

**RESUME WORKSHOP**  
**ANALISIS METABARCODING DAN METAGENOME DENGAN**  
***NEXT GENERATION SEQUENCING***

Universitas  
**Esa Unggul**

**Dr. Henny Saraswati, S.Si, M.Biomed**  
**NIK : 216040630**

Universitas  
**Esa Unggul**

**PRODI BIOTEKNOLOGI**  
**FAKULTAS ILMU-ILMU KESEHATAN**  
**UNIVERSITAS ESA UNGGUL**

Universitas  
**Esa Unggul**

Universitas  
**Esa Unggul**

**AGUSTUS 2018**

## Pendahuluan

Metode *Next Generation Sequencing* (NGS) dalam memetakan sekuen DNA suatu organisme merupakan metode yang semakin diperlukan saat ini. Riset-riset yang menggunakan hasil NGS pun juga semakin banyak dilakukan dibandingkan 5 tahun yang lalu. Riset-riset semacam ini menjadi salah satu primadona bagi peneliti yang memiliki ketertarikan terhadap biodiversitas.

Indonesia juga tidak mau kalah. Sebagai negara dengan kekayaan biodiversitas tertinggi ke-3 di dunia, Indonesia memiliki potensi besar dalam riset ini. Sumber daya manusia dan peralatan yang mumpuni dalam mengolah data NGS di Indonesia sangat diperlukan. Oleh karena itu, pelatihan dalam analisis data NGS sering dilakukan beberapa institusi dalam negeri untuk mempersiapkan pengolahan data NGS ini.

Salah satunya adalah pelatihan atau workshop yang dilakukan oleh Laboratorium Genetika dan Pemuliaan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pelatihan ini mengambil tema analisis metabarcoding dan metagenome menggunakan data hasil NGS. Metabarcoding dan metagenome dipilih sebagai tema dalam pelatihan kali ini dikarenakan kedua metode ini menggunakan penanda molekuler untuk mengidentifikasi takson tertentu.

Istilah "DNA Barcoding" merupakan istilah yang sering diterapkan untuk mengidentifikasi takson tertentu dengan menggunakan penanda molekuler yang sudah dikenal. Pengidentifikasian ini dilakukan pada suatu lingkungan yang memiliki bermacam-macam spesies. Dari beberapa spesies ini kita bisa mendapatkan DNA yang beragam pula. Teknik Metabarcoding untuk identifikasi menggunakan penanda molekuler yang sudah diketahui seperti 16S/18S rRNA atau Cytochrome Oxidase I (COX/COI).

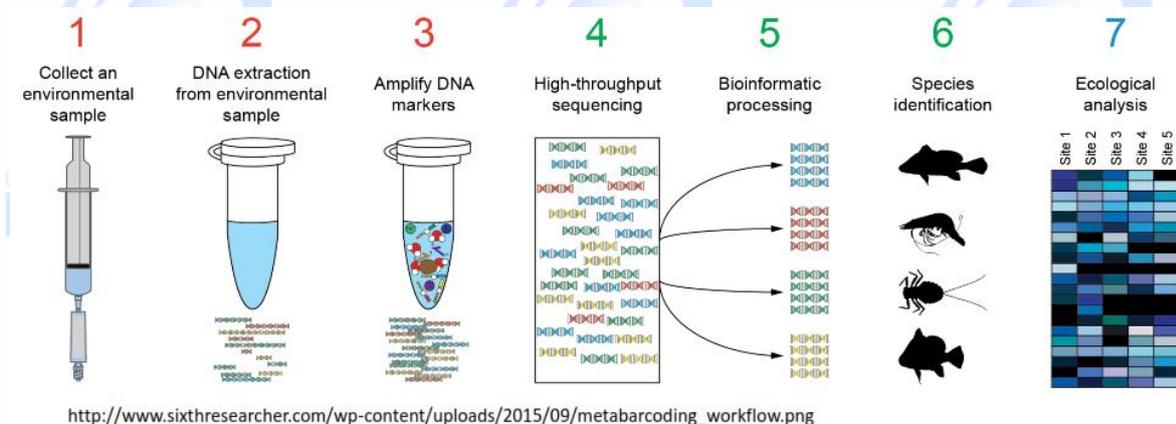
Pemanfaatan metabarcoding sangat luas, mulai dari pemanfaatan di bidang kesehatan hingga ekologi. Untuk pemanfaatan di bidang kesehatan salah satu riset yang ada adalah metabarcoding terhadap metabiome (semua mikroba) yang ada di perut manusia (The Integrative HMP [iHMP] Research Network Consortium, 2014). Untuk bidang ekologi dapat digunakan untuk memetakan mikrobiome di wilayah tertentu yang unik.

Pelatihan yang dilaksanakan di UGM kali ini mengajak para peserta untuk memahami dasar metabarcoding yang dilengkapi dengan praktek langsung. Untuk pelatihan ini, peserta diajak untuk melakukan metabarcoding contoh sampel mikrobioma yang ada di usus manusia menggunakan penanda molekuler 16S/18S rRNA. Perangkat lunak yang digunakan adalah Mothur yang tersedia secara online di Galaxy, kemudian hasilnya akan divisualisasikan menggunakan perangkat lunak MEGAN.

## Rangkaian Kegiatan

Kegiatan dilakukan pada tanggal 30 Juli - 31 Juli 2018, bertempat di Laboratorium Genetika dan Pemuliaan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Acara dimulai dengan registrasi pada pukul 07.30-08.00 WIB dan kemudian dilanjutkan dengan pembukaan acara workshop oleh Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr, Sc sebagai Dekan Fakultas Biologi, UGM. Acara kemudian dilanjutkan dengan presentasi dari narasumber I yaitu Matin Nuhamunada, Msc. Beliau membawakan materi mengenai Pengantar Analisis Metabarcoding Menggunakan NGS. Pada presentasinya Bapak Matin menjelaskan bahwa metabarcoding merupakan identifikasi sekuen DNA melalui penanda molekuler/genetik tertentu untuk menentukan dari spesies apa DNA itu berasal. Hal ini sering juga disebut dengan *DNA Barcoding*. Tentu saja hal ini dapat dilakukan dengan mencocokkan pada database yang data. Penanda atau marker yang digunakan juga ditentukan berdasarkan kriteria-kriteria tertentu, seperti : merupakan penanda yang terstandarisasi (merupakan konsensus), berupa sekuen DNA yang pendek dan conserved (tidak banyak variasi) pada taxon tertentu, dapat digunakan dalam sequencing tanpa memerlukan primer spesifik spesies tertentu dan memiliki variasi sekuen yang cukup besar antar spesies namun cukup kecil untuk intra spesies. Contoh marker yang sering digunakan adalah 16S/18S rRNA, Mt COI, rbcL dan matK (Kloroplas), ITS (Internal transcribed Spacer).

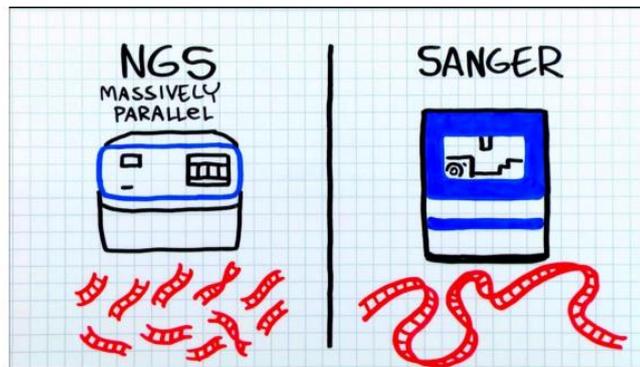
Metabarcoding ini dapat digunakan dalam memahami komunitas biologi yang ada di lingkungan, dengan cara mengidentifikasi sekuen DNA yang sampelnya diambil langsung dari lingkungan (dari tanah, air dan udara). Hal ini sering disebut dengan eDNA atau *Environmental DNA*. Langkah-langkah yang bisa dilakukan pada eDNA adalah : (1) pengambilan sampel dari tanah, air atau udara, (2) ekstraksi DNA, (3) amplifikasi DNA hasil isolasi dengan primer barcode, (4) sekuensing hasil amplifikasi DNA dengan *Next Generation Sequencing*, (5) identifikasi taxa dengan membandingkan pada database yang ada (Gambar 1).



Gambar 1. Langkah-langkah dalam eDNA

Dalam proses metabarcoding diperlukan *High Troughput Sequencing*, dalam hal ini adalah *Next Generation Sequencing*. Seperti sudah diketahui, bahwa metode sekuensing yang sering

digunakan saat ini adalah metode Sanger. Namun berbeda dengan Sanger, sekuensing dengan NGS menghasilkan data yang lebih banyak dalam waktu yang sangat singkat, sehingga disebut dengan *Parallel sequencing* (Gambar 2). Platform yang mendukung NGS saat ini ada beberapa, yaitu Illumina MiSeq/HiSeq (Illumina, Inc), Roche 454 (F.Hoffmann-La Roche, Ltd) dan SOLiD (Thermo Fisher Scientific, Inc). Selain platform-platform di atas, masih ada beberapa yang akan dikembangkan.



<https://www.thermofisher.com/blog/wp-content/uploads/sites/9/2015/09/Capture2.jpg>

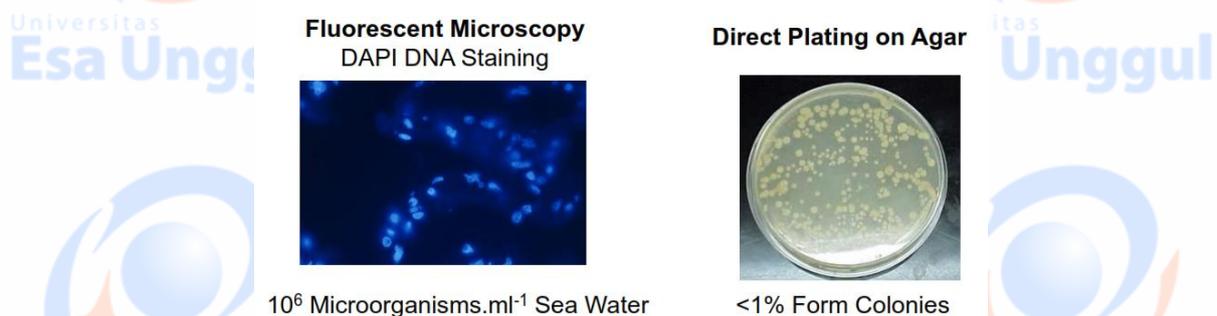
Gambar 2. Perbandingan antara NGS dengan metode Sanger

Walaupun sudah banyak platform canggih yang diperlukan untuk NGS, namun output atau data yang dihasilkan harus dianalisis lebih lanjut untuk dapat menjawab beberapa pertanyaan yang muncul. Seperti pertanyaan : ada mikroba apa saja yang terdapat di sampel lingkungan tertentu? Apa yang fungsi dari mikroba-mikroba ini? Bagaimana mereka bisa melakukan fungsi ini?

Saat ini metabarcoding banyak digunakan untuk analisis mikrobioma. Mikrobioma adalah komunitas mikroorganisme (baik bakteri, jamur dan virus) yang menghuni habitat tertentu (misal pada tanah). Analisis mikrobioma ini sebenarnya telah dilakukan dengan beberapa cara lain seperti kultur pada medium, DNA fingerprinting, analisis fungsi metaboliknya ataupun juga dengan menganalisis antigen yang dimilikinya, namun ada beberapa kelemahan pada beberapa metode ini. Seperti penumbuhan mikroba pada medium kultur. Terdapat fenomena *Great Plate Count Anomaly*, dimana pada sampel air laut terdapat sejumlah besar mikroba ( $10^6$ /ml air laut) yang dapat diamati dengan mikroskop fluoresens. Namun, ketika sampel yang sama ditumbuhkan pada medium agar hanya <1% mikroba yang dapat hidup. Hal ini berarti ~99% mikroba tidak dapat ditumbuhkan dengan penyebab tertentu (Gambar 3). Tentu saja fenomena ini dapat berpengaruh pada hasil penelitian. Kasus yang sama juga dapat ditemukan pada sampel lain semisal sampel tanah. Oleh karena itu penggunaan metabarcoding dapat membantu mengatasi masalah ini.

Metabarcoding dapat dilakukan dengan menggunakan 16S/18S rRNA sebagai marker karena dapat ditemukan pada semua prokariota, tidak mengalami rekombinasi, memiliki bagian yang sangat conserved dan bagian yang lain sangat bervariasi, serta memiliki beberapa database referensi yang dapat digunakan. Referensi database rRNA yang dapat digunakan adalah SILVA (<https://www.arb->

silva.de/), RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/>), dan GREENGENES (<http://greengenes.secondgenome.com/>). Masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan tersendiri. Setiap peneliti yang hendak menggunakan masing-masing database umumnya memiliki preferensi yang disesuaikan dengan tujuan penelitian.



Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.* 1985;39:321–346.

Gambar 3. Fenomena *Great Plate Count Anomaly*

Terdapat beberapa pipeline (alur kerja) untuk analisis mikrobioma yang digunakan, yaitu MG-RAST, QIIME dan Mothur. Semuanya berupa open source dan memiliki karakteristik tertentu.

Dalam kegiatan analisis metabarcoding, peneliti sering disalahartikan metagenomik. Kedua istilah ini sering terbalik-balik dalam penggunaannya. Sebenarnya kedua istilah ini sedikit berbeda. Jika metabarcoding adalah identifikasi DNA berdasarkan marker spesifik suatu taxa, maka metagenomik mengidentifikasi mikrobioma menggunakan shotgun sequencing untuk semua gen dan genom dalam sebuah sampel.

Hal-hal di atas merupakan poin-poin yang diberikan oleh Bapak Martin Nuhamuda, M.Sc. Sedangkan materi kedua diberikan oleh Bapak Setia Permana, PhD. Beliau sejatinya bukanlah biologis atau bioteknologis, tetapi adalah statistikawan. Bidang riset yang ditekuni merupakan bioinformatika yang merupakan ilmu baru yang multidisiplin, memerlukan beberapa keahlian baik dari biologis, genetikawan, matematikawan, ahli computer, ahli biokimia, dll. Oleh karena itu, Setia Permana, PhD mau tidak mau banyak mempelajari mengenai biologi molekuler. Beliau sangat berpengalaman dengan aplikasi data NGS untuk analisis variasi genetik. Pada presentasinya, beliau memaparkan bahwa data sekuensing (data sekuen gen/DNA) pada makhluk hidup sangat diperlukan pada riset-riset biologi molekuler. Hal ini penting untuk mengetahui peran dari gen-gen tersebut. Sebelum Human Genome Project berjalan, proses sekuensing sangat lama. Proses ini sering disebut dengan sekuensing Sanger, karena penemu pertama dari metode ini adalah kelompok riset Frederick Sanger (Cambridge University) pada tahun 1977. Namun, saat ini metode yang terbaru memungkinkan proses sekuensing berlangsung lebih cepat dan mampu membaca urutan nukleotida DNA yang lebih panjang yang disebut dengan metode *Next Generation Sequencing* (NGS). Sebagai gambaran, apabila menggunakan metode Sanger memerlukan beberapa hari, sedangkan dengan

menggunakan NGS hanya memerlukan beberapa jam. Sampai saat ini beberapa pabrikan telah memproduksi mesin-mesin NGS yang kompetitif, masing-masing mempromosikan keunggulan dalam jangka waktu operasi sekuensing, besaran sekuen DNA yang bisa disekuensing, akurasi dan biaya yang diperlukan. Kompetisi ini membuktikan betapa data NGS sangat diperlukan dalam penelitian-penelitian biologi molekuler saat ini. Alur kerja penggunaan data NGS adalah data mentah yang kemudian dianalisis menggunakan beberapa software sehingga dihasilkan hasil akhir yang menjadi kesimpulan. Meskipun NGS merupakan suatu metoda terkini dalam sekuensing, namun hasil akhir analisisnya tetap memerlukan sekuensing Sanger sebagai konfirmasi atau validasi hasil akhir yang didapat. Karena hasil analisis data NGS baru merupakan prediksi, sedangkan ini harus divalidasi dengan sekuensing Sanger. Data NGS dapat digunakan dalam beberapa topik penelitian seperti metagenomik, genomik kanker, epidemiologi genomik, epigenomik, variasi gen manusia, dll. Selain itu, Bapak Setia Permana, PhD juga mengingatkan betapa pentingnya bioinformatika dalam riset, seperti riset mengenai farmakogenomik, deteksi dini penyakit yang diturunkan (herediter), pengembangan diagnosis penyakit, terapi gen, perbaikan nilai gizi, sumber energi baru bahkan dalam pembentukan senjata biologi (*biological weapons*).

Saat ini di Indonesia sendiri sudah terdapat 12 mesin NGS yang digunakan dalam berbagai riset, seperti tentang Avian Influenza, sekuensing whole genome untuk tanaman kelapa, coklat, padi, pisang dan kedelai, identifikasi patogen pada ikan, sekuensing *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten obat, analisis ekspresi gen pada kanker payudara, dll. Namun, terdapat beberapa tantangan yang dihadapi untuk penggunaan NGS ini di Indonesia, di antaranya belum maksimalnya penggunaan alat ini dikarenakan banyak riset-riset yang berdiri sendiri masih belum banyak kolaborasi riset. Meskipun demikian hal ini menjadi potensi akan makin berkembangnya riset-riset dengan menggunakan data NGS di Indonesia.

Setelah Bapak Setia Permana, PhD menyelesaikan paparannya, acara dilanjutkan dengan praktikum Miseq Data Filtering using Mothur. Praktikum ini sendiri memakan waktu yang cukup panjang dikarenakan banyak langkah-langkah yang harus dilakukan. Dikarenakan pada praktikum terdapat cukup banyak asisten, maka peserta merasa sangat terbantu dalam sesi ini. Sesi ini kemudian mengakhiri hari I workshop.

Hari ke-2 workshop diisi dengan praktikum menggunakan laptop masing-masing. Tidak ada presentasi yang diberikan. Praktikum sesi 1 berupa Exploratory Analysis of Microbiome Data using MEGAN. Pada sesi ini, peserta diajak dulu untuk menelusuri data mikrobioma yang ada di EBI Metagenomics (<https://www.ebi.ac.uk/metagenomics/>). Situs ini merupakan database mikrobioma yang disusun oleh European Bioinformatics Institute (EBI). Database yang ada disini cukup lengkap dan dikelompokkan berdasarkan habitat tempat hidupnya, semisal mikrobioma yang ada di perut

manusia, mikrobioma yang ada di perairan ataupun mikrobioma yang ada di limbah. Peserta kemudian memilih dan mengunduh database salah satu mikrobioma yang akan digunakan dalam praktikum, yaitu mikrobioma yang ada pada feses tikus.

Kemudian praktikum dilanjutkan ke sesi ke-2 yaitu Exploratory Analysis of Microbiome Data Using MEGAN (Functional Analysis). Pada sesi ke-2 ini merupakan praktikum lanjutan dari sesi ke-1. Database mikrobioma yang sudah didapatkan sebelumnya merupakan data dengan kompleksitas komunitas mikroba yang tinggi. Sehingga diperlukan suatu analisis eksploratif yang dapat membantu pengambilan keputusan secara visual. Oleh karena itu digunakanlah perangkat lunak MEGAN6 (<http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan6/welcome/>). Langkah yang pertama kali dilakukan adalah mengunduh perangkat lunak ini kemudian diinstal pada laptop masing-masing. Kemudian database mikrobioma dari feses tikus yang telah kita dapatkan tadi dianalisis menggunakan perangkat lunak ini. Langkah-langkah praktikum cukup jelas disebutkan dalam modul praktikum. Praktikum sesi ke-2 ini berlangsung hingga sore dan mengakhiri workshop hari kedua.

Acara workshop kemudian ditutup oleh Kepala Laboratorium Genetika dan Pemuliaan, Ibu Dr. Dra. Tuty Arisuryanti, MSc. Beliau berharap bahwa materi yang disampaikan dapat berguna dalam menunjang penelitian-penelitian yang dilakukan para peserta. Selain itu juga beliau menginformasikan bahwa akan ada seminar internasional tahun depan yang akan digelar oleh fakultas biologi dan berharap bahwa para peserta dapat mengikuti acara ini. Acara kemudian ditutup dengan pemberian sertifikat dan foto bersama.

### **Kesimpulan**

Setelah mengikuti workshop kali ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Data NGS merupakan data yang sangat penting dalam riset bioinformatika dan diaplikasikan kedalam beberapa bidang, baik kesehatan, pangan, energi, maupun militer.
2. Terbuka celah penelitian dengan penggunaan data NGS untuk metabarcoding di Indonesia. Akan tetapi akan lebih baik, jika riset-riset ini merupakan riset kolaborasi sehingga pemanfaatan data NGS sangat efektif.
3. Metabarcoding merupakan salah satu riset yang sangat menarik dalam mengidentifikasi mikrobioma dalam habitat tertentu.
4. Diperlukan penyiapan sumber daya manusia serta infrastruktur yang memadai dalam riset metabarcoding menggunakan data NGS

Foto-foto Kegiatan





