

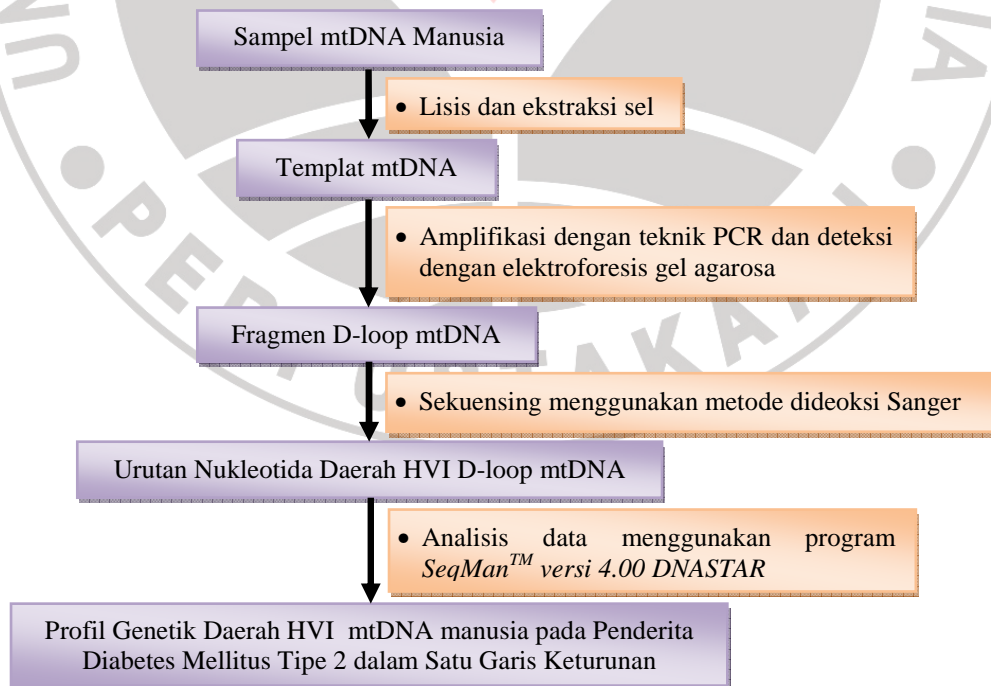
BAB III

METODE PENELITIAN

Secara garis besar langkah-langkah yang dilakukan dalam penelitian ini adalah: pengumpulan sampel; lisis terhadap sampel mtDNA yang telah diperoleh; amplifikasi daerah D-loop mtDNA sampel dengan menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*); pendeteksian hasil PCR dengan elektroforesis gel agarosa; sekuensing hasil PCR dengan metode dideoksi Sanger; serta analisis urutan nukleotida menggunakan program *SeqManTM* versi 4.00 *DNASTAR*.

3.1. Bagan Alir Penelitian

Garis besar keseluruhan tahapan penelitian yang dilakukan ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian

3.2. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan yang lazim digunakan dalam penelitian biokimia dan rekayasa genetika. Peralatan gelas yang digunakan meliputi cawan petri, batang pengaduk, botol reagen, termometer, gelas kimia 600 mL dan 100 mL, gelas ukur 15 mL dan 100 mL, dan pipet tetes. Peralatan non-gelas yang digunakan yaitu pipet mikro 100 μ L dan 10 μ L, spatula, tabung eppendorf 200 μ L, 500 μ L dan 1500 μ L, tip, *ice box*, dan *hot plate*. Selain itu digunakan pula alat lainnya seperti sarung tangan, pinset, kotak sampel, gunting, spidol *marker*, *tissue*, kertas label, *sprayer*, aluminium foil, plastik wrap, plastik obat (sebagai tempat sampel), dan plastik tahan panas.

Pengukuran massa zat kimia dilakukan dengan menggunakan neraca analitik. Sterilisasi alat agar bebas mikroba menggunakan *autoclave*. Untuk inkubasi pada proses lisis digunakan *water bath*. Untuk sentrifugasi digunakan *microcentrifuge*. Penyimpanan bahan-bahan seperti reagen, hasil lisis dan hasil PCR sampel menggunakan *freezer*. Proses amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR. Analisis hasil PCR dengan metode elektroforesis gel agarosa menggunakan perangkat elektroforesis sederhana. Untuk visualisasi hasil elektroforesis digunakan lampu UV. Hasil elektroforesis gel difoto dengan menggunakan kamera digital.

Bahan-bahan yang digunakan dalam proses lisis yaitu sampel akar rambut, etanol teknis 70%, buffer lisis (500 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM EDTA pH 8, dan 5% Tween-20), enzim proteinase K 10 mg/mL, dan ddH₂O. Bahan-bahan yang digunakan dalam proses PCR adalah primer M1 20 pmol/ μ L, primer HV2R

20 pmol/ μ L, buffer PCR 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0 pada suhu 25°C, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂), enzimTaq DNA Polimerase 5 unit/ μ L, dan campuran dNTP 10 mM. Bahan-bahan yang digunakan dalam elektroforesis gel agarosa yaitu agarosa, buffer TAE 1x (Tris-asetat 0,05 M dan EDTA 0,001 M pH 8), larutan EtBr 10 μ g/mL, *loading buffer* (sukrosa 50%, EDTA 0,1 M pH 8, bromfenol biru 0,1% pH 8), dan *marker* pUC19/*Hinf*I 30 ng/ μ L.

3.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Maret-Juli 2010 yang dilakukan di lima tempat, yaitu Laboratorium Kimia Dasar Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI, Laboratorium Riset Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI, Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI, Laboratorium Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI, dan Laboratorium Biokimia Departemen Kimia ITB.

3.4. Tahapan Penelitian

3.4.1. Pengumpulan Sampel mtDNA Manusia

Pengumpulan sampel dilakukan pada minggu ke-3 dan ke-4 bulan Februari 2010, minggu pertama bulan Maret 2010, dan minggu ke-4 bulan Mei 2010 terhadap penderita diabetes mellitus tipe 2 dalam satu garis keturunan ibu yang berada di Kabupaten Garut. Sampel yang diambil berupa akar rambut penderita diabetes mellitus tipe 2 dalam satu garis keturunan ibu. Pengambilan sampel akar rambut diperoleh dengan cara mencabut rambut sampai ke akarnya,

sehingga pada tahap berikutnya bisa dilakukan proses lisis dan ekstraksi mtDNA dari akar rambut tersebut.

3.4.2. Lisis Sampel Akar Rambut

Teknik lisis pada penelitian ini dilakukan secara kimiawi dan enzimatik, dimana dalam proses lisisnya ditambahkan reagen kimia dan enzim proteinase K. Pertama-tama sampel rambut sebanyak 5-7 helai dipotong pada bagian akarnya (± 1 cm) dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf ukuran 1500 μL . Kemudian ditambahkan ddH₂O sebanyak 170 μL . Selanjutnya ditambahkan 20 μL buffer lisis (500 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM EDTA pH 8, dan 5% Tween-20), dan 10 μL enzim proteinase K 10 mg/mL hingga volume lisis tepat 200 μL . Kemudian tabung eppendorf yang berisi campuran reaksi dibungkus dengan parafilm dan diinkubasi selama 1 jam pada *waterbath* dengan suhu $\pm 55^\circ\text{C}$. Setelah itu dilakukan proses deaktivasi enzim proteinase K pada suhu $\pm 95^\circ\text{C}$ selama 10 menit. Kemudian campuran reaksi disentrifugasi selama tiga menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Setelah proses sentrifugasi, supernatannya diambil sebanyak 150 μL dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 1500 μL yang baru untuk selanjutnya digunakan sebagai templat pada proses PCR.

3.4.3. Amplifikasi Fragmen D-loop mtDNA Manusia secara in vitro dengan Teknik PCR

Proses amplifikasi fragmen daerah D-loop mtDNA manusia dilakukan dengan menggunakan primer M1 dan HV2R. Campuran reaksi PCR disimpan

dalam tabung eppendorf 200 μL , terdiri atas 5 μL templat mtDNA hasil lisis; primer M1 (20 pmol/ μL) 0,5 μL ; 0,5 μL primer HV2R (20 pmol/ μL); 2,5 μL buffer PCR 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9 pada suhu 25°C; 1,0% Triton X-100; 15 mM MgCl₂); enzim Taq DNA Polimerase (5 unit/ μL) sebanyak 0,2 μL ; 0,5 μL campuran dNTP 10 mM; dan ditambah 15,8 μL ddH₂O steril sehingga volumenya mencapai 25 μL . Urutan rinci nukleotida primer M1 dan HV2R ditunjukkan pada Tabel 3.1.

Proses PCR dilakukan dengan mesin *GeneAmp® PCR System 2700* sebanyak 30 siklus. Tahap awal dari proses PCR adalah tahap denaturasi awal yang dilakukan pada suhu 94°C selama 5 menit, kemudian masuk ke program siklus PCR dengan masing-masing siklus terdiri dari tiga tahap yaitu tahap denaturasi yang dilakukan pada suhu 94°C selama satu menit, tahap *annealing* yang dilakukan pada suhu 50°C selama satu menit, dan tahap *extension* atau polimerisasi pada suhu 72°C selama satu setengah menit. Pada akhir semua siklus dilakukan tambahan proses polimerisasi pada suhu 72°C selama empat menit. DNA hasil PCR kemudian disimpan pada suhu -20°C.

Tabel 3.1. Urutan Nukleotida Primer M1 dan HV2R

Primer	Urutan 5' ke 3'	Ukuran
M1	-CACCATTAGCACCCAAAGCT-	20 nukleotida
HV2R	-CTGTTAAAAGTGCATACCGCC-	21 nukleotida

3.4.4. Analisis Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil amplifikasi dari proses PCR yang telah dilakukan sebelumnya kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v) menggunakan set

alat elektroforesis sederhana. Komposisi gel agarosa dibuat dengan melarutkan 0,15 gram agarosa dalam 15 mL buffer TAE 1x. Larutan tersebut kemudian dipanaskan hingga semua agarosa larut sempurna, lalu didinginkan hingga suhu larutan mencapai 60°C. Sebelum dituangkan ke dalam cetakan gel yang memiliki sisir sebagai pembentuk sumur gel, ke dalam larutan gel terlebih dahulu ditambahkan larutan EtBr 10 µg/mL sebanyak 2 µL. Pada masing-masing sumur gel dimasukkan 5 µL sampel hasil PCR yang telah dicampurkan dengan 2 µL *loading buffer* (sukrosa 50%; EDTA 0,1 M pH 8; bromfenolbiru 0,1% pH 8).

Proses elektroforesis dilakukan dalam buffer TAE 1x sebagai media penghantar arus pada tegangan 100 volt selama 30 menit. *Marker* atau penanda yang digunakan adalah pUC19/*Hinf*I. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi dengan lampu UV dan difoto dengan kamera digital. Penentuan konsentrasi DNA dapat dilakukan dengan cara membandingkan intensitas pita sampel terhadap pita-pita dari *marker* yang konsentrasinya telah diketahui sebelumnya.

3.4.5. Penentuan Urutan Nukleotida Daerah HVI D-loop mtDNA Manusia dengan Sekuensing Metode Dideoksi Sanger

Sekuensing DNA merupakan tahapan akhir dalam menentukan urutan nukleotida fragmen hasil amplifikasi dengan teknik PCR. Sekuensing dilakukan oleh *Macrogen Inc.* Korea berdasarkan prinsip sekuensing metode Dideoksi Sanger menggunakan *Automatic DNA Sequencer* dengan primer M1 5'(CACCATTAGCACCCAAAGCT)3'.

3.4.6. Pembacaan Elektroforegram Hasil Sekuensing

Pembacaan hasil sekuensing dilakukan dengan menganalisis data elektroforegram. Pada elektroforegram tersebut, masing-masing basa memperlihatkan warna dan tinggi puncak yang berbeda. Basa adenin (A) berwarna hijau, basa guanin (G) berwarna hitam, basa sitosin (C) berwarna biru, dan basa timin (T) berwarna merah.

3.4.7. Analisis Urutan Nukleotida mtDNA Hasil Sekuensing

Urutan nukleotida pada daerah D-loop mtDNA manusia hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan program *SeqManTM* versi 4.00 *DNASTAR*. Proses analisisnya dilakukan dengan cara memasukkan urutan nukleotida sampel dan urutan DNA standar yang ada yaitu urutan *Cambridge* yang telah direvisi oleh Andrews *et al.* pada tahun 1999 yaitu *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS), kemudian program akan secara otomatis menandai basa pada posisi tertentu yang berbeda dengan basa pada standar rCRS.