

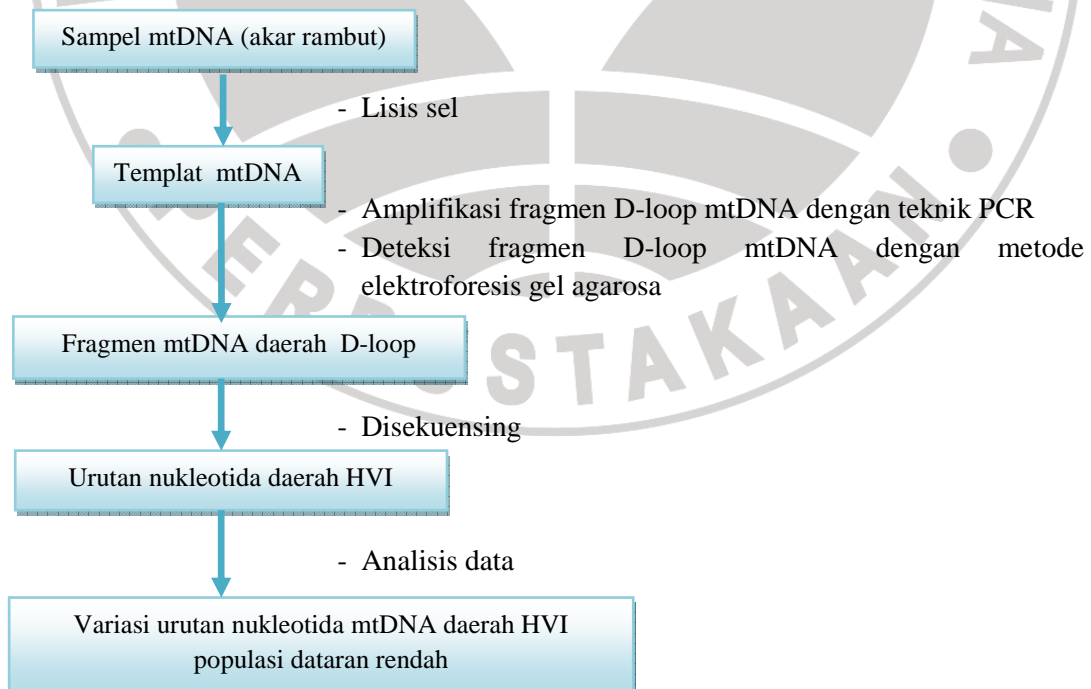
BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Pada penelitian ini terdapat lima tahapan penelitian yang dilakukan yaitu pengumpulan sampel berupa akar rambut, ekstraksi mtDNA melalui proses lisis akar rambut, amplifikasi fragmen D-loop mtDNA hasil lisis dengan menggunakan teknik PCR, deteksi hasil PCR dengan elektroforesis gel agarosa, penentuan urutan fragmen nukleotida mtDNA hasil amplifikasi dan analisis urutan nukleotida mtDNA dengan program *SeqmanTM DNASTAR versi 4*.

3.1 Bagan Alir Penelitian

Secara garis besar, tahapan penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini.



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian Secara Garis Besar

3.2 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung *ependorf* 200 μ L, 500 μ L dan 1,5 mL, mikropipet 1-10 μ L dan 10-100 μ L, tip, autoklaf, neraca analitik, *water bath*, *freezer*, pemanas listrik, termometer, gelas ukur 10 mL dan 100 mL, *micro sentrifuge*, mesin PCR, set alat elektroforesis, dan lampu UV.

Bahan yang digunakan adalah sampel berupa akar rambut, alkohol 70%, buffer lisis 10x (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,5 % Tween-20), enzim proteinase K 10 mg/mL, ddH₂O steril, aquades, 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); enzim *Taq DNA Polimerase* (5 unit/ μ L, Amersham Pharmacia Biotech); campuran dNTP 10 mM (Amersham Pharmacia Biotech), primer *M1* (CACCATTAGCACCCAAAGCT) 20 pmol/ μ L dan *HV2R* (CTGTTAAAAGTGCATACCGCC) 20 pmol/ μ L, dNTP 10 mM, agarosa, buffer TAE 1x (Tris-asetat 0,05 M; EDTA 0,001 M pH 8,0), etidium bromida 10 μ g/mL, *loading buffer* (sukrosa 50%; EDTA 0,1 M pH 8; brom fenol biru 0,1% pH 8), dan *marker* pUC19/*Hinf*I 30 ng/ μ L (Amersham Life Science).

3.3 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar Jurusan Pendidikan Kimia, Laboratorium Riset Jurusan Pendidikan Kimia, Laboratorium Fisiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia, Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA Universitas

Pendidikan Indonesia, Laboratorium Biokimia Program Studi Kimia Institut Teknologi Bandung yang dimulai sejak bulan April 2010.

3.4 Tahapan Penelitian

3.4.1 Pengumpulan Sampel mtDNA Manusia

Sampel mtDNA diperoleh dari 19 orang penduduk yang bertempat tinggal di daerah dataran rendah Pameungpeuk, Garut. Usia rata-rata dari mereka di atas 40 tahun dan pemilihan sampel tidak memperhatikan jenis kelamin. Sampel yang diambil berupa sel epitel rongga mulut dan akar rambut dari masyarakat setempat. Sel epitel rongga mulut diperoleh dengan menggunakan *cotton bud* steril dengan cara menggosokkan *cotton bud* steril pada rongga mulut, sedangkan akar rambut diperoleh dengan cara mencabut rambut sampai ke akarnya. Akar rambut dimasukkan ke dalam plastik obat, kemudian diberi label dengan kode DR (Dataran Rendah) untuk setiap sampel dan diberi nomorurut. Akar rambut di dalam plastik obat disimpan di dalam *ice box* untuk mencegah terdegradasinya DNA di dalam sel akar rambut.

3.4.2 Lisis Sel Akar Rambut

Proses lisis akar rambut dilakukan dengan menggunakan bagian ujung rambut yaitu akar rambut ± 1 cm lalu dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* berukuran 1,5 mL yang telah disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf. Ke dalam tabung ditambahkan ddH₂O 170 μ L, buffer lisis (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,5 % Tween-20) sebanyak 20 μ L, dan enzim proteinase K

10 μ L. Setelah semua pereaksi dimasukkan, tabung *ependorf* dibungkus dengan parafilm, lalu dilisis selama \pm 1 jam pada suhu 55°C. Setelah di lisis, kemudian dilakukan deaktivasi selama 10 menit pada suhu 95°C dan di sentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14000 rpm. Setelah proses sentrifugasi, supernatan diambil \pm 150 μ L lalu dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* 1,5 mL steril yang baru.

3.4.3 Amplifikasi Fragmen mtDNA Daerah D-loop Hasil Lisis dengan Teknik PCR

Proses amplifikasi fragmen daerah D-loop mtDNA manusia dilakukan dengan menggunakan primer universal (M1 dan HV2R). Primer *M1* (CACCATTAGCACCCAAAGCT) yang terdiri dari 20 nukleotida dan primer *HV2R* (CTGTTAAAAGTGCATACCGCC) yang terdiri dari 21 nukleotida. Templat DNA hasil lisis yang berupa supernatan di dalam tabung *ependorf* 1,5 mL diambil \pm 5 μ L lalu dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* baru 200 μ L. Supernatan lalu ditambahkan dengan pereaksi PCR yang terdiri dari 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 ditambahkan ddH₂O steril hingga volume tabung 25 μ L.

Pada prinsipnya teknik PCR terdiri dari 3 tahap reaksi yang berbeda, yaitu denaturasi, *annealing* (penempelan primer), dan polimerisasi (pemanjangan

rantai). Siklus PCR diawali oleh denaturasi pada suhu 95°C, lalu tahap penempelan (pengikatan) primer pada suhu 50°C. Sesudah penempelan primer, suhu ditingkatkan hingga mencapai suhu 72°C, yang berfungsi untuk polimerisasi (pemanjangan) rantai. Proses PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. DNA hasil amplifikasi dengan metode PCR disimpan pada suhu -20°C.

3.4.4 Deteksi Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Hasil amplifikasi PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v) menggunakan alat *mini subTM DNA Electrophoresis cell (TM minicell)*. Gel agarosa dapat dibuat dengan melarutkan 0,15 g agarosa dalam 15 mL buffer TAE 1x (Merck: tris-asetat 0,04 M; EDTA 0,001 M pH 8,0). Larutan tersebut dipanaskan hingga seluruh agarosa larut, kemudian didinginkan hingga suhu larutan 60°C. Setelah suhu mencapai $\pm 60^{\circ}\text{C}$, ditambahkan 2 μL larutan EtBr 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Merck) lalu dicetak. Ke dalam masing-masing sumur dalam gel, dimasukkan 5 μL sampel hasil PCR yang telah dicampur dengan 2 μL loading buffer (Merck; sukrosa 50%, EDTA 0,1 M pH 8; bromfenol biru 0,1% pH 8). Proses elektroforesis dilakukan dalam buffer TAE 1 x sebagai media penghantar arus pada tegangan 100 volt selama ± 40 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan lampu UV seri 9814-312 nm (Cole Parmer) 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.

3.4.5 Sekuensing

Sekuensing DNA merupakan tahap akhir dalam menentukan urutan nukleotida fragmen hasil amplifikasi dengan PCR. Sekuensing dilakukan dengan metode dideoksi sanger. Tahapan sekuensing DNA yang akan dilakukan meliputi persiapan DNA templat, reaksi sekuensing menggunakan primer *M1* (CACCATTAGCACCCAAAGCT), pemurnian hasil sekuensing dengan kolom sephadex G-50, elektroforesis pada gel poliakrilamida dan pembacaan elektroforegram hasil sekuensing. Pembacaan hasil sekuensing dapat dilihat dari data elektroforegram yang menunjukkan warna dan tinggi puncak yang berbeda untuk tiap basa. Untuk basa A berwarna hijau, basa G berwarna hitam, basa C berwarna biru dan basa T berwarna merah. Tahapan sekuensing hasil amplifikasi dengan teknik PCR dilakukan oleh Macrogen *Advancing through Genomics* Korea.

3.4.6 Analisis Hasil Sekuensing

Analisis hasil sekuensing produk PCR dilakukan dengan menggunakan bantuan program *SeqManTM versi 4 DNASTar* dengan cara membandingkan urutan basa nukleotida sampel terhadap urutan basa nukleotida standar *Cambridge* hasil revisi (rCRS, *revised Cambridge Reference Sequence*) yang sudah tersedia. Urutan nukleotida sampel dan urutan nukleotida standar (rCRS) dimasukkan pada program ini, maka 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.