

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif yang didasarkan pada penelitian sebelumnya mengenai penemuan primer *multiplex* yang dapat mendeteksi adanya cemaran DNA babi yang hasilnya divisualisasikan pada agarose 1,5%. Berdasarkan penelitian tersebut, penelitian saat ini dirancang untuk membuktikan bahwa probe dapat lebih efektif mendeteksi adanya kontaminasi DNA babi dan tikus pada makanan olahan karena lebih spesifik dan hasilnya yang muncul secara *real-time* (Kusumawaty *et al.*, 2024).

Penelitian ini menggunakan sampel DNA yang diperoleh dari hati dan jantung ayam, ekor babi, ekor sapi, ekor tikus, mix DNA sampel, dan dari produk olahan seperti bakso sapi, nugget ayam, dan sosis sapi. Primer yang digunakan adalah kit primer 1 dan Taq2 dari setiap spesies hewan, serta menggunakan probe dari setiap jenis hewan. Setelah sampel diisolasi, sampel divisualisasi melalui elektroforesis. Sekuens gen untuk primer dan probe untuk sampel ayam, sapi, babi, dan tikus diambil melalui situs *Genebank* NCBI. Untuk simulasi dan optimalisasi primer dan probe dilakukan melalui *software* PrimerPooler. Real-time PCR dilakukan dengan menggunakan instrumen *real-time* PCR MyGo™ dan Agilent AriaDx™. Campuran reaksi mengandung SensiFast™ *master mix*. Dalam setiap pengaturan reaksi, digunakan kontrol tanpa DNA *template* (NTC) dengan hanya menggunakan air bebas nuklease. Semua reaksi qPCR dilakukan dalam rangkap dua ($n = 2$).

3.2 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama bulan Januari sampai Mei 2025. Lokasi penelitian dilakukan di beberapa lokasi yang berbeda. Tahap desain primer dan probe secara *in silico*, tahap isolasi DNA dari jaringan hewan dan produk olahan, tahap PCR konvensional, dan mix bahan qPCR dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Selanjutnya tahap pengukuran kualitas DNA dilakukan di Laboratorium Halal, Gedung Riset Sekolah Pascasarjana. Optimasi hasil qPCR dilakukan

di Laboratorium Bioteknologi, Gedung Riset Sekolah Pascasarjana dan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.3 Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini di antaranya adalah alat elektroforesis, visualisasi hasil elektroforesis, sentrifuge, PCR, *real-time* PCR, mikropipet, tips, *waterbath*, dan lain-lain, sedangkan untuk bahan-bahannya di antaranya adalah jantung ayam, ekor sapi, ginjal babi, ekor babi, ekor tikus, kit isolasi DNA, *Nuclease free water*, Gotaq Green Master Mix, Sensifast SYBR No. ROX, *ladder*, *loading dye*, gel agarose, buffer TBE, dan lain-lain. Daftar alat dan bahan yang digunakan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Laboratorium Halal, dan Laboratorium Biokimia Universitas Pendidikan Indonesia secara lengkap ditampilkan pada Lampiran I dan II.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Desain Primer dan Probe secara *In Silico*

a. Desain primer

Desain primer dilakukan untuk mendapatkan primer yang dapat digunakan untuk amplifikasi DNA dengan metode PCR. Keberhasilan amplifikasi DNA bergantung pada ketepatan primer yang digunakan karena primer PCR harus dapat membatasi daerah DNA yang akan diamplifikasi. Desain primer ini dilakukan secara *in silico*, yaitu merancang dan mendesain primer dengan bantuan program komputer melalui situs NCBI (ncbi.nlm.nih.gov). Data genom yang dipilih dari situs ini kemudian dicek homologinya lalu dibuat Primer-BLAST. Berdasarkan target sekuens gen mitokondria yang sesuai, primer untuk deteksi DNA khusus dibuat menggunakan perangkat NCBI Primer-BLAST. Untuk mencapai stabilitas ikatan yang optimal, standar desain utama termasuk panjang 18–25 basa, suhu leleh (T_m) 58–62 °C, dan kandungan GC 40–60%. Selanjutnya, IDT OligoAnalyzer digunakan untuk menganalisis struktur sekunder primer seperti tidak ada pembentukan self-dimer, hairpin, atau dimer yang signifikan. Kemudian, dilakukan juga simulasi PCR reaksi *singleplex* melalui PrimerPooler untuk memastikan kualitas primer.

b. Desain probe

Desain sekuens probe dilakukan menggunakan alat PrimerQuest IDT (idtdna.com/). Sekuens target gen mitokondria yang telah dikumpulkan dari database NCBI digunakan untuk mendesain probe Taqman. Kriteria desain termasuk panjang probe 20–30 basa, temperatur leleh (T_m) 68–70 °C, yang lebih tinggi sekitar 8–10 °C dibandingkan primer, dan kandungan GC 40–60% untuk memastikan kestabilan ikatan. Label fluorofor TexasRed pada ujung 5' dan quencher BHQ1 untuk *Gallus gallus*, CY5 pada ujung 5' dan quencher BHQ2 pada ujung 3' untuk *Bos taurus*, label fluorofor FAM pada ujung 5' dan quencher BHQ1 pada ujung 3' untuk *Sus scrofa*, dan label fluorofor HEX pada ujung 5' dan quencher BHQ1 pada ujung 3' untuk *Rattus norvegicus* digunakan pada eksperimen untuk memungkinkan identifikasi fluoresensi khusus selama amplifikasi. Quencher ini berperan untuk menahan pendaran probe agar tetap mendeteksi species dengan spesifik. Untuk memastikan bahwa tidak ada pembentukan self-dimer, hairpin, atau hetero-dimer dengan primer yang signifikan, analisis struktur sekunder dilakukan.

c. Simulasi *multiplex* PCR secara *In Silico*

Software PrimerPooler digunakan untuk mengevaluasi kompatibilitas primer yang telah didesain selama simulasi PCR *multiplex*. Untuk membentuk primer pool, semua primer *forward* dan *reverse* yang menargetkan gen mitokondria khusus untuk beberapa spesies diinput dalam format txt. Pembentukan hetero-dimer dan kompetisi pengikatan pada target sekuens adalah beberapa interaksi antarprimer yang dapat diprediksi melalui analisis. Nilai ΔG untuk dimerisasi, yang harus lebih besar dari -6 kcal/mol untuk mengurangi risiko pembentukan dimer, adalah parameter utama yang diperhatikan. Selain itu, program ini menghitung efisiensi amplifikasi relatif setiap pasangan primer dalam reaksi *multiplex*, yang memungkinkan untuk memilih kombinasi primer dengan tingkat *cross-reactivity* yang rendah. Pasangan primer *multiplex* dan probe yang sudah spesifik akan disintesis di Macrogen.

3.4.2 Persiapan Alat dan Bahan

Alat-alat yang dibutuhkan disterilisasi seperti scalpel, pinset, tabung 1.5 mL, tabung 0.5 mL, tips 200 μ L, dan tips 10 μ L. Kemudian ddH₂O juga di

sterilisasi. Cek bahan-bahan yang dibutuhkan seperti kit isolasi DNA, agarose, TBE (*Tris-Borate-EDTA*), TAE (*Tris-Acetate-EDTA*), *loading dye*, *ladder*, dan lain-lain. Bersihkan meja kerja dan alat seperti mikropipet dengan disemprot alkohol lalu dilap. Bahan-bahan lainnya seperti jantung ayam, ekor sapi, ekor babi, ginjal babi, ekor tikus, dan produk makanan olahan daging dikumpulkan sebelum diisolasi nantinya.

3.4.3 Isolasi DNA

Potong sampel sebanyak 0.2 gram dan masukan ke tabung eppendorf 1.5 mL yang telah disteril. Tambahkan 250 μ L buffer ATL dan 20 μ L proteinase K. Lapsi tabung dengan alumunium foil untuk memastikan air tidak masuk dan inkubasi selama 60 menit pada suhu 55°C. Kemudian tambahkan 250 μ L buffer AL pada sampel lalu vortex selama 15 detik. Inkubasi kembali pada suhu 70°C selama 10 menit. Setelah itu tambahkan 250 μ L etanol absolut pada sampel lalu vortex selama 10 detik pada kecepatan maksimum. Sentrifuge sampel selama 4 menit pada kecepatan 12.000 rpm untuk memisahkan padatan dengan cairan. Ambil sebanyak 750 μ L sampel lalu pindahkan ke *spin column*.

Setelah itu masuk ke tahap pemurnian. Sampel yang sudah ada di dalam *spin column* di sentrifuge kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Buang filtrat dan gunakan kembali *collection tabung*nya. Ulangi tahap ini sampai filtrat benar-benar berkurang. Jika sudah, masukan column dalam *collection tabung* yang baru. Tambahkan buffer GW1 sebanyak 650 μ L pada column lalu di sentrifuge kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Buang filtrat lalu gunakan kembali *collection tabung*nya. Tambahkan buffer GW2 sebanyak 650 μ L pada *column* lalu di sentrifuge kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 1 menit. Buang filtrat lalu gunakan kembali *collection tabung*nya. Sentrifuge kembali sampel dengan kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit untuk mengeringkan matriks *column*nya. Kemudian masukkan *column* pada tabung 1.5 mL baru yang steril. Tambahkan buffer AE sebanyak 80 μ L langsung pada membran *column*. Diamkan selama 5 menit. Setelah itu sentrifuge selama 1 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Masukan tabung pada lemari pendingin dengan suhu -20°C. Lakukan hal yang sama pada tabung 1.5 mL yang baru sebagai sampel pengulangan kedua.

3.4.4 Elektroforesis Hasil Isolasi DNA

Setelah DNA diisolasi, selanjutnya DNA divisualisasi melalui tahap elektroforesis. Elektroforesis dilakukan menggunakan gel agarose 1.5% dalam larutan buffer TAE 1X yang telah dicetak menggunakan cetakan gel dan sisir untuk membentuk sumur. Sebanyak 4 µl sampel DNA dilarutkan dalam 1 µl *loading dye* lalu dimasukkan ke dalam sumur gel yang telah direndam dengan larutan TAE 1X sebagai buffer *running*. Elektroforesis dilakukan selama 30 menit pada tegangan 50 Volt dan hasilnya divisualisasi pada UV *Transilluminator* kemudian didokumentasikan menggunakan kamera *smartphone* (Ariyanti dan Siyanturi., 2019).

3.4.5 Validasi Hasil Isolasi DNA dan Optimasi Konsentrasi Primer

Proses amplifikasi pada PCR konvensional reaksi *Single-PCR* dan *Multiplex-PCR* menggunakan kit amplifikasi PCR GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corporation, 2021). Sebelumnya masing-masing primer *forward* dan *reverse* dengan konsentrasi 10 pmol telah dicampurkan. Reaksi *Singleplex* PCR dilakukan sebagai kontrol positif dengan total volume reaksi 10 µL terdiri dari 5 µL GoTaq® Green Master Mix, 0.2 µL primer *forward reverse* 10 pmol, 1 µL sampel DNA dan 3.8 µL *Nuclease free water*, sedangkan pada reaksi *Multiplex* PCR dengan total volume yang sama 10 µL terdiri dari 5 µL GoTaq® Green Master Mix, 0.08 µL mix primer *forward* dan *reverse* konsentrasi 100 pmol, 2 µL sampel DNA dan 2.92 µL *Nuclease free water*. Adapun kontrol negatif dalam proses amplifikasi menggunakan ddH₂O. Sampel DNA dan reagen PCR yang digunakan akan dicampurkan di dalam tabung PCR 0,2 mL di atas es, selanjutnya dihomogenkan menggunakan *spin down* dan dimasukkan ke dalam *Thermal Cycler* untuk memulai proses amplifikasi. Program PCR dilakukan berdasarkan metode Qin *et al* (2019). dengan memodifikasi suhu denaturasi, siklus PCR dan optimasi suhu *annealing* (Ta). Proses amplifikasi dimulai dengan pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, selanjutnya 40 siklus diawali dari tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik. Tahap *annealing* dilakukan pada suhu 60°C selama 30 detik. Selanjutnya tahap *extension* berlangsung pada suhu 60°C selama 30 detik pada tahap awal dan 5 menit pada tahap akhir, kemudian tahap akhir yaitu *holding* pada suhu 4°C.

Hilda Nur Azizah Rahardi, 2025

APLIKASI MULTIPLEX QPCR DENGAN PROBE TAQMAN UNTUK DETEKSI DNA AYAM, SAPI, BABI, DAN TIKUS

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

Produk PCR yang akan digunakan harus di *spin down* terlebih dahulu untuk digunakan dalam elektroforesis gel agarose.

Visualisasi hasil PCR dilakukan melalui elektroforesis dengan gel agarose 2.5% dalam larutan *buffer* TBE 1X. Tahap elektroforesis dimulai dengan menyiapkan gel agarose 2.5% yang telah dicetak pada cetakan gel dan sisir, sehingga terbentuk sumur. Selanjutnya gel agarose direndam dengan TBE 1X (*buffer running*) di dalam mesin elektroforesis, kemudian 1 μL DNA *ladder* dan 1 μL *loading dye* dilarutkan di dalam 4 μL air deion, kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel agarose untuk *ladder*. Adapun produk PCR yaitu 5 μL dimasukkan ke dalam sumur gel agarose untuk sampel. Elektroforesis gel agarose berlangsung selama 50 menit pada tegangan konstan 50 volt, selanjutnya gel divisualisasi pada UV *Transilluminator* dan didokumentasikan dengan kamera (Qin *et al.*, 2019).

3.4.6 Pengukuran Kualitas DNA

Pengukuran kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan Nanodrop spektrofotometer. Sebelum digunakan untuk mengukur sampel, dilakukan pengukuran dengan menggunakan ddH₂O sebagai blanko. Selanjutnya setiap sampel diambil sebanyak 1 μL lalu dimasukkan dalam detektor dan diukur dengan rasio absorbansi 260/280. Pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali untuk setiap sampel demi menghasilkan hasil yang valid. Setiap hasil pengukuran kemudian dicatat dan didokumentasikan. Setiap akan mengukur sampel yang berbeda, teteskan ddH₂O pada detektor lalu bersihkan dengan kertas lensa.

3.4.7 Optimasi Konsentrasi Probe dengan qPCR

Selain optimasi konsentrasi primer pada PCR, optimasi probe juga perlu dilakukan pada qPCR. Konsentrasi yang digunakan pada tahap optimasi ini adalah 50 nM, 80 nM, 100 nM, dan 150 nM pada reaksi *single*, sedangkan untuk *multiplex* konsentrasi yang digunakan adalah 200 nM, 320 nM, 400 nM, dan 600 nM. Setelah optimasi konsentrasi yang digunakan adalah 80 nM untuk reaksi *singleplex* dan 320 nM untuk reaksi *multiplex*. Reaksi *singleplex* dilakukan sebagai kontrol positif dengan total volume reaksi 10 μL terdiri dari 5 μL Sensifast SYBR No-ROX, 0.2 μL primer forward reverse 10 pmol, 0.8 μL probe 1 pmol, 1 μL sampel DNA dan 3

μL *Nuclease free water*, sedangkan pada reaksi *Multiplex*-PCR dengan total volume yang sama 10 μL terdiri dari 5 μL Sensifast SYBR No-ROX, 0.08 μL campuran primer *forward* dan *reverse* konsentrasi 100 pmol, 0.32 μL campuran probe 10 pmol, 2 μL sampel DNA dan 2.6 μL *Nuclease free water*. Adapun kontrol negatif dalam proses amplifikasi menggunakan NFW. Sampel DNA dan reagen PCR yang digunakan akan dicampurkan di dalam tabung PCR 0,2 mL di atas es, selanjutnya dihomogenkan menggunakan *spin down*.

Program qPCR dilakukan berdasarkan modifikasi dari panduan enzim Sensifast SYBR yang digunakan. Proses amplifikasi dimulai dengan pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, selanjutnya 40 siklus diawali dari tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik. Tahap *annealing* dilakukan pada suhu 60°C selama 30 detik. Selanjutnya tahap *extension* berlangsung pada suhu 60°C selama 30 detik. Pada penelitian ini saluran fluoresensi yang digunakan adalah ROX untuk mendeteksi DNA ayam, FAM digunakan untuk mendeteksi DNA babi, Cy5 digunakan untuk mendeteksi target DNA sapi, dan HEX digunakan untuk mendeteksi DNA tikus. Saluran fluoresensi ini ditentukan berdasarkan ketersediaan pada alat *real-time*.

3.4.8 Optimasi Hasil qPCR

Pada perbandingan hasil qPCR dari alat MyGo™ dan Agilent AriaDx™, formulasi untuk komposisi PCR yang dilakukan itu masih sama yaitu, reaksi *Singleplex* PCR dilakukan sebagai kontrol positif dengan total volume reaksi 10 μL terdiri dari 5 μL Sensifast SYBR No-ROX, 0.2 μL primer *forward reverse* 10 pmol, 0.8 μL probe 1 pmol, 1 μL sampel DNA dan 3 μL *Nuclease free water*, sedangkan pada reaksi *Multiplex*-PCR dengan total volume yang sama 10 μL terdiri dari 5 μL Sensifast SYBR No-ROX, 0.08 μL mix primer *forward* dan *reverse* konsentrasi 100 pmol, 0.32 μL mix probe 10 pmol, 2 μL sampel DNA dan 2.6 μL *Nuclease free water*. Adapun kontrol negatif dalam proses amplifikasi menggunakan NFW. Perbedaannya terletak pada siklus PCR yang digunakan.

Tahapan qPCR ini dimodifikasi dari hasil workshop deteksi halal yang terdiri dari dua tahap utama, yaitu tahap pra-inkubasi dan amplifikasi. Pra-inkubasi

dilakukan melalui dua tahap, yaitu pada suhu 37°C selama 4 menit lalu inkubasi kedua pada suhu 95°C selama 10 menit (pra-denaturasi). Kemudian untuk tahapan kedua dibagi kembali menjadi dua tahap, yaitu denaturasi 95°C selama 5 detik dan *annealing-extension* pada suhu 60°C selama 60 detik. Program PCR ini yang seterusnya akan digunakan untuk mendeteksi DNA target pada DNA produk makanan olahan daging dan menentukan batas deteksi DNA mulai 10 ng – 1 pg.

3.4.9 Pengenceran DNA

Batas deteksi DNA melalui qPCR dilakukan pada konsentrasi DNA 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, dan 1 pg. DNA yang diencerkan adalah DNA hewan ayam, sapi, babi, dan tikus. Pengenceran DNA dilakukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

Keterangan :

M1 : Konsentrasi Larutan Awal

V1 : Volume Larutan Awal

M2 : Konsentrasi Larutan Akhir

V2 : Volume Larutan Akhir

Stok DNA yang telah diuji secara kualitatif kemudian diencerkan menjadi beberapa konsentrasi, yaitu 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, dan 1 pg untuk menguji batas deteksi konsentrasi DNA melalui qPCR. Pengenceran DNA dari konsentrasi awal setelah isolasi dilakukan dengan rumus pengenceran di atas kemudian pengenceran DNA dari 1 ng ke 100 pg dan seterusnya dilakukan dengan cara melarutkan 10 µL DNA ke dalam tabung 1.5 mL yang berisi 90 ddH₂O steril (Retnaningati, 2020).

3.4.10 Deteksi qPCR

Setelah melakukan optimasi hasil qPCR selama beberapa kali, selanjutnya adalah melakukan analisis qPCR menggunakan alat qPCR Agilent™ menggunakan siklus yang sama dengan sebelumnya pada optimasi qPCR antara MyGo™ dan Agilent™. Perbedaannya dalam deteksi ini beberapa sampel yang digunakan adalah DNA kontrol ayam, sapi, babi, dan tikus hasil isolasi, mix DNA sampel dari hasil

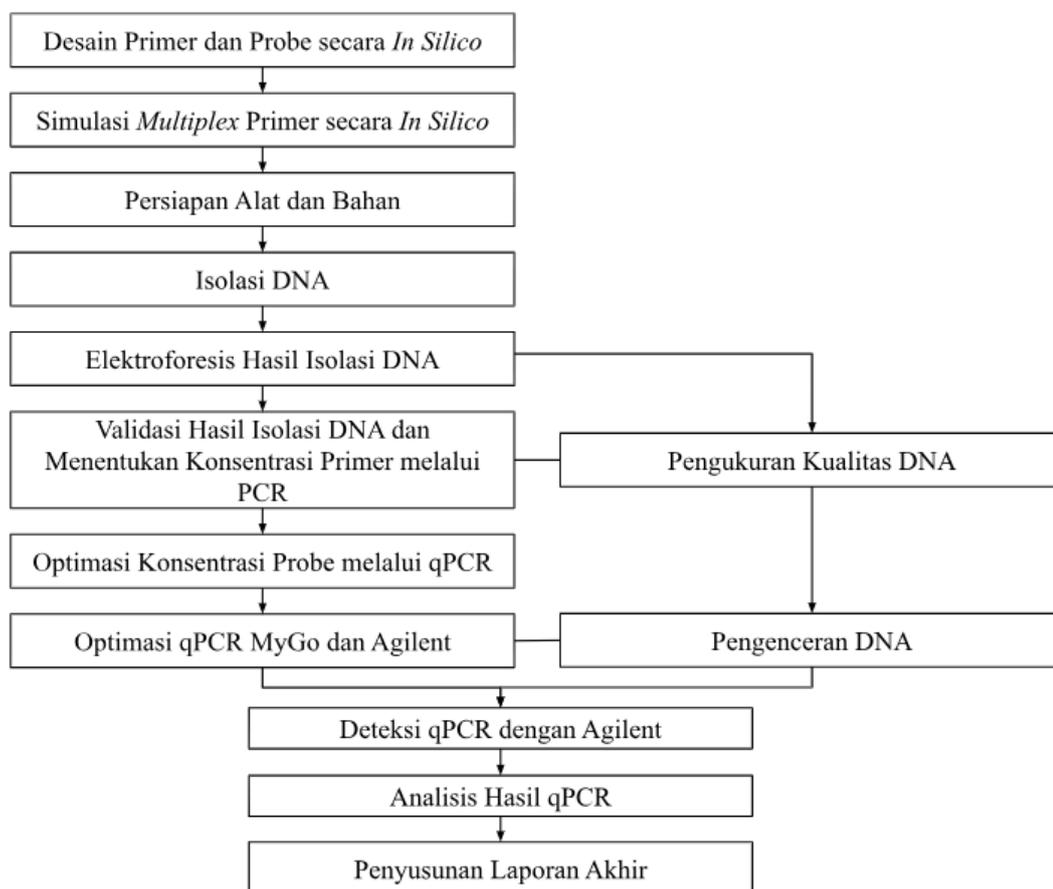
isolasi, DNA dengan konsentrasi 10 ng-1 pg dari sampel ayam, sapi, babi, tikus, dan DNA mix, serta beberapa sampel DNA olahan.

3.4.11 Analisis qPCR

Analisis qPCR dilakukan melalui *software* Agilent Aria Dx. Analisis qPCR dilakukan dengan melihat hasil kurva hasil amplifikasi dan nilai Cq yang dihasilkan dari hasil amplifikasi setiap sampel.

3.5 Alur Penelitian

Berdasarkan prosedur penelitian yang telah diuraikan sebelumnya, maka dari tahapan-tahapan tersebut dibuat alur penelitian seperti pada Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1 Alur Penelitian