

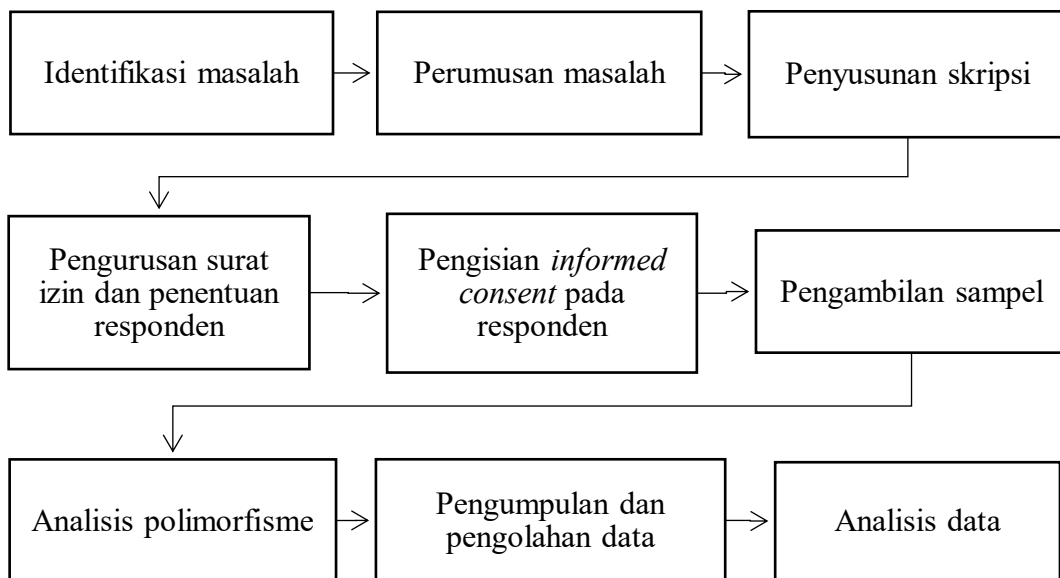
BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif, yang bertujuan untuk mengamati dan menganalisis pola potongan pita DNA pada gen SLC2A4. Penelitian ini dimaksudkan untuk mengidentifikasi potensi risiko bawaan terhadap diabetes mellitus tipe II berdasarkan analisis variasi genetik. Teknik yang digunakan adalah PCR-RFLP, yang memungkinkan deteksi polimorfisme secara spesifik melalui pemotongan DNA pada lokasi pengenalan enzim restriksi tertentu (Natalia *et al.*, 2023).

B. Alur Penelitian



Gambar 2. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di UPTD Puskesmas II Denpasar Utara untuk subjek dengan diabetes mellitus (DM). Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Jurusan Teknologi Laboratorium Medis, Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2024-April 2025.

D. Subjek dan Sampel Penelitian

1. Subjek penelitian

Subjek penelitian ini meliputi 20 individu, yang terdiri atas 10 individu dengan diabetes mellitus tipe II (DM tipe II) dan 10 individu tanpa diabetes mellitus (non-DM).

2. Sampel penelitian

Sampel penelitian berupa 20 sampel darah yang diambil dari 10 subjek DM tipe II dan 10 subjek non-DM. Sampel darah tersebut digunakan untuk proses ekstraksi DNA menggunakan *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega). DNA genom yang diperoleh selanjutnya dianalisis menggunakan teknik PCR-RFLP untuk analisis polimorfisme pada gen SLC2A4.

3. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan metode *purposive sampling* dengan mempertimbangkan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan. Kriteria inklusi mencakup individu dengan diagnosis klinis diabetes mellitus tipe II dan individu tanpa diabetes mellitus sebagai pembanding.

Sampel dipilih berdasarkan ketersediaan data medis yang memadai serta kesediaan individu untuk berpartisipasi dalam penelitian. Adapun kriteria eksklusi, yaitu individu yang tidak bersedia menjadi subjek penelitian dan individu yang membatalkan keikutsertaannya dalam penelitian.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah data primer, yaitu identitas responden (nama, usia, jenis kelamin, alamat, dan nomor telepon), kadar gula darah puasa, serta hasil analisis polimorfisme gen SLC2A4 menggunakan metode PCR-RFLP.

2. Teknik pengumpulan data

Pengumpulan data dalam penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan berikut:

a. Wawancara

Wawancara dilakukan dengan responden yang terlibat dalam penelitian, yaitu individu dari kelompok penderita Diabetes Mellitus Tipe II (DM) dan kelompok non-DM. Wawancara bertujuan untuk mendapatkan informasi terkait nama, jenis kelamin, alamat, nomor telepon, kadar gula darah puasa, riwayat kesehatan, serta memberikan persetujuan untuk berpartisipasi dalam penelitian.

b. Pencatatan dokumen

Data sekunder dalam penelitian ini diperoleh dari rekam medis responden di UPTD Puskesmas II Denpasar Utara, yang mencakup diagnosis resmi Diabetes Mellitus Tipe II. Data ini digunakan untuk memverifikasi kondisi kesehatan Diabetes Mellitus Tipe II pada kelompok penelitian

c. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel darah dilakukan sesuai dengan prosedur standar operasional (SOP) di laboratorium, menggunakan alat steril untuk mencegah kontaminasi. Sampel darah digunakan untuk analisis polimorfisme gen SLC2A4 menggunakan metode PCR-RFLP.

d. Pengolahan data

Setelah pengambilan sampel, data hasil elektroforesis pola potongan DNA dianalisis. Proses pengolahan mencakup verifikasi pola potongan DNA, pengkodean berdasarkan panjang fragmen, dan tabulasi data untuk mempermudah analisis lebih lanjut.

3. Instrument pengumpulan data

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi laptop, UV Transilluminator Analytik Jena AG benchUV 20i, mikropipet dan tip steril, vortex mixer VM-300P Gemmy Industrial Corp, microcentrifuge Hermle Labortechnik Z 130 M, mini centrifuge Hanil Scientific Inc M15R, inkubator Esco Isotherm, *refrigerator*, PCR UV² Workstation Analytik Jena AG, tempat limbah padat dan cair, erlenmeyer, gelas beaker, gelas ukur, hotplate, *magnetic stirrer*, rak tabung, spatula, glucometer (*Sinocare Safe Accu*), autoclick, jarum lancet, jarum vacutainer, tabung EDTA (ungu), torniquet, microcentrifuge tube stand, *thermal cycler* Biometra GmbH, dan *Gel Electrophoresis Apparatus* Biometra GmbH.

b. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel *whole blood* EDTA, *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega) yang terdiri atas cell

lysis solution, nuclei lysis solution, protein precipitation solution, DNA rehydration solution, dan RNase A solution. Selain itu, digunakan isopropanol, ethanol 70%, Tris base, asam borat, EDTA, *distilled water*, serta reagen PCR Master Mix yang meliputi Taq 2x Master Mix, 25mM MgCl₂, *primer forward* 10 µM, *primer reverse* 10 µM, PCR grade H₂O, *template* DNA, dan *nuclease-free water* (NFW), enzim restriksi *EcoRI*, *primer forward* 5'-CTCATTCCTCGTGTGACTCT-3', *primer reverse* 5'-ATACATTTAGTACAACCGACCTTTGGT-3', microtube, yellow tip, blue tip, white tip, TAE 50X, TE buffer, loading dye, DNA ladder 100 bp, *staining gel RedSafe*, bubuk agarose, aquadest, strip gula darah *sinocare safe accu*, alkohol swab 70%, kapas kering, plesterin, tissue, dan shield/parafilm.

c. Prosedur kerja

1) Tahap pra-analitik

a) Desain primer

(1) Pencarian sekuens gen pada NCBI

(a) Buka situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

(b) Ubah opsi pencarian dari “*All databases*” menjadi “*gene*”, lalu ketik nama gen target SLC2A4 dan tekan enter.

(c) Pilih hasil yang sesuai dengan spesies yang diinginkan seperti *Homo sapiens*.

(d) Cari bagian *FASTA sequence* dan salin urutan nukleotida (ATGC).

(2) Analisis *restriction site* dengan benchling

(a) Buka benchling, klik *create project* untuk membuat proyek baru.

(b) Pilih new DNA/RNA sequence dan tempelkan urutan FASTA yang telah disalin sebelumnya.

- (c) Buka bagian settings dan aktifkan opsi cut site untuk melihat lokasi pemotongan enzim restriksi, kemudian identifikasi lokasi pemotongan enzim *EcoRI* (GAATTC) pada urutan nukleotida.
- (3) Desain primer dengan primer express 3.0.1
 - (a) Buka aplikasi primer xpress, tempelkan urutan DNA dari benchling
 - (b) Tentukan lokasi primer yang akan mengapit daerah yang mengandung situs pemotongan *EcoRI*.
 - (c) Pastikan panjang primer sekitar 18-25 *bp*, dengan GC content 40–60%, dan suhu annealing (T_m) optimal 50-60°C.
 - (d) Simpan *primer forward* dan *reverse* yang telah didesain.
- (4) Verifikasi primer
 - (a) Buka situs NCBI *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Pilih Primer-BLAST untuk mengevaluasi spesifisitas pasangan primer.
 - (b) Pada kolom *forward primer*, tempelkan urutan *primer forward* yang telah didesain dan pada kolom *reverse primer*, tempelkan urutan *primer reverse*.
 - (c) Pilih *RefSeq Representative Genomes* untuk memastikan hasil spesifik pada database referensi.
 - (d) Ketik dan pilih *Homo sapiens* agar pencarian terbatas pada genom manusia.
 - (e) Klik BLAST dan tunggu hasil analisis primer.
 - (f) Hasil akan menunjukkan apakah primer hanya menargetkan satu lokasi pada genom manusia atau memiliki hasil lain. Pastikan hanya ada satu produk amplifikasi utama dengan ukuran sesuai target dengan idealnya hanya ada satu produk pada template target.

- (g) Jika ada lebih dari satu produk, primer mungkin tidak spesifik dan harus didesain ulang.
 - (h) Setelah desain primer dikonfirmasi, primer *forward* dan *reverse* dapat dipesan ke vendor penyedia sintesis oligonukleotida.
 - (i) Pastikan primer telah diuji sebelum digunakan dalam PCR-RFLP.
- b) Pengambilan sampel
- (1) Petugas melakukan identifikasi pasien seperti nama, usia, jenis kelamin dan menulis data pasien pada tabung darah EDTA.
 - (2) Petugas melakukan pengecekan kadar gula darah puasa menggunakan alat glukometer (*Sinocare Safe Accu*). Jika hasil pemeriksaan menunjukkan kadar gula darah normal pada responden non-DM, lanjutkan ke proses pengambilan darah. Untuk responden dengan DM, jika hasil kadar gula darah tinggi dan berdasarkan rekam medis terdiagnosis DM tipe II dapat dilanjutkan ke proses pengambilan darah.
 - (3) Siapkan alat bahan untuk mengambil darah seperti jarum vacuntainer, holder, torniquet, tabung EDTA, alkohol swab 70%, kapas kering dan plesterin.
 - (4) Petugas melakukan palpasi pada vena mediana cubiti dengan memasang torniquet pada lengan pasien.
 - (5) Bersihkan lokasi pengambilan darah dengan kapas alkohol 70%.
 - (6) Masukkan jarum sesuai dengan arah vena dan darah ditampung pada tabung darah.
 - (7) Setelah darah sudah tertampung, keluarkan tabung dari holder. Cabut jarum secara perlahan.

(8) Petugas melepas tourniquet pada lengan pasien dan keluarkan jarum dengan menutup ujung jarum menggunakan kapas kering, kemudian bekas suntikan pada pasien ditutup dengan plesterin.

c) Persiapan master *mix* PCR

(1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan di dalam PCR UV² Workstation Analytik Jena AG.

(2) Vortex dan centrifuge *MyTaq™ One-Step RT-PCR* Kit setelah dicairkan.

(3) Pastikan komponen reagen PCR *mix* mencair semua, kemudian pipet komponen reagen PCR *mix* ke dalam microtube 1,5 mL kecuali *template* DNA.

(4) Total reaksi yang dibuat adalah satu reaksi untuk satu sampel. Jadi volume total reagen yang dibuat yakni 25 µL untuk satu reaksi, dengan ketentuan untuk menambahkan komponen sebagai berikut:

Tabel 2
Komponen Master *Mix* PCR

<i>Component</i>	Volume (1X Reaksi)	<i>Final Concentration</i>
2x <i>MyTaq One-Step Mix</i>	12,5 µL	0,5 x
<i>Forward Primer</i> (10 µM)	0,5 µL	400 nM
<i>Reverse Primer</i> (10 µM)	0,5 µL	400 nM
<i>Template</i> RNA	4 µL	-
PCR-grade H ₂ O	7,5 µL	-
Total Volume	25 µL	

Sumber: Ampliqon A/S (2021).

(5) Beri label kode sampel pada bagian tutup tabung PCR.

(6) Selanjutnya *spindown* agar reagen atau cairan yang ada di dinding tabung PCR turun ke dasar tabung.

(7) Masukkan *template* DNA yang sesuai label kode sampel sebanyak 4 µL pada tabung PCR.

(8) Homogenkan, kemudian ditutup rapat untuk dilakukan *spindown* kembali.

(9) Reagen *mix* PCR siap di running untuk pada alat *Thermal cycler*.

d) Pembuatan larutan *buffer* TAE 50X (1000 mL).

(1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.

(2) Tuangkan 20 mL larutan TAE dengan konsentrasi 50X pada gelas ukur 1000mL.

(3) Tambahkan 980 mL aquadest atau sampai tanda batas 1000 mL.

(4) Kemudian tuang ke dalam erlenmeyer dan homogenkan dengan manual.

(5) Tutup erlenmeyer menggunakan *aluminium foil* dan beri label serta tanggal pembuatannya.

(6) Larutan buffer TAE 1000 mL dengan konsentrasi 1x siap digunakan.

e) Pembuatan gel agarose 1,5 %.

(1) Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan.

(2) Timbang bubuk agarose 2,25 gram, masukkan ke dalam labu erlenmeyer.

(3) Tambahkan 150 mL larutan buffer TAE pada labu erlenmeyer.

(4) Letakkan labu erlenmeyer di atas hotplate, kemudian nyalakan hotplate dengan menekan tombol ON.

(5) Letakkan *magnetic stirrer* ke dalam labu erlenmeyer, lalu atur suhu dan kecepatan sesuai yang diinginkan. Tunggu hingga larutan benar-benar bening.

(6) Setelah larutan bening, matikan hotplate dengan menekan tombol OFF dan pindahkan labu erlenmeyer ke atas meja, tunggu hingga larutan tidak terlalu panas.

(7) Masukkan 4 µl pewarna gel red, kemudian homogenkan.

(8) Tuang larutan agarose ke dalam cetakan, kemudian letakkan sisir sesuai tempatnya. Tunggu larutan mengeras.

(9) Setelah larutan agarose mengeras menjadi gel, lepaskan sisir pada gel agarose.

(10) Letakkan gel agarose pada elektroforator. Gel agarose siap digunakan.

2) Tahap analitik

a) Ekstraksi DNA

(1) Proses lisis sel darah merah.

(a) Tambahkan 900 μL cell lysis ke tabung mikrosentrifus 1.5mL lalu campurkan 300 μL darah.

(b) Inkubasi campuran pada suhu ruang selama 10 menit, bolak-balik tabung 2-3x selama inkubasi.

(c) Sentrifus 13.000-16.000 x g selama 20 detik (suhu ruang).

(d) Buang supernatant tanpa mengganggu pellet putih yang terlihat. Tinggalkan residu cairan 10-20 μL .

(2) Proses lisis nuklei

(a) Resuspensi pelet sel putih dengan vortex selama 10-15 detik sampai homogen.

(b) Tambahkan 300 μL *Nuclei Lysis Solution* dan pipet 5-6x untuk melisiskan nuklei.

(c) Jika larutan sangat kental atau ada gumpalan, inkubasi pada 37°C sehingga homogen.

(3) Proses penghilangan RNA

(a) Tambahkan 1,5 μL *RNAse solution* ke larutan inti, lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.

(4) Proses presipitasi protein

(a) Tambahkan 100 μL *Protein Precipitation* ke larutan nuklei, vortex 10 – 20 detik.

(b) Sentrifus 13.000-16.000 x g selama 3 menit (suhu ruang), pelet protein berwarna coklat gelap seharusnya terlihat.

(5) Proses presipitasi DNA

(a) Transfer supernatan (tanpa protein pelet) ke tabung mikro baru yang berisi 300µL isopropanol, bolak-balik tabung secara perlahan hingga DNA membentuk massa putih berbentuk benang.

(b) Sentrifus 13.000-16.000 x g selama 1 menit, DNA akan terlihat seperti pelet putih kecil di dasar tabung.

(6) Proses pencucian DNA

(a) Buang supernatan, tambahkan 300 µL etanol 70% (suhu ruang) untuk mencuci DNA. Bolak-balik mikrotube beberapa kali dengan perlahan.

(b) Sentrifus 13.000-16.000 x g selama 1 menit.

(c) Buang etanol dengan hati-hati menggunakan mikropipet, pastikan pelet DNA tidak terhisap.

(7) Proses pengeringan DNA

(a) Keringkan pelet DNA dengan membalikkan tabung pada kertas serap bersih selama 10-15 menit.

(8) Rehidrasi DNA

(a) Tambahkan 100 µL DNA *Rehydration Solution* ke pelet DNA.

(b) Inkubasi pada 65°C selama 1 jam atau biarkan semalaman pada suhu ruang atau 4°C.

(c) Simpan DNA yang telah direhidrasi pada suhu 2-8°C.

b) PCR-RFLP

(1) Masukkan ke dalam alat *thermal cycler* dengan ketentuan suhu berikut:

Tabel 3
Protokol Siklus PCR

Step	Time	Temperature	Cycle
<i>Polymerase activation</i>	5 menit	95°C	1X
<i>Denaturation</i>	45 detik	95°C	35X
<i>Annealing</i>	45 detik	60°C	
<i>Extension</i>	60 detik	72°C	
<i>Final Extension</i>	5 menit	72°C	1X

Sumber: Ampliqon IIII (2021).

- (2) Tunggu selesai running.
- (3) Simpan hasil PCR pada suhu 4°C selama 24 jam sebelum dilanjutkan dengan elektroforesis.
- (4) Campurkan hasil amplifikasi PCR sebanyak 9 µL dengan enzim *EcoRI* sebanyak 0,5 µL dan *buffer* enzim 2 µL.
- (5) Tambahkan 18 µL *Nuclease Free Water* (NFW) dan homogenkan.
- (6) Selanjutnya *spindown* agar reagen atau cairan yang ada di dinding tabung turun ke dasar tabung.
- (7) Inkubasi dengan suhu 37°C selama 5 jam kemudian dapat di analisis hasil dengan elektroforesis.

c) Elektroforesis

- (1) gel agarose pada elektroforator lalu tambahkan TAE ke dalam alat elektroforesis hingga menutupi gel agarose.
- (2) Masukkan DNA Ladder sebanyak 6 ul di wheel pertama
- (3) Siapkan shield untuk tempat menghomogenkan sampel dengan loading dye.
- (4) Ambil loading dye sebanyak 1 µL kemudian taruh pada shield.
- (5) Ambil sampel ekstraksi DNA dengan mikropipet sebanyak 5 µL dan campurkan ke dalam loading dye

- (6) Homogenkan sampel dengan loading dye beberapa kali dengan menyedot dan mengeluarkan sampel berulang.
- (7) Sedot sampel yang sudah dihomogenkan dengan mikropipet sebanyak 6 μL , kemudian injeksikan kedalam sumuran gel agarose. Lakukan prosedur tersebut berulang pada sampel lainnya.
- (8) Setelah semua terinjeksi ke dalam sumuran gel agarose, programkan alat elektroforesis. Tunggu selama 77 menit untuk proses elektroforesis.
- (9) Setelah 77 menit dan alat sudah berhenti beroperasi hasil dapat di baca di dalam UV-DOC.

d) Pembacaan hasil di UV-DOC

- (1) Sambungkan kabel alat UV *Documentation* pada stop kontak.
- (2) Nyalakan alat dengan menekan tombol ON.
- (3) Nyalakan lampu pada alat.
- (4) Buka pintu alat UV *Documentation*.
- (5) Letakkan gel agarose yang telah ditiriskan pada bagian dalam alat, kemudian tutup kembali.
- (6) Matikan lampu pada alat dan nyalakan UV.
- (7) Setelah UV Transluminator dinyalakan, pita DNA akan berpendar.
- (8) Hasil dari proses elektroforesis tersebut dapat dilihat pada layar monitor yang terhubung dengan UV Transluminator.
- (9) Matikan lampu UV, kemudian hidupkan lampu untuk mengidentifikasi gel agarose.
- (10) Setelah melakukan proses pengamatan dan dokumentasi, matikan kembali lampu alat.

- (11) Buka pintu alat UV *Documentation*, lalu keluarkan gel agarose.
 - (12) Lakukan desinfeksi pada bagian dalam alat menggunakan alkohol.
 - (13) Tutup kembali pintu alat UV *Documentation*.
 - (14) Matikan alat dengan menekan tombol OFF lalu cabut kabel alat UV *Documentation* dari stop kontak.
- 3) Tahap pasca analitik
- a) Amati hasil yang didapat dan dokumentasikan.
 - b) Melakukan pencucian alat yang digunakan.
 - c) Menyimpan sisa bahan yang telah dilakukan pemeriksaan.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Proses pengolahan data dalam penelitian ini dimulai dengan data mentah (primer) yang diperoleh dari hasil PCR-RFLP. Data mentah ini mencakup pola potongan DNA hasil enzim restriksi pada gen SLC2A4. Teknik pengolahan data dilakukan melalui beberapa langkah berikut:

- a. Verifikasi data: verifikasi dilakukan untuk memastikan bahwa hasil elektroforesis yang menunjukkan pola potongan DNA telah sesuai dengan prosedur standar dan tidak terdapat kesalahan teknis.
- b. Pengkodean: pola potongan DNA yang dihasilkan dari hasil PCR-RFLP kemudian dikodekan berdasarkan panjang dan jumlah fragmen DNA yang diidentifikasi, sehingga memudahkan analisis lebih lanjut.
- c. Tabulasi data: data yang telah dikodekan disusun dalam tabel, yang mencakup informasi mengenai panjang fragmen DNA untuk setiap sampel. Langkah ini bertujuan untuk menyajikan data dalam bentuk yang terstruktur dan sistematis.

Data yang sudah ditabulasi kemudian siap untuk dianalisis sesuai dengan variabel penelitian yang telah ditentukan, yaitu apakah terdapat atau tidaknya polimorfisme gen SLC2A4 yang berpotensi mempengaruhi risiko diabetes mellitus tipe II.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis univariat secara deskriptif. Metode ini digunakan untuk mendeskripsikan polimorfisme pola potongan DNA hasil PCR-RFLP pada gen SLC2A4.

G. Etika Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan mematuhi prinsip-prinsip etika penelitian yang bertujuan untuk melindungi hak, martabat, dan keselamatan partisipan. Adapun langkah-langkah yang diambil adalah sebagai berikut:

1. Persetujuan partisipan

Sebelum partisipan dilibatkan dalam penelitian, penelitian ini meminta persetujuan tertulis pada partisipan dimana akan menjelaskan tujuan penelitian, prosedur yang akan dilakukan, manfaat yang mungkin diperoleh, serta jaminan kerahasiaan data.

2. Kerahasiaan data

Data pribadi partisipan, termasuk hasil wawancara, catatan medis, dan hasil analisis genetik, dijaga kerahasiaannya. Data hanya akan digunakan untuk tujuan penelitian ini dan tidak akan dibagikan kepada pihak ketiga tanpa izin tertulis dari partisipan.

3. Hak partisipan

Partisipan diberi kebebasan penuh untuk mengikuti atau mengundurkan diri dari penelitian tanpa tekanan dan tanpa konsekuensi apa pun terhadap hak atau layanan yang mereka terima.

4. Kepentingan partisipan

Penelitian ini tidak dirancang untuk membahayakan partisipan, baik secara fisik maupun psikologis. Sebaliknya, penelitian ini diharapkan memberikan manfaat, terutama dalam pengembangan pengetahuan terkait risiko genetik diabetes mellitus Tipe II.