

BAB 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif *cross sectional* molekuler. Data yang diperoleh berasal dari pemeriksaan langsung yang dilakukan peneliti sebanyak sembilan sampel dan dari data sekunder dari penelitian serupa.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Departemen Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia sejak bulan Mei 2007 sampai dengan bulan November 2008.

3.3. Sampel

3.3.1. Kriteria Inklusi

1. pria oligozoospermia berat
2. bersedia ikut dalam penelitian

3.3.2. Kriteria Eksklusi

1. pasien yang telah dipastikan oleh dokter spesialis andrologi menderita obstruksi saluran reproduksi

3.3.3. Besar Sampel

Besar sampel ditentukan berdasarkan ketentuan studi polimorfisme, yaitu paling sedikit menggunakan 100 alel yang sebanding dengan 50 sampel. Penelitian ini menggunakan 70 sampel yang memenuhi ketentuan tersebut.

3.4. Alat

1. spuit 3 cc
2. Tabung microcentrifuge 1,5 ml
3. Mikropipet 0,5-10 ul, 10-100 ul, 100-1000ul
4. Tip putih (0.5-10ul), kuning (10-100ul), biru (100-1000ul)
5. Microcentrifugator

6. Vortex
7. Inkubator
8. Tabung mikrocentrifuge 0,2 ml
9. *Thermocycler Machine*
10. Timbangan Sartorius
11. Selotip
12. *DNA Electrophoresis Device*
 - a. chamber elektrotorensis
 - b. tray elektroforesis
 - c. sisir
 - d. power supply
13. *UV Transiluminator*

3.5. Bahan

1. 3 cc darah sampel yang telah ditambah heparin
2. *Wizard genomic DNA purification*
 - a. cell lysis solution
 - b. nuclei lysis solution
 - c. protein precipitation solution
 - d. rehydration solution
3. Isopropanol
4. Alkohol 70%
5. H₂O
6. MgCl₂
7. Buffer MgCl₂
8. Deoksinucleotide Triphosphat (dNTP), yaitu dATP, dCTP, dGT, DTTp
9. Primer (oligonukleotida) upstream dan downstream, masing-masing dengan konsentrasi 20 pmol/mL
10. Enzim DNA polimerasi (tag polimerase)
11. agarosa bubuk

12. kertas aluminium
13. selotip
14. larutan *Tris Borat EDTA* (TBE)
15. ethidiumbromida
16. loading buffer (bromofenol biru dan xylene cyanol)

3.6. Cara Kerja

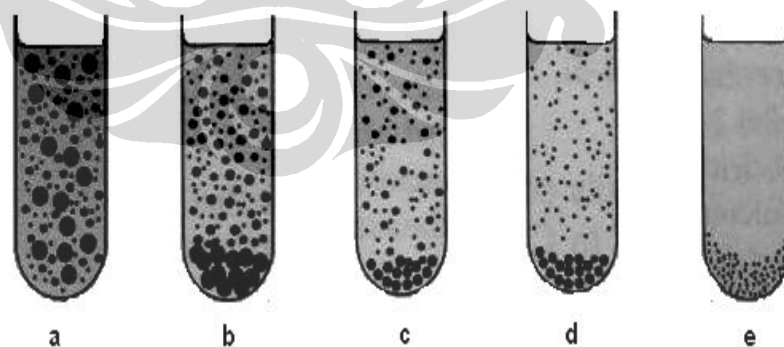
3.6.1. Pengambilan sampel

1. Sampel berupa 3 ml darah tepi pria oligozoospermia, disimpan dalam *vacutainer* yang berisi heparin untuk mencegah pembekuan darah.
2. Diagnosis oligozoospermia berat ditegakkan sebelumnya dengan ditemukannya kurang dari 5 juta sel sperma tiap mililiter cairan ejakulat pada pemeriksaan analisis semen.

3.6.2. Isolasi DNA

1. Sembilan ratus mikroliter *cell lysis solution* dan 300 ul darah pasien dimasukkan dalam tabung *microcentrifuge* steril kemudian dihomogenasi dengan cara dibolak balik, kemudian diinkubasi selama 10 menit dalam suhu ruang, dibolak balik 2 sampai 3 kali selama inkubasi.
2. Setelah diinkubasi, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 putaran per menit (rpm) pada suhu ruang selama tiga menit sehingga dihasilkan pellet berwarna kecoklatan.
3. Supernatan dibuang tanpa mengganggu pellet, kemudian langkah nomor satu dan dua diulangi sampai didapatkan pellet berwarna putih.
4. Tiga ratus mikroliter *nuclei lysis solution* ditambahkan pada pellet yang telah berwarna putih lalu campuran dihomogenasi dengan vorteks sampai pellet larut. Selanjutnya, 100 ul *protein precipitation solution* ditambahkan ke dalam campuran lalu campuran kembali dihomogenasi dengan vortex sampai terlihat butiran-butiran halus.

5. Setelah tampak butiran halus, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama tiga menit pada suhu ruang sehingga dihasilkan pellet dengan warna coklat terang dengan supernatan kecoklatan.
6. Supernatan dipindahkan ke tabung *microcentrifuge* bersih, kemudian langkah nomor lima dan enam diulang sampai didapatkan supernatan yang tidak berwarna atau bening.
7. Isopropanol sebanyak 1 ml ditambahkan dalam supernatan yang sudah bening, dibolak-balik secara perlahan sampai terlihat benang-benang putih halus, kemudian disimpan pada suhu -20°C selama satu hari.
8. Keesokan harinya, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 3 menit sampai didapatkan pellet berwarna putih.
9. Supernatan dibuang lalu pada pellet ditambahkan 400 ul alkohol 70% dingin dan campuran dihomogenasi dengan vorteks sampai pellet larut.
10. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 3 menit sampai didapatkan pellet berwarna putih.
11. Supernatan dibuang, kemudian pellet dilarutkan dalam 100 ul *rehydration solution*. Larutan tersebut disimpan pada suhu 4°C selama satu hari untuk rehidrasi DNA, selanjutnya disimpan pada suhu -20°C



Gambar 3.1. Tahap-tahap isolasi DNA ¹⁶

- a. campuran berisi debris sel, protein, dan DNA
- b. debris sel diendapkan, supernatan berisi protein dan DNA
- c. protein besar diendapkan, supernatan berisi protein kecil dan DNA
- d. protein kecil diendapkan, supernatan berisi DNA
- e. DNA diendapkan

3.6.3. Amplifikasi rantai DNA

1. Primer yang digunakan dalam penelitian ini antara lain STS sY14, sY239, sY 242, sY254, sY255, dan sY1196.
2. Primer diterima dalam konsentrasi pekat sehingga memerlukan pengenceran untuk mencapai konsentrasi yang sesuai kebutuhan penelitian, yaitu dengan konsentrasi 20 pikomolar.

Tabel 3.1. Sekuen STS yang digunakan pada penelitian

No	STS	Sekuens Primer	Produk
1	sY14	5' - GAATATTCCGCTCTCCGGA - 3' 5' - GCTGGTGCTCCATTCTTGAG - 3'	472 bp
2	sY239	5' - CATTTCATCTTCCCTTTTGAAGG - 3' 5' - ATGCAAGTCGCAGGAAATCT - 3'	200 bp
3	sY242	5' - ACACAGTAGCAGCGGGAGTT - 3' 5' - TCTGCCACTAACTCGAAGCTCC - 3'	233 bp
4	sY254	5' - GGGTGTTACCAGAAGGCAAA - 3' 5' - GAACCGTATCTACCAAAGCAGC - 3'	107 bp
5	sY255	5' - GTTACAGGATTCGGCGTGAT - 3' 5' - CTCGTCATGTGCAGCCAC - 3'	126 bp
6	sY1196	5' - GTTGGCAACTTGCACTGCT - 3' 5' - CCTTTCCTCTCAAAGTCCCC - 3'	394 bp

3. Ketepatan primer yang digunakan diperiksa dengan pemeriksaan pengurutan basa DNA (*DNA sequencing*)
4. Campuran PCR terdiri atas buffer MgCl₂, MgCl₂, dNTP, primer *upstream* dan primer *downstream* dengan konsentrasi 20 pikomolar, H₂O, dan enzim DNA polimerase dibuat sekaligus untuk sembilan sampel dan satu kontrol dalam tabung *microcentrifuge* 1,5 ml.
5. Campuran PCR dipindahkan ke dalam 10 tabung *microcentrifuge* 0,2 ml khusus, masing-masing tabung berisi 20 ul campuran PCR.

6. Kedalam masing-masing tabung ditambahkan 5 μ l DNA, lalu tabung diberi kode sesuai sampel, sementara satu tabung lainnya ditambahkan H₂O sebagai kontrol negatif.

Tabel 3.2. Resep campuran PCR

No	Zat	1 resep	10 resep
1	Buffer MgCl ₂	2,5 ul	25 ul
2	MgCl ₂	1,5 ul	15 ul
3	Dntp	0,5 ul	5 ul
4	primer <i>upstream</i>	0,5 ul	5 ul
5	primer <i>downstream</i>	0,5 ul	5 ul
6	H ₂ O	14,25 ul	142,5 ul
7	enzim DNA polimerase	0,25 ul	2,5 ul
Campuran PCR		20 ul	200 ul

7. Campuran PCR dihomogenasi menggunakan vortex. kemudian diletakan dalam mesin PCR (*thermocycler*).
8. Mesin PCR diatur untuk melakukan 35 siklus amplifikasi sesuai temperatur denaturasi, annealing, dan elongasi primer yang digunakan dalam proses amplifikasi rantai DNA, kemudian dijalankan.

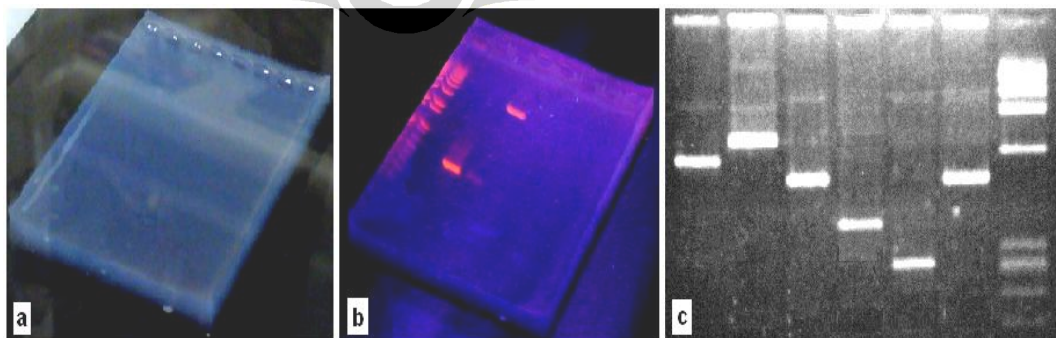
Tabel 3.3. Suhu denaturasi, annealing, dan elongasi

No	STS	denaturasi	annealing	elongasi
1	sY14	94° C	63° C	72° C
2	sY239	94° C	58° C	72° C
3	sY242	94° C	63° C	72° C
4	sY254	94° C	63° C	72° C
5	sY255	94° C	63° C	72° C
6	sY1196	94° C	63° C	72° C

9. Setelah proses amplifikasi selesai, hasil amplifikasi siap dinilai dengan elektroforesis gel agarose

3.6.4. Elektroforesis Gel Agarose

1. *Tray* elektroforesis dibuat dengan bantuan selotip, kemudian diperiksa menggunakan air untuk memastikan tidak ada kebocoran. Selanjutnya dipasang sisir untuk mencetak sumur elektroforesis.
2. Gel agarose 1% yang digunakan untuk memisahkan fragmen DNA berukuran 200 sampai 1000 bp, dibuat dengan memanaskan 0,5 gram agarosa bubuk dalam 50 ml *tris borat EDTA* (TBE) sampai mendidih dan semua bubuk agarosa larut sehingga larutan tampak bening.
3. Campuran didiamkan selama satu menit sampai kira-kira temperatur larutan sekitar 70°C, ditambahkan 1 ul ethidiumbromida 0,1%, dituang larutan agarosa ke dalam *tray* elektroforesis, lalu dibiarkan mengeras.
4. Setelah gel agarose mengeras, selotip dan sisir dilepaskan, kemudian *tray* elektroforesis berikut gel agarose didalamnya diletakan dalam *chamber* elektroforesis yang berisi larutan TBE. Larutan TBE dipastikan merendam gel agarose sampai 1 mm diatas permukaan gel.
5. Satu ul loading buffer bromofenol biru dan xylene cyanol ditambahkan dalam campuran PCR untuk menambah kepadatan DNA, memberi warna campuran PCR, serta mendistribusikan DNA secara merata pada sumur.
6. Campuran *loading buffer*-DNA dimasukan ke dalam sumur gel, lalu alat elektroforesis dihubungkan dengan sumber listrik 95 volt selama 1 jam.
7. Hasil elektroforesis gel agarose berupa pita (*bands*) yang dapat dilihat menggunakan UV *transiluminator* atau kamera polaroid.



Gambar 3.2. Visualisasi hasil elektroforesis gel. ¹⁸

- a. visualisasi langsung tanpa uv transiluminator
- b. visualisasi langsung, dengan uv transiluminator
- c. visualisasi tidak langsung, dengan kamera polaroid

3.6.4. DNA Sequencing

1. Setiap primer yang digunakan dalam penelitian diperiksa ketepatan sekuens basa nukleotidanya dengan pengurutan sekuens DNA.
2. Pemeriksaan dilakukan dengan mengirimkan produk PCR beberapa sampel yang mewakili tiap primer yang digunakan dalam penelitian ini pada Lembaga Eijkmann Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Cipto Mangunkusumo (RSUPRN-CM).
3. Urutan basa nukleotida primer dapat dibaca pada bagian awal dan akhir dari sekuens produk PCR. Primer upstream yang terletak pada awal sekuens dan primer down stream pada akhir sekuens.



Gambar 3.3. Pembacaan sekuens DNA metode terminasi rantai²³