

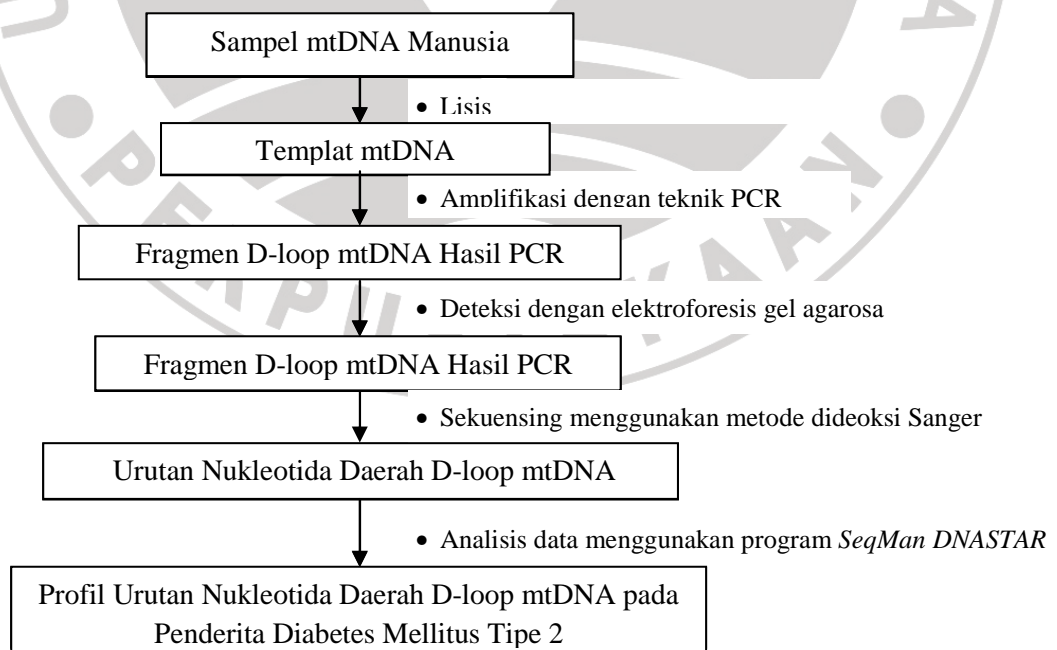
### BAB III

## 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 *Polimerase Chain Reaction* (PCR), pendeteksian hasil PCR dengan elektroforesis gel agarosa, sekuensing terhadap hasil PCR yang menunjukkan hasil positif pada saat elektroforesis gel agarosa, serta *data mining* menggunakan program *SeqMan DNASTAR*.

#### 3.1. Bagan Alir Penelitian

Garis besar keseluruhan tahapan penelitian yang akan dilakukan dapat dilihat pada Gambar 3.1.



**Gambar 3.1. Bagan alir penelitian**

### 3.2. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *cotton bud*, pinset, kertas label, kotak sampel, sarung tangan, pipet mikro, *sprayer*, plastik tempat obat (sebagai tempat sampel), penangas air, gelas kimia, termometer, tabung eppendorf 200  $\mu$ L dan 1,5 mL, *microcentrifuge*, set alat PCR, labu erlemeyer, autoklaf, set alat elektroforesis, dan lampu UV.

Adapun bahan-bahan yang digunakan adalah sel epitel rongga mulut (sebagai sampel), etanol teknis, buffer lisis (Tris-HCl 500 mM pH 8,5, EDTA 10 mM pH 8 dan Tween-20 5%), enzim proteinase K, ddH<sub>2</sub>O, *primer M<sub>1</sub>*, *primer HV<sub>2</sub>R*, buffer PCR 10 x (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9 pada suhu 25°C, Triton X-100 1%, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), enzim Taq DNA Polimerase (5 unit/ $\mu$ L), campuran dNTP, agarosa, buffer TAE 1x, larutan EtBr, *loading buffer* (sukrosa 50%, EDTA 0,1 M pH 8, bromfenol biru 0,1% pH 8), dan *marker*.

### 3.3. Metode Penelitian

#### 3.3.1. Pengumpulan sampel mtDNA Manusia

Pengumpulan sampel dilakukan pada minggu ke-3 dan ke-4 pada bulan april 2009 terhadap pasien penderita Diabetes Mellitus bagian Penyakit Dalam Rumah Sakit TNI AU TK.II Dr. Salamun Bandung. Kerjasama dengan rumah sakit dalam proses pengambilan sampel ini bertujuan untuk melihat status kesehatan dari penderita yang menjalani kontrol rutin di rumah sakit. Hal ini bertujuan untuk memudahkan peneliti untuk membedakan antara pasien yang menderita penyakit diabetes mellitus tipe 1 dan diabetes mellitus tipe 2

berdasarkan status kesehatan pasien yang tercatat pada dokter. Sampel yang diambil berupa sel epitel rongga mulut pasien dengan menggunakan bantuan *cotton bud* sehingga pada tahap berikutnya bisa dilakukan isolasi mtDNA dari sel epitel rongga mulut.

### 3.3.2. Lisis

Sampel sel epitel pada *cotton bud* dipotong bagian kapasnya ( $\pm 1$  cm) dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf ukuran 1,5 mL, kemudian ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 260  $\mu$ L. Kedalam campuran tersebut selanjutnya ditambahkan 30  $\mu$ L buffer lisis (Tris-HCl 500 mM pH 8,5, EDTA 10 mM pH 8, dan Tween-20 5%) dan 10  $\mu$ L enzim proteinase K 10 mg/mL hingga volume lisis tepat 300  $\mu$ L. Tabung eppendorf yang berisi campuran reaksi kemudian dibungkus dengan parafilm dan diinkubasi selama 1 jam 6 menit pada penangas air pada suhu 55°C. Setelah itu dilakukan proses deaktivasi enzim proteinase K pada suhu 95°C selama 10 menit. Campuran reaksi kemudian disentrifugasi selama tiga menit pada 14000 rpm dan supernatannya diambil sebanyak 200  $\mu$ L lalu dimasukkan ke dalam tabung eppendorf yang baru untuk selanjutnya digunakan sebagai *templat* untuk reaksi PCR.

### 3.3.3. Amplifikasi Fragmen Daerah D-loop mtDNA Manusia Secara *in vitro* dengan Teknik PCR

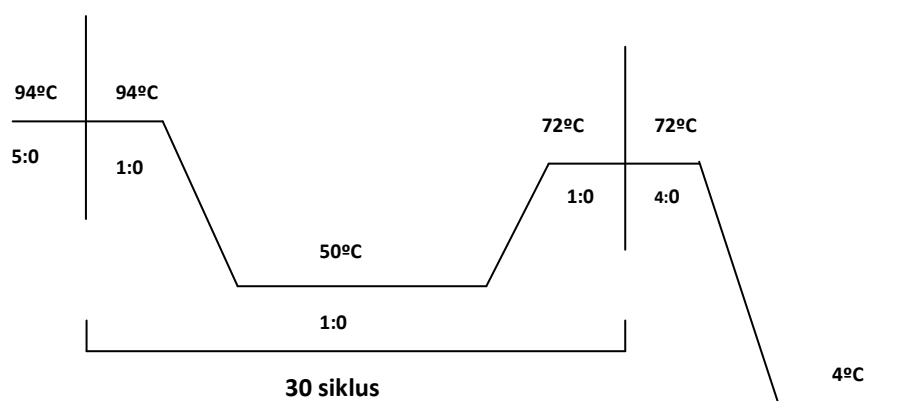
Proses amplifikasi fragmen daerah D-loop mtDNA manusia dilakukan dengan menggunakan *primer* M<sub>1</sub> dan HV<sub>2</sub>R. Campuran reaksi PCR dimasukkan

kedalam tabung eppendorf 200  $\mu\text{L}$ . Campuran terdiri atas 5  $\mu\text{L}$  *templat* mtDNA hasil lisis; 0,5  $\mu\text{L}$  *primer* M<sub>1</sub> (20 pmol/ $\mu\text{L}$ ); 0,5  $\mu\text{L}$  *primer* HV<sub>2</sub>R (20 pmol/ $\mu\text{L}$ ); 2,5  $\mu\text{L}$  buffer PCR 10 x (KCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9 pada suhu 25°C; Triton X-100 1,0%; MgCl<sub>2</sub> 15 mM ); 0,2  $\mu\text{L}$  enzim Taq DNA Polimerase (5 unit/ $\mu\text{L}$ ); 0,5  $\mu\text{L}$  campuran dNTP 10 mM; dan ditambah ddH<sub>2</sub>O steril hingga volume mencapai 25  $\mu\text{L}$ . Adapun urutan rinci nukleotida *primer* M<sub>1</sub> dan HV<sub>2</sub>R dapat dilihat pada Tabel.3.1.

**Tabel 3.1. Urutan nukleotida primer M<sub>1</sub> dan HV<sub>2</sub>R**

Primer	Urutan 5' ke 3'	Ukuran
M <sub>1</sub>	-CACCATTAGCACCCAAAGCT-	20 nukleotida
HV <sub>2</sub> R	-CTGTTAAAAGTGCATACCGCC-	21 nukleotida

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 tahapan 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 *extention* atau polimerasi pada suhu 72 selama satu 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. Skema siklus yang dilakukan pada proses PCR ini dapat dilihat pada Gambar 3.2.



**Gambar 3.2. Skema siklus PCR yang dilakukan**

### 3.3.4. 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 alat *Mini sub<sup>TM</sup> DNA electrophoresis cell* (TM Minicell).

Komposisi gel agarosa dibuat dengan cara melarutkan 0,3 g agarosa dalam 30 mL *buffer* TAE 1x. Larutan tersebut kemudian dipanaskan hingga semua agarosa larut sempurna, lalu didinginkan hingga suhu larutan mencapai 50-60 °C. Sebelum dituangkan ke dalam cetakan gel yang memiliki sisir sebagai pembentuk sumur gel, kedalam larutan gel terlebih dahulu ditambahkan larutan EtBr 10 µg/mL sebanyak 2 µL. Pada masing-masing sumur gel dimasukkan 10 µL sampel hasil PCR yang telah dicampurkan dengan 3 µL *loading buffer* (sukrosa 50%; EDTA 0,1 M pH 8; bromfenol biru 0,1% pH 8).

Proses elektroforesis dilakukan dalam *buffer* TAE 1x sebagai media penghantar arus pada tegangan 80 volt selama 40 menit. *Marker* atau penanda yang digunakan adalah pUC19/*HinfI*. Hasil elektroforesis kemudian dideteksi dengan lampu UV. Penentuan konsentrasi DNA dapat dilakukan dengan cara

membandingkan intensitas pita sampel terhadap pita-pita dari *marker* yang konsentrasinya telah diketahui sebelumnya.

### **3.3.5. Penentuan Urutan Nukleotida Daerah D-loop mtDNA Manusia dengan Metode Sekuensing**

Sekuensing DNA merupakan tahapan akhir dalam menentukan urutan nukleotida fragmen hasil amplifikasi dengan PCR. Sekuensing dilakukan oleh *Macrogen Inc.* berdasarkan prinsip sekuensing metode *Dideoksi Sanger* menggunakan *Automatic DNA Sequencer*.

### **3.3.6. Pembacaan Elektroforegram Hasil Sekuensing**

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

### **3.3.7. Analisis Urutan Nukleotida mtDNA Hasil Sekuensing**

Analisis urutan nukleotida pada daerah D-loop mtDNA manusia hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan program *SeqMan DNASTAR*. Setiap sampel dianalisis homologinya terhadap urutan DNA standar yang ada yaitu urutan *Cambridge* yang telah direvisi Andrew *et al.* pada tahun 1999 yaitu *revised Cambridge Reference Sequence (rCRS)*.