

BAB III

METODE PENELITIAN

Dalam penelitian ini dilakukan lima tahap utama yang meliputi tahap persiapan templat mtDNA, amplifikasi fragmen mtDNA pada daerah D-loop mtDNA manusia dengan teknik PCR, deteksi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa, sekuensing urutan nukleotida daerah HVI mtDNA manusia dengan metode dideoksi Sanger, dan analisis urutan nukleotida hasil sekuensing dengan menggunakan program *DNASTAR versi 4.00*.

3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan kegiatan, yaitu tahap persiapan templat mtDNA yang meliputi tahap awal pengumpulan sampel rambut dan jaringan epitel mulut dari suku Bima-Dompu populasi NTB sehingga dapat dilakukan tahapan selanjutnya, yang meliputi lisis sel, amplifikasi fragmen mtDNA pada daerah D-loop dengan teknik PCR, deteksi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa, sekuensing urutan nukleotida daerah HVI mtDNA manusia dengan metode dideoksi Sanger, dan analisis urutan nukleotida hasil sekuensing daerah HVI mtDNA manusia pada suku Bima-Dompu populasi NTB.

3.2 Alat dan Bahan

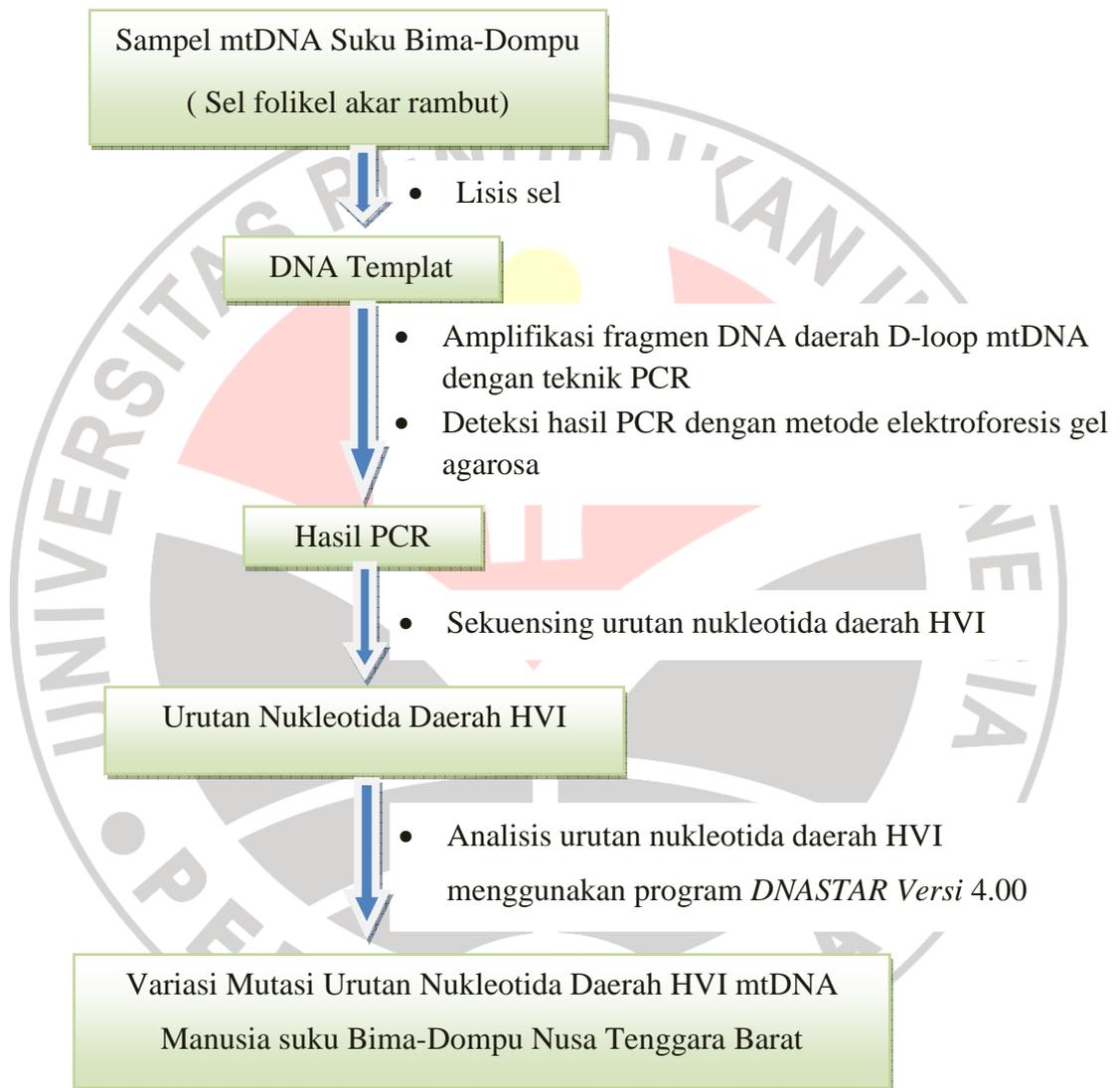
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung ependorf 200 μL dan 1.5 μL , mikropipet 1-10 μL dan 10-100 μL , autoklaf, neraca analitik, *water bath*, *freezer*, *micro sentrifuge*, mesin PCR, set alat elektroforesis, lampu ultra violet (UV) untuk visualisasi DNA. Bahan yang digunakan adalah sampel rambut, alkohol 70%, buffer lisis 10 kali, enzim proteinase K 10 mg/mL, ddH₂O steril, aquades, buffer PCR 10 kali (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0 pada suhu 25°C, 1.0% Triton X-100), 0.5 μL campuran dNTP 10 mM, 0.5 μL primer M1 20 pmol/ μL dan 0.5 primer HV2R 20 pmol/ μL , 5 unit/ μL enzim Taq DNA polymerase, agarosa, buffer TAE 1x (Tris-asetat 0,05 M; EDTA 0,001 M pH 8,0), etidium bromida 10 $\mu\text{g/mL}$, *loading buffer* (sukrosa 50%, EDTA 0.1 M pH 8, brom fenol biru 0.1% pH 8), dan *marker* pUC19/*Hinf*I yang merupakan standar ukuran DNA pada proses elektroforesis gel agarosa.

3.3 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Riset dan laboratorium Kimia Dasar Jurusan Pendidikan Kimia, laboratorium Mikrobiologi dan Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia, serta laboratorium Biokimia Departemen Kimia Institut Teknologi Bandung.

3.4 Bagan Alir Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan secara umum dapat dilihat dari bagan alir pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Bagan alir tahapan penelitian analisis urutan nukleotida daerah HVI mtDNA manusia pada suku Bima-Dompu.

3.5 Tahapan Penelitian

3.5.1 Penyiapan Templat mtDNA Manusia

Penyiapan templat mtDNA manusia meliputi pengumpulan sampel sampai lisis sel. Dalam pengumpulan sampel diambil 10 helai rambut yang dicabut sampai ke akar-akarnya masing-masing dari sembilan individu pada suku Bima-Dompu NTB yang ada di Bandung, sedangkan untuk sampel berupa epitel mulut diambil dengan *cotton bud* steril. Sampel yang diambil kemudian dimasukkan ke dalam plastik obat yang steril lalu diberi kode. Data individu lengkap yang mencakup kode sampel beserta nomor urut, jenis kelamin, tempat lahir, tempat lahir ibu, dan tempat lahir nenek ditulis dalam lembar yang berbeda. Sampel rambut dan epitel mulut yang telah terkumpul dimasukkan ke dalam kotak sampel dan disimpan dalam *freezer*.

Tahap selanjutnya adalah melisis sampel rambut yang telah terkumpul. Proses lisis sel diawali dengan memotong bagian akar rambut (± 1 cm) sebanyak lima helai untuk masing-masing sampel menggunakan gunting dan pinset yang telah disterilkan dengan alkohol 70% di atas cawan petri steril, kemudian sampel tersebut dimasukkan ke dalam tabung eppendorf dan ditambahkan 270 μ L ddH₂O, 20 μ L buffer lisis dan 10 μ L enzim proteinase K. Tabung eppendorf dibungkus dengan parafilm kemudian diinkubasi dalam *water bath* pada suhu 55⁰C selama 1 jam 45 menit yang dilanjutkan dengan inkubasi pada suhu 95⁰C selama 10 menit untuk mendeaktivasi kerja enzim proteinase K. Hasil lisis yang didapat kemudian disentrifugasi menggunakan *micro sentrifuge* dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit agar diperoleh

supernatan. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dari debrisnya. Supernatan diambil sebanyak 150 μL dan disimpan dalam tabung steril baru kemudian disimpan dalam lemari pendingin setelah dilabeli. Supernatan hasil lisis dipakai sebagai templat mtDNA pada proses PCR.

3.5.2 Amplifikasi Daerah D-loop mtDNA Manusia Dengan Teknik PCR

Templat mtDNA yang didapat dari hasil lisis diamplifikasi dengan campuran pereaksi lainnya secara *in vitro* dengan teknik PCR. Proses amplifikasi dilakukan dengan menggunakan primer M1 dan HV2R yang sudah diketahui dapat mengenali DNA templat. Adapun urutan nukleotida kedua primer yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Urutan Nukleotida Primer M1 Dan HV2R

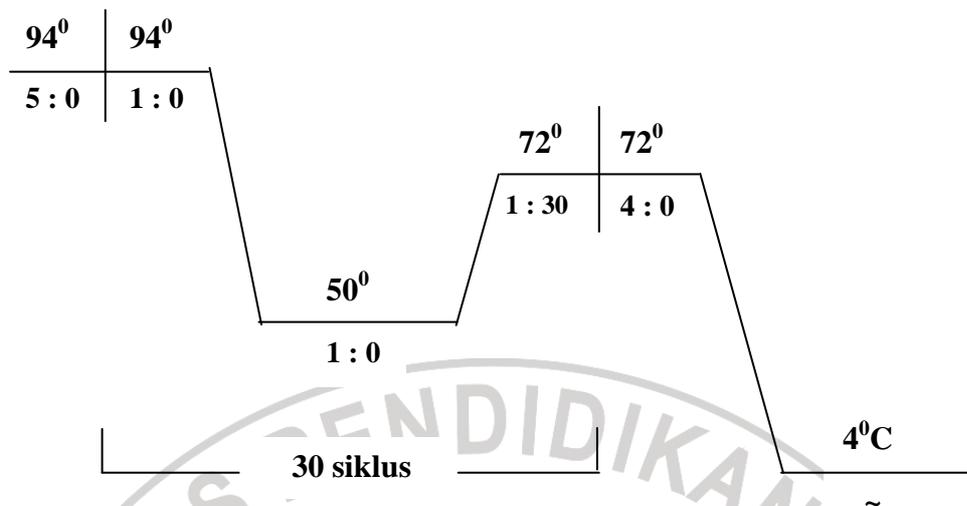
Primer	Urutan 5' ke 3'	Ukuran
M1	-CACCATTAGCACCCAAAGCT-	20 nukleotida
HV2R	-CTGTTAAAAGTGCATACCGCC-	21 nukleotida

Campuran reaksi PCR dimasukkan dan disimpan dalam tabung eppendorf 200 μL . Campuran reaksi PCR yang digunakan adalah 5 μL templat mtDNA, 0.5 μL campuran dNTP 10 mM, 0.5 μL primer M1 20 pmol/ μL dan 0.5 primer HV2R 20 pmol/ μL , 5 unit/ μL enzim Taq DNA polymerase, 2.5 μL buffer PCR 10 kali (500mL KCl, 1.0% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, 100 mM

Tris-HCl pH 9 pada suhu 25⁰ C), dan ditambahkan ddH₂O steril hingga volumenya menjadi 25 µL.

Selain sampel, pada proses amplifikasi disertakan juga kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif terdiri atas 20 µL campuran pereaksi ditambah dengan 5 µL sampel yang telah berhasil diamplifikasi pada penelitian sebelumnya, sedangkan kontrol negatif terdiri dari 20 µL campuran pereaksi ditambah 5 µL ddH₂O steril sebagai pengganti templat mtDNA.

Proses amplifikasi dengan mesin PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Dimana, tahapan proses diawali dengan denaturasi awal selama 9 menit pada suhu 95°C, kemudian dilakukan tahapan siklus yang terdiri dari proses denaturasi selama 60 detik pada suhu 95°C, 60 detik pada suhu 50°C untuk penempelan primer, dan 120 detik pada suhu 72°C untuk polimerisasi. Pada akhir semua siklus dilakukan tambahan proses polimerisasi pada suhu 72°C selama 7 menit. mtDNA hasil amplifikasi kemudian disimpan pada suhu -20⁰C. kondisi amplifikasi dengan mesin PCR dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2. Kondisi Reaksi PCR. Siklus PCR terdiri dari 30 siklus, yang meliputi tahap denaturasi pada suhu 94°C, *annealing* pada suhu 50°C dan polimerisasi pada suhu 72°C

3.5.3 Deteksi Hasil PCR Dengan Metode Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil PCR dianalisis dengan cara elektroforesis pada gel agarosa 1% (b/v) yang dibuat dengan melarutkan 0.15 gram agarosa dalam 15 mL buffer TAE 1x (Tris-asetat 0.05 M, EDTA 0.001 M pH 8.0) lalu dipanaskan hingga seluruh agarosa larut sempurna dan didinginkan hingga suhu larutan $\pm 60^{\circ}\text{C}$ dan ditambahkan 2 μL larutan etidium bromida 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Campuran agarosa dengan etidium bromida dikocok sampai homogen kemudian dituang ke dalam cetakan gel yang telah dilengkapi sisir untuk mencetak sumur gel. Gel yang masih cair dibiarkan hingga membeku seluruhnya. Masing-masing sumur gel diisi campuran 5 μL sampel hasil PCR yang telah dihomogenkan dengan 2 μL *loading buffer* (sukrosa 50%; EDTA 0,1 M pH 8; brom fenol biru 0,1% pH 8).

Penanda atau *marker* yang digunakan adalah pUC19/*Hinf*I (Amersham Life Science) yang mempunyai lima pita DNA yang berukuran 1419 pb, 517 pb, 396 pb, 214 pb, dan 75 pb). Arus dialirkan pada tegangan 80 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis dilihat dengan bantuan sinar ultra violet (UV) pada panjang gelombang 312 nm. Penentuan konsentrasi DNA sampel dapat dilakukan dengan cara membandingkan intensitas pita sampel terhadap intensitas pita-pita dari *marker* yang konsentrasinya telah diketahui.

3.5.4 Sekuensing Urutan Nukleotida Daerah HVI mtDNA Manusia pada Suku Bima-Dompu

Tahapan akhir dalam menentukan urutan nukleotidaa fragmen hasil amplifikasi adalah sekuensing. Proses sekuensing daerah D-loop mtDNA dilakukan dengan metode Dideoksi Sanger dengan alat *Macrogen Inc.*, Korea. Data yang diperoleh berupa elektroforegram dalam bentuk *abi file*, dimana tiap-tiap nukleotida ditunjukkan dengan warna puncak yang berbeda yaitu nukleotida A dengan puncak berwarna hijau, nukleotida G berwarna hitam, nukleotida C berwarna biru dan puncak untuk nukleotida T berwarna merah dan N merupakan grafik DNA yang tumpang tindih sehingga tidak dapat diterjemahkan sebagai A, G, T atau C. Selain itu juga diperoleh urutan nukleotida lengkap dalam bentuk arsip teks.

3.5.5 Analisis Urutan Nukleotida

Urutan nukleotida sampel dianalisa menggunakan program *DNA STAR* versi 4.00. Program ini secara otomatis akan mengurutkan nukleotida sampel sesuai dengan urutan dan posisi nukleotida standar hasil revisi dari Andrew *et al.* pada tahun 1999 (rCRS). Analisis ini dilakukan dengan cara memasukkan urutan nukleotida standar *Cambridge* dan urutan nukleotida sampel, kemudian program ini akan secara otomatis menandai nukleotida pada posisi tertentu dengan warna merah yang terjadi akibat adanya perbedaan urutan nukleotida sampel dengan urutan nukleotida standar *Cambridge*. Adanya perbedaan urutan antara nukleotida sampel dengan urutan nukleotida standar yang ditandai dengan warna merah merupakan mutasi.

