

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, melanjutkan penelitian Aryani (2019, belum dipublikasikan), dengan menggunakan stok DNA dan stok darah ayam leher gundul Aryani (2019, belum dipublikasikan). Setelah diisolasi peneliti merancang primer DNA ayam pada aplikasi NCBI *BLAST*, kemudian di cek primernya pada *software Manager Clone 9*. Setelah dipesan primer diuji secara *in vitro* dengan mengamplifikasi DNA ayam yang sebelumnya sudah diisolasi, selanjutnya *amplicon* di *sequencing*. Hasil *sequencing* ini akan di *BLAST* dan di-*alignment* datanya dengan data ayam yang terdapat pada NCBI dengan kode akses J02579.1 (Gan *et al.* 2015) dan AY1788441, AY178442, AY178888443 (Mazzi *et al.* 2003).

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Ayam Legund dengan menggunakan dua buah darah dan delapan stok DNA Aryani (2019, belum dipublikasi) ayam legund.

3.3 Waktu dan Lokasi Penelitian

Pelaksanaan penelitian akan dilaksanakan selama Maret s.d. Juli 2022 dan berlokasi di Laboratorium Riset, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

3.4 Alat dan Bahan Penelitian

Tabel 3. 1 Daftar Alat yang Digunakan

No	Nama Alat	Jumlah
1.	<i>Autoclave</i>	1 <i>unit</i>
2.	Gelas ukur (Pyrex) 100 ml	1 <i>unit</i>
3.	Gelas ukur (Pyrex) 1000ml	1 <i>unit</i>

No	Nama Alat	Jumlah
4.	Kulkas	1 unit
5.	Mesin elektroforesis	1 unit
6.	Mesin PCR merk <i>Thermocycler GeneAmp® PCR System (Applied Biosystems TM)</i>	1 unit
7.	Mikropipet (0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL)	@1 unit
8.	NCBI Primer- <i>BLAST</i>	-
9.	Spatula	1 unit
10.	<i>Software Manager Clone 9</i>	-
11.	<i>Software Bioedit,</i>	-
12.	<i>Software MEGA 11</i>	-
13.	Timbangan analitik	1 unit
14.	Vortex	1 unit

Tabel 3. 2 Daftar Bahan yang Digunakan

No.	Nama Bahan	Jumlah
1.	Agarosa gel	1,8 gram
2.	Boric Acid	55 gram
3.	ddH ₂ O ionize	5 L
4.	DNA koleksi ayam leher gundul	@100 µL
5.	DNA <i>DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)</i>	Secukupnya
6.	Primer (<i>Forward&Reverse</i>)	25 µL
7.	GoTaq Green Master Mix (Promega)	25µL

No.	Nama Bahan	Jumlah
8.	larutan buffer	100 ml
9.	Loading dye	16 μ l
10.	Microtube Tube	Secukupnya
11.	Na ₂ EDTA	9,3 gram
12.	<i>Nuclease-free water</i>	secukupnya
13.	<i>Nucleic Acid Strain (Gel Red)</i>	Secukupnya
14.	Tabung Eppendorf	Secukupnya
15.	<i>Tips</i>	Secukupnya
16.	Tris Basa	108 gram

3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan sebagai berikut:

3.5.1 Sterilisasi

Semua bahan, yaitu : botol durham, tabung eppendorft, microtube, tips, gelas ukur dan *deion water* yang digunakan untuk penelitian disiapkan dan dipastikan tidak ada kekurangan Botol durham dan gelas ukur kemudian dicuci atau dibersihkan. Begitu pun bahan lainnya (tabung eppendorft, microtube, tips) disusun pada rak atau wadah. Kemudian ditutup rapat dengan menggunakan selotip dan dibungkus dengan kertas. Sterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan tekanan 1.5 atm dan suhu 121°C.

3.5.2 Pembuatan Larutan Stok

Pembuatan larutan stok ini digunakan agar peneliti dapat mengefisienskann waktu. Larutan stok yang dibuat antara lain buffer 10x TBE, berikut ini merupakan langkah-langkah yang digunakan dalam pembuatan buffer 10x TBE : Pertama larutkan Tris sebanyak 108 gram dan Boric Acid 55 gram dalam 900 ml aquades steril. Kemudian tambahkan 9,3 gram Na₂EDTA dan aduk hingga homogen.

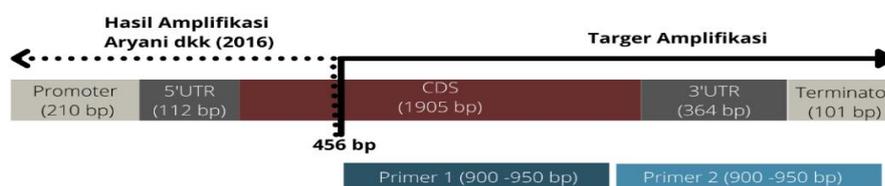
Setelah itu genapkan menggunakan aquades atau *deion water* steril hingga volume genap 1 liter. 10x TBE sudah siap dan dapat disimpan pada suhu ruangan.

3.5.3 Mengumpulkan Data Sequence

Sequence dikumpulkan sebelum desain primer, untuk menentukan daerah target yang akan diamplifikasi. *Sequence* digunakan adalah *sequence* lengkap gen HSP70 ayam (*Gallus gallus*) berdasarkan penelitian Morimoto (1986) dengan kode access J02579.1 pada NCBI. Setelah menentukan *sequence*, selanjutnya memastikan peta SNP yang ditemukan oleh Gan (2015) untuk memastikan daerah yang menjadi target amplifikasi terdapat SNP. Kemudian membuat pola daerah yang sudah diamplifikasi oleh Aryani (2019, belum dipublikasi) di mana sudah terdapat hasil amplifikasi sebesar 787 bp, sehingga dapat menentukan daerah mana yang akan digunakan sebagai target amplifikasi.

3.5.4 Desain Primer

Perancangan primer secara spesifik dengan ukuran 900-950 bp pada daerah target *coding region* (1905 - 465) bp dan 3'UTR (364 bp) dilakukan menggunakan NCBI *Pick-Primers* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/design-pcr-primers/>). Adapun langkah-langkah yang digunakan dalam mendesain Primer berdasarkan situs resmi NCBI, yaitu : Pertama cari *sequence* pada laman pencarian NCBI. Kemudian klik gen target lalu pilih *Pick Primer*. Setelah itu atur wilayah *coding* ke 456 bp sampai 2692 bp seperti yang terlihat pada Gambar 3.1. Setelah itu atur parameter primer seperti TM , ukuran produk, dan lain-lain. Setelah itu klik tombol dapatkan primer. Kemudian hasilnya dicek validitasnya apakah sudah memenuhi standar atau belum.



Gambar 3. 1. Representasi skema target amplifikasi dari gen ayam Leher Gundul.

Tanda panah putus-putus menunjukkan data amplifikasi hasil penelitian sebelumnya dan panah garis menunjukkan data target

amplifikasi. Sedangkan kotak biru tua dan muda menggambarkan letak dan ukuran primer yang dipesan.

3.5.5 Validasi Primer

Software Manager Clone 9 digunakan untuk tahap validasi primer. Desain primer yang dibuat, kemudian dimasukkan satu persatu pada *software Manager Clone 9* dan atur karakter primer sesuai dengan karakteristik primer yang baik menurut Pradnyaniti *et al.* (2013). Adapun langkah-langkah yang digunakan dalam validasi primer, sebagai berikut : pertama buka *software Manager Clone 9*. Muncul *Greeting Started* pada layar, kemudian pilih *primer with evaluation* dan klik *go*. Akan muncul laman detail dan analisis primer, pilih edit primer pada pojok kiri atas dengan ikon pensil. Kemudian ubah nama, masukan *sequence* dan detail lalu pilihlah *type PCR primers*, setelah itu klik oke. Pilih kriteria pada pojok kiri atas sebelah edit primer, pemilihan kriteria ini bertujuan untuk memastikan bahwa kriteria yang digunakan sudah sesuai yang kita inginkan. Penyetingan ini berdasarkan penelitian Pradnyaniti *et al.* (2013) pada Tabel 3.3. Kemudian akan muncul keterangan terkait status primer, pada laman detail akan muncul ringkasan singkat terkait hasil validasi dan pada laman analisis akan terlihat Tabel kriteria primer. Setelah itu primer yang sudah sesuai dipilih dua pasang dan di-BLAST terlebih dahulu.

Tabel 3. 3 Karakteristik dan Kriteria Parameter yang Baik

No	Karakteristik	Kriteria parameter
1	Melting temperature (TM)	55°C - 80 °C
2	% GC	40-60 %
3	3' Dimer	Dimer pada ujung 3' primer sebaiknya tidak lebih dari 3 basa

No	Karakteristik	Kriteria parameter
4	Stabilitas	Rentang stabilitas suatu primer adalah 1,2 – 2 kca
5	<i>Repeats</i>	tidak terdapat <i>Repeats</i>
6	<i>Hairpins</i>	tidak terdapat <i>Hairpins</i>

3.5.4 BLAST Primer

Primer yang sudah divalidasi kemudian di- *Basic Lokal Alignment Search Tool (BLAST)* untuk melihat daerah penempelan primer secara *in silico*. Langkah yang dilakukan, yaitu: membuka home NCBI kemudian pilih Primer *BLAST*. Setelah itu masukan *sequence* gen HSP70 ayam dengan kode *akses sequence* J02579.1 dalam format fasta. Kemudian masukkan satu atau kedua urutan primer di bagian “Parameter Primer” pada formulir. Jika hanya satu primer yang tersedia, urutan *template* juga diperlukan. Lihat "Urutan *Template* Target...". Di bagian Parameter Pemeriksaan Spesifisitas Pasangan Primer, pilih Organisme sumber yang sesuai dan *database* terkecil yang kemungkinan berisi urutan target. Pengaturan ini memberikan hasil yang paling tepat. Kemudian pilih tombol "*BLAST* Primer" untuk mengirimkan pencarian dan mengambil informasi *template* dan spesifisitas, sebelum akhirnya dipesan.

3.5.6 Isolasi DNA

Dua sampel darah stok Aryani (2019, belum dipublikasi) diambil dan diisolasi dengan menggunakan *DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen)* pada laman web resmi (<https://www.qiagen.com>) dengan cara: tambahkan 20 µl Proteinase K kedalam *microtube* 1,5 ml. Setelah itu tambahkan juga 40 µl sampel darah, kemudian masukan 180 ul Buffer ATL. Homogenkan larutan dan simpan pada *waterbath* untuk diinkubasi selama satu jam pada suhu 56°C. Kemudian masukan 200 ul Buffer AL inkubasi lagi selama sepuluh menit pada suhu 56°C. Setelah itu masukan 200 ul Etanol Absolut dingin, pindahkan ke DNeasy mini tube spin colum

dan diamankan selama semalam. Sentrifuge selama satu menit dengan kecepatan 8000 rpm, kemudian buang supernatant, dan pindahkan *DNeasy mini tube spin colum ke collect tube* yang baru. Tambahkan 500 ul buffer AW1 dan sentrifuge selama satu menit dengan kecepatan 8000 rpm, kemudian buang supernatant, dan pindahkan *DNeasy mini tube spin colum ke collect tube* yang baru. Setelah itu tambahkan 500 ul buffer AW2 dan sentrifuge selama tiga menit dengan kecepatan 14000 rpm, kemudian buang supernatant, dan pindahkan *DNeasy mini tube spin colum ke microtube* 1,5 ml yang baru. Tahap terakhir masukan 100 ul buffer AE, diamankan selama 30 menit kemudian sentrifuge selama satu menit dengan kecepatan 8000 rpm. (Ulangi langkah ini agar mendapatkan dua stok isolasi DNA). Simpan DNA pada suhu -20°C. Hasil yang diharapkan adalah terdapat pita yang bersih dari setiap sampel.

3.5.6 Optimasi PCR DNA Ayam Leher Gundul

Primer yang telah dipesan dilakukan optimasi dengan alat PCR (*Polymeration Chain Reaaction*) menggunakan dua pasang primer, untuk mengamplifikasi daerah target amplifikasi sebesar 963 bp (primer satu) dan 934 bp (primer dua). Dari total sepuluh sampel DNA yang ada diambil satu sampel secara acak untuk dilakukan optimasi. Sampel yang digunakan adalah sampel J di mana dilakukan perbedaan suhu *annealing* saat proses amplifikasi dengan alat PCR dalam mengecek suhu penempelan primer pada kondisi amplifikasi yang optimal. Suhu *annealing* ditentukan menggunakan rumus sebagai berikut: $TM \text{ Primer (suhu } annealing) = ((TM \text{ pada label primer 1} + TM \text{ pada label primer}) : 2) - 5 = \text{suhu optimasi pertama.}$

Pengurangan 5°C ini bertujuan untuk melihat terdapatnya pita DNA. Adapun langkah yang dilakukan dalam melakukan optimasi sebagai berikut: pertama-tama primer siapkan primer yang akan diujikan dan DNA stok satu sampel ayam legund. Kemudian optimasi PCR dilakukan dengan menggunakan beberapa formulasi *mix* PCR di mana GoTaq *Green Master Mix* sebanyak 12.5 µL atau 25 µL, kemudian masukan masing-masing 0,1-0,4 µM primer HSP70 *Forward* dan HSP70 *Reverse* (10 µM). dan *nuclease-free water* sampai *volume* mencapai 23µL atau 48 µL. Kemudian ambil 11,5 µL atau 24 µL, lalu masukkan 1-4 µL sampel DNA. Aplikasi PCR terdiri dari denaturasi pertama atau awal pada suhu 95°C

selama 5 menit, diikuti melalui 35 kali denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, selanjutnya akan dilakukan *annealing* pada suhu 58°C selama 45 detik, dilanjutkan dengan tahap *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit, dan tahap terakhir yaitu tahap ekstensi pada 72° C selama 5 menit (Aryani ,2019 (belum dipublikasikan)). Keberhasilan tahap ini ditandai dengan *single* pita yang muncul saat dilakukan elektroforesis.

3.5.7 Amplifikasi DNA Ayam Leher Gundul

Setelah didapatkan suhu optimasi *annealing*. Sembilan sampel sebelumnya diamplifikasi dengan menggunakan formula dan program pada alat PCR yang sama dengan saat optimasi. Berikut ini ketentuan terkait keberhasilan amplifikasi menggunakan PCR, sebagai berikut: pita yang terlihat *single*, ukuran pita pada amplicon sesuai dengan target amplifikasi 1803 bp dan ukuran *amplicon* sesuai dengan ukuran primer 900-950 bp.

3.5.8 Elektroforesis

Hasil isolasi, optimasi PCR dan amplifikasi PCR dianalisis dengan bantuan elektroforesis pada gel agarosa 1-2%, yang diwarnai dengan *Nucleic Acid Strain (Gel Red)* sesuai volume agarose. Adapun berikut ini cara pembuatan agarose 1%, dengan volume 100 ml, sebagai berikut : Timbang agarose 1 gram, kemudian masukan dalam botol durham. Kemudian buffer 1x TBE ditambahkan sebanyak 100 ml dan homogenkan terlebih dahulu. Panaskan agarose sampai agarose larut, diamkan sampai suhu agarose hangat-hangat kuku. Tambahkan 3 µL *Nucleic Acid Strain*, lalu homogenkan. Tunggu agar sampai hangat-hangat kuku, lalu tuangkan agarose pada cetakan agarose di tunggu agarose membeku sempurna. Agarose kemudian dapat digunakan.

Selanjutnya elektroforesis, pertama siapkan alat elektroforesis dan pastikan kutub listrik positif dan negatifnya tidak terbalik. Kemudian masukan buffer 1x TBE kedalam *chamber* sampai bisa merendam agarose (kurang lebih 500 ml), lalu letakan *gel agarose* pada *chamber* dan pastikan sudah terendam larutan buffer 1x TBE. Selanjutnya masukan sampel yang sudah dicampurkan *loading dye* (Promega) dengan formulasi dengan perbandingan sampel DNA (5) : *loading dye* (1), kemudian tahap terakhir *running* dengan waktu 20-25 menit untuk volt 100, dan 30-90 menit untuk volt 50. Adapun ketentuan terkait keberhasilan amplifikasi

menggunakan PCR, sebagai berikut: terlihat pita DNA, ukuran pita pada ampikon sesuai dengan target yaitu 900-950 bp, dan pita DNA tidak *smear*.

3.5.9. Sequencing

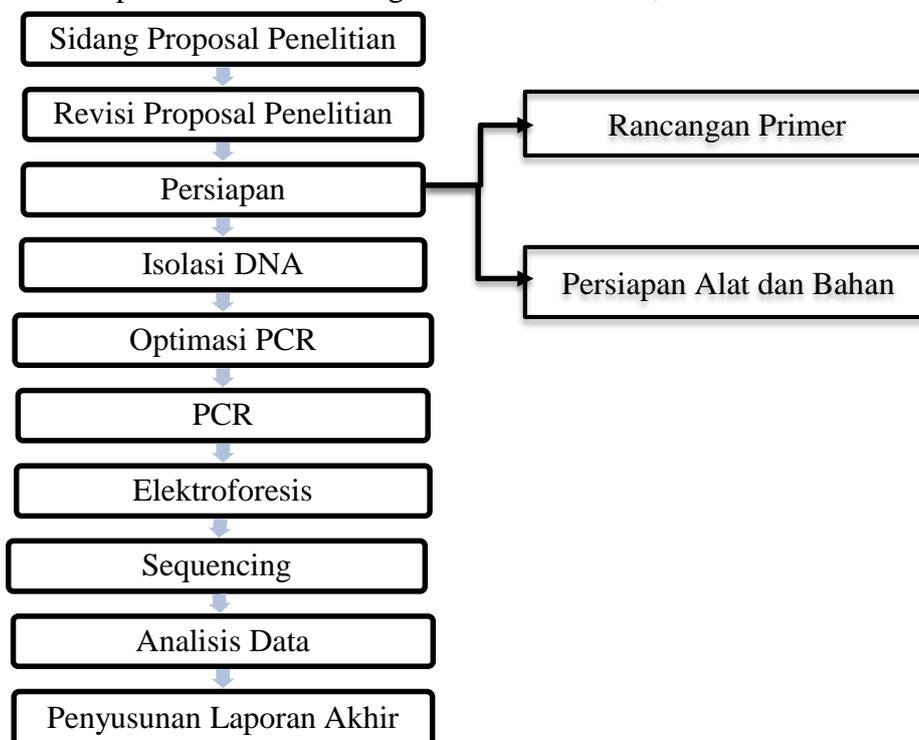
Setelah hasil elektroforesis DNA sampel hasil amplifikasi primer satu dan primer dua sesuai target. Kemudian sampel di-*sequencing* dengan terminator *Big Dye ABI® PRISM v3.1* melalui jasa layanan *sequencing First BASE Laboratories* (Selangor, Malaysia). Diharapkan hasil *sequencing* (Grafik *Chromatogram*) memiliki puncak yang jelas pada setiap urutan basanya atau tidak lebih dari 1 puncak untuk setiap urutan basa.

3.6 Analisis Data

Hasil *sequencing* DNA akan dibuat konsensusnya menggunakan *software Bioedit* kemudian kosensus gen HSP70 ayam leher gundul akan di-*BLAST* di NCBI. Diharapkan hasil *alignment* data sesuai dengan hasil pada *reference* pada NCBI. Kosensus di *alignment* dengan gen J02579.1, AY178441, AY178442 dan AY178443 menggunakan *software MEGA*.

3.7 Alur Penelitian

Alur dari penelitian ini dapat dilihat melalui bagan alur Gambar 3.2, berikut:



Gambar 3. 2 Bagan Alur Penelitian