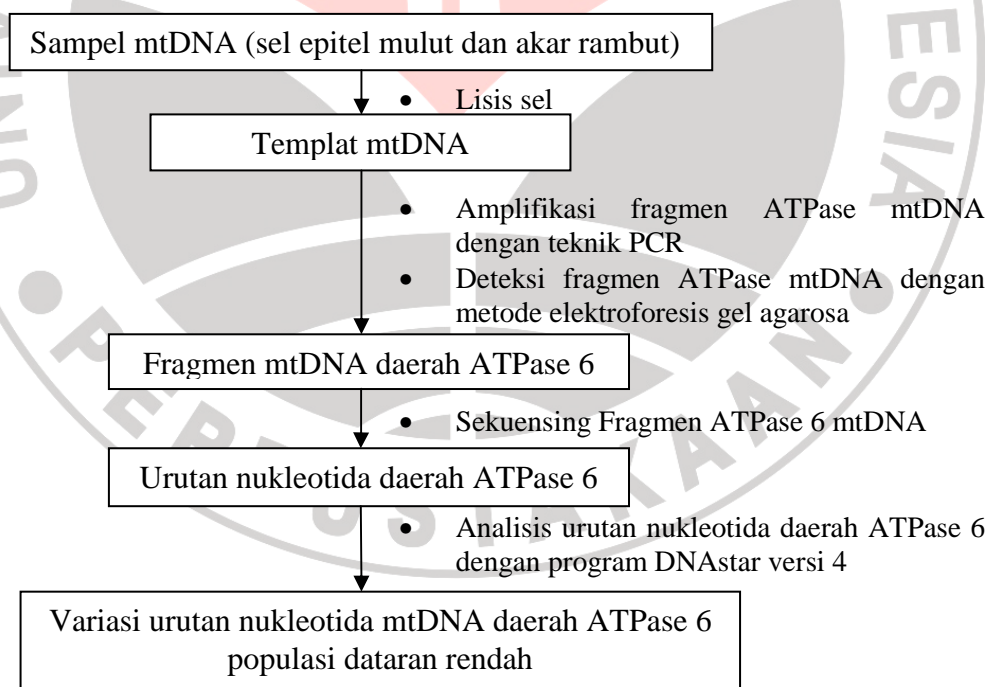


BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Pada penelitian ini terdapat lima tahapan utama yaitu pengumpulan sampel mtDNA berupa epitel mulut, ekstraksi mtDNA melalui proses lisis sel epitel mulut dan akar rambut, amplifikasi fragmen mtDNA daerah ATPase 6 menggunakan metode PCR, penentuan urutan fragmen nukleotida mtDNA hasil amplifikasi dan analisis urutan nukleotida mtDNA dengan program Seqman DNASTar versi 4.

3.1. Bagan Alir Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian. Penelitian ini secara umum terdiri dari lima tahap, yaitu pengumpulan sampel, lisis, amplifikasi, dan sekuensing.

3.2. Tahapan Penelitian

3.2.1. Pengumpulan Sampel mtDNA Manusia

Sampel mtDNA diambil dan dikumpulkan dari 6 orang yang bertempat tinggal di dataran rendah. Sampel yang diambil berupa sel epitel mulut dan akar rambut. Sampel sel epitel mulut diambil dengan *cotton bud sterile*, masing-masing tiga batang *cotton bud* dari penduduk yang bertempat tinggal di dataran rendah. Sampel akar rambut diambil dengan cara mencabut rambut sampai ke akarnya sebanyak empat helai untuk setiap orang. Pengambilan sampel dilakukan pada tanggal 7 Maret 2009 di daerah Indramayu sebanyak 3 sampel dan 3 sampel lainnya di daerah Kejawanan, Cirebon.

3.2.2. Lisis sel

3.2.2.1. Sel epitel

Proses lisis menggunakan tiga batang *cotton bud* yang telah mengandung sel epitel mulut. Diambil bagian kapasnya dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf berukuran 1,5 mL yang telah disterilkan dengan proses autoklaf. Selanjutnya ditambahkan ddH₂O 260 µL, buffer lisis sebanyak 30 µL, dan enzim proteinase K 10 µL pada tabung eppendorf. Kemudian tabung eppendorf dibungkus dengan parafilm, dan dilisis selama satu jam enam menit pada suhu 55°C. Tabung eppendorf yang telah dilisis dideaktivasi selama 10 menit pada suhu 95°C dan disentrifugasi selama tiga menit pada kecepatan 14000 rpm. Setelah proses sentrifugasi, diambil supernatannya sebanyak ± 200 µL dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf steril yang baru.

3.2.2.2. Akar Rambut

Proses lisis menggunakan empat helai rambut yang diambil bagian ujung akarnya sekitar 1 cm dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf berukuran 1,5 mL yang telah disterilkan dengan proses autoklaf. Selanjutnya ditambahkan ddH₂O 170 μ L, buffer lisis sebanyak 20 μ L, dan enzim proteinase K 10 μ L pada tabung eppendorf. Kemudian tabung eppendorf dibungkus dengan parafilm, dan dilisis selama satu jam enam menit pada suhu 55°C. Tabung eppendorf yang telah dilisis dideaktivasi selama 10 menit pada suhu 95°C dan disentrifugasi selama tiga menit pada kecepatan 14000 rpm. Setelah proses sentrifugasi, diambil supernatannya sebanyak \pm 150 μ L dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf steril yang baru.

3.2.3. Amplifikasi mtDNA Daerah ATPase dengan Teknik PCR

Proses amplifikasi fragmen daerah ATPase mtDNA manusia menggunakan primer Efor 7925-7944 (GGCGGACTAATCTTCAACTC), Erev 9884-9863 (GTCAAATATTAGTTGGCGGATG). Campuran reaksi PCR disimpan dalam tabung eppendorf 0,15 mL, yang terdiri atas 5 μ L templat mtDNA hasil lisis; 0,5 μ L dari masing-masing primer (20 pmol/ μ L), 2,5 μ L buffer PCR 10x (Amersham Pharmacia Biotech: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0 pada suhu 25°C; 1,0% Triton X-100); 0,2 μ L enzim *Taq DNA Polimerase* (5 unit/ μ L, Amersham Pharmacia Biotech); 0,5 μ L campuran dNTP 10 mM (Amersham Pharmacia Biotech) dan ditambah ddH₂O steril hingga volumenya mencapai 25 μ L.

Proses PCR dilakukan dengan mesin GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) sebanyak 30 siklus. Proses PCR memiliki beberapa tahapan yang dimulai dengan tahap denaturasi awal yang dilakukan pada suhu 94°C selama 1 menit, proses *annealing* yang dilakukan pada suhu 56°C selama 1 menit 30 detik, dan proses *extention* atau polimerasi pada suhu 72°C selama 2 menit. DNA hasil PCR kemudian disimpan pada suhu -20°C.

3.2.4. Deteksi Hasil PCR Dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil amplifikasi dianalisis dengan gel agarosa 1 % (b/v) menggunakan alat *Mini subTM DNA electrophoresis cell (TM Minicell)*. Gel agarosa dibuat dengan melarutkan 0,15 g agarosa dalam 15 mL buffer TAE 1x (Tris-asetat 0,05 M; EDTA 0,001 M pH 8,0). Larutan tersebut dipanaskan pada gelas Erlenmeyer 100 mL hingga agarosanya larut semua, lalu didinginkan hingga suhu larutan mencapai 60°C dan ditambahkan 2 µL larutan etidium bromida (10 µg/mL) dan kemudian diaduk hingga homogen sebelum dituangkan ke dalam cetakan gel yang memiliki sisir sebagai pembentuk sumur gel. Pada masing-masing sumur gel dimasukkan 3 µL sampel hasil PCR yang telah dicampur dengan 2 µL *loading buffer* (sukrosa 50%; EDTA 0,1 M pH 8; brom fenol biru 0,1% pH 8) dengan ukuran 1 µL *loading buffer* untuk 10 µL ampikon. *Marker* atau penanda kontrol yang digunakan adalah pUC19/*Hinf*I (Amersham Life Science) yang memiliki lima pita (masing-masing berukuran 1419 pb, 517 pb, 396 pb, 214 pb, dan 75 pb). Proses elektroforesis divisualisasi dengan lampu UV seri pada panjang gelombang

312 nm. Penentuan konsentrasi DNA dapat dilakukan dengan cara membandingkan intensitas pita yang dianalisis terhadap pita-pita dari *marker* yang konsentrasinya telah ditentukan sebelumnya.

3.2.5. Sekuensing

Sekuensing merupakan tahapan akhir dalam menentukan urutan nukleotida fragmen hasil amplifikasi dengan PCR. Tahapan sekuensing dilakukan oleh MacroGen yang berada di Korea Selatan. Primer yang digunakan pada proses sekuensing adalah dmt 1L 8412-8435 (TACTCCTTACACTATTCCTCATCA). Data hasil sekuensing berupa elektroforegram dari setiap sampel dalam bentuk *ABI file*, *pdf file*, dan *phd file*. Elektroforegram menunjukkan urutan nukleotida sampel dengan warna yang berbeda sesuai dengan jenis basanya.

3.2.6. Analisis Hasil Sekuensing

Analisis hasil sekuensing dibantu dengan menggunakan program SeqMantm versi 4 dari DNASTar, urutan nukleotida sampel dan urutan nukleotida standar (rCRS) dimasukkan pada program ini yang dengan otomatis program ini akan mengurutkan nukleotida sampel sesuai dengan urutan dan posisi nukleotida standar dan kemudian akan menandai basa tertentu yang berbeda dengan standar sehingga akan tampak perbedaan urutan nukleotida sampel yang mengalami mutasi. Nukleotida sampel yang mengalami mutasi akan terlihat berwarna merah,

sedangkan yang tidak mengalami mutasi tetap berwarna hitam. Perbedaan yang mencolok akan mempermudah proses analisis terhadap urutan nukleotida sampel.

