

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental yang bertujuan untuk mengamplifikasi Gen FNBPII.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Pengambilan sampel darah dilakukan di SMA Al-Kautsar Bandar Lampung, kemudian penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Biokimia Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2014 hingga bulan Maret 2015.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas subyek atau obyek penelitian yang memiliki kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya (Dahlan, 2008). Populasi dalam penelitian ini adalah Siswa-siswi kelas XI MIA di SMA Al-Kautsar Bandar Lampung.

Teknik pengumpulan sampel dalam penelitian ini adalah *simple random sampling* dengan jumlah anggota dalam populasi sebanyak 152 orang dengan kriteria sebagai berikut:

Kriteria Inklusi :

1. Siswa kelas XI MIA SMA Al-Kautsar Bandar Lampung tahun ajaran 2014-2015.
2. Pernah mengikuti Test IQ di SMA Al-Kautsar Bandar Lampung yang dibuktikan dengan sertifikat hasil ujian.
3. Bersedia berpartisipasi dalam penelitian yang ditandai dengan mengisi *inform consent*.
4. Bebas dari penyakit kronik dan trauma fisik.

Kriteria Eksklusi :

1. Tidak hadir saat penelitian dilakukan.
2. Sampel darah rusak ketika dilakukan pengolahan.

Untuk besar sampel minimal yang digunakan berdasarkan rumus Slovin adalah:

$$\begin{aligned}
 n &= \frac{N}{1 + N(d)^2} \\
 &= \frac{152}{1 + 152(0,1)^2} \\
 &= \frac{152}{2,52}
 \end{aligned}$$

$n = 60,3174603$ dibulatkan menjadi 61

Keterangan: n adalah jumlah sampel, N adalah besar populasi, d adalah kekuatan penelitian (0,1).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 69 sampel darah. Banyaknya sampel yang digunakan melebihi perhitungan rumus jumlah sampel dikarenakan partisipan yang berminat menjadi subjek penelitian berjumlah 69 orang.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

Untuk memudahkan pelaksanaan penelitian ini dan agar penelitian tidak terlalu luas maka dibuat definisi operasional sebagai berikut :

Tabel 2. Defisini Operasional

No.	Variabel	Definisi	Alat ukur	Hasil ukur	Skala
1.	Gen FNBPI1L	Merupakan struktur yang berhubungan dengan protein pengikat mikrotubul yang mengatur regulasi sel, ukuran sel, polarisasi, motilitas dan tranduksi sinyal yang terletak pada pasang basa 287 bps.	PCR Konvensional TC5000	a. Positif : Bila hasil pembacaan di bawah sinar UV didapatkan pita terang pada pasang basa 287 bps. b. Negatif: Bila hasil pembacaan dibawah sianr UV tidak didapatkan pita terang pada pasang basa 287 bps	Nominal

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Isolasi DNA

Pada penelitian ini digunakan alat-alat yaitu *microsentrifuge tube* 1,5 ml, *collection tube* 2 ml, mikropipet, *yellow tip*, *white tip*, *GD column*, inkubator, vortex, *sentrifuge sort*. Bahan yang digunakan adalah darah sampel, *RBC lysis buffer*, *GT buffer*, *GB buffer*, *W1 buffer*, etanol absolut, dan *elution buffer* 10mM Trls-HCl (pH 8,5).

2. Ekstraksi Gen FBNP1L

Alat yang digunakan pada tahap ini adalah, mikropipet, *white tip*, *sentrifuge sort*, *vortex*, dan *ice gel*. Bahan yang digunakan adalah PCR *master mix*, *primer forward* Gen FBNP1L, *primer reverse* Gen FBNP1L, dan aquades.

3. Proses Amplifikasi PCR

Alat yang digunakan pada tahap ini adalah *white tip*, mesin PCR Konvensional TC5000, *microtube* 0,2 ml, *vortex*, dan *sentrifuge sort*. Bahan yang digunakan adalah DNA total yang telah diekstraksi.

4. Elektroforesis Gel Agarose

Alat yang digunakan pada tahap ini adalah mesin elektroforesis, *white tip*, mikropipet, timbangan analitik, gelas baker, gelas ukur, labu erlenmeyer, *hot plate*, plastik *wrap*, *aluminium foil*, spatula, kertas parafilm, *UV light box*. Bahan yang digunakan adalah *purified* DNA, *loading dye*, DNA *marker*, *nucleic acid gel stain* 10.000X, PCR agarose, dan TBE 0,5X.

F. Prosedur Penelitian

Sebelum melakukan penelitian, peneliti mengajukan permohonan *ethical clearence* kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Kemudian peneliti melakukan koordinasi dengan Laboratorium Biologi Molekuler dan Biokimia Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Bioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Lampung dilakukan untuk meminta izin kepada Kepala Laboratorium masing-masing laboratorium untuk melakukan penelitian.

Pada saat pengambilan sampel darah, peneliti memberi penjelasan terlebih dahulu kepada subjek penelitian tentang persiapan dan pelaksanaan penelitian. Subjek penelitian berhak bertanya tentang penelitian yang akan dilakukan. Setelah subjek mendapat penjelasan dan menanda tangani *informed consent*, kepada seluruh subjek dilakukan pengambilan sampel darah. Diambil 69 sampel darah (sampel minimal rumus slovin 61). Darah yang diambil dari setiap sampel adalah 3-5 cc dan kemudian disimpan dalam tabung EDTA.

Darah sampel dipisahkan dari plasmanya, lalu dilakukan isolasi DNA dan pengecekan DNA total. Isolasi DNA menggunakan *Genomic DNA Mini Kit Protocol* Geneaid[®]. Setelah DNA diisolasi, dilakukan pengecekan DNA total dengan cara mencampurkan sampel dengan *loading dye* (5 µl diteteskan ke kertas parafilm sebanyak 7-8 titik). Lalu, mengambil 2 µl DNA yang dicapur

dengan *loading dye* yang terdapat di parafilm. Setelah itu sampel tersebut dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose yang telah digenangi dengan TBE 0,5X dengan satu sumuran sebagai DNA *marker*. Setelah elektroforesis selesai, gel agarose dibaca pada *UV light box* dengan intensitas 100 Candella.

Sekuens Gen FBNP1L dapat diamplifikasi dengan metode PCR menggunakan pasangan *primer forward* (5'-ACAGGGTAGCTGTCTGAGAA-3') dan *primer reverse* (5'-GGAAACTCCTCCAAGTCTTT-3'). Tiap *microtube* 0,2 ml berisi 10 µl PCR *master mix*, 0,5 µl *primer forward*, 0,5 µl primer reverse, 7 µl aquades, dan 2 µl DNA total yang kemudian diamplifikasi menggunakan PCR Konvensional TC5000 sebanyak 40 siklus. Suhu *initial denaturation* adalah 95°C selama 5 menit. Suhu denaturasi 95°C selama 30 detik. Suhu *annealing* adalah suhu yang perlu diujicobakan. Berdasarkan petunjuk, suhu yang perlu diujicobakan adalah 52°C, 53°C, dan 55°C selama 1 menit 30 detik. Suhu ekstensi 72°C selama 1 menit. Suhu *final extension* 72°C selama 5 menit. Proses PCR ini berlangsung selama kurang lebih 3 jam.

Hasil amplifikasi PCR dibaca menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5% dan diwarnai dengan *nucleic acid gel stain* 10.000X sebanyak 5 µl. Hasilnya dibaca pada *UV light box* dengan intensitas 100 Candella.

G. Parameter yang Diamati

Dalam penelitian ini parameter yang diamati adalah suhu *annealing* optimum dengan hasil amplifikasi pada PCR Konvensional untuk mengamplifikasi Gen FNBP1L. Suhu *annealing* optimum ini untuk mengamati panjang Gen FNBP1L di posisi 287 bps.

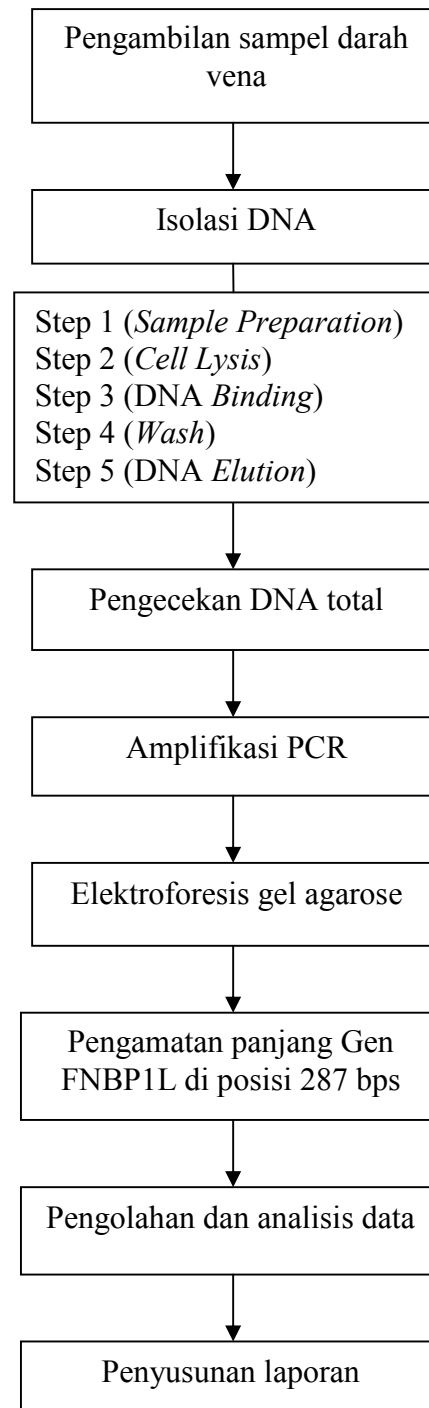
H. Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini merupakan data primer, yaitu data yang diperoleh peneliti langsung dari hasil penelitian mengenai amplifikasi Gen FNBP1L sebagai tahap pendahuluan identifikasi mutasi gen yang berhubungan dengan tingkat IQ.

Pengolahan data menggunakan program komputer terdiri beberapa langkah:

1. *Coding*, untuk mengkonversikan (menerjemahkan) data yang dikumpulkan selama penelitian kedalam simbol yang cocok untuk keperluan analisis.
2. *Data entry*, memasukkan data kedalam komputer
3. Verifikasi, memasukkan data pemeriksaan secara visual terhadap data yang telah dimasukkan kedalam komputer.
4. *Output* komputer, hasil yang telah dianalisis oleh komputer kemudian dicetak.

I. Diagram Alir Penelitian



Gambar 16. Diagram Alir Penelitian