

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif yang bertujuan untuk mengidentifikasi gen *angiotensin converting enzyme* (ACE) insersi/ delesi (I/D) pada penderita hipertensi di rumah sakit dr. Saiful Anwar Malang.

3.2 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Insersi alu *elements*
2. Variabel Terikat : Gen *angiotensin converting enzyme* (ACE) insersi/ delesi (I/D)

3.3 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2013 sampai bulan Agustus 2014, yang bertempat di Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya dan Laboratorium Genetika Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.4 Subyek Penelitian

3.4.1 Subyek Penelitian

Subyek penelitian merupakan pasien hipertensi yang berobat di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang yang didiagnosis menderita hipertensi oleh dokter spesialis jantung dan tidak dibedakan jenis kelamin maupun usia. Penelitian dilakukan setelah mendapat persetujuan dari komite etik Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya dan Rumah Sakit Saiful Anwar Malang. Pasien hipertensi diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (*informed concern*)

3.4.2 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dari subyek penelitian ini yaitu, pasien hipertensi yang berobat di poli jantung rumah sakit dr.Saiful Anwar Malang dengan tekanan darah sistol ≥ 140 mmHg dan diastol ≥ 90 mmHg. Tanpa batasan usia maupun jenis kelamin sebab, yang akan diteliti pada penelitian ini adalah gen dari pasien yang berada pada kromosom *autosomal* sehingga tidak dipengaruhi oleh jenis kelamin maupun usia subyek.

3.4.3 Jumlah Sampel

Sampel berupa darah pasien hipertensi sebanyak 100 sampel. Kemudian diekstraksi DNA-nya untuk keperluan penelitian. Pada semua sampel DNA yang didapat, dilakukan genotyping untuk menemukan 3 macam genotipe yaitu II, ID dan DD.

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan untuk pengambilan darah pasien yaitu *venojack* dan *vacuntainer tube* dengan EDTA 20%. Isolasi DNA menggunakan alat-alat diantaranya yaitu, mikropipet, white tip, yellow tip, mikrosentrifuge, ependorf, freezer, dan vortex. Alat untuk amplifikasi DNA (PCR) yaitu, mesin PCR, mikropipet, *mikrosentrifuge* dan vortex. Sedangkan alat untuk elektroforesis yaitu, *hot plate and stirer*, sisir pencetak sumuran, *mikropipet*, timbangan digital, mesin elektroforesis. Alat untuk melihat hasil elektroforesis yaitu UV *transiluminator*.

3.5.2 Bahan

Isolasi DNA menggunakan Qiagen Mini Kit, dan etanol absolut. Bahan untuk PCR antara lain ddH₂O, PCR mix (merek intron), sample whole genome DNA, serta primer ACE *Applied Biosystems* 111, 112. forward 5'- CCC ATC CTT TCT CCC ATT TCT C -3' dan primer ACE reverse 5'- AGC TGG AAT AAA ATT GGC GAA AC -3' . Bahan untuk elektroforesis yaitu, agarosa, TBE 1X, DNA ladder 100bp *vivantis* dan EtBr.

3.6 Kegiatan Penelitian

3.6.1 Diagnosis Hipertensi

Penentuan kondisi hipertensi dilakukan sesuai dengan rekomendasi *American Heart Disease* (1981) yaitu dengan menggunakan alat pengukur tekanan darah *mercury sphygmomanometer*. Pengukuran dilakukan pada lengan kanan dengan posisi duduk tenang dan santai. Tidak ada pakaian sempit yang melingkari lengan yang akan diperiksa. Lengan yang akan diperiksa diletakkan pada tempat yang setinggi dada. Stetoskop diletakkan pada fossa antekubiti di atas arteri brakialis, 10- 15 menit kemudian tekanan diukur. Tekanan dinaikkan sampai ± 20 mmHg dari tekanan sistolik dugaan sambil dilakukan palpasi pada arteri radialis. Bunyi nada Korotkoff terdengar pada waktu tekanan dalam manset perlahan-lahan diturunkan (dengan kecepatan 2-3 mm untuk tiap satu denyut nadi). Tekanan sistolik adalah bunyi yang pertama kali terdengar (Korotkoff I). Tekanan diastolik adalah saat bunyi hilang (Korotkoff). Seseorang dikategorikan penderita hipertensi apabila tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan diiringi tekanan darah diastolik ≥ 120 mmHg.

3.4.2 Pengambilan Sampel Darah

Sampel darah didapatkan dari penderita hipertensi di Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang sebanyak 5 μ l masing-masing subyek yang diambil dari vena jugularis menggunakan venojack dan vacuntainer yang telah diisi EDTA 20% kemudian diberi label sesuai identitas sampel yang diperoleh. Selanjutnya sampel darah disimpan dan ditransportasikan ke laboratorium dengan suhu -20⁰ C untuk diproses ketahap penelitian selanjutnya.

3.6.3 Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan *Mini Kit QIAGEN*. Sampel darah yang sebelumnya disimpan, diambil sebanyak 200 μ l dan diisolasi dengan prosedur yang sesuai dengan protokol QIAamp[®] DNA Blood mini Kit QIAGEN. Selanjutnya DNA disimpan pada suhu -4⁰C di dalam microtube eppendorf.

3.6.4 Konfirmasi DNA Whole genom

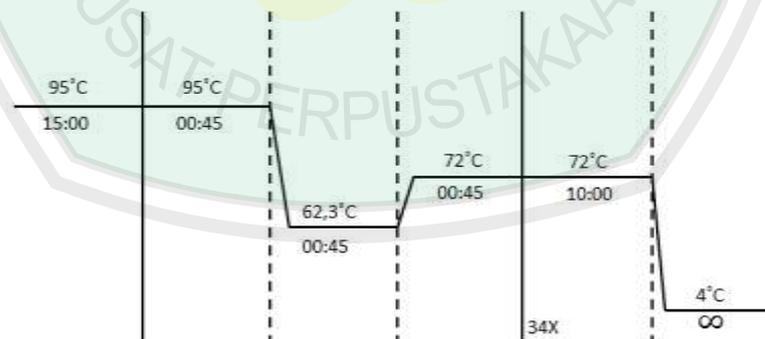
DNA yang sudah diisolasi, diuji kualitasnya dengan menggunakan elektroforesis gel agarose 0,8% yang dilarutkan dalam TBE 1X. Sebelum dimasukkan DNA ke dalam *well* agarose terlebih dahulu ditambahkan dengan 2 μ l *loading dye* dalam 3 μ l DNA. *Running* elektroforesis dilakukan dengan tegangan 50 V, 40A, dalam waktu 60 menit.

Gel agarose kemudian direndam dalam larutan EtBr (Etidium Bromida) selama 15 menit. Band DNA dilihat pada transiluminator UV. Hasil elektroforesis menunjukkan berhasil tidaknya isolasi DNA, Pada sampel yang tidak tampak band DNAny maka tidak dilanjutkan ke tahap selanjutnya, sebab tidak terdapat DNA pada sampel DNA tersebut.

3.6.5 Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan dengan reaksi berantai polimerase (PCR = *polymerase chain reaction*). Hasil isolasi DNA genom dari sampel darah pasien hipertensi diamplifikasikan menggunakan teknik PCR dengan primer ACE *Applied Biosystems* 111, 112. forward 5'- CCC ATC CTT TCT CCC ATT TCT C -3' dan primer ACE reverse 5'- AGC TGG AAT AAA ATT GGC GAA AC -3'. Komposisi larutan PCR yaitu 8µl ddH₂O *Otsuka*, 10µl *Master Mix Kit Intron*, 1 µl DNA whole Genom, dan primer F dan R (20pmol) masing- masing 0,5 µl, sehingga volume total 20 µl.

Kondisi PCR yang digunakan diawali dengan *predenaturation* 95⁰C selama 15 menit, kemudian *denaturation* selama 45 detik dengan suhu 95⁰C. *Annealing* 62,3⁰C selama 45 detik, *extention* 72⁰C selama 45 detik, dari tahap *denaturation* sampai *extention* dilakukan pengulangan sebanyak 34 siklus. Kemudian dilanjutkan dengan *post-extention* 72⁰C selama 10 menit, dan disimpan pada suhu 4⁰C.



3.6.6 Visualisasi Hasil PCR

Visualisasi hasil PCR dilakukan menggunakan elektroforesis horizontal dengan gel agarosa 2,5% dalam larutan buffer TBE 1X. Sampel yang akan dirunning elektroforesis, dimasukkan ke dalam sumuran/ well yang telah dicetak

pada agarosa sebanyak 5 μ l setiap sumuran, dan salah satu sumuran dimasukkan DNA marker 100bp sebanyak 4 μ l. Elektroforesis dilakukan dengan voltase 50 V, selama 120 menit. Kemudian, setelah selesai elektroforesis gel agarose di keluarkan dari bak elektroforesis dan direndam dalam EtBr selama 15 menit. Selanjutnya dilihat dengan *trasiluminator UV (gel doc)*.

3.6.7 Uji Konfirmasi Genotip ID

Hasil amplifikasi yang memunculkan satu pita berukuran 319bp dilakukan reamplifikasi (diampifikasi kembali) menggunakan primer spesifik insersi dengan *sequence* primer forward 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC -3' dan reverse 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA -3'. Dengan kondisi PCR *predenaturation* 95⁰C selama 15 menit, kemudian *denaturation* selama 45 detik dengan suhu 95⁰C. *Annealing* 50⁰C selama 45 detik, *extention* 72⁰C selama 45 detik, dari tahap *denaturation* sampai *extention* dilakukan pengulangan sebanyak 34 siklus. Kemudian dilanjutkan dengan *post-extention* 72⁰C selama 10 menit, dan disimpan pada suhu 4⁰C.

3.6.8 Analisis Data

Hasil visualisasi PCR dengan gel agarose 2,5%, akan menunjukkan genotip dari setiap sampel. Genotip tersebut antara lain II, ID, dan DD. Ukuran band untuk alel I yaitu 597 pb dan untuk alel D yaitu 319 pb. Apabila hanya muncul satu band dan berukuran 597pb maka genotipnya II atau muncul satu band dan berukuran 319pb maka genotipnya DD. Sedangkan, apabila muncul dua band berukuran 597pb dan 319pb maka genotipnya ID (Borah *et al.*, 2011).

Genotip ID terkadang hanya muncul satu band pada ukuran 319bp, sehingga perlu di PCR kembali dengan primer spesifik insersi. Sekuen forward 5'-

TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC -3' dan sekuen referse 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA -3'. Apabila muncul band maka sampel tersebut bergenotip ID, sedangkan apabila tidak muncul maka sampel tersebut bergenotip DD. Hasil visualisasi seluruh sampel dicatat dan dihitung persentase jumlah pasien hipertensi yang memiliki genotipe II, ID dan DD. Hasil persentase genotip dapat digunakan untuk mencari frekuensi alel dengan menggunakan hukum Hardy – Weinberg yaitu (Salem *and* Batzer, 2009) :

$$p^2+2pq+q^2 = 1 \text{ dan } p+q = 1$$

p^2 merupakan fraksi dari genotip dominan heterozigot dalam penelitian ini mewakili II (insersi – insersi). $2pq$ merupakan fraksi dari genotip heterozigot ID (insersi – delesi). q^2 merupakan fraksi genotip homozigot resesif dalam penelitian ini mewakili DD (delesi – delesi) (Elrod and Stansfield, 2007).

p dan q dalam perhitungan diatas melambangkan alel, dimana p dianggap sebagai alel I (insersi) dan q dianggap sebagai alel D (delesi) (Salem *and* Batzer, 2009). Sehingga, rumus menghitung frenkuensi alel menjadi :

$$II + 2ID + DD = 1 \text{ dan } I + D = 1$$