Produk:

- R1100-50 - 50ml
- R1100-250 - 250ml
- R1200-25 - 25ml (2X Concentrate)
- R1200-125 - 125ml (2X Concentrate)

DNA/RNA Shield™ Collection Devices



Worry free solution for sample collection, virus inactivation, and room temp storage of RNA for over a month!

DNA/RNA Shield™ Collection Devices

DESKRIPSI	UKURAN	CAT NO.
DNA/RNA Shield™ Fecal Collection Tube	10 Pack	R1101
DNA/RNA Shield™ SafeCollect™ Swab Collection	1 Kit	R1161
DNA/RNA Shield™ Collection Tube w/ Swab	50 Pack	R1106
DNA/RNA Shield™ SafeCollect™ Saliva Collection	1 Kit	R1211
DNA/RNA Shield™ Blood Collection Tube	50 Pack	R1150

SCAN QR



UNTUK INFORMASI LEBIH LANJUT

Memilih Metode Ekstraksi RNA dengan Cermat

Metode mana yang sebaiknya Anda percaya untuk penelitian Anda?

Metode Pelarut Organik

Metode organik adalah pendekatan klasik yang memanfaatkan senyawa kimia yang kuat seperti fenol dan kloroform. Metode organik telah menjadi metode andalan selama beberapa dekade, terkenal karena kemampuannya mengekstraksi RNA dalam jumlah (*yield*) besar, termasuk di dalamnya small RNA yang sulit diperoleh. Dengan metode ini memastikan, RNA dapat terpisah menjadi satu fasa tersendiri (fase *aqueous*) dan terpisah dari kontaminan DNA

dan protein. Sayangnya, metode organik melibatkan penggunaan pelarut yang tidak hanya berbahaya, tetapi juga tidak sepenuhnya ramah lingkungan dan aman bagi penggunaannya. Metode ini juga memakan waktu, memerlukan teknik *pipetting* yang cermat untuk menghindari kesalahan, serta membutuhkan mesin sentrifugasi berpendingin.



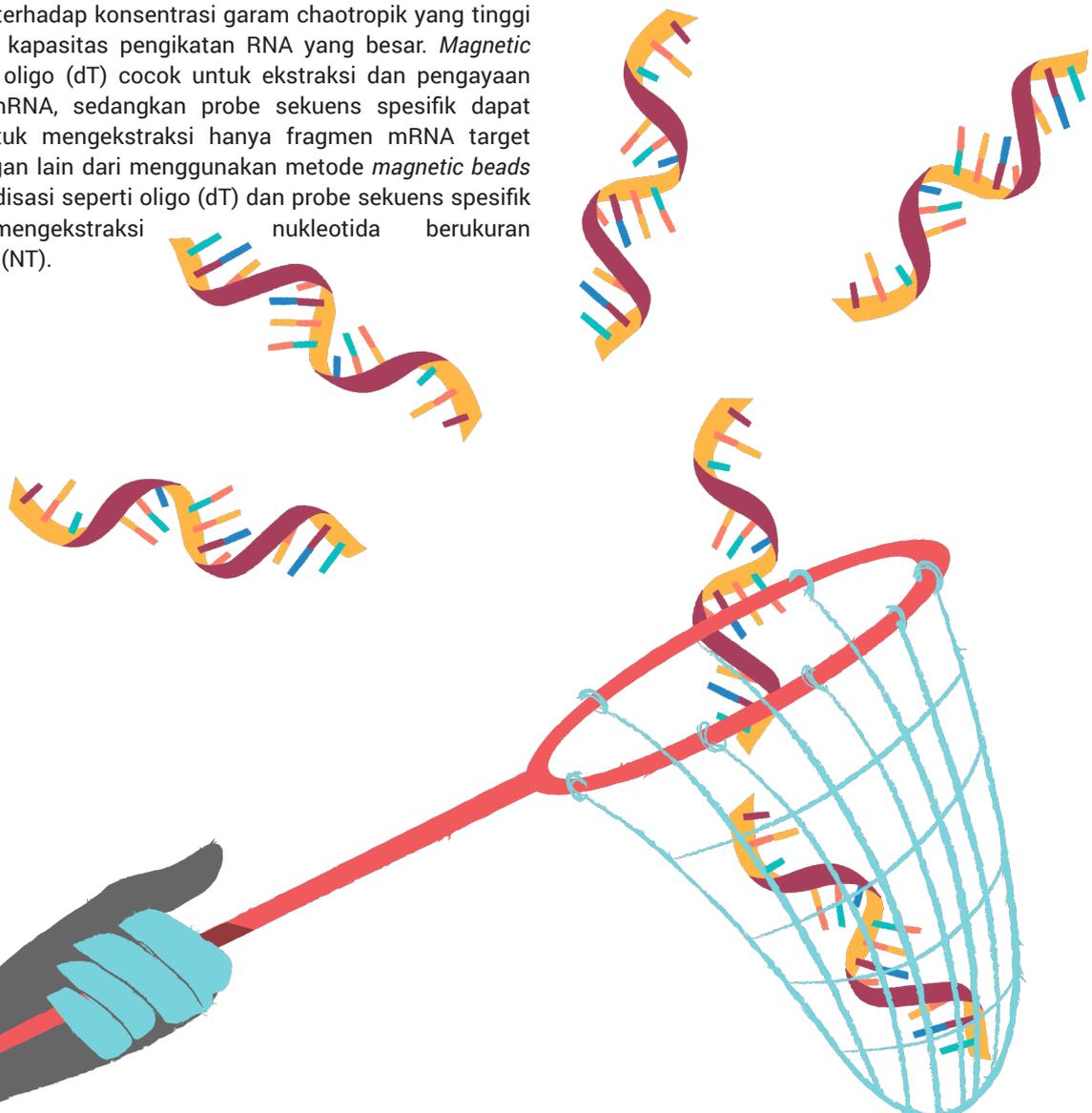
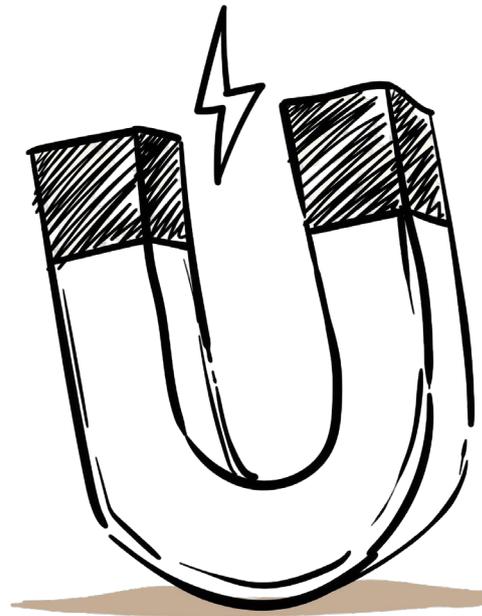
Metode *Spin-Column*

Setelah metode organik, metode *spin-column* mencetuskan revolusi dalam metode ekstraksi RNA. Metode ini banyak digunakan karena mudah, simpel, dan cepat. Prinsip metode *spin-column* terletak pada membran silika, di mana matriks silika pada membran mampu mengikat RNA dalam kondisi kadar garam tinggi dan pH rendah. Prinsip pengikatan ini memungkinkan RNA dipisahkan dari komponen seluler lainnya, seperti protein dan

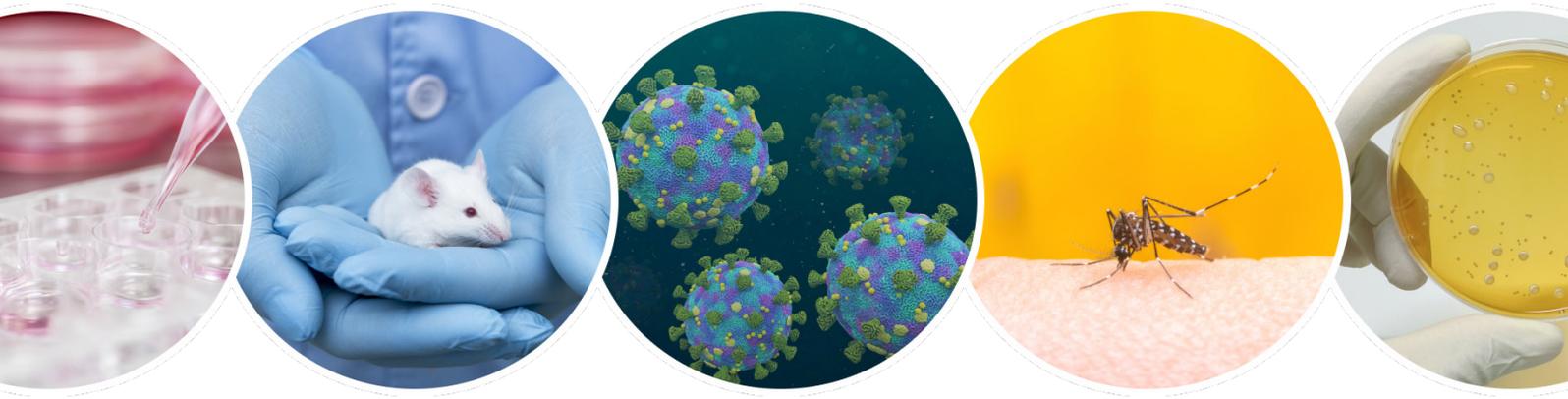
DNA, hanya dalam satu langkah. Setelah terikat pada membran, RNA akan dicuci dari pengotornya. Selanjutnya, RNA murni akan dielusi menggunakan *low-salt buffer* atau air bebas nuklease. Tidak hanya simpel dan cepat, metode *spin-column* juga menawarkan alur kerja yang *toxic-free* (tanpa fenol, tanpa kloroform) serta dapat dilakukan di suhu ruang tanpa membutuhkan mesin sentrifugasi berpendingin.

Metode *Magnetic Beads*

Magnetic beads adalah "Tesla"-nya ekstraksi RNA—serbaguna, otomatis, dan super cepat. Manik-manik kecil ini menggunakan buffer khusus untuk mengikat RNA, yang kemudian dipisahkan menggunakan magnet. Metode ini cocok untuk laboratorium berskala besar, yang menggunakan mesin otomatisasi ekstraksi asam nukleat untuk menangani puluhan hingga ratusan sampel sekaligus.≈ Dalam ekstraksi RNA menggunakan metode *magnetic beads*, terdapat beberapa material yang umum dipilih untuk melapisi permukaan *magnetic beads* perlu dipertimbangkan dengan cermat berdasarkan target RNA, jenis sampel, serta metode deteksi hilir yang akan digunakan. Tiga material pelapis *magnetic beads* umum yang banyak digunakan untuk mengekstraksi RNA : silika, oligo (dT), dan probe sekuens spesifik. *Magnetic beads* dengan lapisan silika adalah metode yang paling banyak ditemukan. Silika dapat mengikat asam nukleat secara non selektif, cocok untuk ekstraksi total RNA secara cepat, toleran terhadap konsentrasi garam chaotropik yang tinggi serta memiliki kapasitas pengikatan RNA yang besar. *Magnetic beads* dengan oligo (dT) cocok untuk ekstraksi dan pengayaan (*enrichment*) mRNA, sedangkan probe sekuens spesifik dapat digunakan untuk mengekstraksi hanya fragmen mRNA target saja. Keuntungan lain dari menggunakan metode *magnetic beads* berbasis hibridisasi seperti oligo (dT) dan probe sekuens spesifik adalah dapat mengekstraksi nukleotida berukuran kecil $\leq \sim 60$ bp (NT).



RNA EXTRACTION KITS RNA CLEAN & CONCENTRATOR



**THE BEAUTY
OF SCIENCE
IS TO MAKE
THINGS SIMPLE**

Ekstraksi kit & RNA *clean-up* dari Zymo Research dirancang dengan teknologi canggih untuk menghasilkan **RNA murni berkualitas tinggi yang bebas dari kontaminan dan inhibitor.**

RNA murni yang dihasilkan sangat cocok untuk aplikasi seperti **Next-Gen Sequencing** dan **RT-PCR**. Solusi yang dapat diandalkan untuk penelitian Anda.



R2014

Quick-RNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit

Kit ekstraksi RNA yang dirancang untuk isolasi RNA dengan mudah dan cepat dari jamur yang sulit untuk dilisis serta bakteri Gram (+/-), alga, dan protozoa.



R2072 / R2073

Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit

Kit ekstraksi RNA yang dirancang dengan metode yang efisien untuk isoalsi RNA berkualitas tinggi langsung dari sampel.



R1057 / R1058

Quick-RNA™ Miniprep Plus Kit

Salah satu kit isolasi RNA paling inovatif, dirancang untuk isolasi RNA bebas DNA yang mudah, andal, dan cepat dari sel, semua jenis jaringan, *whole blood*, dan cairan biologis.



R1008

Quick-RNA™ FFPE Kit

Kit yang menyediakan metode yang mudah dan dapat diandalkan untuk isolasi RNA dari sampel jaringan *formalin-fixed paraffin embedded* (FFPE).



R1042 / R1043

Quick-DNA/RNA™ Pathogen Miniprep Kit

Kit ekstraksi DNA/RNA dengan metode *spin-column* untuk isolasi dari patogen dan berbagai macam vektor (nyamuk, kutu, kutu, dll.) dan jenis jaringan (mamalia, burung, dll.)



R1059

Quick-cfRNA™ Serum & Plasma Kit

Kit sederhana dan efisien dari RNA *cell-free* berkualitas tinggi (termasuk *protein-bound*, eksosom, miRNA, dan RNA kecil lainnya) dari serum, plasma, dan cairan biologis.



R1201

Quick-RNA™ Whole Blood

Kit dengan DNA/RNA Shield™, sebuah teknologi preservasi sample, sehingga memungkinkan isolasi cepat RNA total dari seluruh darah atau partisi atau *cell pellet* (setelah lisis sel darah merah).



R2024

Quick-RNA™ Tissue/Plant Microprep Kit

Kit RNA yang mampu isolasi RNA dengan cepat dan mudah dari berbagai sampel tanaman (misalnya daun, batang, kuncup, bunga, buah, biji, dll.).



R2132/ R2133

Quick-RNA™ MagBead

Kit yang memberikan *throughput* RNA total berkualitas tinggi (termasuk RNA *small/micro*) tinggi, dengan metode *Magnetic Beads* dari dari sumber sampel apa pun.



R1008

Direct-zol 96 MagBead RNA

Kit yang memberikan *throughput* RNA total berkualitas tinggi (termasuk RNA *small/micro*) tinggi (96-well), dengan metode *magnetic beads* dari dari sumber sampel apa pun.



R1013 / R1014

RNA Clean & Concentrator™ -5

Kit yang dapat diandalkan dan dapat secara efektif membersihkan sampel RNA apa pun untuk aplikasi lanjut yang sensitif seperti RT-qPCR dan *Next-Gen Sequencing* (NGS).

SCAN QR

UNTUK INFORMASI
LEBIH LANJUT



Plastic Consumables Catalog

Plastik Habis Pakai untuk **Riset RNA yang Optimal**



Cryo Box, PC

Terbuat dari polikarbonat kuat dan tahan suhu -196°C hingga 121°C . Dapat digunakan dalam fase gas nitrogen cair dengan prosedur keamanan yang tepat.

Informasi Produk:

P20601 1 – 2 ml *Cryo Tube* 25 (5 x 5 Array)

P20602 1 – 2 ml *Cryo Tube* 81 (9 x 9 Array)

P20607 5 ml *Cryo Tube* 81 (9 x 9 Array)



Cryo Cube Box / Storage Cube Box, PP

Terbuat dari *polypropylene* murni, dengan teknologi pencetakan canggih dirancang untuk penyimpanan sampel hingga -80°C . Kotak ini kompatibel dengan mikrotube 1.5–2.0 ml dan vial kriogenik 1.0–2.0 ml.

Informasi Produk:

P20612 5 – 2 ml *Micro Tube* & 1- 2 ml *Cryo Tube*

P20614 1.5 – 2 ml *Micro Tube* & 1- 2 ml *Cryo Tube*

P20607 - 1.5 – 2 ml *Micro Tube* & 1- 2 ml *Cryo Tube*



P11061

Last Drop Racked Filter Micro Tips 0.2-10 µL

Pipette tips filter dengan ukuran 0.2-10 µL. Dengan filter, tips ini mencegah kontaminasi silang dan degradasi RNA karena RNase.



P11065

Last Drop Racked Filter Micro Tips 2-20 µL

Pipette tips filter dengan ukuran 2-20 µL. Dengan filter, tips ini mencegah kontaminasi silang dan degradasi RNA karena RNase.



P11077

Last Drop Racked Filter Micro Tips 100-1000 µL

Pipette tips filter dengan ukuran 100-1000 µL. Dengan filter, tips ini mencegah kontaminasi silang dan degradasi RNA karena RNase.



P11072

Last drop, Low Retention, Racked Filter Micro Tips 2- 200 µL

Pipette tips filter retention dengan ukuran 2-200 µL. Dengan filter, tips ini mencegah kontaminasi silang dan degradasi RNA karena RNase.



P10025

Last Drop, Low Retention, Racked Filter Micro Tips 100 – 1000 µL

Pipette tips filter retention dengan ukuran 100-1000 µL. Dengan filter, tips ini mencegah kontaminasi silang dan degradasi RNA karena RNase.



MB-Q100C

0,1 ml qPCR 8-strip Clear Tubes (With optical caps)

Tube ultra-jernih dan tutup optik transparan memastikan sinyal fluoresensi yang konsisten. Bebas dari DNase, RNase, DNA.



MB-Q200

0.2ml qPCR 8-Strip Tubes (With Optical Caps)

Tube ultra-jernih dan tutup optik transparan memastikan sinyal fluoresensi yang konsisten. Bebas dari DNase, RNase, DNA.



122263

Cryo.S 2 mL Freezing Tubes, Internal Thread

Terbuat dari *polypropylene* berkualitas tinggi, tabung ini tahan suhu ekstrem (-196°C hingga +37°C) dan bebas dari DNase, RNase, serta DNA manusia.



126277

Cryo.S, 2mL Freezing Tubes, External Thread

Terbuat dari *polypropylene* berkualitas tinggi, tabung ini tahan suhu ekstrem (-196°C hingga +37°C) dan bebas dari DNase, RNase, serta DNA manusia.

GLOWNFISH

Amphiprion percula



SEX CHANGE PADA IKAN CLOWNFISH SEBAGAI STRATEGI BERTAHAN HIDUP

Pernah menonton *Finding Nemo*? Kita mungkin berfikir kalau ayahnya Nemo, Marlin, adalah seekor ikan badut (*clownfish*) jantan. Tapi ternyata, secara biologis seharusnya ayahnya Nemo berubah menjadi betina! Kok bisa?

Dalam hierarki sosial ikan badut yang didasarkan pada ukuran tubuh, individu yang paling dominan adalah individu terbesar dan merupakan betina. Betina ini menjadi pemimpin komunitas dan mengatur anggota lainnya. Pasangannya adalah jantan dengan ukuran tubuh terbesar kedua dalam kelompok, sementara anggota lainnya adalah jantan dengan ukuran yang lebih kecil dan organ reproduksi yang belum berkembang. Jika betina dominan mati, jantan terbesar (pasangan betina dominan) akan mengalami perubahan jenis kelamin menjadi betina dan mengambil alih posisi pemimpin tersebut. Kemudian, ikan jantan terbesar selanjutnya akan naik pangkat menjadi pasangan betina baru tersebut. [1]

Jadi, dalam cerita *Finding Nemo*, setelah Nemo kehilangan ibunya, seharusnya Marlin, sebagai pasangan ibunya Nemo, berubah menjadi betina, dan mengambil alih posisi sebagai pemimpin komunitas ikan tersebut loh!

Lalu, bagaimana sebenarnya proses perubahan jenis kelamin pada *clownfish* ini terjadi? Penelitian yang dilakukan oleh Casas pada tahun 2016 menunjukkan bahwa setelah betina dominan mati, ikan jantan pasangannya mengalami perubahan perilaku yang signifikan. Jantan yang sebelumnya tunduk dan menerima perintah dari betina mulai menunjukkan

perilaku agresif dan dominan, menguasai sumber makanan, serta memperbesar ukuran tubuhnya. Selain itu, ia juga mulai mendekati ikan-ikan yang lebih kecil, mirip dengan perilaku betina dominan sebelumnya. [2]

Menurut penelitian, perubahan perilaku dan jenis kelamin ini dimediasi oleh perubahan ekspresi gen diantaranya pada organ otak dan gonad. Berdasarkan hasil penelitian, pada organ otak ikan jantan yang sedang mengalami perubahan jenis kelamin, teramati adanya peningkatan ekspresi gen *Cyp19a1b* yang berperan dalam mengubah androgen menjadi estrogen. Proses ini kemudian memicu peningkatan kadar estrogen yang memengaruhi perkembangan karakteristik betina. Selain itu, ekspresi gen *Sox6* dan *Foxp4*, yang terkait dengan spermatogenesis, juga teramati mengalami penurunan selama transisi ini. [2]

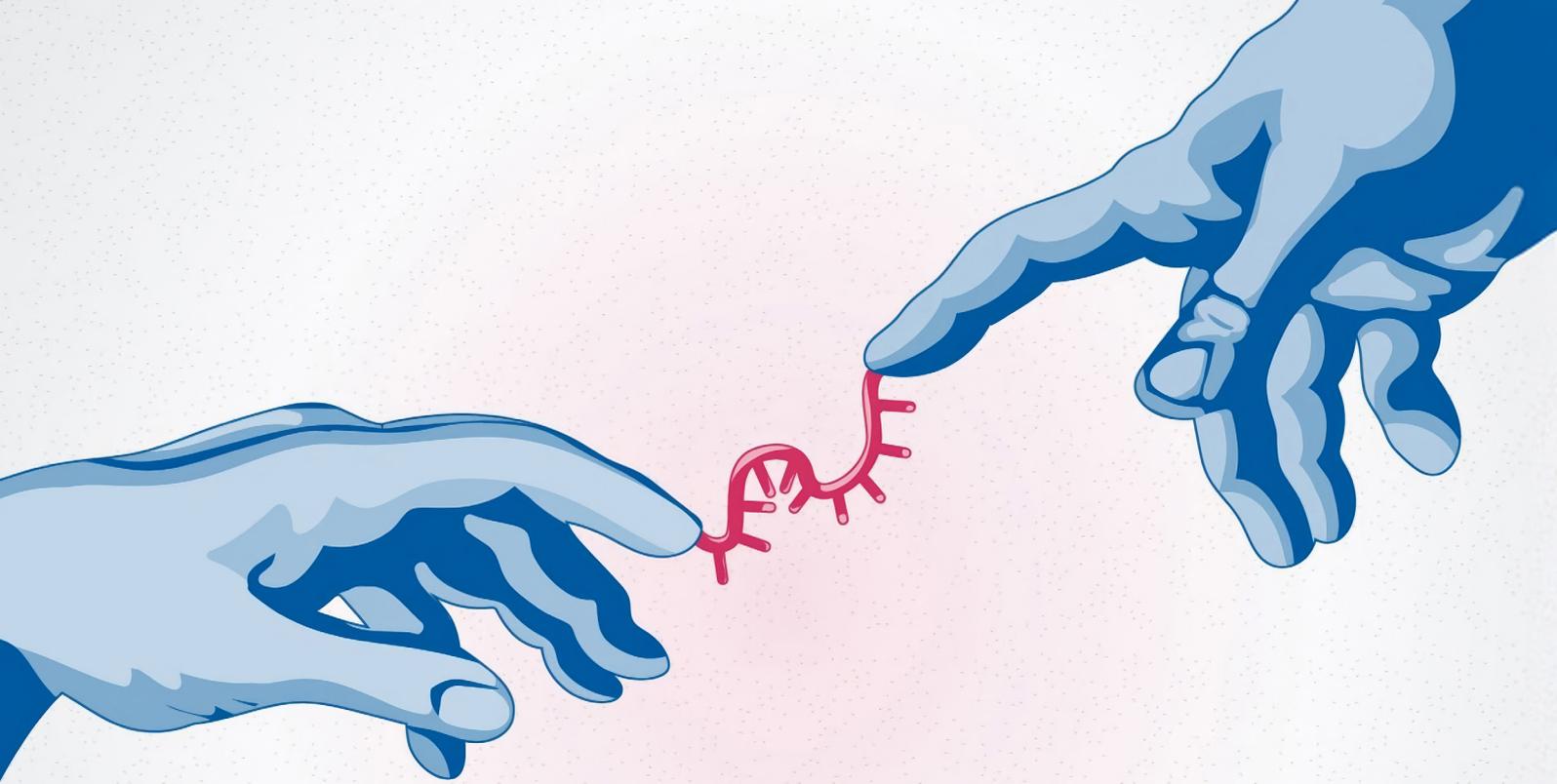
Sedangkan pada organ gonad, ekspresi gen *Cyp19a1a* teramati mengalami peningkatan secara signifikan. Gen ini sangat penting dalam diferensiasi ovarium dan sintesis estrogen. Selain itu, gen *Foxl2*, *Star*, dan *Hsd17b1*, yang juga berperan dalam regulasi sintesis estrogen dan perkembangan ovarium, menunjukkan peningkatan ekspresi. Sebaliknya, gen *Dmrt1*, *Sox8*, dan *Amh*, yang diketahui berperan dalam spermatogenesis pada ikan jantan, mengalami penurunan ekspresi yang signifikan. [2]

Kombinasi perubahan ekspresi gen ini menciptakan kondisi hormonal dan struktural yang memungkinkan transformasi lengkap dari jantan menjadi betina, sehingga ikan tersebut dapat mengambil peran baru sebagai betina dominan dalam komunitasnya (YP).

Referensi:

[1] Iwata, E., Nagai, Y., Hyoudou, M., & Sasaki, H. (2008). Social environment and sex differentiation in the false clown anemonefish, *Amphiprion ocellaris*. *Zoological Science*, 25(2), 123–128. <https://doi.org/10.2108/zsj.25.123>

[2] Casas, L., Saborido-Rey, F., Ryu, T., Michell, C., Ravasi, T., & Irigoien, X. (2016). Sex Change in Clownfish: Molecular Insights from Transcriptome Analysis. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep35461>



mRNA *Sequencing*

Analisis Ekspresi Gen secara NGS (*Next Generation Sequencing*)

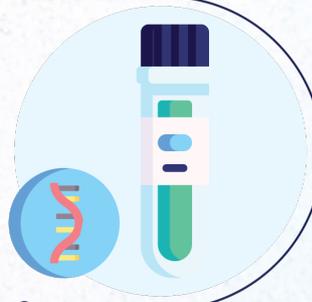
mRNA sequencing (mRNA-seq) adalah salah satu teknik sekuensing *Next-Generation Sequencing* (NGS) yang digunakan untuk mengetahui urutan basa nukleotida dari seluruh transkrip mRNA yang terdapat di dalam sampel. Suatu transkrip mRNA hanya dapat ditemukan bila sekuens DNA gen ditranskripsikan menjadi transkrip mRNA atau dengan kata lain gen yang memiliki sekuens tersebut diekspresikan. Selain itu, dalam mRNA-seq jumlah sekuens yang terbaca sebanding dengan jumlah transkrip yang terdapat di dalam sampel sehingga kuantitas suatu transkrip mRNA dapat dihitung dengan menggunakan metode ini. Oleh karena itu, mRNA-seq dimanfaatkan untuk mengetahui profil ekspresi gen dan level ekspresi dari setiap gen yang ada.

mRNA Sequencing

From Start to Finish

ISOLASI RNA DARI SAMPLE

Tahapan dalam metode sekuensing RNA, dimana keseluruhan RNA diekstraksi dan dipurifikasi dari sel atau jaringan dengan menggunakan reagen-reagen pengekstraksi RNA.



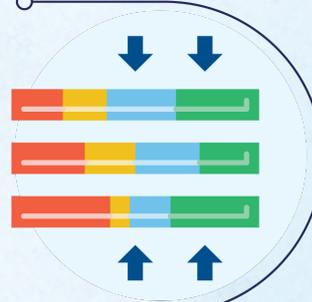
QUALITY CONTROL (QC) RNA

Untuk memastikan bahwa hasil isolasi RNA layak untuk disekuensing. Kriteria yang umum digunakan adalah konsentrasi, kemurnian, dan integritas RNA.



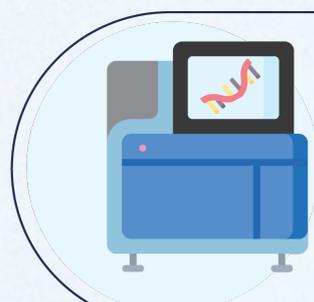
SEQUENCING LIBRARY PREPARATION

Sampel RNA akan di-enrich jumlah mRNAnya, diubah menjadi cDNA, disesuaikan ukuran *fragment*-nya, dan ditambahkan adapter sekuensing sesuai alat penyekuensing yang digunakan.



SEQUENCING

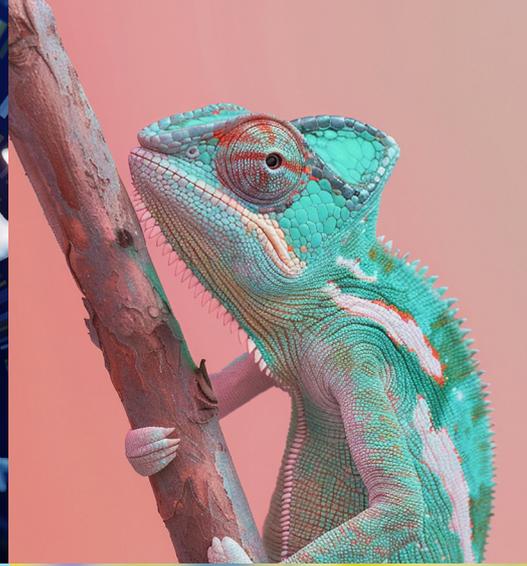
Sampel yang telah dilakukan *library preparation*, disekuensing sesuai dengan besaran *yield* yang ditargetkan.



ANALISIS BIOINFORMATIKA

Hasil sekuensing diolah dengan bantuan komputasi sehingga diperoleh data yang dapat dipergunakan untuk menjawab pertanyaan ilmiah yang diajukan.





Aplikasi mRNA *Sequencing*

Dalam aplikasinya, mRNA-seq dapat digunakan untuk menganalisis profil mRNA, identifikasi *Single-Nucleotide Polymorphism* (SNP), dan aplikasi mRNA-seq yang paling populer adalah analisis perubahan level ekspresi. Seperti halnya dengan metode qPCR, analisis perubahan level ekspresi adalah metode analisis yang melihat perubahan level ekspresi suatu gen ketika diberi perlakuan

yang berbeda. Perubahan tersebut dapat memberikan petunjuk terkait perubahan proses metabolisme yang sedang terjadi sebagai akibat atau respon dari kondisi lingkungan sekitar. Namun, tidak seperti metode qPCR yang hanya dapat menganalisis beberapa jenis transkrip RNA (hingga 3-5 jenis mRNA) dalam sekali waktu, metode ini dapat menyurvei keberadaan hampir seluruh mRNA yang ada di dalam sampel dalam sekali

waktu sehingga informasi yang dapat diperoleh memiliki volume data yang lebih besar dan lebih komprehensif. Selain itu tidak terbatas hanya pada gen yang sudah diketahui, dalam mRNA-seq juga dapat digunakan untuk mendeteksi gen-gen yang belum pernah diketahui sebelumnya sehingga penemuan sistem regulasi ekspresi gen yang baru juga memungkinkan untuk dilakukan [1]. Karena metode ini bergantung pada sekuens mRNA

yang dibaca, analisis *alternative splicing* dari proses maturasi mRNA yang terjadi pada organisme eukariot juga dapat dilakukan. Dalam salah satu proses maturasi mRNA, terdapat tahapan yang disebut sebagai *splicing* yang mana dalam tahapan tersebut sekuens intron dikeluarkan dari sekuens mRNA semula dan

menyisakan hanya sekuens eksonya saja. Namun, selama proses tersebut terjadi terdapat kemungkinan terjadinya pemotongan intron yang juga mengikut sertakan sekuens ekson menyebabkan pembentukan mRNA dewasa yang berbeda dari seharusnya. mRNA yang berbeda ini kemudian akan menghasilkan jenis

protein yang berbeda pula. Peristiwa tersebut dikenal sebagai *alternative splicing* dan keberadaan peristiwa ini dapat berdampak pada respon metabolik yang terjadi. Melalui mRNA-seq, peristiwa *alternative splicing* dapat dianalisis, termasuk varian mRNA mana yang lebih dominan terbentuk ketika suatu kondisi terjadi [1].

DALAM MERANCANG SUATU EKSPERIMEN YANG MENGGUNAKAN mRNA-SEQ, TERDAPAT BEBERAPA ASPEK YANG PERLU DIPASTIKAN TERLEBIH DAHULU, SEMISALNYA:

Berapa jumlah pengulangan biologis yang akan digunakan?

Jumlah pengulangan biologis akan mempengaruhi kekuatan analisis statistik yang akan dilakukan, dimana semakin banyak jumlah pengulangan yang digunakan akan meningkatkan kepercayaan secara statistik untuk menemukan gen yang benar berbeda signifikan antara dua kondisi [2].

Apa metode preparasi sampel dan metode ekstraksi RNA dapat memberikan kualitas isolat RNA terbaik?

Sampel yang berbeda akan memiliki metode penyiapan sampel yang berbeda pula. Beberapa jenis sampel dapat secara alami memiliki kandungan RNase yang tinggi (contohnya pankreas) dan beberapa jenis sampel melepaskan RNase ketika mengalami kematian[3] sehingga perlu adanya penanganan khusus untuk menjaga integritas RNA selama proses sampling berlangsung. Selain itu karena mRNA-seq merupakan metode sekuensing, kualitas RNA yang digunakan akan mempengaruhi hasil yang diperoleh. Kualitas RNA yang buruk menunjukkan sekuens RNA yang terfragmentasi atau terdegradasi sehingga akan memberikan hasil sekuensing yang tidak lengkap. Ketidakeengkapan data yang diperoleh dapat menghasilkan analisis data yang bias

dan bisa berbeda dari kenyataan yang seharusnya[4].

Berapa output sekuensing yang dibutuhkan?

Besar output sekuensing menunjukkan seberapa banyak transkrip mRNA yang akan disekuensing. Semakin besar output yang digunakan maka semakin banyak transkrip mRNA yang tersekuensing. Besar kecilnya output sekuensing bergantung pada populasi mRNA yang ingin dianalisis. Untuk gen yang tidak secara dominan terekspresikan akan membutuhkan output sekuensing yang lebih besar dibandingkan gen yang secara umum dominan terekspresikan[5].

Apakah organisme memiliki sekuens genom referensi dan sekuens yang mana yang akan digunakan?

Untuk organisme yang sudah memiliki genom referensi umumnya telah memiliki sekuens gen yang telah tervalidasi sehingga analisis mRNA-seq yang dilakukan dapat memberikan informasi yang lebih akurat. Namun untuk organisme yang belum memiliki genom referensi, hasil analisis mRNA-seq yang diperoleh sebagian besar masih berupa prediksi berdasarkan pola atau data mRNA-seq yang sudah pernah dilakukan sebelumnya [6] (MS).

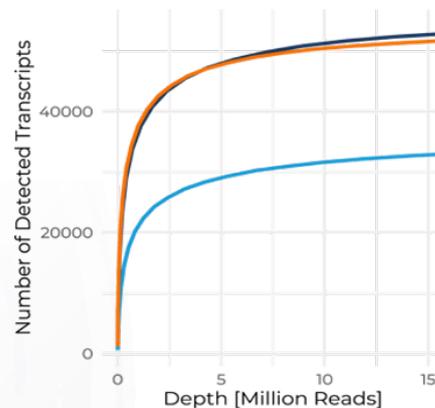
Referensi:

- [1] K. van den Berge, K. M. Hembach, C. Sonesson, S. Tiberi, L. Clement, M. I. Love, R. Patro, dan M. D. Robinson. "RNA sequencing data: hitchhiker's guide to expression analysis. Annual Review of Biomedical Data Science 2: 139-173. 2019. doi:10.1146/annurev-biodatasci-072018-021255.
- [2] N. J. Schurch, P. Schofield, M. Gierinski, C. Cole, A. Sherstnev, V. Singh, N. Wrobel, K. Gharbi, G. G. Simpson, T. Owen-Hughes, M. Blaxter, dan G. J. Barton, "How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use?" RNA 22:839-851. 2016. doi:10.1261/rna.053959.115.
- [3] F. Sampaio-Silva, T. Magalhaes, F. Carvalho, R. J. Dinis-Oliveira, dan R. Silvestre. "Profiling of RNA Degradation for Estimation of Post Mortem Interval". PLoS One 8(2):e56507. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0056507.
- [4] W. Lu, Q. Zhou, Y. Chen, "Impact of RNA degradation on next-generation sequencing transcriptome data." Genomics 114(4):110429. 2022. doi:10.1016/j.ygeno.2022.110429.
- [5] S. Tarazona, F. Garcia-Alcalde, J. Dopazo, A. Ferrer, dan A. Conesa, "Differential expression in RNA-seq: A matter of depth." Genome Research 21:2213-2223. 2011. doi:10.1101/gr.124321.111.
- [6] L. A. Corchete, E. A., Rojas, D. Alonzo-Lopez, J. D. Las Rivas, N. C. Gutierrez, dan F. J. Burguillo, "Systematic comparison and assessment of RNA-seq procedures for gene expression quantitative analysis." Scientific Reports 10: 19737. 2020. doi:10.1038/s41598-020-76881.

Kedalaman dan Replikasi Sekuensing RNA

Perhitungan peluang mengambil satu bola berwarna tertentu dari sekumpulan bola dengan berbagai warna dalam suatu karung adalah salah satu soal yang umum diberikan ketika topik terkait probabilitas sedang dibahas. Suatu kejadian yang 100% terjadi (misalnya matahari terbit dari timur dan terbenam ke barat) ataupun yang 0% terjadi (misalnya matahari terbit dari barat dan terbenam ke timur) tidak termasuk sebagai peluang. Hanya kejadian yang memiliki kemungkinan antara 0% hingga 100% saja yang diperhitungkan. Dalam perhitungannya, probabilitas suatu kejadian dapat diprediksikan kemungkinannya sehingga kita dapat meminimalisasi atau memaksimalkan terjadinya kejadian tersebut. Mari kita ilustrasikan seperti ini, jika kita mengetahui peluang terambilnya bola merah adalah 10%, maka untuk memperoleh 10 bola merah, kita sekurang-kurangnya memerlukan mengambil 100 bola dari dalam karung dan jika peluang hanya 1% maka kita perlu mengambil sebanyak sekurang-kurangnya 1000 bola! Selayaknya permainan pengambilan bola dari karung dibawah, kejadian sekuensing mRNA juga mengikuti konsep probabilitas. Dalam suatu populasi RNA, semakin sedikit jumlah mRNA di dalam sampel maka akan semakin kecil kemungkinan untuk mRNA tersebut dapat ditemukan. Untuk memperbesar peluang ditemukannya mRNA tersebut, kita dapat memperbesar jumlah pembacaan yang dilakukan, selayaknya kita memperbanyak jumlah bola yang perlu diambil untuk memperbesar peluang ditemukannya target yang

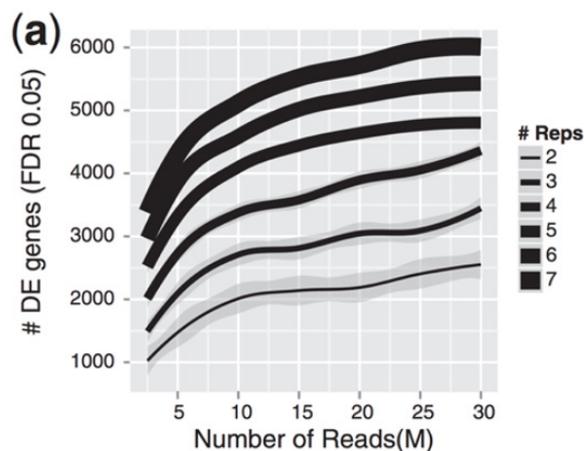
diharapkan. Di dalam metode sekuensing, besaran basa yang dibaca merupakan variable yang lebih mudah untuk diatur dibandingkan dengan besaran jumlah fragmen yang dibaca. Oleh karena itu dalam metode sekuensing RNA, besaran jumlah basa yang perlu disekuensingkan harus ditentukan. Umumnya sekuensing sebesar 6 – 12 Gb dapat memberikan gambaran secara umum terkait profil ekspresi mRNA yang dimiliki oleh suatu sampel [1]. Sekuensing yang lebih besar dari itu diperuntukkan bagi gen-gen yang tidak terekspresi secara tinggi [2] atau untuk mempelajari alternative splicing pada proses transkripsi gen [3].



Semakin Banyaknya Pengulangan atau Replikasi Maka Kemungkinan Tersebut Menjadi Suatu Kepastian



Variabel lain yang dapat diperhatikan adalah jumlah replikasi yang digunakan dalam suatu eksperimen [1] [4]. Keberadaan suatu ulangan memberikan kepastian terhadap suatu kejadian. Seperti yang telah dijabarkan sebelumnya, sekuensing RNA cukup erat kaitannya dengan probabilitas, sehingga untuk memastikan kemustahilan suatu kejadian dapat terjadi atau tidak terjadi, diperlukan adanya replikasi. Mari kita coba bayangkan sejenak, seberapa mungkin suatu koin yang dilempar jatuh pada sisi gambar? Cukup mungkin bukan? Namun, seberapa mungkin suatu koin dilempar oleh 3 orang, semuanya jatuh pada sisi gambar? Masih ada kemungkinan terjadi tetapi lebih jarang daripada hanya 1 orang saja yang melakukan, bukan? Di sini kita bisa melihat bahwa dengan semakin banyaknya pengulangan atau replikasi, maka kemungkinan tersebut menjadi suatu kepastian. Dengan memiliki sampel lebih dari 1 ulangan, kita mengeliminasi peluang suatu temuan kita sebagai hal yang terjadi karena sebagai kebetulan. Dalam sekuensing RNA, replikasi yang umumnya dipergunakan adalah replikasi biologis, dimana beberapa sampel diberi perlakuan yang sama sehingga efek yang dihasilkan dalam satu sampel seharusnya juga berulang di dalam sampel yang diperlakukan sama.



Kombinasi antara kedalaman sekuensing dan jumlah replikasi sampel ini memberikan kita alat untuk menemukan suatu fenomena entah selangka apapun itu dan memastikan bahwa fenomena yang ditemukan tersebut bukanlah suatu kebetulan belaka. Dengan adanya replikasi juga, suatu mRNA dapat lebih mudah untuk ditemukan sehingga proses sekuensing dapat dilakukan dengan menggunakan jumlah basa yang lebih hemat (MS).

Referensi:

- [1] Y. Liu, J. Zhou, K. P. White, "RNA-seq differential expression studies: more sequence or more replication?" *Bioinformatics* 30(3):301-304. doi:10.1093/bioinformatics/btt688.
- [2] S. Tarazona, F. Garcia-Alcalde, J. Dopazo, A. Ferrer, dan A. Conesa, "Differential expression in RNA-seq: A matter of depth." *Genome Research* 21:2213-2223. 2011. doi:10.1101/gr.124321.111.
- [3] K. van den Berge, K. M. Hembach, C. Sonesson, S. Tiberi, L. Clement, M. I. Love, R. Patro, dan M. D. Robinson. "RNA sequencing data: hitchhiker's guide to expression analysis. *Annual Review of Biomedical Data Science* 2: 139-173. 2019. doi:10.1146/annurev-biodatasci-072018-021255.
- [4] N. J. Schurch, P. Schofield, M. Gierinski, C. Cole, A. Sherstnev, V. Singh, N. Wrobel, K. Gharbi, G. G. Simpson, T. Owen-Hughes, M. Blaxter, dan G. J. Barton, "How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use?" *RNA* 22:839-851. 2016. doi:10.1261/rna.053959.115 and Colon Cancer Data Sets. In *CANCER RESEARCH* (Vol. 64)

Menjelajahi Potensi RNA-Seq dalam Riset di Indonesia

Sejumlah penelitian di Indonesia telah mulai memanfaatkan metode RNA-sequencing (RNA-seq) sebagai salah satu teknik analisis molekuler yang powerful untuk menggali dan menjawab berbagai pertanyaan ilmiah yang kompleks di bidang biologi dan biomedis. Metode ini memungkinkan para peneliti untuk memperoleh gambaran menyeluruh mengenai ekspresi gen secara kuantitatif dan komprehensif.

Sebagai *service provider* RNA-seq yang terpercaya, Genetika Science telah menjadi mitra riset bagi berbagai institusi dan laboratorium di Indonesia. Berikut ini kami sajikan beberapa contoh publikasi ilmiah yang merupakan hasil dari riset para customer kami yang telah memanfaatkan layanan RNA-seq dari Genetika Science dalam proyek penelitian mereka:

Hermawan et al. (2022) menggunakan mRNA-seq untuk mengkonfirmasi hasil prediksi target protein dari senyawa turunan dari kurkumin, CCA-1.1, yang memiliki potensi sebagai obat anti kanker di otak. Berdasarkan hasil analisis secara bioinformatik diprediksikan senyawa *analog* tersebut dapat berinteraksi dengan 4 target protein yang terlibat di dalam proses imunitas dan kesintasan sel. Hasil mRNA-seq kemudian digunakan untuk mengkonfirmasi bahwa CCA-1.1 benar dapat mempengaruhi salah satu dari keempat target protein tersebut.

Judul Publikasi:

Hermawan, A. Wulandari, F., Hanif, N., Utomo, R. Y., Jenie, R. I., Ikawati, M., dan Tafrihani, A. S. (2022) Identification of potential targets of the curcumin analog CCA-1.1 for glioblastoma treatment: integrated computational analysis and in vitro study. *Scientific Reports* 12:13928.



Septiani et al. (2024) memanfaatkan teknik ini untuk mengidentifikasi jenis-jenis miRNA pada tanaman coklat, *Theobroma cacao*, dan fungi penyebab busuk buah, *Phytophthora palmivora*. Dari hasil sekuensing ditemukan beberapa sekuens miRNA dari sisi tanaman yang menekan ketahanan tanaman untuk melawan patogen sedangkan dari sisi fungi ditemukan miRNA yang meningkatkan patogenisitas fungi. Dengan mengubah level ekspresi dari kedua jenis miRNA yang ditemukan diharapkan juga dapat meningkatkan ketahanan tanaman coklat dari serangan fungi busuk buah tersebut.

Judul Publikasi:

Septiani, P., Pramesti, Y., Ningsih, D. U., Pancaningtyas, S., dan Meitha, K. (2024) Identification of self- and pathogen-targeted miRNAs from resistant and susceptible *Theobroma cacao* variety to black pod disease. *Scientific Report* 14:3272.





Hermawaty et al. (2025) memetakan gen-gen yang dipengaruhi oleh inokulasi *Fusarium solani* pada pohon muda *Gyrinops versteegii*, spesies pohon yang masih berkerabat dekat dengan genus *Aquilaria* (gaharu-gaharuan), dengan menggunakan teknik sekuensing mRNA. Hasil analisis menunjukkan gen-gen yang berperan dalam proses biosintesis seskuiterpenoid dan terpenoid meningkat ketika terjadi infeksi oleh *F. solani*. Adapun senyawa aktif dalam kayu gaharu (bahan baku produk wewangian dengan nilai ekonomis tinggi) merupakan kelompok seskuiterpenoid dan hal tersebut mengindikasikan adanya potensi pemanfaatan *G. versteegii* sebagai tanaman alternatif pemroduksi kayu gaharu.

Judul Publikasi:

Hermawaty, D., Setyobudi, T., Nugrahapraja, H., Turjaman, M., dan Faizal, A. (2025) De novo transcriptome assembly and analysis during agarwood induction in *Gyrinops versteegii* Gilg. Seedling. *Scientific Report* 15: 2977.

Transcriptome RNA-Seq Service

Apa yang Bisa Diketahui dari Transkriptom?

Transkriptom adalah metode untuk menganalisis kumpulan gen yang ditranskripsi dalam suatu kondisi tertentu. Proses ini memungkinkan kita memahami kode genetik dalam transkriptom dan proporsi relatifnya. Urutan RNA mencerminkan urutan DNA yang menjadi cetaknya. Dengan menganalisis transkriptom dalam suatu sel, peneliti

dapat mengetahui kapan dan di mana setiap gen diaktifkan atau dinonaktifkan dalam sel dan jaringan organisme. Transkriptom mencakup seluruh spektrum molekul *messenger* RNA (mRNA) yang diekspresikan oleh suatu organisme. Istilah ini juga dapat merujuk pada kumpulan transkrip mRNA dalam jenis sel atau jaringan tertentu.

Jenis Sampel yang Bisa Dikirim:

Kami menerima sampel **Total RNA** dengan persyaratan:

1. Konsentrasi: ≥ 50 ng/uL
2. *RNA Integrity Number* (RIN): ≥ 6.5 , baseline yang halus
3. Kemurnian:
 - OD260/280 $\geq 1.8 - 2.0$
 - OD260/230 $\geq 2.0 - 2.2$

Jenis *raw sample* yang dapat diterima:

1. Jaringan tanaman
2. Jaringan hewan
3. Isolat bakteri murni

Sampel harus dikirim dalam buffer preservasi (DNA/RNA™ Shield) atau dry ice atau nitrogen cair.

Jenis Layanan RNA-Seq yang Genetika Science Tawarkan:

1. *mRNA Sequencing*
2. *Prokaryote RNA Sequencing*
3. *Whole-Transcriptome Sequencing*

Jenis Analisis Data yang Diberikan

Kami menyediakan berbagai analisis komprehensif untuk membantu riset Anda:

- | | | |
|-----------------------------------|------------------------|------------------------------------|
| 1. <i>Alignment</i> | 3. <i>Heatmap</i> | 6. <i>Gene Ontology</i> |
| 2. Diferensial Ekspresi Gen (DEG) | 4. <i>MA-Plot</i> | 7. <i>SNP & InDel Analysis</i> |
| | 5. <i>Volcano Plot</i> | 8. <i>Diagram Venn</i> |



UNTUK INFORMASI
LEBIH LANJUT

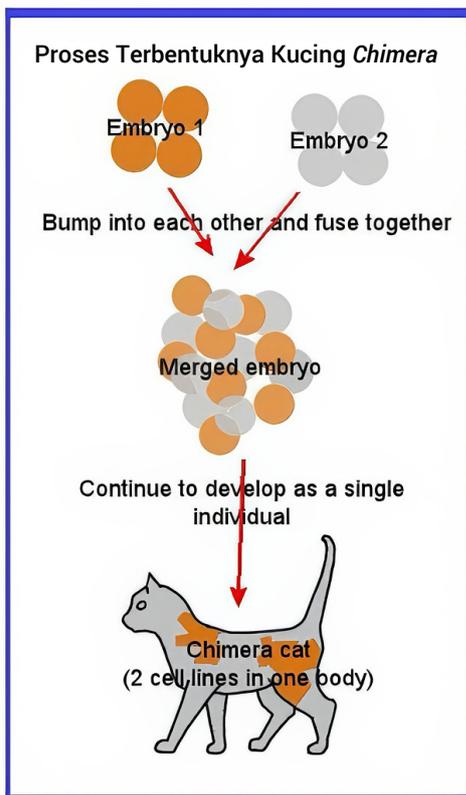
The Two-Faced

Chimera Cat

Chimera pada kucing adalah fenomena genetika langka yang terjadi ketika dua embrio menyatu menjadi satu individu. Hasilnya adalah seekor kucing dengan dua set DNA berbeda yang sering kali tercermin dalam pola warna yang mencolok di wajah atau tubuhnya.

Namun, apakah setiap kucing dengan wajah dua warna dapat langsung disebut sebagai *chimera*?





Tidak selalu. Perbedaan warna pada wajah kucing juga dapat disebabkan oleh fenomena lain, seperti inaktivasi kromosom X pada kucing betina *calico/ tortoiseshell*.

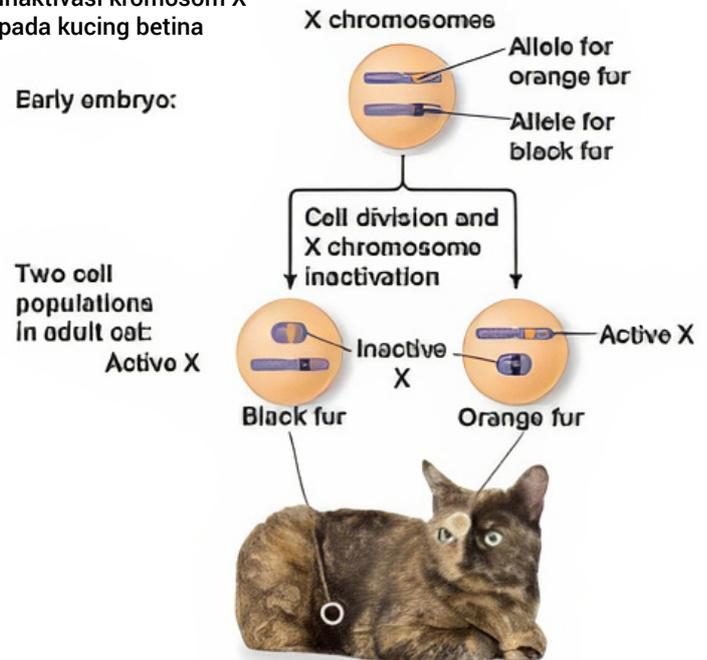
Inaktivasi Kromosom X

Alel untuk pigmen hitam dan oranye pada kucing terdapat pada kromosom X. Karena kucing betina memiliki dua kromosom X, masing-masing kromosom X dapat membawa alel pigmen yang berbeda, dan dalam setiap selnya, salah satu kromosom X tersebut akan dinonaktifkan secara acak, sehingga menciptakan pola warna yang beragam pada tubuh kucing betina.

Dalam kasus kucing Venus dan Quimera, dengan wajah yang terbagi simetris menjadi 2 warna, secara kebetulan gen pigmen hitam dinonaktifkan di satu sisi wajah mereka, sementara gen pigmen oranye dinonaktifkan di sisi lainnya, sehingga menghasilkan pola warna yang terlihat simetris. Oleh karena itu, Venus dan Quimera sebenarnya adalah kucing *calico/ tortoiseshell*, bukan kucing *chimera*.

Sedangkan pada kucing jantan, karena mereka hanya memiliki satu kromosom X, mereka umumnya hanya memiliki satu warna saja. Namun, kita juga sering kali menemukan kucing *calico/tortoiseshell* dengan jenis kelamin jantan. Hal tersebut terjadi karena mereka memiliki kromosom X tambahan yang memungkinkan mereka membawa alel pigmen lainnya, dimana kromosom X tambahan tersebut dapat diperoleh dari fenomena *chimera*.

Inaktivasi kromosom X pada kucing betina



Studi pada kucing *calico/ tortoiseshell* jantan

Penelitian Malouf pada tahun 2008 pada kucing *tortoiseshell* jantan menemukan bahwa kucing tersebut memiliki campuran kromosom XY sebanyak 43% dan kromosom XX sebanyak 57% [1]. Penemuan Chu pada tahun 2008 pada kucing jantan 2 warna juga menemukan bahwa kucing tersebut memiliki campuran kromosom triploid XXY dan kromosom diploid XX [2]. Kedua penelitian ini menunjukkan bahwa kedua kucing jantan tersebut memiliki warna bulu yang berbeda karena fenomena chimera atau peleburan embrio yang menyebabkan adanya penambahan kromosom X.

Kucing *chimera* dengan wajah dua warna yang unik, menjadi bukti nyata betapa kompleks dan menakjubkannya genetika. Untuk menentukan apakah perbedaan warna pada kucing terjadi karena fenomena *chimera* atau inaktivasi kromosom X, perlu dilakukan uji DNA untuk melihat apakah genotipe kucing tersebut mencerminkan peleburan dua embrio atau tidak (YP).

Referensi:

- [1] Malouf, N., Benirschke, K., & Hoefnagel, D. (2008). XX/XY Chimerism in a Tricolored Male Cat. *Cytogenetics*, 6(3-4), 228-241. <https://doi.org/10.1159/000129944>
- [2] Chu, E. H. Y., Thuline, H. C., & Norby, D. E. (2008). Triploid-Diploid Chimerism in a Male Tortoiseshell Cat. *Cytogenetics*, 3(1), 1-18. <https://doi.org/10.1159/000129794>

Evolusi Modern dari PCR Konvensional ke *Real-time* PCR

Penemuan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) oleh Kary Mullis, yang membuatnya mendapatkan hadiah Nobel pada bidang Kimia, merupakan salah satu penemuan yang revolusioner dibidang biologi molekuler. Pada waktu yang hampir bersamaan, Russel Higuchi melakukan riset yang menjadi cikal bakal penemuan *quantitative real-time PCR* (qRT-PCR), dengan menggunakan *probe* fluoresensi untuk memantau proses amplifikasi.



Prinsip Dasar qPCR dan Mengapa Menjadi Metode Ideal untuk Deteksi Ekspresi Gen?

Prinsip dasar dari qPCR mirip dengan PCR konvensional, yaitu amplifikasi sekuens DNA target menggunakan enzim DNA polimerase. Namun, qPCR membawa inovasi tersendiri dengan menggabungkan pendeteksian fluoresensi selama proses amplifikasi. Saat DNA target digandakan, sinyal fluoresensi yang dihasilkan akan meningkat secara proporsional. Salah satu elemen kunci dalam qPCR adalah penggunaan *probe* fluoresen atau pewarna fluoresen seperti SYBR Green. *Probe* ataupun pewarna ini akan berikatan dengan DNA yang berlipat ganda dan menghasilkan sinyal cahaya yang terdeteksi oleh instrumen qPCR. Semakin banyak DNA yang teramplifikasi, semakin kuat sinyal yang terdeteksi. *Quantitative* PCR (qPCR), atau *real-time* PCR, merupakan teknik amplifikasi DNA yang memungkinkan pengukuran kuantitatif DNA atau

RNA secara dan akurat. qPCR menggabungkan prinsip dasar PCR dengan deteksi fluoresensi, sehingga amplifikasi DNA dapat dipantau secara *real-time* [1]. Penemuan enzim *reverse transcriptase* pada tahun 1970 membuat penggunaan qPCR tidak hanya untuk analisis DNA, tetapi juga RNA. Analisis ekspresi gen menggunakan RT-qPCR (*Reverse Transcription Quantitative* PCR) dikenal karena keakuratan, sensitivitas, dan kecepatannya dalam menghasilkan data (NI).

Referensi:

[1] Adams G. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *Biochemist*. 2020;42(3):48–53





qPCR Route

ONE-STEP →

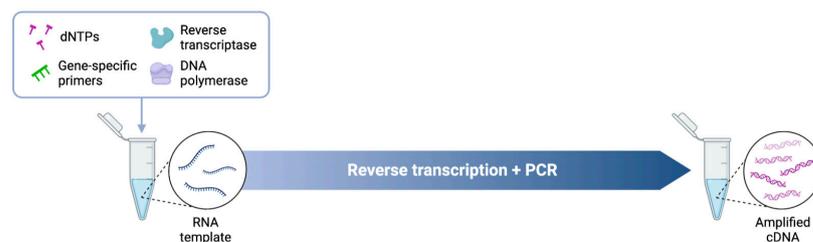
← **TWO-STEP**

Dua Metode Pengerjaan qPCR

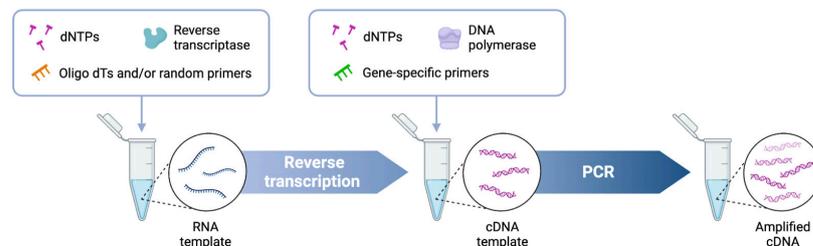
PENJELASAN UNTUK MASING-MASING METODE DAN METODE MANA YANG KAMU PILIH?

Dalam melakukan qPCR menggunakan RNA pada studi terkait ekspresi gen, terdapat dua cara utama yang kerap dilakukan. RT-qPCR tersendiri dapat dilakukan dengan dua metode utama. Cara pertama, yang disebut juga sebagai *one-step* RT-qPCR, yang menggabungkan proses *reverse transcription* (RT) dan PCR dalam satu reaksi yang sama. Cara kedua, disebut metode *two-step* RT-qPCR, dimana proses *reverse transcription* untuk mengonversi RNA menjadi cDNA dilakukan terlebih dahulu, kemudian cDNA tersebut digunakan sebagai *template* dalam qPCR pada *tube* terpisah [1].

One-step RT-PCR



Two-step RT-PCR



ONE-STEP

Metode *one-step* RT-PCR memiliki beberapa keuntungan, seperti proses yang lebih cepat, biaya yang lebih rendah, dan penanganan sampel yang minimal, sehingga mengurangi risiko kesalahan pipet, kontaminasi, dan sumber kesalahan lainnya. Dalam metode ini, primer spesifik-gen digunakan, dan proses RT (*reverse transcription*) serta PCR dilakukan dalam satu *tube* reaksi. Namun, karena hanya gen target yang dapat dianalisis, gen lain tidak bisa diamplifikasi untuk penelitian lebih lanjut.

Referensi:

[1] Wacker MJ, Godard MP. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. J Biomol Tech. 2005 Sep;16(3):266-71.

TWO-STEP

Sebaliknya, metode *two-step* RT-PCR menawarkan fleksibilitas lebih besar karena biasanya menggunakan primer *random hexamer* atau oligo dT dalam langkah *Reverse Transcription* yang dilakukan di tabung terpisah. Pendekatan ini memungkinkan seluruh transkrip RNA dalam sampel diubah menjadi cDNA, sehingga sampel dapat disimpan untuk analisis gen lain di masa depan.

FAKTOR - FAKTOR YANG

Mempengaruhi Pemilihan Metode

Pemilihan antara metode *one-step* dan *two-step* biasanya bergantung pada kebutuhan penelitian, akan tetapi terdapat beberapa faktor tambahan yang dapat memengaruhi hasil RT-qPCR. Misalnya, metode *priming* pada langkah *reverse transcription*, seperti primer spesifik-gen, *random hexamer*, atau oligo dT, memiliki sensitivitas dan efisiensi yang berbeda, yang dapat memengaruhi performa eksperimen serta pembuatan kurva standar. Penelitian menunjukkan bahwa pengujian dengan primer spesifik-gen menghasilkan linearitas lebih baik dibandingkan *random hexamer*. Selain itu, konsentrasi RNA dalam

reaksi juga memengaruhi efisiensi langkah RT, terutama pada metode *one-step*. Jika efisiensi enzim *reverse transcription* berubah tergantung konsentrasi RNA, cDNA yang dihasilkan tidak akan proporsional atau linear, yang berdampak pada produk PCR dan kurva standar. Masalah ini lebih jarang terjadi pada metode *two-step*, karena cDNA dibuat lebih dulu di satu *tube* sebelum diencerkan. Faktor lain yang perlu dipertimbangkan adalah stabilitas mRNA dan cDNA. DNA umumnya dianggap lebih stabil dibandingkan mRNA, sehingga cDNA sering digunakan untuk penyimpanan jangka panjang. Perbedaan

stabilitas ini penting dalam konteks penggunaan jangka panjang serta kondisi inkubasi yang digunakan dalam reaksi *one-step* dan *two-step* [1]. *One-step* maupun *two-step* qPCR memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing. Metode *one-step* RT-PCR memiliki beberapa keuntungan, seperti proses yang lebih cepat, biaya yang lebih rendah, dan penanganan sampel yang minimal, sehingga mengurangi risiko kesalahan pipet, kontaminasi, dan sumber kesalahan lainnya (NI).

Referensi:

[1] Wacker MJ, Godard MP. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *J Biomol Tech.* 2005 Sep;16(3):266-71





ONE-STEP qPCR Enzyme

DESKRIPSI	BRAND	CATALOG NO
SensiFAST™ SYBR No-ROX One Step Kit (100/500 reactions)	Meridian Bioscience	BIO-72001 BIO-72005
SensiFAST™ SYBR Lo-ROX One Step Kit (100/500 reactions)	Meridian Bioscience	BIO-74001 BIO-74005
SensiFAST™ SYBR Hi-ROX One Step Kit (100/500 reactions)	Meridian Bioscience	BIO-73001 BIO-73005
THUNDERBIRD™ Probe one-step qRT-PCR Kit	Toyobo	QRZ-101
THUNDERBIRD™ Next Probe One-step qRT-PCR 4xMix (50/250 reactions)	Toyobo	QRX-101S QRX-101



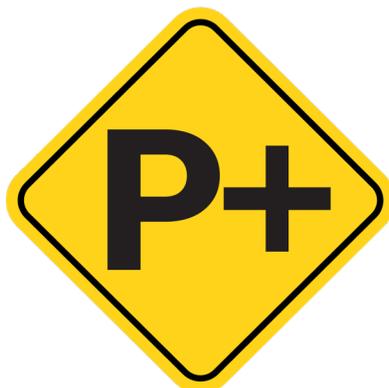
TWO-STEP qPCR Enzyme

DESKRIPSI	BRAND	CATALOG NO
THUNDERBIRD™ Next SYBR qPCR Mix (100/500 reactions)	Toyobo	QPX-201T QPX-201
KOD SYBR® qPCR Mix (40 / 200 reactions)	Toyobo	QKD-201T QKD-201
SensiFAST™ SYBR Hi-ROX One Step Kit (100/500 reactions)	Meridian Bioscience	BIO-73001 BIO-73005
THUNDERBIRD™ Next Probe qPCR Mix (100 / 500 reactions)	Toyobo	QPX-101T QPX-101
THUNDERBIRD™ Probe qPCR Mix (40 / 200 reactions)	Toyobo	QPS-101T QPS-101



cDNA Synthesis

DESKRIPSI	BRAND	CATALOG NO
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (100 reactions)	Thermo Scientific	K1622
ReverTra Ace™ qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (200 reactions)	Toyobo	FSQ-301
SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (50/250 reactions)	Meridian Bioscience	BIO-65053 BIO-65054

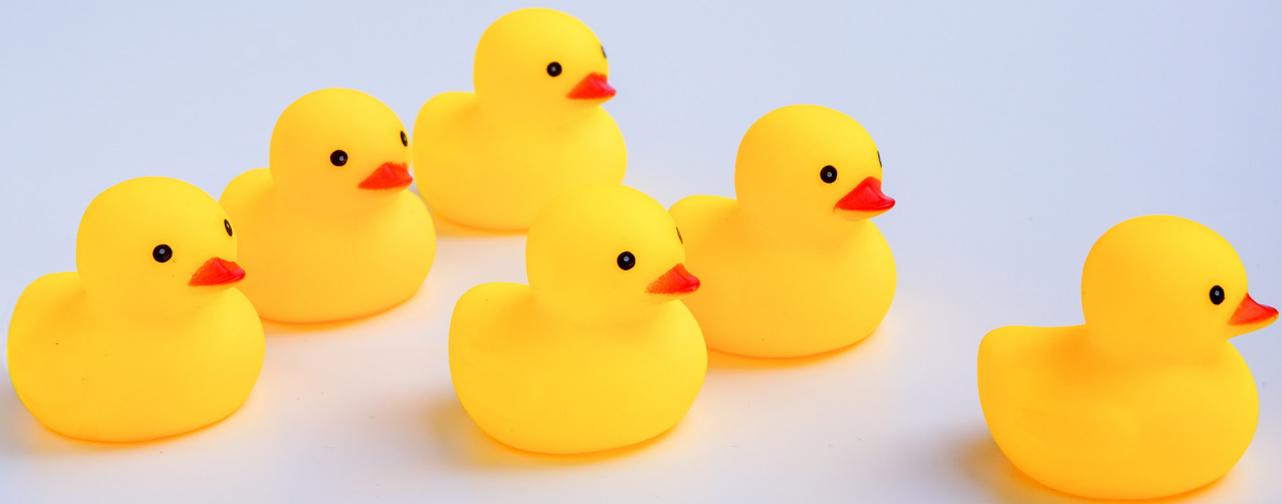


Positive Control

DESKRIPSI	BRAND
gBlocks™ Gene Fragments (125 – 250 bp)	IDT
gBlocks™ Gene Fragments (251 – 500 bp)	IDT

Replikasi

Biologis vs Teknis



Strategi Optimal dalam Eksperimen qPCR

Eksperimen qPCR, khususnya dalam studi terkait ekspresi gen melibatkan dua jenis replikasi yang berbeda untuk memastikan hasil yang akurat. Replikasi teknis, yaitu pengulangan reaksi qPCR, digunakan untuk mengurangi *noise* teknis dan meningkatkan presisi pengukuran. Namun, pengukuran ulang ini tidak boleh digunakan untuk pengujian statistik terkait hipotesis biologis. Sebaliknya, replikasi biologis, yang melibatkan kultur sel yang berbeda atau individu/spesimen

yang berbeda, diperlukan untuk memperoleh kesimpulan biologis yang valid dari eksperimen. Jumlah replikasi yang dibutuhkan bergantung pada tujuan dan desain eksperimen. Secara umum, setiap sampel eksperimen dan kontrol yang akan dibandingkan memerlukan setidaknya 3 replikasi biologis dan 3 replikasi teknis untuk mengurangi kesalahan pengukuran, seperti yang disebabkan oleh kesalahan *pipetting*. Jika tujuan eksperimen adalah untuk menarik kesimpulan statistik, minimal 3 replikasi biologis diperlukan. Namun, jika

qPCR dilakukan untuk mendeteksi perbedaan kecil dalam ekspresi gen atau membutuhkan tingkat kepercayaan yang lebih tinggi, seperti dalam aplikasi diagnostik, lebih banyak replikasi disarankan. Sebagian besar penelitian memerlukan ukuran sampel yang lebih besar untuk meningkatkan validitas hasil. Namun, dalam studi berskala besar yang melibatkan banyak sampel dengan replikasi terbatas, metode ini sering kali cukup asalkan dilakukan oleh peneliti yang berpengalaman (NI).

KUANTIFIKASI ABSOLUT VS RELATIF DARI EKSPRESI GEN PADA qPCR



Data yang dihasilkan dari RT-qPCR dalam studi terkait ekspresi gen dapat dianalisis dengan dua metode kuantifikasi, yaitu kuantifikasi absolut dan kuantifikasi relatif. Metode kuantifikasi absolut bergantung pada plot standar yang dibangun dari konsentrasi standar yang diketahui untuk mengukur jumlah salinan sebenarnya dari target tertentu, sehingga dianggap lebih informatif dan andal untuk perbandingan. Namun, kuantitas target dalam sampel hanya dapat dievaluasi dengan akurasi yang memadai jika menggunakan kurva standar yang dikarakterisasi dengan baik [1]. Pendekatan ini juga memiliki kelemahan karena tidak dapat mengatasi variabilitas yang mungkin muncul antar sampel atau dalam sampel yang sama akibat proses eksperimen. Berbagai bahan telah digunakan sebagai standar, seperti urutan DNA target yang diperbanyak dengan PCR [2], plasmid yang mengandung DNA target [3] atau DNA yang dibuat secara komersial [4]. Keandalan kurva standar dalam qPCR sangat penting, sehingga banyak penelitian dilakukan untuk menentukan gen target yang paling tepat untuk analisis. Standar biasanya digunakan untuk waktu yang lama, sehingga stabilitasnya menjadi faktor utama yang sering terlupakan. Stabilitas ini sangat penting, terutama ketika memilih standar untuk eksperimen jangka panjang, di mana sampel harus dibandingkan secara akurat dari waktu ke waktu, maupun untuk eksperimen jangka pendek [5]. Berbeda dengan kuantifikasi absolut, kuantifikasi relatif mengukur perubahan relatif dalam tingkat ekspresi mRNA. Metode ini menentukan perubahan tingkat mRNA yang stabil untuk suatu gen di berbagai sampel dan ekspresi relatifnya terhadap tingkat RNA lain. Kuantifikasi relatif tidak memerlukan kurva kalibrasi atau standar dengan konsentrasi yang diketahui, dan RNA referensi dapat berupa transkrip apa pun selama sekuennya diketahui [4]. Unit yang digunakan untuk menyatakan kuantitas relatif tidak terlalu penting, sehingga hasilnya dapat dibandingkan di berbagai eksperimen RT-qPCR [6]. Metode ini sangat cocok untuk menyelidiki perubahan kecil dalam ekspresi gen secara fisiologis. Biasanya, gen referensi yang diekspresikan secara konstan (seperti *housekeeping gene*) dapat dipilih sebagai gen referensi. Gen referensi ini dapat diperkuat dalam *tube* yang sama dalam uji *multiplex* (sebagai kontrol endogen) atau dalam *tube* terpisah (sebagai kontrol eksogen) [7]. Kuantifikasi absolut digunakan di berbagai bidang seperti mikrobiologi, teknologi pangan, dan bioteknologi untuk mengukur jumlah mikroorganisme, bahan pencemar, atau jumlah salinan DNA dalam suatu komoditas. Sebaliknya, kuantifikasi relatif lebih sering diterapkan dalam bidang genomik dan transkriptomik fungsional untuk menganalisis ekspresi gen dalam eksperimen biologis [8] (NI).

Referensi:

- [1] Fu, J., Li, D., Xia, S., Song, H., Dong, Z., Chen, F., Sun, X., Tang, Z., 2009. Absolute quantification of plasmid DNA by real-time PCR with genomic DNA as external standard and its application to a biodistribution study of an HIV DNA vaccine. *Anal. Sci.* 25, 675
- [2] Leong, D.T., Gupta, A., Bai, H.F., Wan, G., Yoong, L.F., Too, H.P., Chew, F.T., Hutmacher, D.W., 2007. Absolute quantification of gene expression in biomaterials research using real-time PCR. *Biomaterials* 28, 203–210
- [3] Whelan, J.A., Russel, N.B., Whelan, M.A., 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR. *J. Immunol. Meth.* 278, 261–26
- [4] Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002 Aug;29(1):23-39. doi: 10.1677/jme.0.0290023
- [5] Dhanasekaran R, Kooby DA, Staley CA, Kauh JS, Khanna V, Kim HS. Comparison of conventional transarterial chemoembolization (TACE) and chemoembolization with doxorubicin drug eluting beads (DEB) for unresectable hepatocellular carcinoma (HCC). *J Surg Oncol.* 2010 May 1;101(6):476-80. doi: 10.1002/jso.21522
- [6] Hellemans J, Mortier G, Coucke P, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2006) qBase: open source relative quantification software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data (submitted to *Biotechniques*)
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25(4): 402–408
- [8] Harshitha R, dan Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ.* 2021 Sep;49(5):800-812. doi: 10.1002/bmb.21552

Validasi Hasil RNA-Seq dengan qPCR

Metode Independen yang Sangat
Disarankan untuk Memastikan
Akurasi Data



RNA sequencing (RNA-Seq) saat ini semakin populer dalam dunia penelitian biologi molekuler. Sebagai teknik *high-throughput* yang mampu menghasilkan data dalam jumlah besar, RNA-Seq menyediakan informasi yang mendalam mengenai pola ekspresi gen secara *global*. Hal tersebut menjadikan RNA-Seq sebagai pilihan utama dalam studi transkriptomik.

Namun, meskipun RNA-Seq saat ini diakui sebagai metode yang unggul dalam *proiling* ekspresi gen, teknik ini tidak luput dari keterbatasan. Bias *library preparation*, kesalahan selama proses sekuensing, hingga masalah normalisasi dapat mempengaruhi kualitas dan interpretasi data. Selain itu, kedalaman sekuensing juga sangat mempengaruhi sensitivitas dalam mendeteksi transkrip dengan kelimpahan rendah. [1] Oleh karena itu, validasi hasil RNA-Seq dengan menggunakan metode independen sangat disarankan untuk memastikan akurasi data (YP).

qPCR Sebagai Metode Validasi Hasil RNA-Seq yang Sensitif dan Spesifik



Quantitative PCR (qPCR) adalah metode independen yang banyak digunakan untuk memverifikasi hasil RNA-Seq. Penggunaan teknologi yang berbeda untuk mengukur parameter yang sama dalam suatu sampel dapat membantu meningkatkan kepercayaan terhadap data yang diperoleh. Misalnya, pada RNA-Seq dengan kedalaman sekuensing yang terbatas, RNA-Seq sering kali kurang akurat dalam mendeteksi transkrip dengan kelimpahan rendah. Dalam kasus seperti ini, qPCR yang lebih sensitif dan spesifik, dapat digunakan untuk memvalidasi keberadaan transkrip tersebut, memberikan bukti tambahan terhadap hasil RNA-Seq. Contoh lain adalah ketika jumlah pengulangan biologis yang digunakan

dalam RNA-seq terbatas. Dalam situasi tersebut, kita mungkin bertanya – tanya, apakah ada reproduktifitas secara biologis? atau apakah transkrip - transkrip yang terdeteksi tersebut akan menunjukkan pola ekspresi yang konsisten pada sampel lain dengan perlakuan serupa? Untuk menjawabnya, qPCR dapat digunakan sebagai metode validasi pada sampel biologis lain. Jika hasil qPCR dari sampel tersebut sesuai dengan data RNA-Seq, maka hal tersebut memberikan bukti bahwa pola ekspresi gen yang terdeteksi melalui RNA-Seq dapat direproduksi secara biologis. Selain itu, saat ini juga sudah banyak perangkat lunak yang tersedia yang dapat membantu kita memilih gen untuk divalidasi dengan qPCR.

Bagaimana Memilih Gen untuk Validasi qPCR?

Terdapat beberapa pendekatan yang dapat digunakan dalam memilih gen untuk divalidasi:



Gen yang relevan dengan penelitian: Pilih gen yang berkaitan dengan topik penelitian yang sedang dilakukan. Misalnya, jika sedang mempelajari respons stres, kita dapat memilih gen yang diketahui berperan dalam respon stres tersebut.



Gen dengan pola ekspresi unik: Gen yang memiliki pola ekspresi yang menarik pada hasil RNA-Seq juga dapat digunakan sebagai kandidat yang baik untuk validasi.



Referensi dari literatur: Kita juga dapat mengacu pada publikasi terbaru dalam bidang penelitian yang sedang dilakukan, sehingga dapat membantu mengidentifikasi gen yang relevan yang dapat dipilih untuk divalidasi.

Salah satunya adalah **GSV** atau **Gene Selector for Validation** [2], yang dapat mengidentifikasi gen variabel dan gen referensi terbaik untuk divalidasi dalam data transkriptom. Selain itu, terdapat juga perangkat lunak lain seperti **OLIVER** [3] dan **NormFinder** [4], yang dapat menganalisis data *microarray* guna menentukan kandidat gen untuk divalidasi. qPCR merupakan teknologi dewasa yang sudah teruji dan juga sudah menjadi *gold standard* dalam kuantifikasi ekspresi gen. Penggunaan qPCR untuk memvalidasi hasil RNA-Seq memberikan keselarasan (*agreement*) antara dua metode yang berbeda. Hal ini tidak hanya memperkuat argumen bahwa fenomena yang diamati dari RNA-Seq benar-benar nyata, tetapi juga meningkatkan kepercayaan diri terhadap data RNA-Seq yang dihasilkan (YP).

Referensi:

[1] Shi, H., Zhou, Y., Jia, E., Pan, M., Bai, Y., & Ge, Q. (2021). Bias in RNA-seq Library Preparation: Current Challenges and Solutions. In *BioMed Research International* (Vol. 2021). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/6647597>

[2] de Brito, M. W. D., de Carvalho, S. S., Mota, M. B. dos S., & Mesquita, R. D. (2024). RNA-seq validation: software for selection of reference and variable candidate genes for RT-qPCR. *BMC Genomics*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10511-y>

[3] Chan, O. Y. W., Keng, B. M. H., & Ling, M. H. T. (2014). Correlation and variation-based method for identifying reference genes from large datasets. *Electronic Physician*, 6(1), 719–727. <https://doi.org/10.14661/2014.719-727>

[4] Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Falck orntoft, T. (2004). Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. In *CANCER RESEARCH* (Vol. 64)

LIFE SCIENCE GAZETTE

Gene Expressions

How RNA Shapes Us

May 2025

PT. Genetika Science Indonesia

Rukan Great Wall Blok C No. 19-21
Green Lake City, Kel. Gondrong, Kec.
Cipondoh, Kota Tangerang, Banten 15147,
Indonesia.

+62 21 5433 2034

+62 21 5433 2425

+62 21 5433 2701

www.ptgenetika.com

www.instagram.com/genetikascience

www.linkedin.com/company/genetikascience

www.facebook.com/GenetikaScience

