

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

Metode penelitian yang dilakukan meliputi 3 tahap utama, yaitu amplifikasi fragmen ATPase mtDNA manusia dengan teknik PCR, sekuensing urutan nukleotida daerah ATPase mtDNA menggunakan metode dideoksi Sanger dan analisis hasil sekuensing.

#### **3.1. Desain Penelitian**

Desain kegiatan penelitian meliputi beberapa tahap, antara lain pengumpulan sampel mtDNA manusia berupa jaringan epitel yang berasal dari rongga mulut, penyiapan templat mtDNA sampel, amplifikasi fragmen ATPase teknik dengan PCR, deteksi produk PCR dengan elektroforesis gel agarosa, sekuensing urutan nukleotida daerah ATPase dan analisis hasil sekuensing.

#### **3.2. Alat dan Bahan**

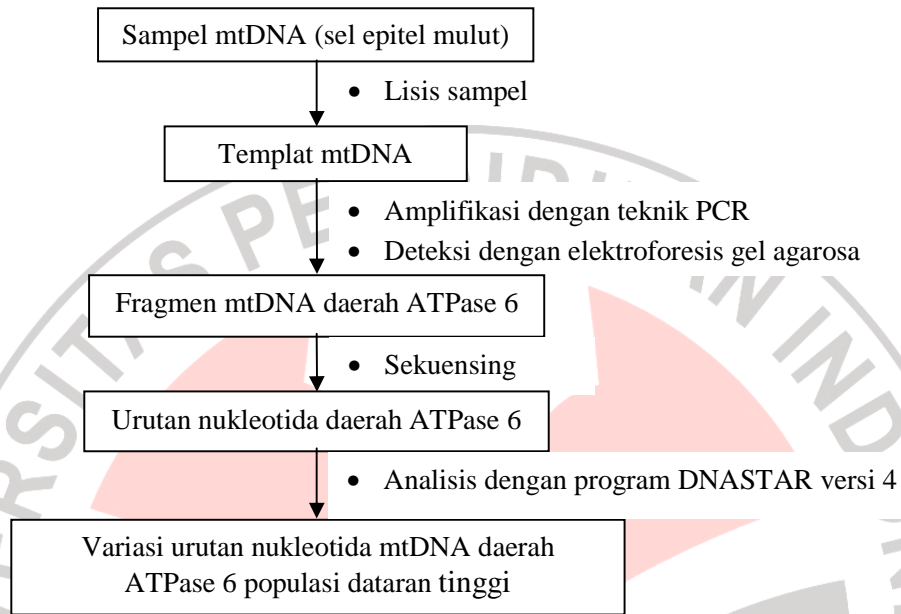
Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung lisis 200  $\mu$ L dan 1,5  $\mu$ L, rak tabung mikro, mikropipet 1-10  $\mu$ L dan 10-100  $\mu$ L, tip, autoklaf, neraca analitik, *water bath*, *freezer*, sarung tangan plastik, botol semprot, gelas kimia, batang pengaduk, cawan petri, gunting, pinset, plastik obat, plastik tahan panas, parafilm, *ice box*, tissue, kertas label, termometer, gelas ukur, spidol marker, plastik

wrap, masker, *micro sentrifuge*, mesin PCR, set alat elektroforesis, lampu UV dan kamera digital.

Bahan yang digunakan antara lain sampel berupa jaringan epitel yang diambil dari rongga mulut, 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/ $\mu$ L, Amersham Pharmacia Biotech); campuran dNTP 10 mM (Amersham Pharmacia Biotech), primer *Efor* 7925-7944 (GGCGGACTAATCTTCAACTC) 20 pmol/ $\mu$ L dan *Erev* 9884-9863 (GTCAAATATTAGTTGGCGGATG) 20 pmol/ $\mu$ L, dNTP 10 mM, agarosa, buffer TAE 1x (Tris-asetat 0,05 M; EDTA 0,001 M pH 8,0), etidium bromida 10  $\mu$ g/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).

### 3.3. Bagan Alir Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi :



**Gambar 3.1. Bagan Alir Penelitian Variasi urutan nukleotida mtDNA daerah ATPase 6 populasi dataran tinggi**

### 3.4. Prosedur Penelitian

Berdasarkan bagan alir penelitian di atas, langkah kerja dalam penelitian ini secara rinci adalah sebagai berikut :

#### 3.4.1. Pengumpulan Sampel mtDNA Manusia

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jaringan epitel yang diambil dari rongga mulut bagian atas. Pengambilan sampel dilakukan oleh individu yang bersangkutan sebanyak tiga kali menggunakan *cotton bud* yang telah disterilisasi sebelumnya. Ujung *cotton bud* lainnya dipotong untuk menghindari adanya kontaminasi. Sampel berupa jaringan epitel tersebut kemudian dimasukkan ke

dalam plastik obat yang telah diberi label dan kode tersendiri. Data sampel dicatat untuk mengetahui silsilah masing-masing individu. Data tersebut meliputi kode sampel, jenis kelamin dan usia. Sampel kemudian di simpan dalam lemari pendingin untuk menjaga kondisi sampel.

#### **3.4.2. Penyiapan Templat mtDNA**

Templat mtDNA diperoleh dengan cara lisis. Langkah kerja yang dilakukan dalam tahap ini, pertama satu buah *cotton bud* dipotong bagian ujungnya menggunakan gunting yang telah disemprot dengan alkohol 70% di atas cawan petri steril hingga hanya tersisa bagian kapasnya yang mengandung jaringan epitel. Kapas *cotton bud* tersebut dimasukkan ke dalam tabung lisis steril 1,5 mL kemudian ditambahkan 260  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O, 30  $\mu\text{L}$  buffer lisis dan 10  $\mu\text{L}$  enzim proteinase K.

Tabung lisis dibungkus dengan parafilm kemudian diinkubasi dalam *water bath* pada suhu 55<sup>0</sup>C selama 1 jam 6 menit yang dilanjutkan dengan deaktivasi enzim proteinase K pada suhu 95<sup>0</sup>C selama 10 menit. Hasil lisis lalu di sentrifugasi menggunakan *micro sentrifuge* dengan kecepatan 14000 rpm selama 3 menit agar diperoleh supernatan. Supernatan yang diperoleh dipisahkan dari debrisnya. Supernatan diambil sebanyak  $\pm 200 \mu\text{L}$  dan disimpan dalam tabung steril baru. Untuk menjaga kestabilan sampel, supernatan disimpan dalam lemari pendingin untuk kemudian digunakan sebagai templat dalam reaksi PCR.

#### **3.4.3. Amplifikasi Fragmen ATPase 6 mtDNA Manusia dengan Teknik PCR**

Agar dapat dideteksi, templat mtDNA hasil lisis harus diperbanyak. Proses perbanyak atau yang biasa disebut amplifikasi ini dilakukan secara *in vitro* dengan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Templat mtDNA (supernatan) dipipet sebanyak 5  $\mu\text{L}$  ke dalam tabung 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 Efor 20 pmol/  $\mu\text{L}$  dan Erev 20 pmol/  $\mu\text{L}$ . biasanya *master mix* ini dibuat dalam keadaan *fresh* untuk beberapa reaksi tergantung banyaknya sampel yang diamplifikasi. Agar diperoleh fragmen ATPase 6, digunakan beberapa primer yang dapat mengenali fragmen ATPase. Urutan basa nukleotida primer yang digunakan ditunjukkan pada tabel 3.1.

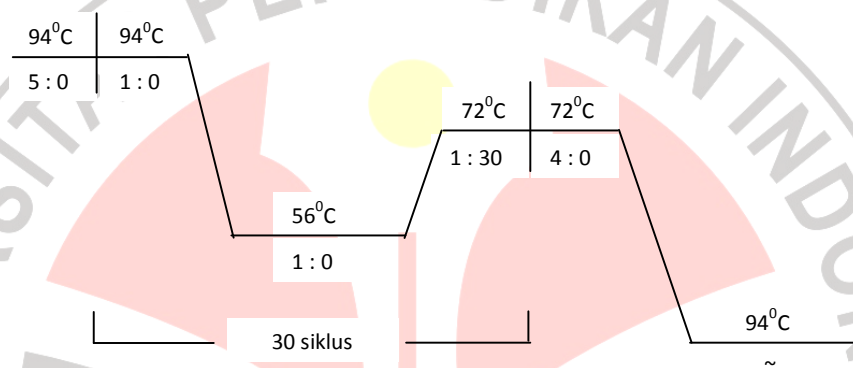
**Tabel 3.1. Urutan Basa Nukleotida Primer Efor, Erev dan Dmt 1L**

Primer	Urutan basa 5' ke 3'	Posisi	Ukuran
Efor	GGCGGACTAATCTTCAACTC	7925-7944	20 nukleotida
Erev	GTCAAATATTAGTTGGCGGATG	9884-9863	22 nukleotida
Dmt 1L	TACTCCTTACACTATTCCTCATCA	8412-8435	24 nukleotida

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, sedangkan kontrol negatif terdiri atas 20  $\mu\text{L}$  *master mix* dan 5  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O.

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 56°C selama 1,5 menit kemudian *extention* atau polimerisasi pada suhu 72°C selama 2 menit. DNA hasil PCR kemudian disimpan pada suhu -20°C. Bagan kondisi PCR lebih rinci diperlihatkan 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 56°C dan polimerisasi pada suhu

#### 3.4.4. 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  $\mu$ 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, 75 pb, dan 65 pb). Hasil elektroforesis divisualisasi dengan lampu UV seri pada panjang gelombang 312 nm. Penentuan konsentrasi DNA dapat dilakukan dengan cara membandingkan intensitas pita yang dianalisis terhadap pita-pita *marker* yang konsentrasinya telah diketahui sebelumnya.

#### **3.4.5. Sekuensing Urutan Nukleotida Fragmen ATPase 6 mtDNA Manusia**

Sekuensing merupakan tahapan akhir dalam menentukan urutan nukleotida fragmen hasil amplifikasi dengan PCR. Sekuensing daerah ATPase mtDNA dilakukan oleh *Macrogen Inc.*, Korea. Data yang diperoleh berupa elektroforegram dalam bentuk *ABI file*, dimana setiap nukleotida ditunjukkan oleh warna yang berbeda. Nukleotida (adenin) A ditunjukkan dengan warna hijau, (guanin) G hitam, timin (T) merah dan sitosin (C) biru.

Tahapan sekuensing DNA yang akan dilakukan meliputi: (a) penyiapan templat DNA; (b) reaksi sekuensing dengan menggunakan primer Dmt 1L; (c) pemurnian hasil reaksi sekuensing; (d) elektroforesis pada gel poliakrilamid; dan (e) pembacaan elektroforegam hasil sekuensing.



#### 3.4.6. Analisis Hasil sekuensing

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

