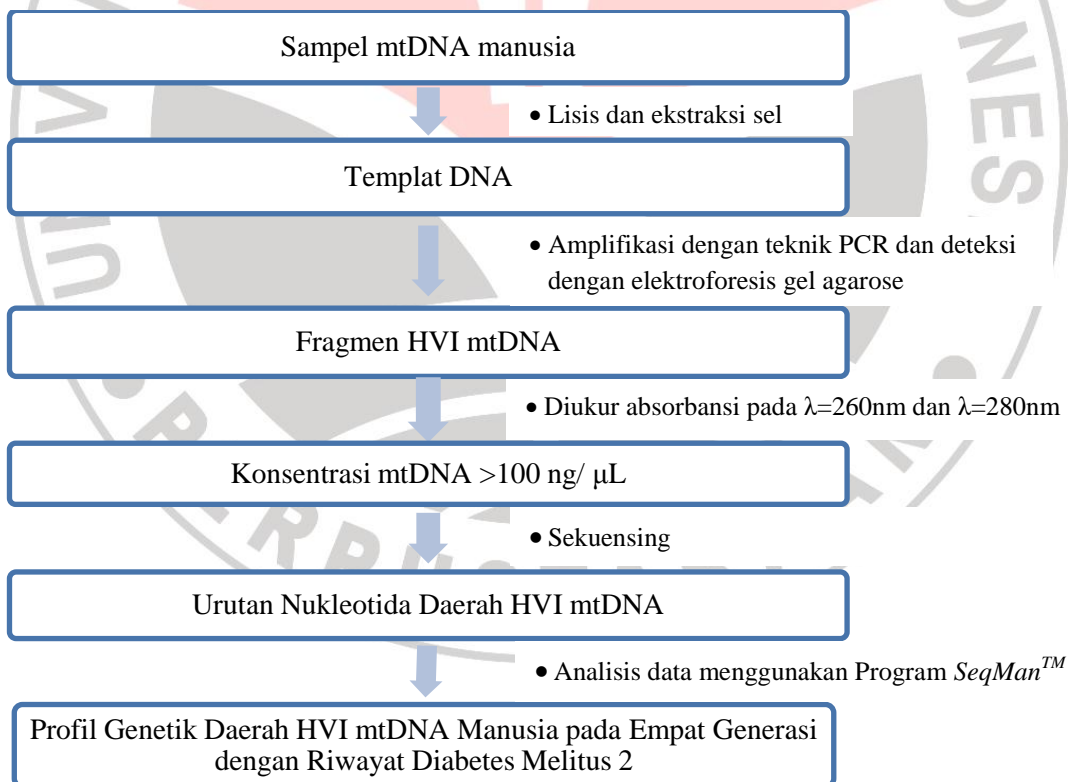


## BAB III METODE PENELITIAN

Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah: pengumpulan sampel, lisis terhadap sampel mtDNA yang telah diperoleh, amplifikasi daerah HVI mtDNA sampel dengan menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pendeteksian hasil PCR dengan elektroforesis gel agarosa, pengukuran konsentrasi mtDNA dengan Spektrofotometri UV-Vis, sekuensing hasil PCR dengan konsentrasi  $> 100 \text{ ng/ } \mu\text{L}$ , serta analisis urutan nukleotida menggunakan program SeqMan<sup>TM</sup> versi 4.00 DNASTAR.

### 3.1. Bagan Alir

Penelitian ini secara umum dapat digambarkan pada skema berikut:



## 3.2. Alat dan Bahan

### 3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pipet mikro, tabung eppendorf, sentrifuge, set alat PCR, autoklaf, set alat elektroforesis, lampu UV, dan Spektrofotometri UV-Vis.

### 3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam tahap lisis yaitu buffer lisis (500 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM EDTA pH 8, dan 5% Tween-20), enzim proteinase K 10 mg/mL, dan ddH<sub>2</sub>O. Bahan-bahan yang digunakan dalam proses PCR adalah primer M1 20 pmol/μL, primer M2 20 pmol/μL, buffer PCR 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,0 pada suhu 25C, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), enzim Taq DNA Polimerase 5 unit/μL, dan campuran dNTP 10 mM. Bahan-bahan yang digunakan dalam elektroforesis gel agarosa yaitu agarosa, buffer TAE 1x (Tris-asetat 0,05 M dan EDTA 0,001 M pH 8), larutan EtBr 10 μg/mL, *loading buffer* (sukrosa 50%, EDTA 0,1 M pH 8, bromfenol biru 0,1% pH 8), dan *marker* pUC19/*Hinf*I 30 μg/μL.

## 3.3. Metode Penelitian

### 3.3.1. Pengumpulan Sampel mtDNA

Sampel yang digunakan berupa akar rambut dari empat generasi dengan riwayat diabetes melitus tipe 2. Pengambilan sampel akar rambut dengan cara mencabut rambut sampai akarnya, sehingga selanjutnya dapat dilakukan proses lisis dan ekstraksi mtDNA dari akar rambut tersebut.

### 3.3.2. Lisis Sampel Akar Rambut

Sampel akar rambut dilisis secara kimiawi dan enzimatik. Tahap awal sampel rambut sebanyak 5-7 helai dipotong pada bagian akarnya ( $\pm 1$  cm) dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf ukuran 1500 μL. Kemudian ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 170 μL. Selanjutnya ditambahkan 20 μL buffer lisis (500 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM EDTA pH 8, dan 5% Tween-20), dan 10μL enzim

proteinase K 10 mg/ mL hingga volume lisis tepat 200  $\mu$ L. Kemudian tabung eppendrof yang berisi campuran reaksi dibungkus dengan parafilm dan diinkubasi selama 1 jam pada waterbath dengan suhu  $\pm 55^{\circ}\text{C}$ . Setelah itu dilakukan proses deaktivasi enzim proteinase K pada suhu  $\pm 95^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit. Kemudian campuran reaksi disentrifugasi selama 3 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Setelah proses sentrifugasi, supernatannya diambil sebanyak 150  $\mu$ L dan dimasukkan ke dalam tabung eppendrof 1500  $\mu$ L yang baru untuk selanjutnya digunakan sebagai templat pada proses PCR.

### 3.3.3. Amplifikasi Fragmen mtDNA Manusia secara *In vitro* dengan Teknik PCR

Proses amplifikasi fragmen daerah HVI mtDNA manusia dilakukan dengan menggunakan *primer* M1 dan M2. Campuran reaksi PCR dimasukkan ke dalam tabung eppendrof 200  $\mu$ L, terdiri atas 5  $\mu$ L template mtDNA hasil lisis; primer M1 (30 pmol/ $\mu$ L) 0,5  $\mu$ L; 0,5  $\mu$ L primer M2 (30 pmol/ $\mu$ L); 2,5  $\mu$ L buffer PCR 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9 pada suhu  $25^{\circ}\text{C}$ ); 1,0% Triton X-100; 15 mM  $\text{MgCl}_2$ ); enzim Taq DNA Polimerase (5 unit/ $\mu$ L) sebanyak 0,2  $\mu$ L; 0,5  $\mu$ L campuran dNTP 10 mM; dan ditambah 15,8  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O steril sehingga volumenya mencapai 25  $\mu$ L. Urutan rinci nukleotida primer M1 dan M2 ditunjukkan pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1. Urutan Nukleotida Primer M1 dan M2**

Primer	Urutan 5' ke 3'	Posisi	Ukuran
M1	-CACCATTAGCACCCAAAGCT-	L 15.978-15.997	20 Nukleotida
M2	-GATTTACGGAGGATGGTG-	H 16.419-16.401	19 Nukleotida

Proses PCR dilakukan dengan mesin *GeneAmp® PCR System 2700* sebanyak 35 siklus. Tahap awal dari proses PCR adalah tahap denaturasi awal yang dilakukan pada suhu  $90^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, kemudian masuk ke program siklus PCR dengan masing-masing siklus terdiri dari 3 tahap yaitu tahap denaturasi yang dilakukan pada suhu  $94^{\circ}\text{C}$  selama satu menit, tahap *annealing*

yang dilakukan pada suhu 50°C selama 1 menit, dan tahap *extension* atau polimerisasi pada suhu 72°C selama satu setengah menit. Pada akhir semua siklus dilakukan tambahan proses polimerisasi pada 72°C selama empat menit. DNA hasil PCR kemudian disimpan pada suhu -20°C.

#### 3.3.4. Analisis Hasil PCR dengan Elektroforesis Gel Agarose

Hasil amplifikasi dari proses PCR yang telah dilakukan sebelumnya kemudian dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 1% (b/v) menggunakan set alat elektroforesis sederhana. Komposisi gel agarosa dibuat dengan melarutkan 0,15 gram agarosa dalam 15 mL buffer TAE 1x. Larutan tersebut kemudian dipanaskan hingga semua agarosa larut sempurna, lalu didinginkan hingga suhu larutan mencapai 60°C. Pada masing-masing sumur gel dimasukkan 5 µL sampel hasil PCR yang telah dicampurkan dengan 2 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 100 volt selama 45 menit. *Marker* atau penanda yang digunakan adalah pUC19/*Hinf*I. Setelah elektroforesis selesai, agarosa direndam dan digoyangkan menggunakan *shaker* selama 5 menit dalam larutan EtBr. Kemudian direndam dan dishake di dalam dH<sub>2</sub>O selama 3 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan dengan sinar UV dan difoto dengan kamera digital. Penentuan konsentrasi DNA dapat dilakukan dengan cara membandingkan intensitas pita sampel terhadap pita-pita dari *marker* yang konsentrasinya telah diketahui sebelumnya.

#### 3.3.5. Pengukuran Konsentrasi mtDNA dengan Spektrofotometri UV-Vis

Ekstrak mtDNA hasil isolasi dihitung konsentrasinya menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Total volume yang digunakan untuk pengukuran pada spektrofotometer sebanyak 1000 µl dan faktor pengenceran yang digunakan sebesar 200 kali. Larutan blanko yang digunakan adalah ddH<sub>2</sub>O sebanyak 1000 µl. Pengukuran konsentrasi DNA dilakukan pada panjang gelombang 260 nm.

Sedangkan untuk pengukuran kemurnian DNA dilakukan dengan perbandingan absorban 260/280 ( $A_{260/280}$ ).

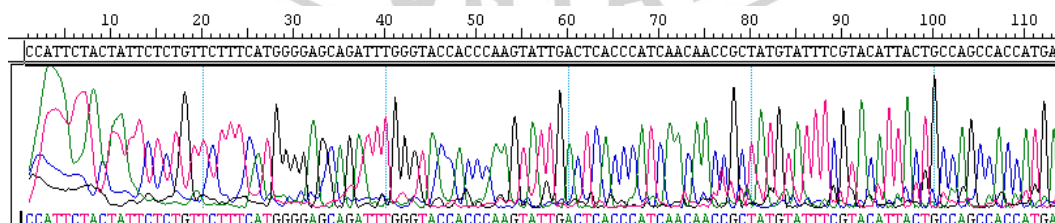
Kalibrasi spektrofotometer dilakukan sebelum digunakan untuk pengukuran sampel DNA. Sebanyak 1000  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O dimasukkan ke dalam kuvet lalu dimasukkan ke dalam Spektrofotometer UV-Vis dan ditekan tombol *read blank* untuk kalibrasi. Sebanyak 5  $\mu\text{l}$  sampel DNA dimasukkan ke dalam kuvet kemudian ditambahkan ddH<sub>2</sub>O sebanyak 995  $\mu\text{l}$ . Konsentrasi DNA diukur pada panjang gelombang 260 nm dan kemurnian DNA diukur dengan perbandingan absorban 260/280 ( $OD_{260/280}$ ).

### 3.3.6. Penentuan Urutan Nukleotida Daerah HVI mtDNA Manusia dengan Sekuensing Metode Dideoksi Sanger

Sekuensing DNA merupakan tahapan akhir dalam menentukan urutan nukleotida fragmen hasil amplifikasi dengan teknik PCR. Sekuensing dilakukan oleh *Macrogen In. Korea* berdasarkan prinsip sekuensing metode Dideoksi Sanger menggunakan *Automatic DNA Sequencer* dengan primer M1 5'(CACCATTAGC-ACCCAAAGCT)3'.

### 3.3.7. Pembacaan Elektroferogram Hasil Sekuensing

Pembacaan elektroferogram hasil sekuensing dilakukan dengan menganalisis data elektroferogram. Pada elektroferogram tersebut, masing-masing basa memperlihatkan warna dan tinggi puncak yang berbeda. Basa adenin (A) berwarna hijau, basa guanin (G) berwarna hitam, basa sitosin (C) berwarna biru, dan basa timin (T) berwarna merah, seperti pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Contoh tampilan elektroferogram hasil sekuensing



### 3.3.8. Analisis Urutan Nukleotida Daerah HVI mtDNA Manusia dengan Sekuensing Metode Dideoksi Sanger

Urutan nukleotida pada daerah HVI mtDNA manusia hasil sekuensing dianalisis dengan menggunakan *SeqMan<sup>TM</sup>* versi 4.00 *DNASTAR*. Proses analisisnya dilakukan dengan cara memasukkan urutan nukleotida sampel dan urutan DNA standar yang ada yaitu urutan *Cambrige* yang telah direvisi oleh Andrews *et al.* pada tahun 1999 yaitu *revised Cambrige Reference Sequence* (rCRS), kemudian program akan secara otomatis menandai basa pada posisi tertentu yang berbeda dengan basa pada standar rCRS.

