

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan merupakan penelitian deskriptif, karena tidak melibatkan perlakuan khusus yang diberikan pada burung. Penelitian deskriptif merupakan penelitian untuk menggambarkan suatu hasil penelitian. Jenis penelitian deskriptif memiliki tujuan untuk memberikan deskripsi, penjelasan, dan validasi mengenai fenomena yang tengah diteliti. Dalam penelitian deskriptif, masalah yang dirumuskan harus layak untuk diangkat, mengandung nilai ilmiah, dan sifatnya tidak terlalu luas. Tujuan dari penelitian deskriptif juga tidak boleh terlalu luas dan harus menggunakan data yang bersifat fakta bukan opini (Ramdhan, 2021).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan menggunakan uji *in silico* yang akan dilaksanakan pada bulan Desember 2024 s.d. April 2025 di laboratorium Riset Bioteknologi, Universitas Pendidikan Indonesia. Penelitian ini melibatkan perangkat komputer yang sudah dilengkapi dengan perangkat lunak untuk merancang dan memvalidasi primer.

3.3 Alat dan Bahan

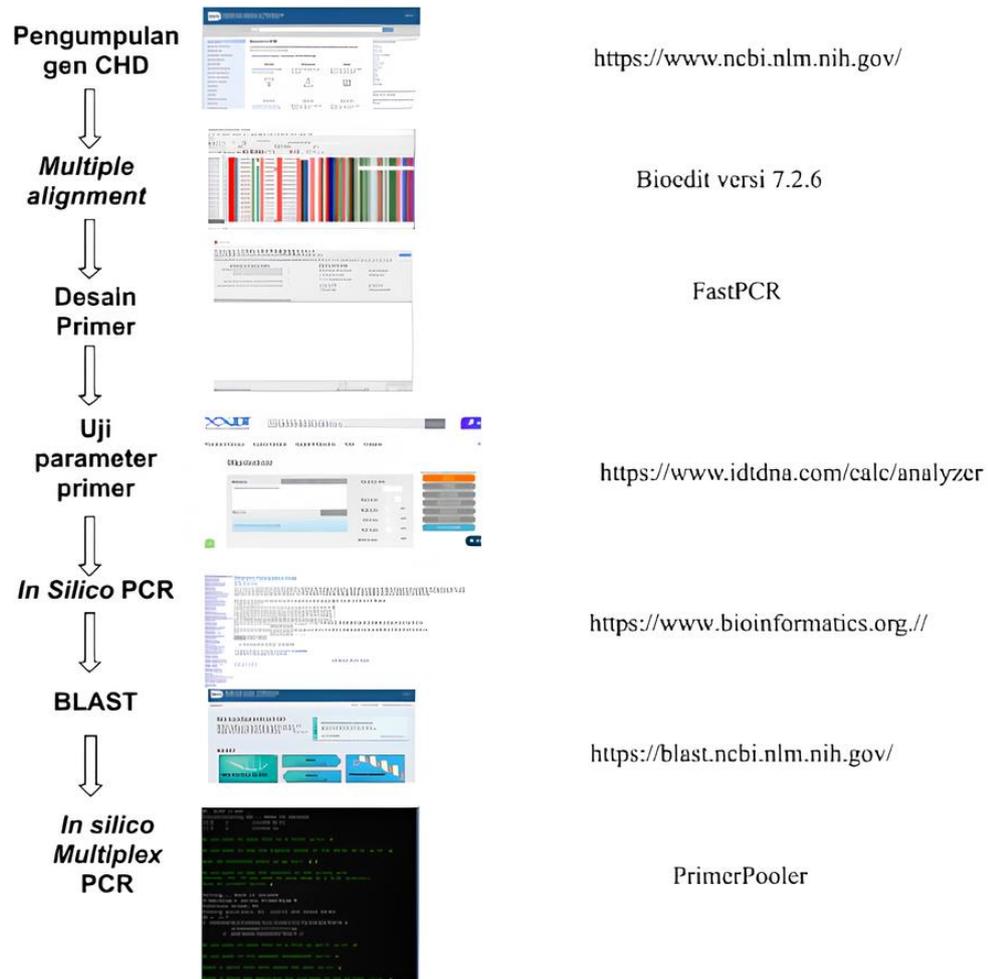
Alat dan bahan yang digunakan untuk penelitian *in silico* adalah alat yang berupa perangkat lunak, dapat dilihat pada **Tabel 3.1** Alat dan bahan pada penelitian ini bersifat *open source* atau dapat diakses oleh siapapun. Sampel yang digunakan berupa sekuen gen CHDW dan CHDZ dari berbagai spesies burung. Data diambil dari database *GenBank*.

Tabel 3. 1 Alat yang digunakan

No.	Alat	Spesifikasi
1.	Laptop Lenovo	Prosesor Intel(R) Core(TM) i3-6006U CPU @ 2.00GHz 2.00 GHz; Memori RAM 4GB
2.	Aplikasi Notepad	Menyimpan data sekuen
3.	Basis data sekuen	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
4.	<i>Multiple Alignment</i>	Bioedit versi 7.2.6
5.	Perancangan Primer	FastPCR
6.	Primer BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
7.	<i>In silico Multiplex PCR</i>	PrimerPooler
8.	Perangkat lunak Google Chrome	Versi 131.0.6778.109 (Build Resmi) (64bit)

3.4 Prosedur Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *in silico*. Studi *in silico* merupakan metode yang menggabungkan ilmu biologi dan komputasi dengan bantuan komputer dan perangkat lunak (Fakih *et al.*, 2021). Tahapan penelitian untuk merancang primer serta simulasi PCR secara *in silico* diuraikan dalam tahapan sebagai berikut **Gambar 3.1**.



Gambar 3. 1 Alur kerja umum dalam perancangan primer serta website dan Software bioinformatika yang digunakan

Metode perancangan primer pada penelitian ini adalah *multiplex primer*, sehingga memiliki beberapa perbedaan dibandingkan dengan primer biasa. perbedaan antara perancangan primer biasa dengan *multiplex primer* dapat dilihat pada **Tabel 3.2** berikut ini.

Tabel 3. 2 Perbedaan perancangan primer biasa dengan *multiplex primer*

Aspek	Primer Biasa	<i>Multiplex Primer</i>
Target primer	Primer yang dirancang hanya satu set primer <i>forward</i> dan <i>reverse</i> untuk satu target spesifik	Primer yang dirancang adalah untuk beberapa target gen dalam satu reaksi PCR
<i>Multiple alignment</i>	<i>Alignment</i> dilakukan pada satu gen CHD (CHDW dan CHDZ) untuk menentukan daerah konservatif	<i>Alignment</i> dilakukan: Gen CHDW saja Gen CHDZ saja Konsensus dari hasil <i>alignment</i> digunakan untuk perancangan primer
Penggunaan perangkat lunak	Bioedit untuk <i>multiple alignment</i> Primer3Plus untuk merancang primer PCR test untuk menguji primer	Bioedit untuk <i>multiple alignment</i> FastPCR untuk perancangan primer PCR test untuk menguji primer dan melihat panjang amplicon PrimerPooler untuk mengecek kompatibilitas primer
Validasi primer	Terhadap satu gen target	Terhadap beberapa gen target dalam satu reaksi PCR
Hasil perancangan primer	Satu set primer spesifik yang terdiri dari primer <i>forward</i> dan <i>reverse</i> untuk satu target	Dua set primer: Primer spesifik untuk CHDW (betina) Primer spesifik untuk CHDZ (jantan)

3.5 Pengumpulan data sekuen gen CHDW dan CHDZ

Sebelum melakukan perancangan primer, sekuen gen CHD dikumpulkan terlebih dahulu. Sekuen yang digunakan merupakan sekuen parsial dari gen CHDW dan CHDZ berdasarkan tiga familia yang terdiri dari 30 spesies burung. Pemilihan familia dan spesies dilakukan berdasarkan ketersediaan data di *Genbank*. Jumlah data sekuens yang dibatasi tidak lebih dari 30 bertujuan untuk menghindari variasi gen yang lebih tinggi, sehingga diharapkan primer yang akan dirancang dapat memiliki kemampuan amplifikasi yang lebih luas. Sekuens diambil dari laman *Genbank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan nomor akses yang tertera pada **Tabel 3.3**. Sekuens yang telah dikumpulkan, kemudian format FASTA dari sekuen disimpan pada aplikasi *Notepad* dalam format txt.

Tabel 3. 3 Data sekuens gen CHDW dan CHDZ tiga familia mencakup 30 spesies burung

No	Familia	Spesies (Nama Lokal)	Nomor Akses	Lokasi Distribusi
1.	Accipitridae	<i>Accipiter cooperii</i> (Elang cooper)	JX460775.1 JX460774.1	Amerika Utara
		<i>Aquila chrysaetos</i>	JX460771.1	Amerika Utara

No	Familia	Spesies (Nama Lokal)	Nomor Akses	Lokasi Distribusi
		(Elang emas)	JX460770.1	
		<i>Buteo jamaicensis</i> (Elang ekor merah)	KF425685.1 KF412787.1	Amerika Utara
		<i>Buteo swainsoni</i> (Swainson's hawk)	KF425697.1 KF412795.1	Amerika Utara
		<i>Circus cyaneus</i> (Hen harrier)	KF425686.1 KF412784.1	Amerika Utara, Eropa, Asia
		<i>Circaetus gallicus</i> (Short-toed snake eagle)	AY313609.1 AY313610.1	Eropa Selatan, Afrika Utara, Timur Tengah, Asia Tengah
		<i>Gyps bengalensis</i> (White-rumped vulture)	HQ236385.1 HQ236388.1	India
		<i>Gyps indicus</i> (Indian vulture)	HQ236386.1 HQ236387.1	India
		<i>Haliaeetus leucocephalus</i> (Bald eagle)	JX460790.1 JX460789.1	Amerika Utara
		<i>Parabuteo unicinctus</i> (Elang Harris)	KF425683.1 KF412786.1	Amerika Serikat
2.	Ardeidae	<i>Ardea alba</i> (Kuntul besar)	GU969107.1 GU969117.1	Seluruh dunia (kecuali kutub dan gurun)
		<i>Ardea cinerea</i> (Cangak abu)	GU969109.1 GU969119.1	Afrika, Eropa, Asia, Indonesia bagian barat (Pulau Dua)
		<i>Ardeola bacchus</i> (Blekok cina)	GU969108.1 GU969118.1	Cina bagian timur dan Jepang
		<i>Bubulcus ibis</i> (Kuntul kerbau)	GU969110.1 GU969120.1	Sumatera, Kalimantan, Jawa, Bali
		<i>Egretta eulophotes</i> (Chinese egret)	GU969111.1 GU969121.1	Asia Timur dan Asia Tenggara (Filipina dan Indonesia)
		<i>Egretta garzetta</i> (Little egret)	GU969112.1 GU969122.1	Afrika, Eropa, Australia, Asia (Jepang dan Indonesia: Sulawesi dan Maluku)
		<i>Egretta sacra</i> (Kuntul karang)	GU969113.1 GU969123.1	(Wallacea, Myanmar, Jepang, dan Polinesia)
		<i>Ixobrychus sinensis</i> (Bambangan kuning)	GU969114.1 GU969124.1	Wallacea, Siberia tenggara, India, Papua, Indonesia (Sulawesi)
		<i>Ixobrychus cinnamomeus</i> (Bambangan merah)	GU969115.1 GU969125.1	Indonesia (Sulawesi, Butung, Kepulauan Banggai, kepulauan Sula, Lombok, Sumbawa, Flores), Cina, dan India
		<i>Nycticorax nycticorax</i>	GU969116.1 GU969126.1	Eurasia, Eropa, Asia, Amerika

No	Familia	Spesies (Nama Lokal)	Nomor Akses	Lokasi Distribusi
		(Black-crowned night heron)		Utara, Amerika Selatan
3.	Psittacidae	<i>Agapornis roseicollis</i> (Rosy-faced lovebird)	KR108201.1 KF412781.1	Afrika
		<i>Amazona aestiva</i> (Blue-fronted amazon)	KF425690.1 JX460794.1	Amerika Selatan
		<i>Amazona ochrocephala</i> (Yellow-crowned amazon)	KR108203.1 KF412777.1	Amerika Tengah dan Amerika Selatan
		<i>Ara Macao</i> (Makaw kirmizi)	KF425691.1 KF412778.1	Amerika Tengah dan Amerika Selatan
		<i>Myiopsitta monachus</i> (Monk paeakeet)	JX460802.1 JX460801.1	Amerika Selatan
		<i>Pionites melanocephalus</i> (Black-headed parrot)	JX460796.1 JX460795.1	Amerika Selatan
		<i>Poicephalus meyeri</i> (Meyer's parrot)	JX460798.1 JX460797.1	Afrika Tengah dan Afrika Timur
		<i>Poicephalus senegalus</i> (Senegal parrot)	KF425692.1 KF412780.1	Afrika Barat
		<i>Psittacus erithacus</i> (Grey parrot)	KF425694.1 JX460793.1	Afrika Tengah dan Afrika Barat
		<i>Trichoglossus haematodus</i> (Perkici Pelangi)	MT081968.1 MT081967.1	Indonesia (Maluku, Papua, Nusa Tenggara, Sulawesi) dan Australia

3.6 Penjajaran (*Multiple Alignment*) sekuen gen CHD

Seluruh gen CHD disejajarkan menggunakan metode Clustal-W yang terintegrasi dari perangkat lunak Bioedit versi 7.2.6. Proses penjajaran dilakukan dengan *multiple sequence alignment* (MSA) untuk menyelaraskan lebih dari dua sekuens secara simultan. MSA dapat membantu untuk melihat daerah konservatif pada gen CHD. Hasil *alignment* disimpan dalam format yang diperlukan, seperti *aln.* untuk Clustal Format dan *.fasta* untuk Fasta format. Selanjutnya, dibuat sekuen konsensus untuk desain perancangan primer. Sekuen konsensus merupakan urutan representatif yang diperoleh dari proses MSA. Tepatnya, pada setiap posisi dalam penjajaran, urutan konsensus merepresentasikan nukleotida atau residu asam amino yang paling sering muncul. Urutan ini telah merangkum daerah yang konservatif dan memiliki signifikansi fungsional di antara urutan-urutan yang di analisis, sehingga sekuen konsensus ini dimanfaatkan dalam perancangan primer (Liljas, 2013).

Konsensus dibuat pada *software* yang sama yaitu BioEdit dengan menggunakan hasil MSA data sekuens sebelumnya, konsensus sekuens DNA dibuat dengan menggunakan fitur *create consensus sequence*. Setelah konsensus dibentuk, selanjutnya di salin untuk di simpan dalam bentuk FASTA format pada program NotePad.

3.7 Desain *Multiplex Primer*

Desain primer yang berkualitas tinggi sangat penting untuk memastikan keberhasilan semua eksperimen yang berbasis PCR, karena desain primer yang buruk dapat menyebabkan kegagalan PCR itu sendiri (Li *et al.*, 2024). Selain itu, desain primer dilakukan untuk meminimalkan pembentukan dimer primer dan amplifikasi non spesifik yang sangat penting dalam proses *multiplex* PCR untuk memastikan hasil yang akurat dan efisien (Xie *et al.*, 2022).

Desain primer dilakukan menggunakan perangkat lunak FastPCR. Adapun untuk langkah-langkah pengerjaan yang dilakukan untuk mendesain primer yaitu menyiapkan sekuens gen CHD dari spesies burung yang sudah didapatkan melalui situs resmi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pada tahap *multiple alignment* setiap kelompok Gen CHDW dan CHDZ dihasilkan konsensus yang selanjutnya akan digunakan sebagai dasar perancangan primer. Pada saat masuk ke perangkat lunak FastPCR, masing-masing konsensus dari hasil *alignment* Gen CHDW dan Gen CHDZ di salin pada kolom “*PCR Primer Design*” bagian “*Main Sequence*”, selanjutnya klik “*run*” yang disimbolkan oleh tanda panah berwarna hijau. Setelah FastPCR selesai memproses perancangan primer, selanjutnya kandidat primer akan dimunculkan pada bagian “*PCR primers design result*”.

Setelah primer dibuat, parameter primer diuji menggunakan OligoAnalyzer dari IDT melalui laman <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>, untuk mengidentifikasi struktur primer, seperti panjang basa, *GC content*, dan *melting temperature* (T_m). Selain itu, struktur sekunder yang dapat mempengaruhi efisiensi dan spesifisitas primer juga dilihat, seperti *hairpin*, *self-dimer*, dan *hetero-dimer*.

3.8 *In Silico* PCR melalui PCR Test

In silico PCR merupakan tahap yang penting untuk memastikan spesifisitas primer sebelum melakukan eksperimen di laboratorium (Kalendar *et al.*, 2024). Selain itu, *in silico* PCR dilakukan untuk memprediksi hasil PCR, meningkatkan

spesifisitas primer, dan mengoptimalkan kondisi eksperimental, sehingga dapat meningkatkan akurasi dan efisiensi perencanaan eksperimental dan interpretasi hasil (Waziri *et al.*, 2024).

Uji *in silico* PCR dilakukan menggunakan fitur PCR test yang tersedia pada situs Bioinformatics.org. Adapun tahapan *in silico* PCR tersebut meliputi (1) sekuens DNA dari gen CHD spesies burung yang ditargetkan disalin dalam bentuk format FASTA, kemudian ditambahkan pada kolom *input* sebagai *template*. (2) Pasangan primer yang telah dirancang sebelumnya di *input* dalam kolom primer *forward* dan *reverse* yang tersedia. (3) Setelah seluruh data dimasukkan, selanjutnya tombol “*submit*” di klik untuk menjalankan simulasi. (4) Terakhir, hasil akan ditampilkan dalam bentuk panjang amplikon, posisi primer pada *template* dan sekuens hasil amplifikasi.

3.9 Efektivitas Primer menggunakan Primer BLAST

Primer yang sudah dirancang kemudian di *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) untuk melihat daerah penempelan primer secara *in silico*. Hal ini bertujuan untuk menghindari pengikatan pada sekuen non-target. Langkah yang dilakukan, yaitu: (1) mengakses situs web NCBI, kemudian pilih primer *BLAST*. (2) memasukkan sekuen gen CHD target dalam format FASTA, lalu memasukkan sekuen *forward* dan *reverse* primer pada bagian "*Primer Parameters*", (3) memilih database refseq nt pada bagian "*Primer Pair Specificity Checking Parameters*", (4) memilih organisme target pada kolom "*Organism*", dan (5) mengatur parameter PCR seperti: *product size*, *primer melting temperature*, dan *GC content* sesuai kebutuhan (Ye *et al.*, 2012). Hasil *BLAST* akan menunjukkan posisi penempelan primer pada sekuen target dan kemungkinan amplifikasi non-spesifik pada genom organisme target.

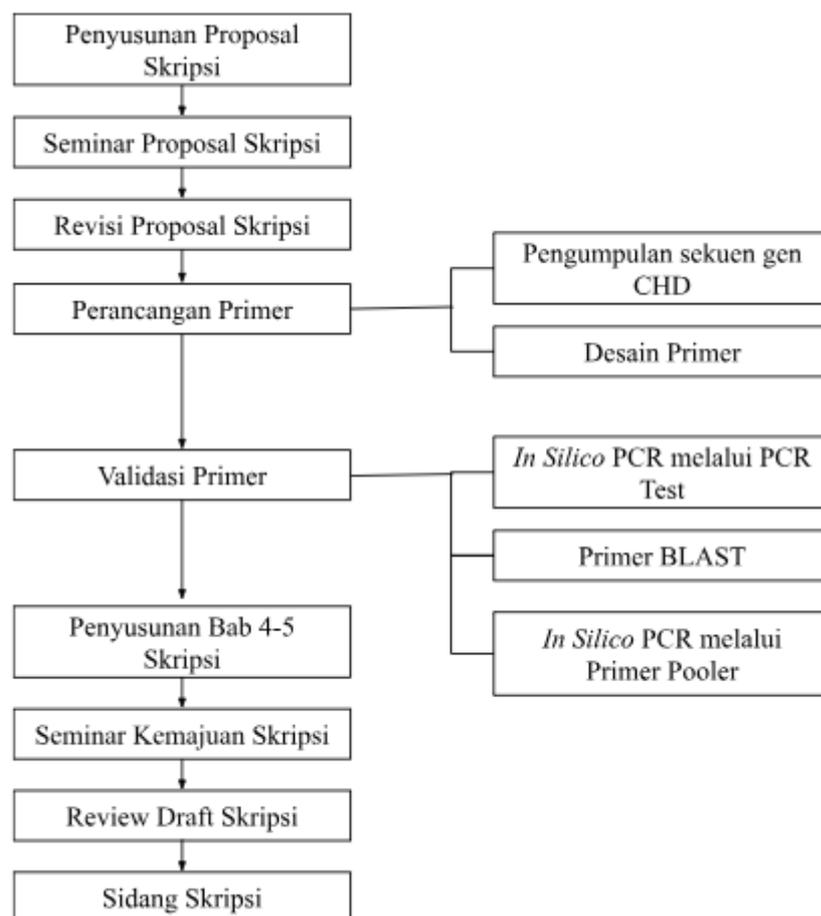
3.10 Analisis Multiplex PCR secara In Silico

Analisis *in silico multiplex PCR* untuk memvalidasi spesifisitas dan efisiensi pengikatan primer pada sekuen target dilakukan menggunakan *Software PrimerPooler*. Langkah-langkah analisis *multiplex PCR in silico* yaitu: (1) primer dalam format file .txt di buka pada *software PrimerPooler* (2) Hasil uji ΔG dipilih dengan nilai *threshold* paling kecil, yaitu ≥ -7 (Brown *et al.*, 2017). Setelah itu, akan muncul gen dan lokasi terjadinya dimer (3) data genom yang sesuai dengan primer

dicek. (4) Terakhir, akan dimunculkan hasil akhir yang menunjukkan keberhasilan dari primer yang diuji. Primer yang sudah berhasil atau sesuai, akan ditandai dengan tulisan berwarna hijau atau *all amplicon were found*, dan tidak ada *overlaps*, sedangkan primer yang tidak berhasil atau tidak sesuai akan ditandai dengan tulisan berwarna merah atau *amplicon not found* yang menandakan *multiplex primer* yang dilakukan belum terdeteksi.

3.11 Alur Penelitian

Alur penelitian yang akan dilakukan terdiri dari beberapa kegiatan yang tertera pada **Gambar 3.2** berikut ini.



Gambar 3. 2 Bagan Alur Penelitian