

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Alat – alat yang digunakan berupa mikropipet, *mini spin down sentrifuge* (*Multi Spin Biosan*[®] MSC-6000), *thermal cycler PCR* (*ThermoScientific*[®]), *microwave*, elektroforesis *Mupid-exu Advance*[®] untuk analisis DNA produk PCR dan *NyxTechnic*[®] untuk analisis digesti DNA, *UV box* (*Cleaver Scientific Ltd*[®]), dan *gel documentation*.

3.1.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu spesimen biologis DNA tersimpan, sepasang primer *forward* dan *reverse*, reagen kit amplifikasi DNA (*GoTaq*[®] *Green Master Mix Promega*[®]), *Ladder* (*Bioline HyperLadder*[™] 50 bp dan *Geneaid 100 bp DNA Ladder*), enzim restriksi *NsiI* (*New England Biolabs*[®]) dan *Fastdigest* (*ThermoScientific*[®]), gel agarosa (*Promega*[®]), *Fluorescent DNA Stain BIO-5170 (1st BASE)*[®], tip putih dan kuning (*Axygen*[®]).

3.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 100 sampel spesimen biologis DNA tersimpan berupa isolat DNA yang telah diambil pada penelitian sebelumnya dengan judul “*Distribusi Frekuensi Alel Gen Penyandi Transporter Carbamazepine : Abcb1 Rs1045642 C>T Pada Populasi Perempuan Suku Jawa Di Indonesia*”. Kriteria inklusi isolat DNA yang dipersyaratkan sama dengan kriteria inklusi pada penelitian sebelumnya yaitu:

1. 50 subjek perempuan dan 50 laki-laki sehat berdasarkan keterangan pemeriksaan dokter
2. Usia 18 - 23 tahun (kategori usia minimal risiko penyakit kronis)
3. Bersuku Jawa, dibatasi 3 generasi sebelumnya asli Jawa-Indonesia (subyek, ayah/ibu; kakek dan nenek; ayah dan ibu dari kakek dan nenek).

4. Bersedia terlibat dalam penelitian dengan menandatangani surat persetujuan mengikuti penelitian

Kriteria eksklusi subyek: Subjek memiliki hubungan persaudaraan dengan tim peneliti atau mahasiswa/i Prodi Farmasi, Prodi Profesi Apoteker UII.

Kriteria eksklusi isolat DNA: sampel tidak disimpan pada suhu di bawah -22°C dan jumlah DNA di dalam sample tidak cukup untuk dilakukan analisis.

3.3 Besar Sampel

Untuk menentukan besar sampel digunakan metode deskriptif kategorik menggunakan hasil penelitian sebelumnya (Dahlan, 2010).

$$n = \frac{Z\alpha^2 \times P \times Q}{d^2} = \frac{1,96^2 \times 0,535 \times 0,49}{0,1^2} = 100$$

n : jumlah sampel

$Z\alpha$: deviat baku alfa (kesalahan ditetapkan sebesar 5%, sehingga $Z\alpha=1,96$)

P : proporsi kategori variabel yang diteliti (angka prevalensi penelitian sebelumnya = 49%)

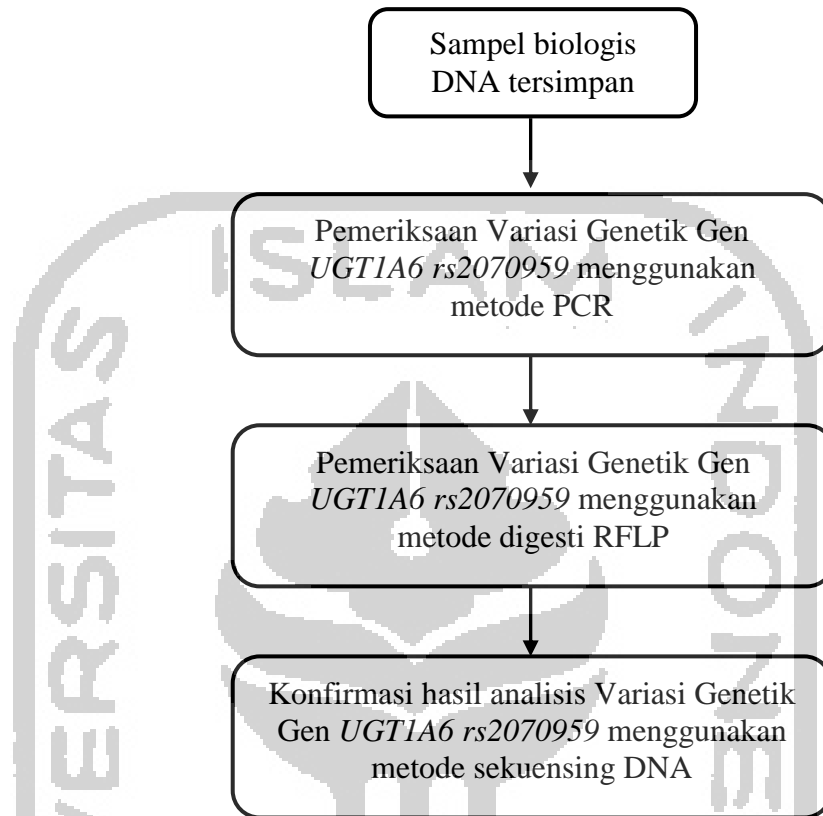
Q : 1-P

d : presisi (ditetapkan sebesar 10%)

Total besar sampel yang dibutuhkan yaitu 100 sampel. Pada saat penelitian, deteksi variasi genetik pada gen target dilakukan terhadap 50 sampel DNA responden sehat laki-laki dan terhadap 50 sampel DNA responden sehat perempuan.

3.4 Cara Penelitian

3.4.1 Skema Penelitian



Gambar 3.1. Tahapan Penelitian

3.4.2 Implikasi Etik pada Manusia

Penelitian ini menggunakan spesimen biologis DNA tersimpan dari penelitian sebelumnya dengan judul “*Distribusi Frekuensi Alel Gen Penyandi Transporter Carbamazepine : Abcb1 Rs1045642 C>T Pada Populasi Perempuan Suku Jawa Di Indonesia*”. Pengajuan *Ethical Clearance* dilakukan di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia tanpa membuat dokumen persetujuan kelompok pasien yang direkrut pada penelitian ini.

3.5 Analisis Kualitas Primer

Analisis kualitas primer dilakukan dengan pengujian spesifikasi menggunakan website *PrimerBLAST* pada laman *National Center for Biotechnology Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pengujian spesifikasi digunakan untuk mengonfirmasi jumlah penempelan primer dan jumlah basa primer pada target yang diinginkan dengan memasukkan sekuen SNP *rs2070959* yang diperoleh dari database NCBI dan primer yang diperoleh dari penelitian sebelumnya terhadap gen *UGT1A6 rs2070959* yang dilakukan oleh Nagar *et al*, (2004) dengan sekuen primer *forward* 5'-CTT TAA GGA GAG CAA GTT TGA TG-3' dan primer *reverse* 5'-CCA CTC GTT GGG AAA AAG TC-3' ke dalam alamat web (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Selanjutnya, letak penempelan primer dikonfirmasi melalui website *Primer 3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

3.6 Analisis Kualitas Enzim Restriksi

Analisis enzim restriksi *NsiI* dilakukan supaya enzim tepat memotong di sekuen target. Sekuen target dapat diketahui melalui website *Enzyme Finder* pada laman *New England Biolabs* (<https://enzyme finder.neb.com/#!/name/NsiI>). Sedangkan, konfirmasi letak pemotongan enzim *NsiI* pada produk PCR dapat menggunakan *Restriction Digest* dari website *Sequence Manipulation Suite Version 2* (http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_digest.html) dengan memasukkan sekuen DNA yang memuat polimorfisme *rs2070959*.

3.7 Analisis Polimorfisme Gen *UGT1A6 rs2070959 A>G* menggunakan Metode PCR

Langkah awal sebelum melakukan analisis polimorfisme gen adalah mempersiapkan komponen bahan yang dibutuhkan untuk proses amplifikasi menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). DNA template diambil dan dicampurkan bersama komponen lain ke dalam mikrotube. Primer yang digunakan dalam amplifikasi PCR yaitu primer *forward* 5'-CTT TAA GGA

GAG CAA GTT TGA TG-3' dan primer *reverse* 5'-CCA CTC GTT GGG AAA AAG TC-3'.

Tabel 3.1. Bahan-Bahan pada Proses PCR

No.	Bahan	Jumlah (μL)	
		Kontrol negatif	Sampel
1.	PCR Master Mix Promega® 2x	12,5	12,5
2.	Primer <i>forward</i> (10 μM)	1,0	1,0
3.	Primer <i>reverse</i> (10 μM)	1,0	1,0
4.	<i>Nuclease free water</i>	10 (add 25)	5,5 (add 25)
5.	DNA template	0	5,0
	Total	25,0	25,0

Tabel 3.2. Tahapan dan Kondisi proses PCR

No.	Tahap PCR	Suhu ($^{\circ}\text{C}$)	Waktu (detik)	Siklus
1.	Pre-Denaturasi	94	45	1
2.	Denaturasi	94	30	34
3.	<i>Annealing</i>	56	30	34
4.	Elongasi (<i>Extension</i>)	72	50	34
5.	Post Elongasi (<i>Final Extension</i>)	72	180	1

Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis menggunakan media gel agarosa dengan konsentrasi agarosa 1,5% pada tegangan 100 volt selama 30 menit menghasilkan produk DNA amplifikasi sebesar 215 bp dan penyimpanan dilakukan pada suhu -20°C . Pengamatan hasil analisis dilakukan di bawah sinar UV 365 nm dengan bantuan pewarna *Florosafe* untuk dapat melihat hasil pita yang terbentuk.

3.8 Analisis Genotip pada Gen *UGT1A6* rs2070959 A>G

Analisis genotip dilakukan melalui proses pemotongan sekuen target (digesti) oleh enzim restriksi dalam metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) terhadap produk PCR yang telah berhasil diamplifikasi. Proses digesti dilakukan menggunakan enzim restriksi *NsiI* dari dua merk *New England Biolabs Inc (NEB)* dan *Fastdigest* dari *Thermo Scientific*. Panjang produk yang akan dihasilkan dari digesti enzim restriksi *NsiI* adalah 128 bp dan 87 bp untuk variasi genotip AA (*wildtype*); 218, 87 dan 215 bp untuk variasi genotip AG (heterozigot *mutant*); dan satu pita utuh berukuran 215 bp untuk variasi genotip GG (homozigot *mutant*). Upaya untuk mendapatkan kondisi optimum digesti enzim *NsiI* telah dilakukan sebanyak 4 optimasi. Optimasi I dilakukan dengan mengatur waktu inkubasi enzim, optimasi II dilakukan meningkatkan konsentrasi DNA, optimasi III dilakukan dengan meningkatkan jumlah enzim restriksi, dan optimasi IV dengan melakukan skrining digesti pada sampel. Kondisi dan komponen yang dibutuhkan selama proses digesti *NsiI* sesuai dengan tabel 3.1.

Tabel 3.3. Kondisi dan Komponen Optimasi Digesti Enzim

No.	Bahan	Volume Optimasi (μL)			
		I	II	III	IV
1.	Enzim <i>NsiI</i>	1	1	1,2	1
2.	Produk PCR	10	11	10	10
3.	Greenbuffer	2	2	2	2
4.	<i>Nuclease Free Water</i> (NFW)	17	16	16,8	17
Total Volume		30			
Suhu Inkubasi ($^{\circ}\text{C}$)		37			
Waktu inkubasi (menit)		5, 10, 15, 60, 120, 180			
Suhu dan waktu inaktivasi		65 $^{\circ}\text{C}$, 15 menit			

3.9 Sekuensing DNA

Sekuensing DNA (*Direct sequencing*) dilakukan pada 2 sampel produk yang secara acak diambil dari 100 produk PCR yang telah divisualisasi untuk mengonfirmasi varian genotip produk. Sampel acak dipilih dengan memasukkan total keseluruhan sampel yang digunakan dan jumlah sampel acak yang diinginkan pada laman *Research Randomizer* (<https://www.randomizer.org/>). Sampel sekuensing dikirimkan kepada pihak yang menyediakan fasilitas pengujian sekuesing, yaitu PT. Genetika Science untuk dilakukan analisis lebih lanjut.

3.10 Analisis Hasil

Analisis untuk pengujian kualitatif primer *forward* dan *reverse* pada metode PCR dan enzim restriksi pada metode RFLP dilakukan secara deskriptif. Hasil digesti enzim restriksi yang diperoleh dilakukan perbandingan dengan data hasil sekuensing DNA sebagai konfirmasi hasil analisis untuk mengetahui adanya variasi genetik pada gen *UGT1A6 rs2070959 A>G*. Pengolahan data hasil sekuensing DNA diolah menggunakan perangkat lunak *Bioedit* dan *Chromas*.