

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mengembangkan metode deteksi DNA non-halal dalam produk pangan menggunakan *High-Resolution Melting Analysis (HRMA) multiplex* dan *quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)* melalui desain primer yang optimal untuk penggunaan metode HRMA itu sendiri. Metode ini dipilih untuk mengevaluasi sensitivitas dan spesifisitas HRMA dan qRT-PCR dalam mendeteksi DNA dari beberapa *species* secara simultan.

Menurut Sugiyono (2022), penerapan analisis deskriptif dalam sebuah studi bertujuan untuk menghadirkan gambaran atau penjelasan yang jelas, terstruktur, dan tepat mengenai data atau fenomena yang telah diperoleh. Analisis deskriptif digunakan untuk menyajikan data dalam format yang mudah dipahami, baik dalam konteks kuantitatif maupun kualitatif.

Tujuan utama dari penelitian deskriptif bukan untuk menguji hipotesis atau mencari hubungan sebab dan akibat, tetapi untuk hanya menggambarkan kondisi objek penelitian berdasarkan fakta yang ada. Melalui analisis deskriptif, peneliti dapat memaparkan karakteristik variabel, distribusi frekuensi, pola, atau peristiwa yang terjadi pada data yang dianalisis.

3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama kurang lebih enam bulan, yaitu bulan Januari 2025 hingga bulan Juni 2025. Lokasi penelitian berbasis *in silico* dilakukan di Laboratorium Riset Bioteknologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pendidikan Indonesia.

3.3. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dibagi menjadi alat yang digunakan (Tabel 3.1) dan bahan yang digunakan (Tabel 3.2).

Tabel 3. 1 Alat yang Digunakan

No.	Alat	Keterangan
1	Laptop	Untuk menjalankan perangkat lunak dan simulasi <i>in silico</i> . Adapun spesifikasi laptop yang digunakan meliputi: - Merk: LENOVO - Prosesor: AMD Ryzen 3 7320U with Radeon Graphics - RAM: 8.00 GB - System type 64-bit operating system, x64-based processor - Spesifikasi Windows: Windows 11
2	Koneksi Internet	Diperlukan untuk mengakses situs web seperti GeneBank, uMELT, <i>PrimerPooler</i> , <i>PCRTTest</i> .
3	Perangkat Lunak dan Situs Bioinformatika	- Primer-BLAST: Merancang primer spesifik <i>species</i> - <i>PrimerPooler</i>: Menganalisis interaksi primer dan optimasi desain primer - uMELT: Memperkirakan suhu leleh (Tm) dan karakteristik <i>melting peak</i> amplikon - BLAST: Verifikasi homologi primer dengan genom <i>species</i> lainnya - BioEdit: Menyelaraskan Sekuens guna mendapatkan Konsensus Sekuens - <i>PCRTTest</i>: Simulasi PCR untuk mendapatkan sekuens amplikon
4	FASTA viewer atau editor	Perangkat lunak seperti NotePad digunakan untuk menyimpan dan memeriksa urutan primer serta data amplikon.

Tabel 3. 2 Bahan yang Digunakan

No.	Bahan	Keterangan
1	Data Genom	Urutan genom dari <i>species</i> yang dianalisis (ayam, sapi, tikus, babi) yang diambil dari <i>GeneBank</i> NCBI.
2	Urutan Gen Spesifik	- Data sekuens DNA mitokondria dari NCBI <i>GeneBank</i> (<i>Gallus gallus</i>, <i>Bos taurus</i>, <i>Sus scrofa</i>, <i>Sus scrofa domesticus</i>, <i>Rattus norvegicus</i>, <i>Rattus rattus</i>, <i>Rattus argentiventer</i>). - Plasmid kontrol pGEM®-T Easy dari katalog Promega
3	Dokumentasi dan Referensi	Artikel atau publikasi ilmiah untuk referensi desain primer dan protokol <i>Multiplex</i> PCR.

3.4. Prosedur Penelitian

Penelitian ini terdiri dari prosedur *in silico* yang bertaut pada penelitian Kusumawaty *et al.*, (2024) dan Denyinghot *et al.*, (2021) dengan modifikasi. Prosedur *in silico* bertujuan merancang primer spesifik untuk ayam, sapi, babi, tikus, dan kontrol internal serta melakukan simulasi dan optimalisasi *Multiplex*

PCR. Prosedur ini dinilai efisien karena mampu mengurangi penggunaan bahan, alat, dan hewan uji, serta menekan biaya penelitian dan mengurangi risiko kesalahan pada pengujian *in vitro* (Dona *et al.*, 2019). Namun, kelemahan utamanya adalah ketergantungan hasil prediksi pada kualitas data. Apabila data tidak akurat, tidak lengkap, atau kurang representatif, maka hasil *in silico* juga berpotensi tidak valid (Fadillah *et al.*, 2023).

3.4.1. Persiapan Alat dan Data Sekunder

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini dipersiapkan terlebih dahulu, meliputi gawai yang akan digunakan, instalasi perangkat lunak yang diperlukan, serta ketersediaan program dan situs yang perlu diakses. Semuanya dipastikan ketersediaannya terlebih dahulu untuk menjalani proses penelitian secara efisien.

3.4.2. Pengumpulan Data Genom

Data genom untuk ayam, babi, sapi, dan tikus diambil dari basis data GenBank yang tersedia di situs NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sumber data ini dipilih karena menyediakan urutan genom yang lengkap, valid, dan sering digunakan dalam penelitian genetika (O'Leary *et al.*, 2024).

3.4.2.1. Sumber Data Genom

Genom yang digunakan termasuk dalam kategori "*complete genome*" untuk memastikan bahwa seluruh urutan gen yang relevan tersedia tanpa adanya potongan atau kekurangan data. Penelitian ini memfokuskan pada gen mitokondria sebagai wilayah target. Gen mitokondria seperti dipilih karena memiliki keunikan spesifik antar *species*, tetapi tetap cukup konservatif untuk memungkinkan analisis dengan primer universal (Chen *et al.*, 2023). Data genom pGEM-t sendiri diperoleh dari katalog Promega (Dinh *et al.*, 2022).

3.4.2.2. *Alignment* Sekuens Genom

Alignment dilakukan untuk sekuens babi dan tikus menggunakan BioEdit v7.2.5 dengan metode ClustalW (Hall, 1999). Tujuan dari dilakukannya *alignment* ini adalah mengidentifikasi daerah konservatif yang representatif secara *species*,

tanpa celah, dan konsisten secara struktur untuk dijadikan target primer (Arsyadin *et al.*, 2024).

3.4.2.3. Verifikasi Homologi Genom Hasil *Alignment*

Setelah sekuens genom diperoleh, langkah berikutnya adalah memastikan bahwa wilayah gen target memiliki tingkat spesifisitas yang cukup untuk masing-masing *species*. Untuk itu, analisis homologi dilakukan menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang juga tersedia di situs NCBI. Tujuan analisis BLAST ini antara lain yaitu untuk mengidentifikasi wilayah gen yang unik untuk masing-masing *species* sehingga amplifikasi primer tidak menghasilkan produk non-spesifik dari *species* lain dan memastikan bahwa tidak ada tumpang tindih signifikan antara genom *species* yang berbeda, yang dapat menyebabkan amplifikasi silang dan mengurangi keakuratan hasil PCR (Xie *et al.*, 2024).

3.4.3. Perancangan Primer *Multiplex*

Proses desain primer merupakan tahap yang sangat penting dalam penelitian ini, mengingat primer yang dirancang dengan baik akan sangat menentukan keberhasilan amplifikasi *Multiplex* PCR. Tahap desain ini melibatkan penentuan parameter desain untuk mendapatkan primer yang optimal. Keseluruhan desain primer dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak (Chen & Zhao, 2019).

Setelah wilayah gen target teridentifikasi dan terverifikasi homologinya, desain primer dilakukan menggunakan alat Primer-BLAST yang tersedia di situs NCBI. Alat ini dirancang untuk membantu peneliti membuat primer berdasarkan parameter yang telah ditentukan. Menurut Quick (2017), salah satu keberhasilan *Multiplex* PCR sangat bergantung pada kualitas desain primer yang optimal. Oleh karena itu, parameter desain primer yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

- a. Panjang primer: Primer dirancang memiliki panjang antara 18-25 basa. Panjang ini dipilih karena primer yang terlalu pendek cenderung menyebabkan amplifikasi non-spesifik, sedangkan primer yang terlalu panjang memerlukan suhu leleh yang lebih tinggi, yang dapat menyulitkan reaksi PCR (Kang *et al.*, 2018).
- b. Ukuran ampikon: Target panjang ampikon tiap *species*nya tidak spesifik, namun perbedaan panjang ampikon ideal untuk Real-Time PCR adalah 70-

200 bp. Kisaran ini dianggap ideal karena cukup pendek untuk amplifikasi efisien dan cukup panjang untuk analisis yang mudah menggunakan kurva leleh *Real-Time* PCR (NEB, 2016).

- c. Temperatur leleh (T_m): Suhu leleh primer (T_m) didefinisikan sebagai suhu di mana setengah dari dupleks DNA terpisah menjadi untai tunggal, mencerminkan tingkat stabilitas dupleks tersebut. Primer dengan nilai T_m dalam rentang 55-60°C biasanya menghasilkan kinerja yang optimal (Bakar *et al.*, 2017). T_m semua primer dari masing-masing *species* dalam satu reaksi *Multiplex* PCR dijaga agar berada di suhu berbeda (Denyinghot *et al.*, 2021) untuk memastikan amplifikasi yang optimal sehingga terbentuk puncak T_m di rentang suhu yang berbeda agar terlihat pola dari setiap *species*nya. Selisih suhu leleh antar primer dalam satu reaksi *Multiplex* PCR dijaga seminimal mungkin, idealnya tidak lebih dari 1°C, untuk memastikan perbedaan pola dalam proses amplifikasi (Yuniarti & Cholis, 2021).
- d. Kandungan GC: Kandungan basa guanin (G) dan sitosin (C) dalam primer diatur dalam rentang 40-60%. Kandungan GC yang terlalu rendah dapat menyebabkan instabilitas primer, sedangkan kandungan GC yang terlalu tinggi dapat meningkatkan pembentukan struktur sekunder yang mengganggu (Yuniarti & Cholis, 2021).
- e. Maksimal *self-complementarity*: Nilai *self-complementarity* primer dijaga di bawah 8,00 untuk mengurangi risiko pembentukan *hairpin*. Untuk komplementaritas di ujung 3', batasnya lebih ketat, yaitu maksimal 3,00, karena reaksi elongasi dimulai dari ujung ini (Xu *et al.*, 2023).
- f. Maksimal pengulangan basa (*repeats*): Primer tidak boleh mengandung lebih dari tiga pengulangan basa yang sama berturut-turut, untuk menghindari pembentukan struktur tidak stabil dan menjaga efisiensi pengikatan primer ke *template* DNA (Meier-Stephenson *et al.*, 2021).
- g. Maksimal GC *clamp*: Maksimal tiga basa GC di ujung 5' ditambahkan untuk meningkatkan efisiensi pengikatan primer ke *template*, namun tidak berlebihan agar tidak mempengaruhi amplifikasi (Smith & Johnson, 2022).

3.4.4. Simulasi dan Optimasi Primer *Multiplex* PCR secara *In silico*

Sebelum reaksi PCR dilakukan secara aktual, tahapan penting berupa simulasi dan optimasi *in silico* dilakukan untuk mengevaluasi performa seluruh primer yang telah dirancang. Evaluasi dilakukan terhadap kemampuan primer dalam mengamplifikasi target, stabilitas termodinamikanya, dan kesesuaian suhu leleh antar primer dalam satu sistem *multiplex*. Langkah-langkah ini dilakukan untuk memastikan bahwa primer yang terpilih tidak hanya efektif secara individual, tetapi juga kompatibel saat digabungkan (Banaganapalli *et al.*, 2019).

3.3.4.1. Simulasi PCR secara *In silico*

Simulasi PCR secara *in silico* dilakukan untuk mengevaluasi efektivitas pasangan primer dalam mengamplifikasi DNA target dari setiap *species*. Perangkat lunak yang dipakai adalah *PCRTTest* dari *Sequence Manipulation Suite* yang dapat diakses di situs bioinformatics.org (Stothard, 2000). Proses simulasi ini memungkinkan untuk menemukan pasangan primer yang dapat menghasilkan ampikon yang spesifik dan sesuai ukuran yang diharapkan, sekaligus mengidentifikasi adanya potensi amplifikasi yang tidak diinginkan (Telatin *et al.*, 2021).

3.3.4.2. Visualisasi Tm Primer

Berdasarkan penelitian Denyinghyot *et al.* (2021), primer yang telah dirancang diuji lebih lanjut untuk memprediksi suhu leleh *Melting temperature* (Tm) serta menganalisis karakteristik puncak leleh ampikon menggunakan platform uMELT (<https://dna-utah.org/umelt/umelt.html>) oleh Dwight *et al.*, (2011). Apabila kurva leleh dari salah satu hewan non-halal memiliki puncak leleh (*melting peak*) dengan nilai Tm yang serupa, urutan primer akan disesuaikan atau dirancang kembali hingga puncak leleh dari keenam *species* hewan yang dipilih dapat dibedakan secara jelas dan akurat.

3.3.4.3. Penyeleksian Kombinasi Primer *Multiplex*

Kombinasi utama dari setiap *species* yang memenuhi kriteria suhu leleh, panjang ampikon, dan kandungan GC akan dievaluasi secara bersamaan dalam satu sistem *multiplex*. Pemilihan ini harus memperhatikan perbedaan suhu leleh antar

primer yang cukup signifikan, idealnya setidaknya 1-2°C, agar dapat teridentifikasi sebagai puncak yang berbeda dalam analisis HRMA (Kim *et al.*, 2023).

Primer yang memiliki suhu leleh yang terlalu dekat atau terlalu tinggi dapat berpotensi menghasilkan puncak ganda atau kurva yang tidak stabil. Oleh sebab itu, pilihan terbaik dari setiap *species* dipilih berdasarkan T_m amplikon yang jelas, tidak tumpang tindih, serta memiliki stabilitas GC dan panjang yang optimal (Salsabila *et al.*, 2021; Smith & Johnson, 2022).

3.4.4.4. Pengujian dan Analisis Kompatibilitas Primer dengan *PrimerPooler*

Mengacu pada penelitian Kusumawaty *et al.*, (2024), digunakan *PrimerPooler* untuk menganalisis apakah primer yang dirancang memiliki kemungkinan reaktivitas silang dengan primer lain atau dengan genom yang tidak diinginkan. Sehingga hanya primer *forward* dan *reverse* yang terbukti tidak memiliki reaktivitas silang atau amplifikasi non-spesifik yang dilanjutkan ke tahap berikutnya. Pasangan primer spesifik yang telah dirancang digunakan untuk simulasi *Multiplex* PCR secara *in silico* dengan memanfaatkan software *PrimerPooler* (<http://ssb22.user.sref.net/pooler/>). Software ini berfungsi untuk mendeteksi dan mencegah interaksi antar primer yang tidak diinginkan, seperti pembentukan dimer atau *overlaps*, yang dapat mengganggu efisiensi reaksi (Brown *et al.*, 2017; Zangenberg *et al.*, 1999). *PrimerPooler* dirancang menggunakan protokol eksperimental yang dioptimalkan untuk mengurangi potensi masalah interaksi primer, dengan memanfaatkan primer yang telah dibuat untuk reaksi *Multiplex*-PCR. Primer tersebut harus memenuhi kriteria tertentu, termasuk persyaratan nilai ΔG yang sesuai dengan standar protokol. Nilai ΔG yang digunakan dalam desain primer multipleks harus nol atau tidak negatif, karena nilai Delta G yang semakin negatif menunjukkan peningkatan kemungkinan pembentukan dimer atau *overlaps*. Berdasarkan penelitian sebelumnya, ambang batas (*threshold*) Delta G yang disarankan adalah ≥ -7 kkal/mol (Brown *et al.*, 2017). Apabila kedua primer memiliki kemungkinan untuk terikat dan membentuk struktur sekunder yang tidak diinginkan, seperti *self* dimer atau hetero dimer, maka primer tersebut akan diganti atau didesain ulang.

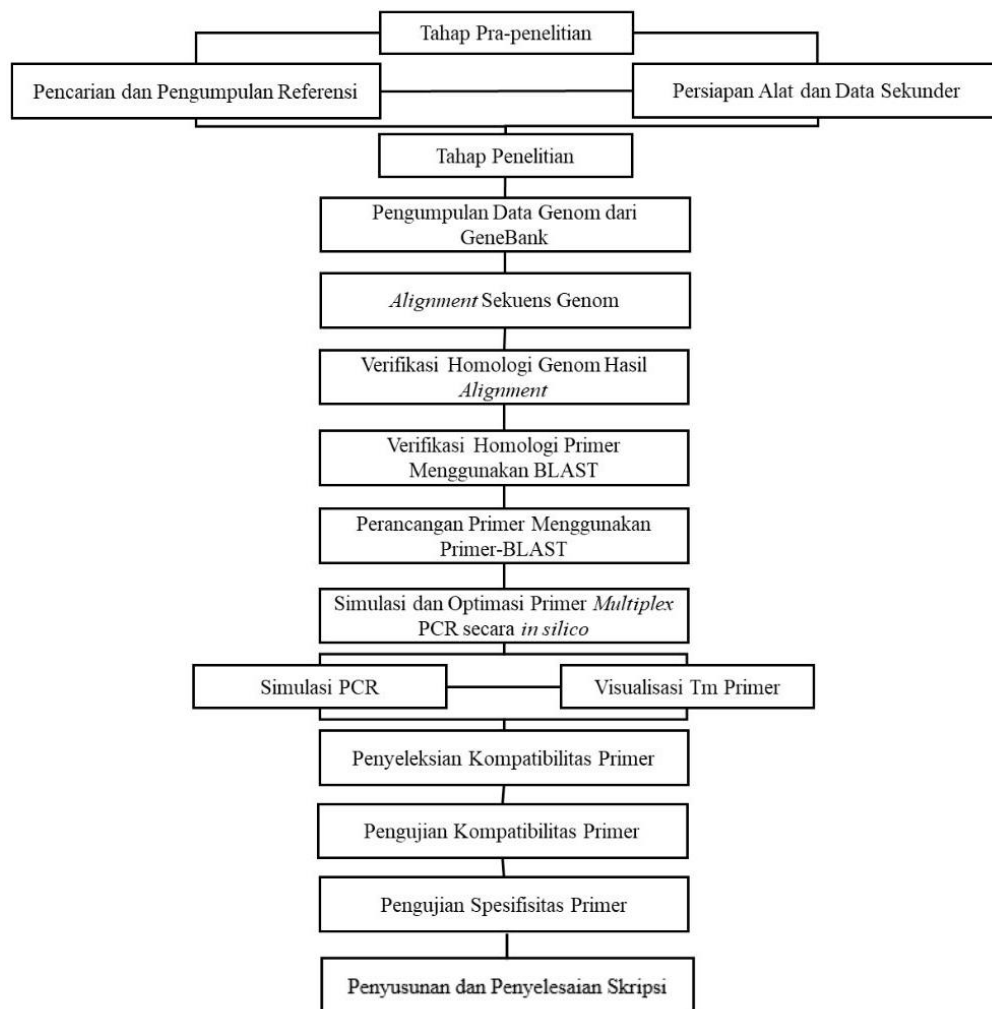
3.5. Pengujian Spesifisitas Primer

Uji spesifisitas dilakukan dengan menggunakan NCBI Primer-BLAST guna memastikan bahwa primer hanya menargetkan *species* yang diinginkan. Kombinasi pasangan primer yang sudah dipilih dan dimasukkan ke dalam Primer-BLAST dan dinilai terhadap seluruh database nukleotida NCBI. Primer yang menunjukkan hasil amplifikasi silang dengan *species* lain di luar target utama akan disingkirkan (So *et al.*, 2020).

Tujuan analisis ini adalah untuk memastikan bahwa setiap primer adalah unik untuk sekuens yang ditargetkan dan tidak memiliki kesamaan signifikan dengan *species* lainnya, terutama dengan anggota subfilum vertebrata lainnya. Memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi sangat penting dalam perancangan *Multiplex HRMA* untuk mencegah kesalahan identifikasi *species* serta meningkatkan keakuratan hasil (So *et al.*, 2020).

3.6. Alur Penelitian

Alur penelitian Desain dan Optimasi Primer *Multiplex High Resolution Melting Analysis* untuk Identifikasi Daging Babi, Tikus, Ayam, dan Sapi secara *In Silico* dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Diagram Alur Penelitian