

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui variasi genetik (polimorfisme) gen Apo E pada pasien IMA di Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang.

3.2 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Pasien Infark Miokard Akut
2. Variabel terikat: Polimorfisme gen Apo E pasien Infark Miokard Akut

3.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2014- Agustus 2014, bertempat di Laboratorium Genetika Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi Universitas Brawijaya Malang.

3.4 Populasi dan Subyek Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah pasien Infark Miokard Akut yang dirawat di CVCU RS dr Saiful Anwar Malang.

3.4.2 Subyek Penelitian

Subyek penelitian merupakan pasien pasien Infark Miokard Akut yang yang dirawat di CVCU RS dr Saiful Anwar Malang. Pasien berjenis kelamin laki-laki berusia 30-74 tahun, dengan diagnosa Infark Miokard Akut yang ditegakkan dari hasil anamnesa, Elektrokardiografi dan peningkatan enzim jantung (troponin I), serta tidak menderita diabetes melitus, infeksi berat, gangguan fungsi hepar dan ginjal yang berat dan keganasan. Pasien yang telah didiagnosis positif menderita IMA oleh dokter spesialis jantung kemudian diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (*informed concern*) untuk mengikuti penelitian ini.

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat

Alat- alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi: Sentrifuge, Mesin PCR, oven, autoklaf, mikropipet, tabung eppendorf, microtube, PCR-tube white tip, blue tip, yellow tip, elektroforesis horisontal, gel doc, vortex, hot plate, dan beaker glass.

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel darah yang diperoleh dari pasien IMA yang dirawat di CVCU RS dr Saiful Anwar Malang, *Geneaid DNA Ekstraktion kit*, TBE buffer, EtBr, gel agarose 2%, loading dye, alkohol 70%, primer spesifik Apo E, master mix PCR *Kapa HiFi HotStart PCR kit.*, DNA Ladder 100bp, alumunium foil, plastic wrap, dan ddH₂O.

3.6 Kegiatan Penelitian

3.6.1 Diagnosa Pasien IMA

Penentuan pasien IMA dilakukan oleh dokter spesialis jantung RS dr. Saiful Anwar Malang. Pasien memiliki keluhan atau gejala ACS yang utama adalah sakit dada yang dirasakan dibagian sternum, tetapi dapat menjalar ke dada kiri atau kanan, ke rahang, ke bahu kiri dan kanan pada satu atau dua lengan. Rasa tertekan, terhimpit, rasa berat atau panas di dada, sesak nafas, terkadang diiringi dengan rasa cemas, mual dan muntah. Biasanya berlangsung lebih dari setengah jam dan tidak hilang dengan istirahat atau pemberian nitrat (Aoronson, 2010; Gray, 2005).

Pemeriksaan fisik yang meliputi EKG dan enzim jantung. Elevasi segmen ST, peningkatan gelombang Q, dan inversi gelombang T berkembang. Peningkatan lebih dari dua kali lipat pada konsentrasi enzim selular jantung dalam plasma menunjukkan bahwa terjadi nekrosis Miokard. Enzim ini mencakup Kreatin kinase MB (CK-MB) dan troponin T dan I jantung. Kadar CK-MB mulai meningkat dalam 4-8 jam, memuncak dalam 24 jam, dan menurun hingga normal pada 2-3 hari. Troponin jantung mulai meningkat dalam 4-8 jam dan tetap tinggi selama 4-7 hari (Aoronson, 2010).

3.6.2 Pengambilan Sampel Darah

Pasien yang didiagnosis sebagai penderita IMA dengan kriteria inklusi dan eksklusi tersebut diambil darahnya sebanyak kurang lebih 20 ml oleh tenaga medis yang bertugas di CVCU RS dr. Saiful Anwar Malang.

Kemudian diberi label sesuai identitas pasien pada tabung yang telah disediakan, dengan hati-hati sampel darah dibawa ke laboratorium dan segera dipisahkan antara sampel darah dengan serum. Selanjutnya sampel darah yang telah terpisah dengan serum disimpan dalam lemari es dengan suhu -20°C.

3.6.3 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dulu disterilkan dalam autoklaf. Sterilisasi dilakukan dengan cara membungkus alat menggunakan aluminium foil. Autoklaf diatur dengan suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit

3.6.4 Isolasi DNA

Sebanyak 200 µl darah dari 10 pasien IMA diambil dan diisolasi dengan menggunakan *Geneaid GNA Ekstraktion Kit*. Prosedur isolasi DNA dilakukan sesuai dengan protokol yang terdapat pada kit tersebut.

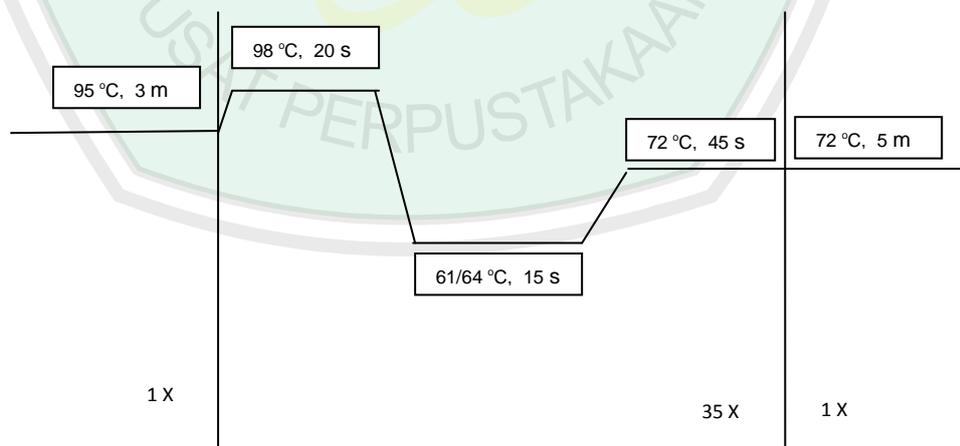
3.6.5 Amplifikasi Gen Apolipoprotein E

Polimorfisme gen Apo E diidentifikasi dengan single PCR dengan menggunakan 5 macam primer. Diantaranya adalah 4 primer spesifik, dan 1 primer *common*.. Primer I, II, III, dan IV merupakan primer spesifik Apo E, primer V merupakan primer *common*. Metode ini disebut Amplifikasi Refactory Mutation System.

Tabel 3.1 Primer Spesifik ARMS untuk Polimorfisme Apo E

Primer	Primer Sekuens (5'-3')	Panjang Produk PCR(bp)
I (Cys 158)	ATGCCGATGACCTGCAGAATT	588
II (Arg 158)	ATGCCGATGACCTGCAGAATC	588
III (Cys 112)	CGCGGACATGGAGGACGTTC	451
IV(Arg 112)	CGCGGACATGGAGGACGTTT	451
Common	G TTCAGTGATTGTCGCTGGGCA	-

Proses PCR ini berlangsung dengan suhu denaturasi awal 95 °C selama 5 menit, 35 siklus dengan suhu denaturasi 98 °C selama 20 detik, annealing 61 °C selama 15 detik (untuk primer I dan III) dan 63,5°C selama 15 detik (untuk primer II dan IV), dan elongasi 72 °C selama 45 detik dan post elongasi 72 °C selama 5 menit.



Gambar 3.1 Siklus PCR

3.6.5 Deteksi Polimorfisme Gen Apo E

Molekul DNA hasil PCR dapat dideteksi dengan menggunakan elektroforesis gel agarose. Elektroforesis gel agarose ini menggunakan gel agarose 2%. Produk PCR dimasukkan ke dalam sumuran sebanyak 4 μ L dan dialiri arus listrik 100 V selama 1 jam. Hasil elektroforesis selanjutnya divisualisasi dengan Gel Doc untuk melihat fragmen DNA yang telah dipisahkan.

3.7 Analisa Data

Hasil dari Amplifikasi Refactory Mutation System (ARMS) dianalisa secara deskriptif. untuk mengetahui variasi genetik yang terdapat pada pasien IMA. Genotip akan terlihat sesuai dengan pola amplifikasi oleh primer spesifik Cys/Arg 112 dan Cys/Arg 158 pada hasil visualisasi sehingga dapat dihitung secara langsung genotip yang terdapat pada pasien IMA.

Hubungan gen Apo E dengan penyakit IMA dapat dilihat dari analisis SPSS uji korelasi pearson menggunakan data sekunder yang telah diperoleh (kadar HDL, LDL, kolesterol dan trigliserida) yang dibandingkan dengan kontrol.