

## BAB III

### METODE PENELITIAN

Metode penelitian yang dilakukan meliputi 4 tahapan utama, yaitu lisis mtDNA, amplifikasi fragmen D-Loop mtDNA manusia dengan teknik PCR, sekuensing urutan basa nukleotida daerah Hipervariabel I mtDNA menggunakan metode *dideoksi Sanger* dan analisis hasil sekuensing.

#### 3.1 Desain Penelitian

Desain penelitian ini meliputi pengumpulan sampel mtDNA manusia, penyiapan templat melalui lisis sampel mtDNA manusia, amplifikasi fragmen HVI menggunakan teknik PCR, deteksi produk menggunakan elektroforesis gel agarosa, sekuensing urutan nukleotida daerah HVI mtDNA, serta analisis hasil sekuensing menggunakan program Seqman versi 4 DNASTAR.

##### 3.1.1 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung eppendorf 200  $\mu$ L dan 1,5 mL, mikropipet 1-10  $\mu$ L dan 10-100  $\mu$ L, autoklaf, neraca analitik, *water bath*, *freezer*, *micro sentrifuge* (eppendorf), mesin PCR, mesin ABI PRISM *DNA Sequencer* (Macrogen Inc, Korea), set alat elektroforesis, lampu UV.

Bahan yang digunakan antara lain sampel berupa jaringan epitel yang diambil dari akar rambut, alkohol 70%, buffer lisis 10x, enzim proteinase K 10

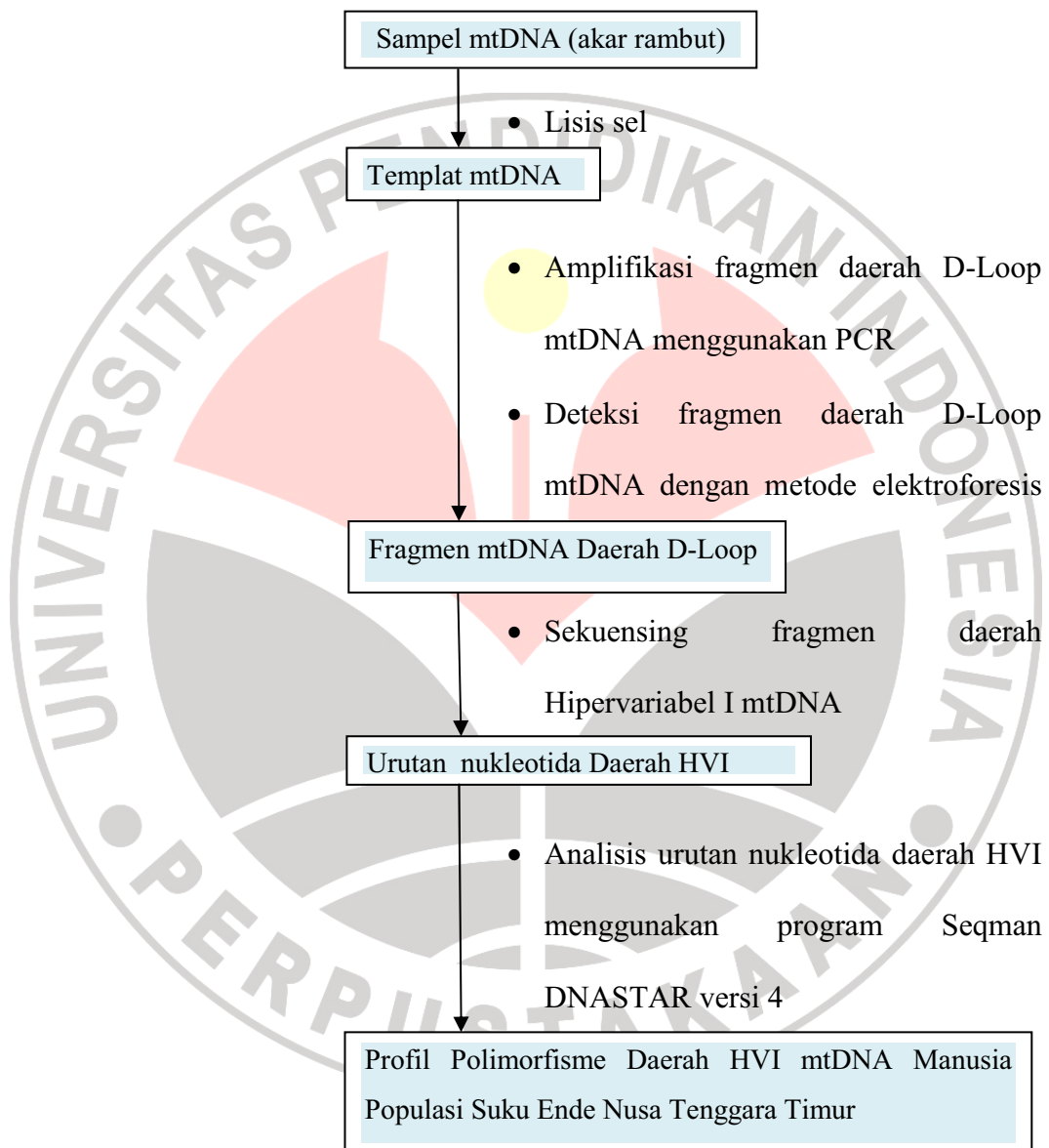
mg/mL, ddH<sub>2</sub>O steril, aquades, buffer PCR 10x (Amersham Pharmacia Biotech: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0 pada suhu 25°C; 1,0% Triton X-100); enzim Taq DNA Polimerase (5 unit/μL, Amersham Pharmacia Biotech); campuran dNTP 10 mM (Amersham Pharmacia Biotech), primer M1 dan HV2R masing-masing 20 pmol/ μL, dNTP 10 mM, agarosa, buffer TAE 1x (Tris-asetat 0,05 M; EDTA 0,001 M pH 8,0), etidium bromida 10 μg/mL, *loading buffer* (sukrosa 50%; EDTA 0,1 M pH 8; brom fenol biru 0,1% pH 8), dan *marker* pUC19/*Hinf*I (Amersham Life Science).

### 3.1.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - Juli 2010 yang bertempat di Laboratorium Kimia Dasar (Gedung JICA lantai 4), Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi (Gedung JICA lantai 2) FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia (UPI), Jl. Dr. Setiabudhi No.229 Bandung dan Laboratorium DNA Institut Teknologi Bandung (ITB).

### 3.1.3 Bagan Alir Penelitian

Tahapan- tahapan penelitian yang dilakukan dapat diamati pada bagan alir dalam Gambar 3.1.



**Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian Profil Polimorfisme Daerah Hipervariabel I mtDNA Manusia Populasi Suku Ende Nusa Tenggara Timur.** Bagan alir berisi tahapan yang dilakukan selama penelitian.

### 3.1.2 Prosedur Penelitian

#### 3.1.2.1 Sampel mtDNA Manusia

Sampel mtDNA diambil dari 12 orang penduduk yang berasal dari populasi asli suku Ende Nusa Tenggara Timur. Sampel yang diambil berupa folikel akar rambut yang dilambangkan NT 01, NT 02, NT 03, NT 04, NT 05, NT 06, NT 07, NT 08, NT 09, NT 10, NT 11, NT 12. Sampel akar rambut diambil dengan cara mencabut rambut sampai ke akarnya sebanyak sepuluh helai untuk setiap orang.

#### 3.1.2.2 Preparasi Templat mtDNA

Templat mtDNA diperoleh dengan cara melisis sel epitel akar rambut sehingga diperoleh DNAny. Langkah kerja yang dilakukan dalam tahap ini antara lain, satu helai rambut dipotong bagian ujungnya menggunakan gunting yang telah disemprot dengan alkohol 70% di atas cawan petri steril hingga hanya tersisa bagian pangkal dengan panjang sekitar 1 cm yang mengandung jaringan epitel. Sampel rambut kemudian dimasukkan ke dalam tabung lisis steril 1,5 mL kemudian ditambahkan 170  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 20  $\mu$ L buffer lisis dan 10  $\mu$ L enzim proteinase K sehingga volume keseluruhan menjadi 200  $\mu$ L. Tabung lisis dibungkus dengan parafilm kemudian diinkubasi dalam *water bath* pada suhu 55<sup>0</sup>C selama 1 jam yang dilanjutkan dengan deaktivasi enzim proteinase K pada suhu 95<sup>0</sup>C selama 10 menit. Hasil lisis disentrifugasi menggunakan *micro sentrifuge* dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit agar diperoleh supernatan. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dari debrisnya menggunakan pipet mikro 100  $\mu$ L. Supernatan yang diambil sebanyak  $\pm$  150  $\mu$ L disimpan dalam

tabung steril kemudian disimpan di alat pendingin (kulkas) untuk menjaga kestabilan sampel.

### 3.1.2.3 Amplifikasi Fragmen D-Loop mtDNA Manusia dengan Teknik PCR

Templat mtDNA merupakan DNA mitokondria pada supernatan hasil lisis epitel akar rambut. Templat mtDNA diperbanyak agar dapat dideteksi pada proses elektroforesis. Proses perbanyakan (amplifikasi) dilakukan secara *in vitro* dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Templat mtDNA (supernatan) dipipet sebanyak 5  $\mu\text{L}$  ke dalam tabung eppendorf 200  $\mu\text{L}$ , kemudian ditambahkan *master mix* yang berisi campuran ddH<sub>2</sub>O; buffer PCR 10x (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/ $\mu\text{L}$ ; campuran dNTP 10 mM; primer MI dan HV2R masing-masing 20 pmol/ $\mu\text{L}$ . Master mix ini dibuat dalam keadaan segar untuk beberapa reaksi tergantung banyaknya sampel yang diamplifikasi. Urutan basa nukleotida primer yang digunakan ditunjukkan pada Tabel 3.1.

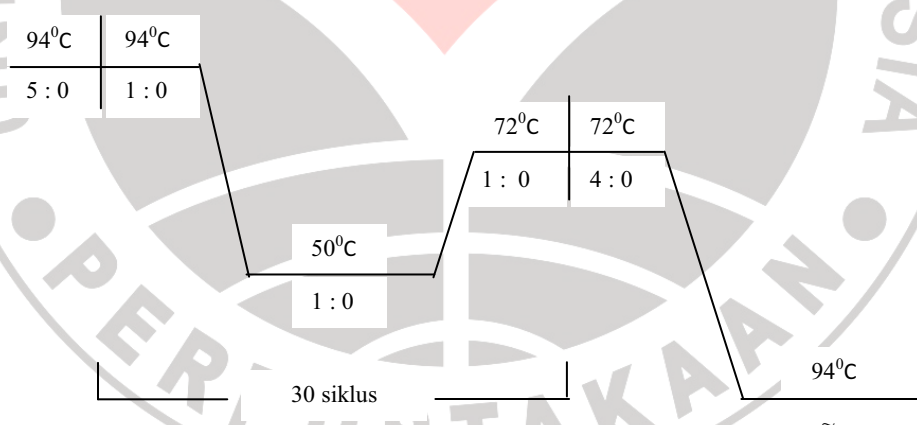
**Tabel 3.1 Urutan Basa Nukleotida Primer**

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

Primer merupakan gabungan beberapa nukleotida atau oligonukleotida sepanjang 15-32 pasang basa atau *base pair* (bp) yang mampu mengenali urutan DNA yang akan diamplifikasi. Sepasang primer akan mempunyai kisaran pasangan basa sekitar 20 basa panjangnya pada tiap primernya sebagai standar

amplifikasi. Pada proses PCR ini juga digunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif terdiri atas 20  $\mu\text{L}$  *master mix* dan 5  $\mu\text{L}$  templat yang telah diamplifikasi yang berfungsi sebagai pengontrol keberadaan DNA di dalam sampel, sedangkan kontrol negatif terdiri atas 20  $\mu\text{L}$  *master mix* dan 5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O yang berfungsi sebagai kontrol pereaksi (tanpa sampel).

Proses amplifikasi pada mesin PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dimana pada masing-masing siklus terdiri dari tahap denaturasi, *annealing* dan polimerisasi. Proses PCR diawali dengan tahap denaturasi awal pada suhu 94°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan proses *annealing* pada suhu 50°C selama 1 menit kemudian *extention* atau polimerisasi pada suhu 72°C selama 3 menit. DNA hasil PCR kemudian disimpan pada suhu -20°C. Bagan kondisi PCR ditunjukkan pada Gambar 3.2.



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

#### 3.1.2.4 Deteksi Produk PCR dengan Elektroforesis Gel Agarosa

Deteksi hasil amplifikasi dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1 % (b/v). 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 kimia 100 mL hingga seluruh agarosa larut, lalu didinginkan hingga suhu larutan  $\pm 60^{\circ}\text{C}$  dan ditambahkan 2  $\mu\text{L}$  larutan etidium bromida (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) kemudian diaduk hingga homogen sebelum dituangkan ke dalam cetakan gel yang telah dipasang sisir pembentuk sumur gel. Masing-masing sumur gel diisi 5  $\mu\text{L}$  sampel hasil PCR yang telah dicampur dengan 3  $\mu\text{L}$  *loading buffer* (sukrosa 50%; EDTA 0,1 M pH 8; brom fenol biru 0,1% pH 8).

*Marker* atau penanda kontrol yang digunakan adalah pUC19/*Hinf*I (Amersham Life Science). *Marker* ini memiliki enam pita, masing-masing berukuran 1419 pb, 517 pb, 396 pb, 214 pb, dan 75 pb. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan lampu UV seri pada panjang gelombang 312 nm. Penentuan konsentrasi DNA dapat dilakukan dengan cara membandingkan intensitas pita genetik sampel yang dianalisis terhadap pita-pita *marker* yang konsentrasinya telah diketahui sebelumnya.

#### 3.1.2.5 Sekuensing Urutan Nukleotida Fragmen Hipervariabel I mtDNA

##### Manusia

Sekuensing merupakan tahapan akhir dalam menentukan urutan nukleotida fragmen hasil amplifikasi dengan PCR. Pada metode terminasi Sanger, pemanjangan rantai DNA dimulai pada urutan yang spesifik pada templat DNA

dengan menggunakan *primer* yang komplementer terhadap DNA. Selain itu juga ditambahkan empat jenis basa deoksinukleotida (dNTP), dan dideoksinukleotida (ddNTP) konsentrasi yang sama. Penambahan ddNTP dilakukan secara spesifik pada rantai DNA oleh DNA polimerase sehingga fragmen-fragmen DNA berhenti tumbuh pada posisi nukleotida yang ditambahkan. Fragmen-fragmen DNA tersebut dipisahkan menurut ukurannya dengan elektroforesis gel poliakrilamida. Setelah itu dilakukan pembacaan elektroforegram menggunakan komputer.

Pada penelitian ini, sekuensing daerah HVI mtDNA dilakukan oleh *Macrogen Inc*, Korea. Data yang diperoleh berupa puncak-puncak yang disebut elektroforegram dalam bentuk *ABI file*, dimana setiap basa ditunjukkan oleh warna yang berbeda. Basa adenin (A) ditunjukkan dengan warna hijau, basa guanin (G) dengan warna hitam, basa timin (T) dengan warna merah dan basa sitosin (C) dengan warna biru.

#### **3.1.4.6 Analisis Hasil sekuensing**

Analisis hasil sekuensing produk PCR dilakukan dengan membandingkan urutan basa nukleotida sampel terhadap urutan basa nukleotida standar *Cambridge* hasil revisi, *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS) dengan bantuan program SeqMan<sup>tm</sup> versi 4 DNASTAR. Urutan nukleotida sampel dan urutan nukleotida standar dimasukkan pada program ini. Secara otomatis program ini akan mengurutkan nukleotida sampel sesuai dengan urutan dan posisi nukleotida standar dan kemudian akan menandai basa tertentu yang berbeda dengan standar sebagai mutasi atau varian yang baru.