

BAB III

METODE PENELITIAN

3. 1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah jenis penelitian deskriptif. Penelitian Deskriptif merupakan suatu penelitian untuk membuat gambaran secara sistematis, faktual, dan akurat mengenai fakta-fakta, sifat-sifat serta hubungan antar fenomena yang diteliti (Nazir, 1988). Penelitian ini mendeskripsikan pasangan primer yang dapat mengamplifikasi gen HSP70 ayam Walik.

3. 2. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini diawali dengan studi *in silico* yang dilakukan dari bulan Januari sampai Februari 2022 di rumah peneliti, setelah itu dilakukan pemesanan primer di Macrogen Inc., Korea Selatan. Studi *in vitro* dilakukan selama lima bulan dari bulan Maret sampai Juli 2022 di Laboratorium Riset Bioteknologi, Gedung FPMIPA B, Departemen Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia; sedangkan untuk proses sekuensing sampel hasil amplifikasi DNA gen HSP70 ayam Walik dilakukan oleh *1st Base Laboratory*, Selangor, Malaysia.

3. 3. Populasi dan Sampel Penelitian

Dalam penelitian ini digunakan urutan sekuens gen HSP70 ayam (*Gallus gallus*) dari *genbank* dengan nomor akses J02579, enam belas sampel darah ayam Walik koleksi Aryani *et al.*, (2019) dan tiga DNA ayam lokal sebagai DNA pembanding koleksi Aryani (2016).

3. 4. Alat dan Bahan Penelitian

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian tersedia di Laboratorium Riset Bioteknologi, Gedung FPMIPA B, Departemen Pendidikan Biologi, Universitas Pendidikan Indonesia. Daftar alat (Tabel 3.1) dan bahan (Tabel 3.2) yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

Tabel 3.1
Alat yang digunakan dalam penelitian

No.	Nama Alat	Kegunaan
1.	Autoclave	Alat sterilisasi alat dan bahan penelitian
2.	Micropipet 0.5-10	
3.	Micropipet 10-100	Alat pengukuran bahan cair dengan ukuran mikro berkisar 0.5 µl s.d. 100 µl
4.	Micropipet 20-200	
5.	Micropipet 200-1000	

No.	Nama Alat	Kegunaan
6.	<i>Waterbath</i>	Digunakan untuk inkubasi 56 °C
7.	<i>Centrifuge</i>	Digunakan di tahap pencucian dan pemisahan DNA pada tahap isolasi
8.	Gelas ukur 1000 ml	Digunakan dalam pengukuran bahan cair seperti aquades, TBE, dan bahan cair lainnya dalam skala besar > 1 ml
9.	Gelas ukur 100 ml	Digunakan untuk menyimpan larutan <i>buffer</i> maupun bahan cair lain yang membutuhkan wadah tahan panas
10.	Duran 1000 ml	Digunakan dalam proses pemanasan dan pembuatan gel agarose untuk elektroforesis
11.	Duran 250 ml	Digunakan untuk proses menimbang bahan padat
12.	Duran 50 ml	Mengambil bahan padat
13.	<i>Hot plate</i>	Digunakan untuk proses homogen sampel
14.	Timbangan analitik digital	Digunakan untuk pengukuran suhu air
15.	Spatula	Tempat penyimpanan es batu saat proses <i>mixing</i> PCR berlangsung
16.	<i>Vortex</i>	Mengelektroforesis hasil isolasi DNA maupun produk hasil PCR
17.	Termometer	Media bantuan untuk visualisasi hasil elektroforesis
18.	<i>Cool Box</i>	Digunakan dalam proses PCR untuk amplifikasi DNA
19.	Mesin Elektroforesis	Tempat penyimpanan sampel dengan kebutuhan suhu berkisar -20 °C
20.	<i>UV-transilluminator</i>	Tempat penyimpanan sampel dengan kebutuhan suhu berkisar -4 °C
21.	Mesin PCR	Digunakan dalam proses ekstraksi dan isolasi DNA ayam walik
22.	Lemari pendingin -20 °C	Digunakan untuk <i>running</i> PCR
23.	Lemari pendingin -4 °C	Segel tabung produk PCR untuk pengiriman
24.	<i>Tube Eppendorf</i> 1,5 ml	Untuk mengambil larutan sekali pakai sesuai ukuran
25.	<i>Mini spin column</i>	Alat tulis guna mencatat
26.	<i>Collection tube</i>	Membungkus alat untuk disterilisasi
27.	<i>Tube PCR</i> 0,2 ml	Pemberi tanda
28.	Parafilm	Dokumentasi
29.	Tip 1-10	Pencatatan seputar penelitian
30.	Tip 20-200	Perangkat bantuan untuk mengolah dan menganalisis data penelitian
31.	Tip 200-1000	
32.	Spidol marker	
33.	Plastik tahan panas	
34.	<i>Aluminium foil</i>	
35.	Label	
36.	Kamera telepon genggam	
37.	<i>Logbook</i>	
38.	Laptop	
39.	Aplikasi NotePad	

Tabel 3.2
Bahan yang digunakan dalam penelitian

No.	Nama Bahan	Kegunaan
1.	Sampel darah	Subjek analisis penelitian
2.	Proteinase K	
3.	<i>DNeasy Blood & Tissue Kit</i> , termasuk di dalamnya <i>Buffer ATL</i> , <i>Buffer AL</i> , <i>Buffer AW 1</i> , <i>Buffer AW 2</i> , <i>Buffer AE</i>	
4.	<i>Ethanol absolute</i>	Digunakan dalam proses ekstraksi dan isolasi DNA ayam Walik
5.	GoTaq® Green Master Mix	
6.	Primer 1	
7.	Primer 2	Digunakan dalam proses amplifikasi DNA
8.	<i>Nuclear free water</i>	
9.	Aquades	
10.	10 X TBE	Digunakan untuk konfirmasi hasil isolasi DNA dan produk PCR dengan gel agarosa
11.	1 X TBE	
12.	Agarose, LE, <i>Analytical grade</i>	
13.	GelGreen	Campuran bagi pengenceran primer
14.	Blue 6X <i>Loading Dye</i>	
15.	<i>RNAse free water</i>	

3. 5. Prosedur Penelitian

3. 5. 1. Tahap Persiapan

Tahap persiapan dilakukan dengan persiapan alat, bahan dan sampel. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian sebelumnya disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121 °C dengan tekanan 1.5 atm selama 15 menit. Darah diambil dari bagian vena sayap ayam Walik dengan menggunakan *syringe* 1-3 cc yang telah diberi antikoagulan EDTA 10% dan disimpan pada suhu -20 °C (Aryani *et al.*, 2019).

3. 5. 2. Tahap Penelitian

3. 5. 2. 1. Koleksi Sekuens Gen HSP70 *G. gallus* dan Perancangan Primer

Dalam tahap ini hal pertama yang dilakukan adalah mengoleksi sekuens gen HSP70 Ayam (*G. gallus*). Sekuens yang digunakan sebagai cetakan diambil dari laman *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan nomor akses J02579 disimpan dalam format FASTA dengan ekstensi file .txt. Kemudian untuk langkah selanjutnya proses perancangan dan analisis primer dilakukan dengan menggunakan aplikasi *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp>). Primer dirancang spesifik sesuai dengan daerah target, yaitu mentargetkan daerah setelah sekuens basa posisi +466 hingga *terminator* untuk mengambil data yang belum terkoleksi dari penelitian sebelumnya (Aryani *et al.*,

2019) kemudian membaginya menjadi dua daerah amplifikasi, sehingga diharapkan akan ada dua pasang primer yang hasil amplikonnya diperkirakan memiliki panjang ≥ 950 bp.

Sekuens yang telah dikoleksi dengan format FASTA disimpan aplikasi *Benchling* dan ditandai menjadi dua bagian yang akan menjadi target amplifikasi (*Benchling [Biology Software]*, 2022). Dari kedua bagian tersebut ditetapkan primer *forward* dan primer *reverse* yang dapat mencakup keseluruhan bagian yang menjadi target, sehingga terbentuklah dua pasang primer dengan empat primer (2 *forward* dan 2 *reverse*). Masing-masing sekuens dari primer dimasukkan dan dianalisis menggunakan aplikasi *NetPrimer* (Abd-Elsalam, 2003). Kemudian hasilnya dianalisis dan dipilih yang sesuai dengan kriteria primer yang baik.

3. 5. 2. 2. Uji *In silico* PCR Rancangan Primer

Setelah primer terpilih, sebelum dipesan dan diuji secara *in vitro* untuk mendapat perkiraan keberhasilan primer, maka dilakukan uji *in silico* terlebih dahulu. Pengujian *in silico* ini ditujukan untuk melihat tingkat spesifisitas dan keberhasilan primer dalam mengamplifikasi sekuens gen HSP70 *G. gallus*. Sekuens pasangan primer dimasukkan pada aplikasi *Primer-BLAST* dan *WebPCR* (Pereira *et al.*, 2015), digunakan sekuens dengan nomor akses J02579 untuk mengisi kolom cetakan PCR. Kemudian analisis BLAST dilakukan. Hasil kemudian akan didapat berupa tampilan grafis dan keterangan mengenai spesifisitas sekuens primernya, serta prediksi mengenai suhu *annealing* optimal. Selanjutnya primer yang memenuhi kriteria akan dipesan ke Macrogen Inc., Korea Selatan.

3. 5. 2. 3. Isolasi DNA

Isolasi dan purifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan kit *DNeasy blood and tissue* (Qiagen, Venlo, Netherlands) akan melalui tahap ekstraksi dan tahap purifikasi, langkahnya yaitu: sebanyak 20 μ l *proteinase K* dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml, selanjutnya sebanyak 20 μ l darah ayam Walik dan 180 μ l *buffer ATL* dimasukkan ke dalam tabung yang sama dan dihomogenkan. Sampel kemudian diinkubasi di atas air dalam *waterbath* pada suhu 56 °C selama 60 menit, setelah itu ditambahkan sebanyak 200 μ l *buffet al*, dihomogenkan dan diinkubasi kembali di atas air dalam *waterbath* pada suhu 56 °C selama 10 menit. Ke dalam tabung sampel, 200 μ l *etanol absolut* dingin dimasukkan dan dihomogenkan,

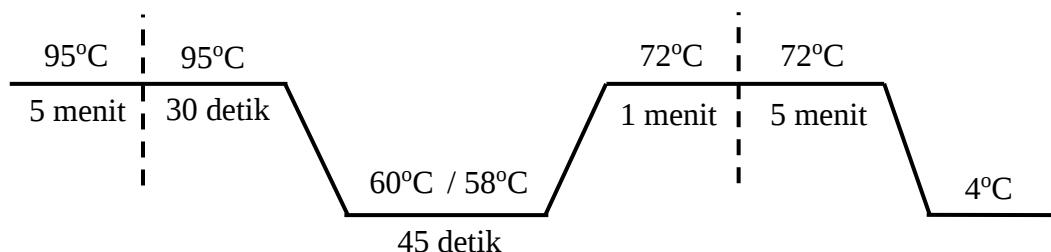
kemudian sampel dipindahkan ke dalam wadah *mini spin column* yang dilengkapi *collection tube*. Sampel kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm, supernatan dibuang. Selanjutnya ditambahkan 500 µl *buffer AW1* dan sampel disentrifugasi kembali selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm, supernatan dibuang kembali. Kemudian ditambahkan kembali 500 µl *buffer AW2* dan sampel disentrifugasi kembali selama 3 menit dengan kecepatan 14000 rpm, supernatan dibuang. Setelah itu wadah *mini spin column* dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml yang kemudian ditambahkan *buffer AE* sebanyak 100 µl dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Setelah 30 menit, sampel disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm dalam waktu 1 menit. Wadah *mini spin column* yang telah disentrifugasi kemudian dipindahkan kembali ke dalam tabung eppendorf 1.5 ml baru untuk ditambahkan lagi dengan 100 µl *buffer AE*, diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit, sehingga didapatkan dua stok DNA ayam Walik yang selanjutnya tabung eppendorf 1.5 ml berisikan sampel DNA ayam Walik disimpan dalam lemari pendingin pada suhu -20 °C.

3. 5. 2. 4. Amplifikasi Gen HSP70 dari DNA Ayam Walik

Amplifikasi gen HSP70 Ayam Walik dilakukan dengan menggunakan dua pasang primer yang masing-masing primernya mengamplifikasi besaran panjang basa yang berbeda, yaitu pasang primer pertama sebesar 963 bp dan pasang primer kedua sebesar 934 bp. Dalam amplifikasi ini digunakan kit *GoTaq Green Master Mix* masing-masing total reaksi sebanyak 25 µl per tabung PCR 0.2 ml yang terdiri dari 12.5 µl enzim *GoTaq Green Master Mix* (Promega, Madison, Wisconsin), 1 µl primer *forward* HSP70 (10 µM), 1 µl primer *reverse* HSP70 (10 µM), 1 µl DNA cetakan dan *nuclease free water* hingga mix mencapai 25 µl. Amplifikasi ini dibantu dengan penggunaan alat *thermocycle* oleh *GeneAmp 9700* yang diatur dengan beberapa pengaturan untuk beberapa kondisi. Program PCR dilakukan berdasarkan protokol *GoTaq Green Master Mix* dengan beberapa modifikasi.

Proses amplifikasi berlangsung sebanyak 35 siklus yang diawali dengan tahap denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, kemudian diikuti dengan tahap denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, tahap *annealing* yang dilakukan dengan suhu spesifik untuk setiap pasang primernya, 60 °C untuk pasangan primer

pertama dan 58 °C untuk pasangan primer kedua selama 45 detik, tahap ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit. Selanjutnya masuk pada tahap ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit dan tahap terakhir yaitu tahap holding pada suhu 4 °C (Gambar 3.1). Untuk menemukan suhu yang tepat bagi setiap primer, dilakukan optimasi PCR suhu *annealing* (Ta) hingga mendapatkan hasil amplifikasi terbaik.



Gambar 3.1. Diagram kondisi PCR primer pertama dan primer kedua gen HSP70

Produk PCR kemudian dikonfirmasi hasilnya dengan elektroforesis pada gel agarosa. Gel agarosa yang digunakan adalah gel agarose dengan konsentrasi 1% yang dibuat dengan menggunakan 0.36 g agarosa (Promega) yang dilarutkan dalam 30 ml ddH₂O steril dan diwarnai dengan pewarna *PaqGreen* (Promega), kemudian dicetak. Elektroforesis gel agarosa dilakukan dengan 100 volt selama 30 menit, setelahnya dilihat di atas *blupad UV illuminator*. Produk PCR yang dikonfirmasi baik hasilnya kemudian dikemas sesuai dengan ketentuan untuk dikirim ke *1st Base*, Selangor, Malaysia. Dari ke enam belas produk PCR yang ada, hanya satu sampel yang dikirimkan sebagai data awal dan uji validasi keberhasilan primer terhadap kesesuaiannya dalam mengamplifikasi daerah target.

3. 5. 2. 5. Sekuensing DNA Produk PCR

Sekuensing DNA dilakukan secara dua arah, *forward* dan *reverse* dengan ABI® PRISM *bigdye terminator cycle sequencing kit v3.1* oleh laboratorium *1st Base*, Selangor, Malaysia. Hasil sekuensing dianalisis untuk mengetahui sekuens dari daerah target amplifikasi.

3. 5. 2. 6. Analisis Data

a) Penggabungan Sekuens Basa (*Contig*)

Hasil yang didapat dari sekuensing merupakan sekuens *forward* dan *reverse* nukleotida. Data yang diperoleh ini diolah dan digabung (*contig*) menggunakan aplikasi Bioedit (Hall, 2011). Dari hasil *contig* akan didapatkan *consensus* dari kedua sekuens *forward* dan *reverse* yang setiap basa konsensusnya akan dianalisis

dengan melihat *peak* pada hasil sekuensing. Sekuens yang didapatkan kemudian disimpan dalam format FASTA dengan file ekstensi .txt pada aplikasi Notepad.

b) BLAST

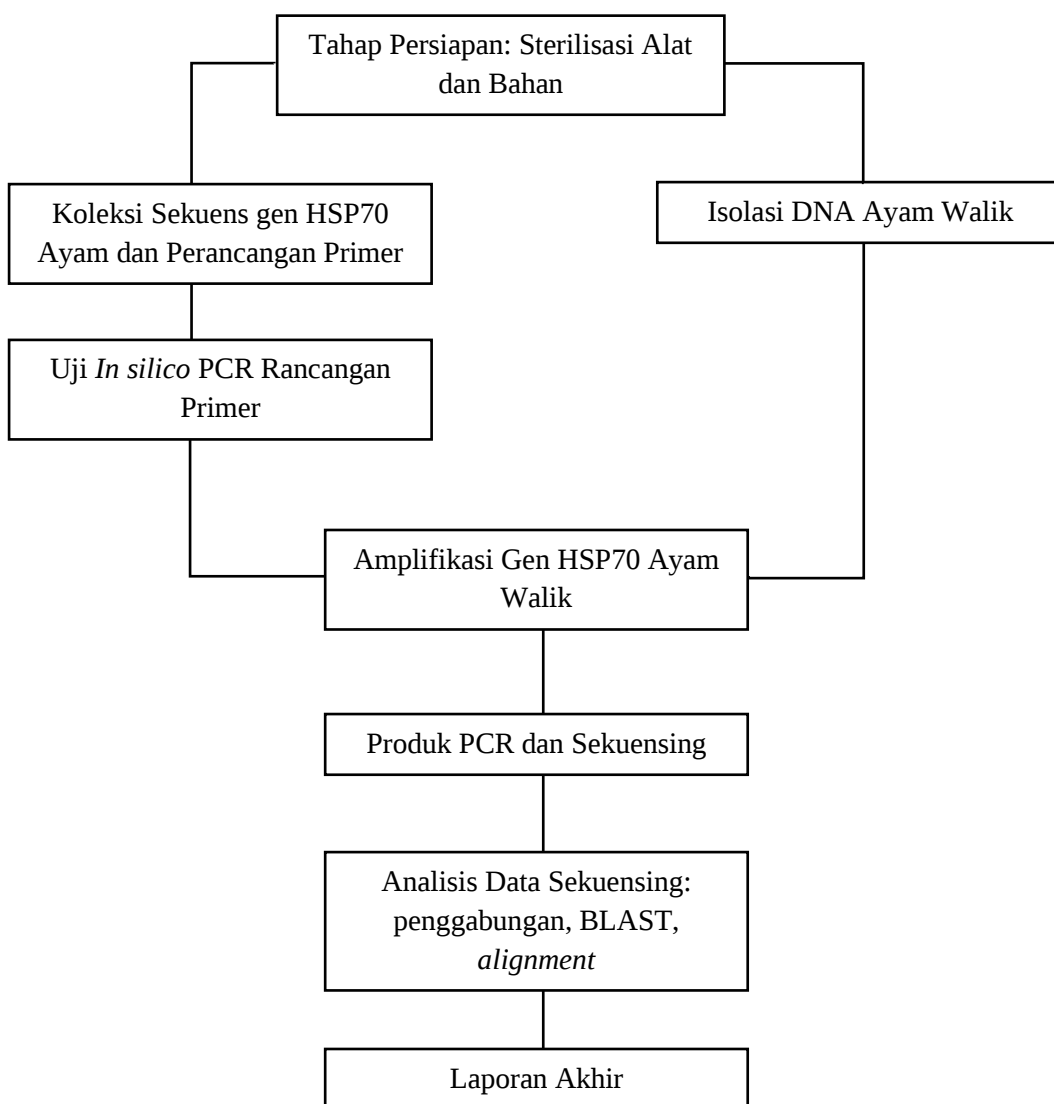
Data hasil *contig* sekuens gen HSP70 Ayam Walik dalam format FASTA yang sebelumnya didapatkan kemudian dianalisis pada proses selanjutnya, yaitu *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Analisis ini dilakukan secara *online* menggunakan aplikasi BLAST yang terdapat pada laman <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> dengan mengunggah sekuens *consensus* yang didapatkan sebelumnya, kemudian dilihat homologinya.

c) Alignment

Hasil *consensus* yang didapatkan untuk pasang primer pertama dan pasang primer kedua disejajarkan dengan gen HSP70 *G. gallus* (Morimoto *et al.*, 1986) dan gen HSP70 *G. gallus* sp. yang memiliki pola persebaran SNP (Mazzi *et al.*, 2003) dengan menggunakan perangkat lunak MEGA v.11 (Tamura *et al.*, 2021).

3. 6. Alur Penelitian

Alur penelitian dimulai dengan tahap persiapan, isolasi DNA dan koleksi sekuens gen, perancangan primer, uji *in silico* rancangan primer, amplifikasi, sekuensing. Kemudian analisis data dan pembuatan skripsi seperti yang tertera pada Gambar 3.2 di bawah ini.



Gambar 3.2. Diagram Alur Penelitian