

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif untuk menjelaskan desain primer multipleks gen penanda halal yang akan digunakan untuk mendeteksi kehalalan jenis daging pada produk olahan daging menggunakan *Multiplex-PCR* dan visulasi hasil PCR melalui elektroforesis gel agarose. Adapun metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *in vitro* dan *in silico*.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Kegiatan penelitian dimulai dengan tahap *in silico* yang dilaksanakan di rumah peneliti yaitu pada bulan Februari hingga bulan Maret 2022, sedangkan penelitian *in vitro* dilaksanakan di Laboratorium Riset, Departemen Pendidikan Biologi, FPMIPA, UPI yaitu pada bulan Mei hingga bulan Juli 2022. Adapun waktu pelaksanaan penelitian *in vitro* terdapat keterlambatan dikarenakan terjadi hambatan pada proses pengiriman primer untuk *Multiplex-PCR* dari Macrogen Korea. Penelitian dilanjutkan pada tahap analisis data dan pembuatan laporan akhir.

3.3. Alat dan Bahan

1. Alat

Gunting, pinset, *micropestle*, kaca arloji, *aluminium foil*, plastik *wrap*, gelas kimia, gelas ukur, mikropipet, mikrotips (biru, kuning, putih), pipet, sentrifuge, vortex, spatula, tube PCR (0.2 mL), tabung Eppendorf (1.5 mL), botol duran, kuarsa, botol semprot, *tissue*, timbangan analit PCR ik, waterbath, inkubator, kulkas, *hot plate*, kit elektroforesis gel, mesin elektroforesis, *Thermal Cycler PCR*, *UV transiluminator*, website NCBI, *software NotePad*, *software Primer Pooler*, *software Aliview*.

2. Bahan

Daging mentah segar (sapi, babi, tikus, ayam), sosis, *nugget*, bakso, *Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega)*, alcohol 70%, isopropanol, aquades, air deion, *GoTaq® Green Master Mix 2X*, *loading dye*, *DNA ladder*, primer *forward* dan *reverse*, gel agarose, *buffer* (TBE), pewarna DNA, data sekuen primer multiplex *forward* dan *reverse*.

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Prosedur *In Silico*

Prosedur *in silico* dilakukan untuk merancang urutan primer sapi dan babi serta simulasi dan optimasi *Multiplex-PCR*. Prosedur *in silico* merupakan langkah yang efektif dan efisien karena dapat meminimalisir kesalahan prosedur *in vitro* (Pratiwi *et al.*, 2019). Berikut prosedur *in silico* yang dilakukan pada penelitian ini:

1. Desain Primer Multipleks

Primer multipleks yang akan dirancang dalam penelitian ini harus memenuhi parameter diantaranya: 1) ukuran primer 18-27 bp; 2) maksimum selisih masing-masing amplicon 200 bp 3) *Temperature melting* (Tm) 57-63°C (maksimum perbedaan 0,5-1°C); 4) kandungan GC primer 40-60%; 5) maksimum *self-complementarity* 8,00 dan 3' *self-complementarity* 3,00; 6) maksimum *repeats* (urutan pengulangan 2 basa) 2 kali; 7) maksimum *runs* (pengulangan) 4 kali; 8) maksimum *GC Clamp* (basa G/C di ujung 5 terakhir) 3 basa; 9) primer dimer harus diminimalisir; 10) kesamaan suhu leleh (Tm) masing-masing primer (Ozturk & Can, 2017; Shen *et al.*, 2010). Langkah atau tahapan dalam merancang primer dimulai dari pengambilan data sekuen genom mitokondria sapi dan babi dari situs *Genebank* NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dengan memasukkan kata kunci “Nama spesies (spasi) mitochondrion”, setelah muncul genom mitokondria dari spesies babi atau sapi dengan kategori “*complete genome*” maka genom tersebut dipilih. Sekuen dari genom dilakukan uji homologi dengan *data base* yang ada pada situs NCBI melalui BLAST. Sekuen genom yang terpilih dari hasil BLAST akan digunakan untuk perancangan primer melalui menu *Pick primer* atau Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) untuk mendapatkan urutan primer dengan menyesuaikan parameter yang sudah ditetapkan. Setiap urutan primer yang muncul dengan daerah penempelan primer yang telah diketahui, dianalisis berdasarkan parameter primer yang telah ditentukan dan dilakukan pengecekan atau uji homologi untuk memastikan primer berasal dari spesies babi/sapi yang digunakan (Zangenberg *et al.*, 1999). Pasangan primer spesifik kemudian digunakan untuk simulasi m-PCR secara *in silico*.

2. Simulasi *Multiplex-PCR* secara *In silico*

Pasangan primer spesifik yang telah didesain, digunakan untuk pre-amplifikasi atau simulasi *Multiplex-PCR* secara *in silico* menggunakan *software Primer Pooler* (<http://ssb22.user.srcf.net/pooler/>) untuk menghindari terjadinya interaksi antara primer yang tidak diinginkan yaitu dimer dan *overlaps* (Brown *et al.*, 2017; Zangenberg *et al.*, 1999). *Primer Pooler* merupakan aplikasi yang dirancang dengan protokol eksperimental yang dioptimalkan untuk meminimalisir masalah interaksi primer yang tidak diinginkan pada proses amplifikasi. Primer yang digunakan dalam *software* ini berupa pasangan primer yang dirancang untuk proses *Multiplex-PCR* dengan persyaratan yang baik berdasarkan protokol standar yaitu memiliki nilai Delta G nol atau tidak negatif, karena semakin negatif maka kemungkinan terbentuknya dimer dan *overlaps* semakin besar. Nilai ambang batas (*threshold*) untuk delta G yaitu ≥ -7 kkal/mol (Brown *et al.*, 2017). Data yang dibutuhkan untuk simulasi dan optimasi *Multiplex-PCR* secara *in silico* yaitu data genom dan urutan primer ayam, babi, sapi, dan tikus. Data genom dapat diunduh dari situs NCBI-Genom dengan memasukkan kata kunci berupa “Nama Spesies” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), kemudian seluruh data genom (format .2bit) digabungkan menggunakan *software* AliView sedangkan urutan primer yang telah didesain harus disusun dalam bentuk fasta format (.txt) dengan kode >Primer (F/R).

Proses simulasi dimulai dengan *Single-PCR* untuk uji coba pasangan primer dari setiap spesies menggunakan data genom yang sudah diunduh sebelumnya. Langkah simulasi dimulai dengan membuka *software* PrimerPooler, kemudian akan muncul perintah untuk memasukkan file urutan primer (format .txt). Setelah file urutan primer dimasukan akan muncul berbagai perintah diantaranya mengisi angka untuk temperatur yang akan digunakan dan berbagai komponen PCR sesuai dengan protokol standar yang telah ditetapkan untuk mengetahui keberadaan interaksi primer yang ditunjukkan dengan nilai dG. Perintah selanjutnya yaitu memasukkan data genom dari spesies yang digunakan, kemudian proses amplifikasi secara *in silico* akan berjalan. Proses amplifikasi telah berhasil jika urutan pasangan primer yang telah didesain berhasil ditemukan di dalam genom dan tidak terjadi *overlaps*. Seluruh urutan primer yang telah

berhasil teramplifikasi melalui *Single*-PCR selanjutnya disusun dalam bentuk fasta format (.txt) untuk digunakan di dalam simulasi *Multiplex*-PCR dengan prosedur yang sama. Urutan primer hasil simulasi *in silico* terbaik, dipesan ke Macrogen Korea. Setelah DNA dan primer tersedia, dilakukan validasi *in vitro*.

3.4.2. Prosedur *In vitro*

1. Persiapan Sampel

Sampel daging mentah segar sapi dan ayam dikumpulkan dari Rumah Potong Hewan (RPH) Ciroyom, Bandung, sedangkan sampel daging tikus dan babi didapatkan dari seorang pemburu yang tidak ingin disebutkan namanya. Pengujian kehalalan menggunakan produk olahan daging sosis, *nugget*, dan bakso yang didapatkan dari pasar, toko *frozen food*, dan supermarket di Kota Bandung dengan ketentuan produk ber-merk yang berlabel halal dan produk curah (tanpa merk dan label halal).

2. Isolasi dan Ekstraksi Sampel DNA

Metode isolasi dan ekstraksi sampel DNA pada penelitian ini menggunakan *Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega)*. Tahap awal yaitu lisis sel, sebanyak 0.01 gr sampel yang sudah dihancurkan dengan *micropestle* dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1.5 mL, lalu ditambahkan 600 μ L buffer *nuclei lysis* dan dihomogenkan, kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu 65°C. Tahap selanjutnya yaitu presipitasi RNA dan protein. Sampel yang sudah diinkubasi ditambahkan 3 μ L *RNase*, lalu inkubasi kembali selama 30 menit pada suhu 30°C dan didiamkan pada suhu ruangan selama 5 menit. Sebanyak 200 μ L *protein precipitation* ditambahkan dan dihomogenkan dengan *Vortex* selama 20 detik, lalu didinginkan di atas es selama 5 menit. Sampel disentrifugasi pada 13.000-16.000 rpm selama 4 menit. Tahap akhir yaitu presipitasi dan rehidrasi DNA. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 mL yang baru, kemudian ditambahkan 600 μ L isopropanol lalu sentrifugasi selama 1 menit dan DNA akan terlihat pada pellet. Supernatan dibuang dan ditambahkan 600 μ L etanol 70% dan sentrifugasi kembali selama 1 menit. Supernatant dibuang untuk memisahkan pellet dari Etanol, lalu didiamkan selama 15 menit dengan posisi tutup tabung terbuka atau terbalik di atas *clean absorbent paper*, kemudian ditambahkan 100 μ L DNA *rehydration* dan diinkubasi pada suhu 65°C

selama 60 menit (Promega Corporation, 2019). DNA hasil isolasi divisualisasi melalui elektroforesis menggunakan gel agarose 1% dalam larutan *buffer* TBE 1X yang telah dicetak sehingga terbentuk sumur pada gel. Sebanyak 4 μ l sampel DNA dilarutkan dalam 1 μ l *loading dye*, kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel yang telah direndam dengan larutan TBE 1X sebagai *buffer running*. Elektroforesis berlangsung selama 30 menit pada tegangan 50 Volt dan hasilnya divisualisasi pada UV *Transilluminator* kemudian didokumentasikan dengan kamera *smartphone* (Ariyanti & Sianturi, 2019).

3. Optimasi dan Amplifikasi *Multiplex*-PCR

Amplifikasi dilakukan melalui *Single*-PCR dan *Multiplex*-PCR menggunakan kit amplifikasi PCR GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corporation, 2021). *Single*-PCR dilakukan sebagai kontrol positif dengan total volume reaksi 10 μ L terdiri dari 5 μ L GoTaq® Green Master Mix, 1 μ L primer forward 10 μ M, 1 μ L primer reverse 10 μ M, 1 μ L sampel DNA dan 2 μ L *Nuclease free water*, sedangkan total volume reaksi *Multiplex*-PCR yaitu 25 μ L terdiri dari 12,5 μ L, 8 μ L mix primer forward dan reverse, 4 μ L sampel DNA dan 0,5 *Nuclease free water*. Kontrol negatif yang digunakan dalam proses amplifikasi yaitu larutan 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 (2019) dengan memodifikasi suhu denaturasi, siklus PCR dan optimasi suhu *annealing* (T_a). Proses amplifikasi dimulai dengan pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, selanjutnya 35 siklus diawali dari tahap denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik. Tahap *annealing* dilakukan pada suhu yang berbeda-beda dimulai dari suhu rendah yaitu 55, 58, 60, 63, dan 65°C selama 30 detik. Tahap *extension* berlangsung pada suhu 72°C selama 30 detik pada tahap awal dan 5 menit pada tahap akhir, kemudian tahap akhir yaitu *holding* pada suhu 4°C. Produk PCR yang akan digunakan harus dihomogenkan terlebih dahulu menggunakan *microcentrifuge* untuk digunakan dalam elektroforesis gel agarose. Suhu *annealing* (T_a) hasil optimasi *Multiplex*-PCR secara *in vitro* yang terbaik akan digunakan untuk amplifikasi produk olahan daging.

4. Elektroforesis dan Visualisasi dari Hasil PCR

Visualisasi hasil PCR dilakukan melalui elektroforesis dengan gel agarose 1% dalam larutan *buffer* TBE 1X. Tahap elektroforesis dimulai dengan menyiapkan gel agarose 1% yang telah dicetak pada cetakan gel dan sisir sehingga terbentuk sumur. Gel agarose direndam dengan TBE 1X (*buffer running*) di dalam mesin elektroforesis, kemudian 1 μ L DNA *ladder* dan 1 μ L *loading dye* dilarutkan di dalam 4 μ L air deion, kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel agarose untuk *ladder*. Sebanyak 5 μ L produk PCR dimasukkan ke dalam sumur gel agarose untuk sampel. Elektroforesis gel agarose berlangsung selama 30 menit pada tegangan konstan 100 volt, selanjutnya gel divisualisasi pada UV *Transilluminator* dan didokumentasikan dengan kamera *smartphone* (Qin *et al.*, 2019).

3.5. Indikator Keberhasilan

Indikator keberhasilan setiap tahap dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3. 1. Indikator Keberhasilan Setiap Tahap

No	Tahap	Indikator Keberhasilan
1	Desain Primer Gen Penanda Halal	Didapatkan sikuen 4 pasang primer spesifik gen penanda halal dengan selisih amplicon minimal 200 bp.
2	Kualitas DNA	Didapatkan pita DNA yang jelas dan tebal serta tidak ada <i>smear</i>
3	Simulasi dan Optimasi primer <i>Multiplex-PCR in silico</i>	Setiap primer berhasil teramplifikasi tanpa dimer dan overlaps. Dimer dapat ditoleransi pada nilai $dG \geq -7$ kkal/mol.
4	<i>Multiplex-PCR</i>	Didapatkan ketebalan pita serta ukuran besar pasang basa dari setiap sampel yang diuji.
5	Elektroforesis dan Visualisasi produk hasil m-PCR	Didapatkan visualisasi berupa pasangan basa sampel serta pita sapi, babi, ayam dan tikus yang dapat dibedakan

3.6. Teknik Pengumpulan Data dan Analisis Data

Data yang dikumpulkan dan dianalisis berasal dari prosedur *in silico* dan *in vitro* yang disajikan dalam bentuk tekstular, tabel dan gambar. Berikut ini format pengumpulan data dan analisis data yang digunakan dalam penelitian ini:

Tabel 3. 2. Format Desain Primer Gen Penanda Halal

Jenis Daging	Gen Target	Sekuen Primer (5'-3')	Amplikon (bp)
Sapi			
Babi			
Tikus			
Ayam			

Tabel 3. 3. Format Simulasi Primer Multipleks Gen Penanda Halal secara *In silico*

Spesies	Gen Target	Multiplex-PCR
Sapi		+/-
Babi		+/-
Tikus		+/-
Ayam		+/-

Keterangan: +: terdeteksi / -: tidak terdeteksi

Tabel 3. 4. Format Optimasi Suhu *Annealing Single* dan *Multiplex-PCR*

Spesies	Multiplex-PCR				
	55°C	58°C	60°C	63°C	65°C
Sapi	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Babi	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Tikus	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Ayam	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

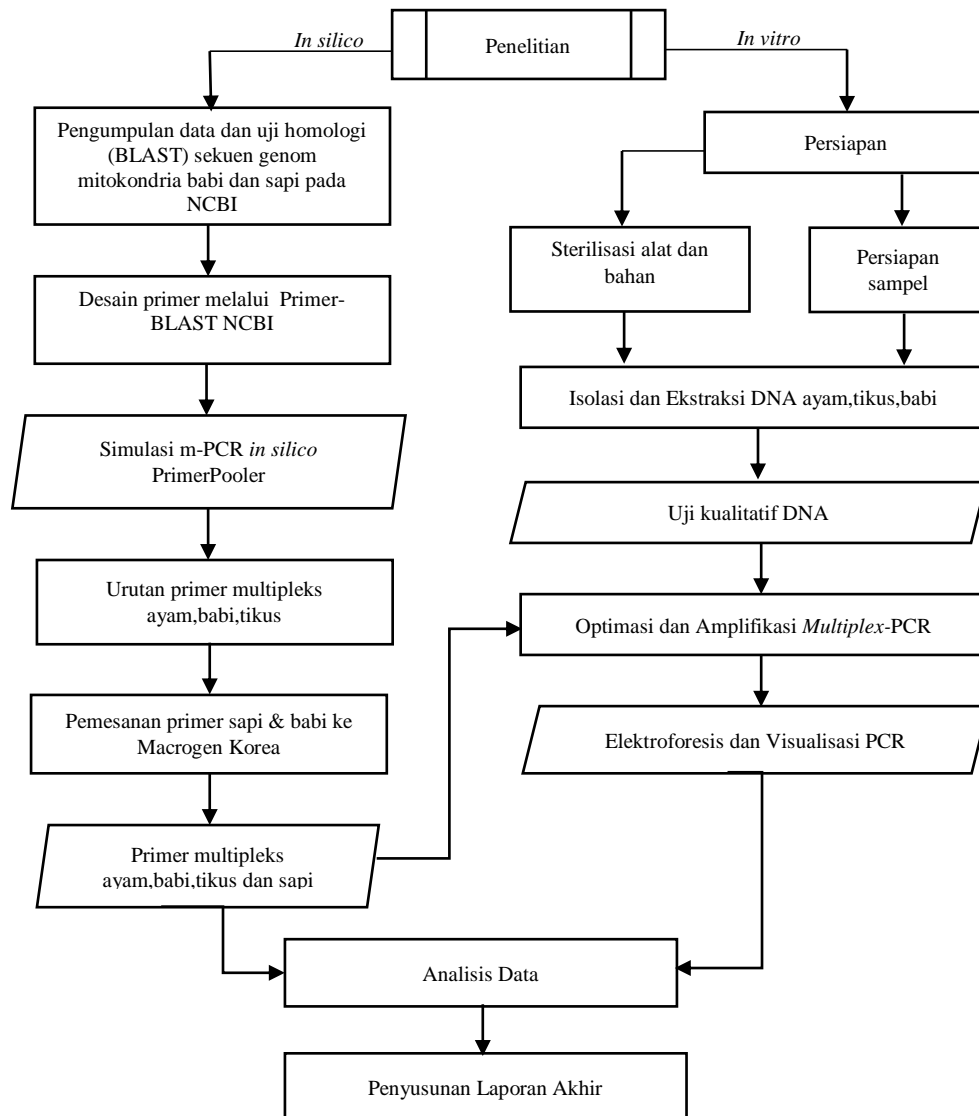
Keterangan: +: terdeteksi / -: tidak terdeteksi

3.7. Penafsian Data dan Penyimpulan Data

Penafsiran data dan penyimpulan dilakukan berdasarkan hasil simulasi dan optimasi primer m-PCR secara *in silico*, desain primer, serta visualisasi produk m-PCR melalui elektroforesis. Penafsiran dan penyimpulan disajikan dalam bentuk uraian dan pembahasan mengenai data yang telah didapatkan yang didukung oleh teori dan hasil penelitian sebelumnya yang relevan.

3.8. Alur Penelitian

Gambar 3.1. berikut adalah diagram alur penelitian untuk menggambarkan kegiatan yang dilakukan pada penelitian ini:



Gambar 3. 1. Diagram Alir Penelitian