

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif. Penelitian deskriptif dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui dan memberi gambaran mengenai variabel secara objektif (Sugiyono, 2016; Luthfan, 2016).

#### 3.2. Waktu dan Lokasi Penelitian

Kegiatan penelitian menggunakan uji *in silico* sehingga dapat dilakukan di rumah peneliti. Karena adanya pandemi Covid-19, sehingga penelitian ini menyesuaikan dengan anjuran pemerintah untuk mengikuti protokol kesehatan yang telah ditetapkan. Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2021 hingga November 2021.

#### 3.3. Alat dan Bahan

Penelitian yang dilakukan secara *in silico* ini menggunakan alat atau perangkat lunak, dapat dilihat pada Tabel 3.1. Penelitian ini menggunakan alat dan bahan yang bersifat *open source* atau dapat diakses oleh siapapun. Sampel yang digunakan berupa sekuen gen HSP90 pada ayam (*Gallus gallus*) diambil dari database Ensembl.

Tabel 3.1 Alat yang Digunakan

No.	Alat	Spesifikasi
1.	Komputer Acer ES1-131 Series	Prosesor intel coleron N3050 dual core 1,6GHz, TurboBoost 2,1Ghz; Memori RAM 2GB
2.	Basis data sekuen	<a href="https://www.ensembl.org">https://www.ensembl.org</a>
3.	Analisis potensi CpG island	<a href="http://www.urogene.org/methprimer">http://www.urogene.org/methprimer</a>
4.	Perancangan primer	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/</a>
5.	Analisis primer	<a href="http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp">http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp</a>
6.	Perangkat lunak Google Chrome	Versi 87.0.4280.88 (64 bit)

### 3.4. Prosedur Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *in silico*. Bioinformatika, atau biologi *in silico*, adalah bidang yang berkembang pesat yang mencakup teori dan penerapan pendekatan komputasi untuk memodelkan, memprediksi, dan menjelaskan fungsi biologis pada tingkat molekuler (Fielden dkk., 2002). Bioinformatika juga biasanya digunakan dalam kajian genomik. Penggunaan umum bioinformatika termasuk di dalamnya identifikasi gen dan polimorfisme nukleotida tunggal (Lesk dkk. 2013). Dalam penelitian ini dilakukan menggunakan metode komputasi atau uji *in silico* menggunakan data gen yang telah tersedia untuk umum. Selanjutnya, karena seluruh pemodelan dan analisis didasarkan pada pendekatan komputasi, peneliti dapat memperoleh hasil analisis tersebut bahkan dalam waktu yang singkat, hal ini menghemat banyak waktu dan mengurangi biaya jika dibandingkan dengan metode dengan studi *in vitro* (Barh dkk., 2014). Kekhawatiran atas masalah tersebut dapat dikurangi dengan melakukan uji komputasi, dengan melakukan analisis *in silico* dapat secara signifikan mengurangi jumlah pekerjaan laboratorium yang diperlukan (Murray dkk., 2007).

#### 3.4.1 Koleksi data

Data sekuen gen HSP90 dari ayam (*Gallus gallus*) diperoleh dari database *online* Ensembl (<https://www.ensembl.org>) dalam format FASTA. Variasi gen atau polimorfisme didapatkan juga dari basis data Ensembl.

Analisis area kecil gen, seperti polimorfisme dalam satu gen atau transkrip, tampilan visual tetap menjadi kunci untuk mengeksplorasi dan menganalisis temuan ilmiah. Ensembl menciptakan alat dan visualisasi unik untuk data variasi dan membuatnya tersedia secara bebas untuk komunitas ilmiah secara global. Membuat data tersedia melalui serangkaian antarmuka (*interfaces*) yang matang dan stabil. Basis data variasi Ensembl saat ini berisi data yang tersedia untuk umum, dan berisi 20 spesies vertebrata dari berbagai sumber yaitu dbSNP, Arsip Variasi Eropa (EVA) dan ClinVar (Hunt dkk., 2018).

#### 3.4.2 Merancang primer

Rancangan primer secara otomatis dapat dilakukan dengan menggunakan layanan *online* ataupun perangkat lunak bioinformatika. Perancangan yang dilakukan program berdasarkan parameter yang ditentukan pengguna. Proses

komputasi seperti ini akan mempersingkat waktu dan meningkatkan spesifitas primer yang didesain (Utomo dkk., 2019).

Primer dirancang berdasarkan sekuen database Ensembl. Primer dirancang menggunakan Primer3 *automated method* versi 4.1.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Primer3 merupakan layanan *online* yang banyak digunakan. Proses komputasi yang digunakan oleh primer3 juga telah digunakan oleh beberapa program dan layanan rancangan primer *online* yang lain. Kekurangan ketika menggunakan layanan Primer3 ini yaitu, *Gaphical user interface* yang kurang menarik, tapi keakuratan hasil desain primer tidak diragukan lagi (Utomo dkk., 2019).

Seluruh pasangan primer yang telah dirancang kemudian dianalisis kualitas dan struktur sekundernya untuk menemukan kandidat-kandidat pasangan primer yang terbaik. Analisis dilakukan menggunakan laman NetPrimer (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp>)

Data sekuen gen HSP90 pada ayam yang diperoleh dari Ensembl sudah memiliki data mengenai polimorfisme pada gen HSP90, data mengenai polimorfisme dapat dianalisis dengan data yang sudah ada. Hal tersebut dilakukan karena kurangnya data sekuen gen HSP90 ayam pada Genbank (*The National Center for Biotechnology Information*) NCBI. Kurangnya data ini menyebabkan kesulitan untuk melakukan *alignment* untuk proses *Variant calling*. *Variant calling* adalah proses mengidentifikasi varian dari data urutan atau *sequence data* (Armstrong dkk., 2017).

Daerah yang diambil atau yang dijadikan patokan perancangan primer adalah daerah *upstream 5'* dan ekson gen HSP90 yang memiliki polimorfisme, data polimorfisme tersebut didapatkan dari laman Ensembl. Polimorfisme yang telah diketahui tersebut menjadi salah satu karakteristik yang diperhatikan saat perancangan primer gen HSP90 pada ayam. Polimorfisme merupakan variasi genetik yang mengakibatkan terjadinya beberapa bentuk atau jenis individu yang berbeda di antara anggota satu spesies (Jennings dkk., 2020). Data sekuen gen dari laman Ensembl tersebut dapat menunjukkan variasi gen yang ada pada masing-masing isoform gen HSP90. Perancangan primer gen HSP90 yang dapat

menunjukkan polimorfisme pada gen HSP90 ayam merupakan langkah awal untuk pengembangan marker cekaman panas pada ayam lokal Indonesia.

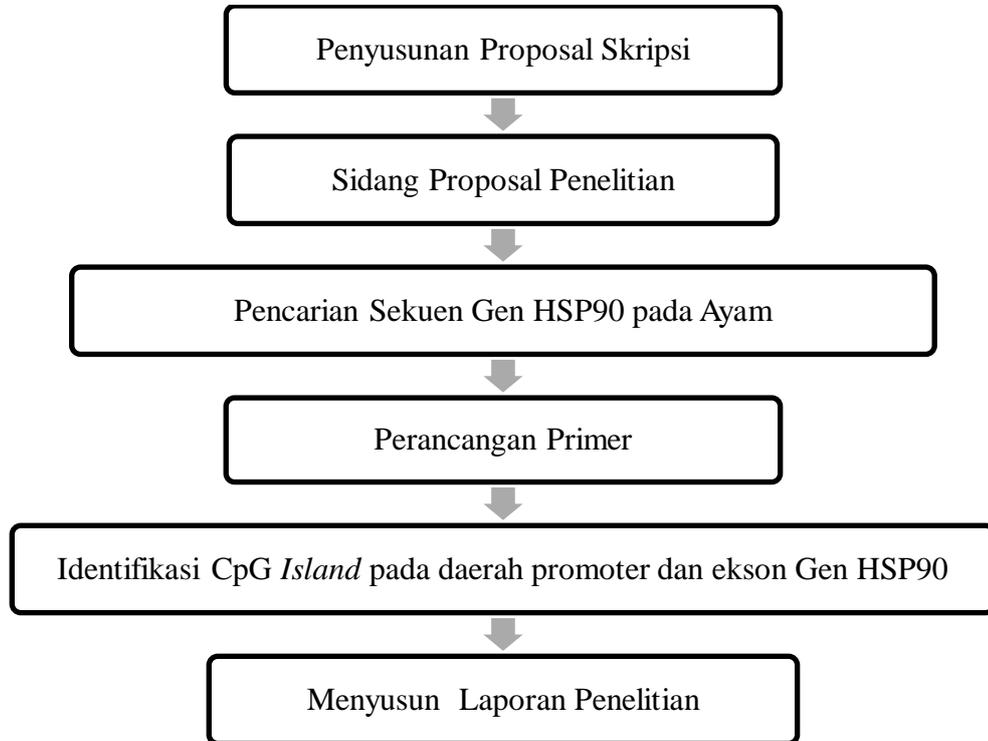
Halaman gen khusus pada Ensembl mencakup tabel yang menjelaskan semua varian di wilayah suatu gen, dengan banyak opsi pemfilteran termasuk berdasarkan konsekuensi atau jenis varian. Ini dapat dikonfigurasi untuk meningkatkan keterbacaan dan kemampuan analisis, terutama pada gen dengan sejumlah besar data varian. Sebagian besar data varian Ensembl diimpor dari database dbSNP NCBI. Pada laman Ensembl telah disediakan informasi untuk mengetahui posisi variasi gen, perubahan pada kodon dan asam amino (contohnya jika terjadi *missense variant*), jenis variasi yang terjadi, dan nama varian tersebut atau link variasi Ensembl. Varian dapat diberi nama dalam berbagai cara, tergantung pada sumber literatur dan sumber daya database, (misalnya, pengidentifikasi 'ENSP00000420705.2:p.Ser737Asn', 'NM\_0072943:c.5522G>A', 'rs80357368' dan 'RCV000236784' semua mengacu pada varian yang sama) menyebabkan kesulitan dalam interpretasi. Untuk mengatasi masalah ini, Ensembl telah menggunakan deskripsi *Human Genome Variation Society* (HGVS) dan nama lain yang diketahui untuk pengenalan input atau penamaan polimorfisme (Hunt dkk., 2018).

### **3.4.3 Identifikasi CpG island pada daerah promotor dan ekson gen HSP90**

Analisis potensi CpG *Island* pada gen HSP90 ayam dideteksi dengan MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>). MethPrimer bekerja dengan mengambil urutan DNA sebagai inputnya dan mencari urutan CpG *Island* yang potensial, situs-situs CG yang didapatkan kemudian divisualisasikan dan dianalisis apakah memiliki hubungan dengan faktor transkrip yang ada di daerah promotor (Li & Dahiya, 2002).

### 3.5. Alur Penelitian

Berdasarkan uraian metode penelitian sebelumnya maka didapatkan Alur penelitian seperti yang tercantum dalam Gambar 3.1 diawali dengan mencari sekuen gen sampai dengan merancang primer pada HSP90 pada ayam.



Gambar 3.1. Alur Penelitian