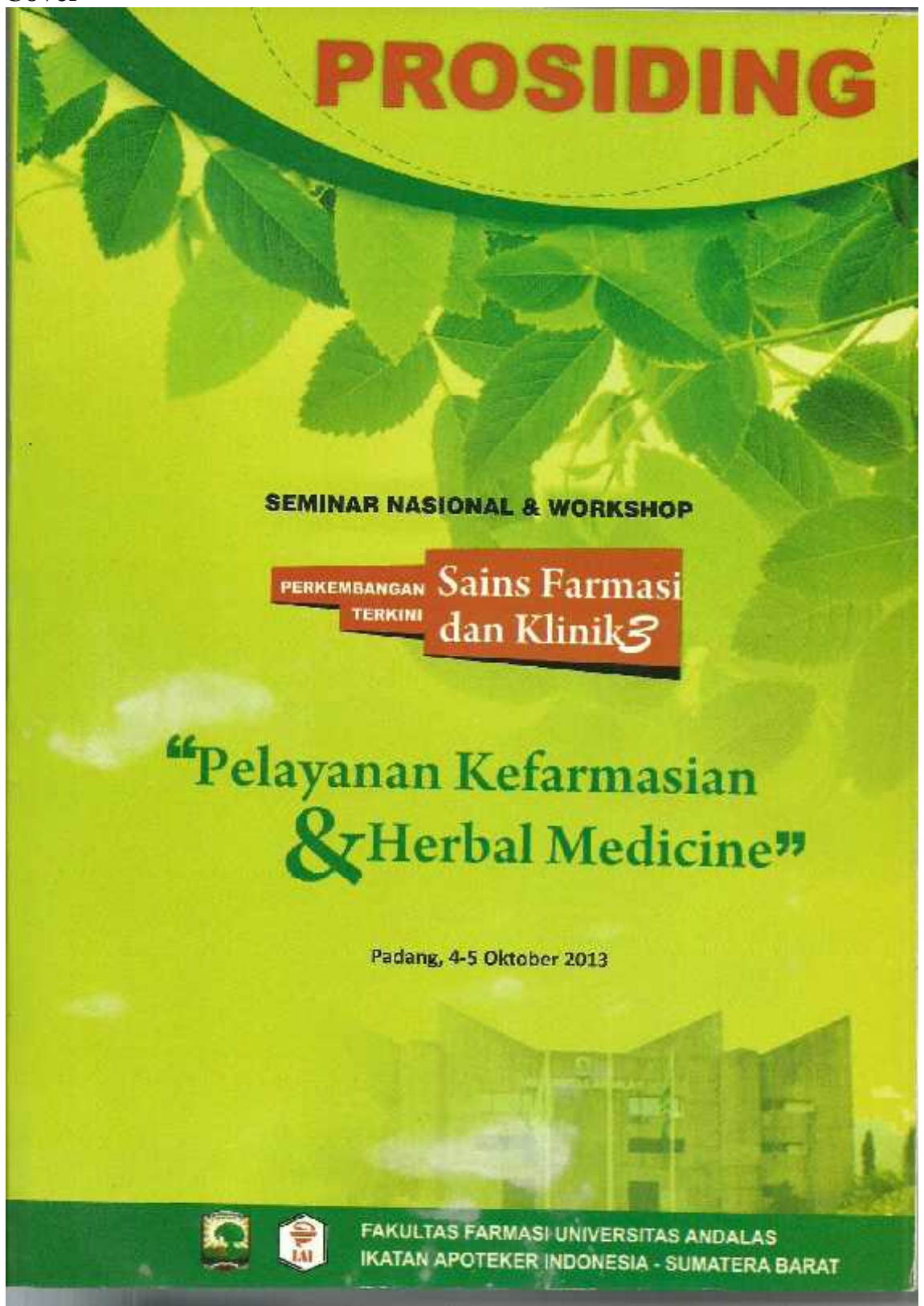


1. Cover



## **2. Panitia Pelaksana**

# **PROSIDING**

**Seminar Nasional dan Workshop  
“Perkembangan Terkini  
Sains Farmasi dan Klinik 3”**

**“Pelayanan Kefarmasian &  
Herbal Medicine”**

**DITERBITKAN OLEH:  
FAKULTAS ILMU FARMASI  
UNIVERSITAS ANDALAS**

### 3. Panitia Pengarah

Prosiding  
Seminar Nasional dan Workshop

Perkembangan Terkini Sains Farmasi Klinik 3  
Tahun 2014

“ Pelayanan Kefarmasian & Herbal Medicine ”

1 (satu) jilid, A4  
349 Hal

ISBN : 978-602-71830-1-8

Hak Cipta © 2013 pada Penulis

Dilarang mengutip sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara apapun, termasuk dengan cara penggunaan mesin fotocopy, tanpa izin sah dari penerbit

Percetakan : Sukabina  
Penyusun : Fakultas Farmasi Universitas Andalas

Tim Editor  
Penanggung Jawab : Dr. Muslim Suardi, M.Si, Apt  
Ketua : Dr. H. Yufri Aldi, M.Si, Apt  
Sekretaris : Yori Yuliandra, M.Farm, Apt  
Anggota : Dr. Friardi, Apt  
Dian Ayu Juwita, M.Farm, Apt  
Rahmi Yosmar, M.Farm, Apt  
Dwisari Dillasamola, M.Farm, Apt  
Nova Gyafni, M.Farm, Apt  
Layout : Sari Juniatti  
Desain Sampul : Jafril

Hak Cipta dilindungi Undang undang  
Isi diluar tanggung jawab Penerbit dan Percetakan

## 4. Daftar Isi

19	<b>Efek Anti-Inflamasi dan Anti-Diare Ekstrak Etanol Herba Meniran (<i>Phyllanthus niruri</i> L.) dan Daun Ungu (<i>Garptophyllum pictum</i> L. Griff)</b>	193
	<i>Ros Sumary</i>	
20	<b>Uji Sensitivitas Isolat Bakteri dari Pasien Luka Bakar di Bangsal Luka Bakar RSUP Dr. M. Djamil Padang</b>	198
	<i>Rostini</i>	
21	<b>Aktivitas Proteksi Fraksi Etil Asetat Daun Surian (<i>Toona sureni</i> Bl Merr.) Terhadap Disfungsi Sel Endotel Tikus Hiperkholesterolemia</b>	207
	<i>Suhatri</i>	
22	<b>Konstruksi Primer untuk Deteksi SNP RS12255372 pada Gen Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2) Penyebab Diabetes Melitus Tipe-2 dengan Metode <i>Amplification Refractory Mutation System</i> (ARMS) – PCR</b>	214
	<i>Syamsurizal</i> ✓	
23	<b>Penyiapan Radioimunokonjugat <sup>177</sup>Lu-DOTA-PAMAM G3-Nimotuzumab untuk Radioimunoterapi Kanker</b>	224
	<i>Vanji Ikhson Azis</i>	
24	<b>Evaluasi Pengelolaan Obat dan Strategi Perbaikan dengan Metode Hanlon di Instalasi Farmasi Rumah Sakit Umum Daerah Karel Sadsuitubun Kabupaten Maluku Tenggara Tahun 2012</b>	233
	<i>Wirdah Wati Renfan</i>	
25	<b>Gambir Terstandar Memperbaiki Fungsi Ginjal Tikus Gagal Ginjal yang Diinduksi Gliserol dan L-NAME</b>	244
	<i>Yona Hariani Putri</i>	
26	<b>Studi Efek Antihipertensi Tumbuhan Tali Putri (<i>Cassytha filiformis</i> L.) pada Tikus Hipertensi yang Diinduksi Prednison dan Garam</b>	250
	<i>Yori Yulindra</i>	
27	<b>Uji Aktivitas Beberapa Subfraksi Ekstrak Etil Asetat dari Herba Meniran (<i>Phyllanthus niruri</i> Linn.) Terhadap Titer Antibodi dan Jumlah Sel Leukosit pada Mencit Putih Jantan</b>	257
	<i>Yufri Aldi</i>	
28	<b>Evaluasi Penggunaan Kombinasi <i>Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor</i> dengan Furosemid Terhadap Fungsi Ginjal Pasien Gagal Jantung Kongestif di RSUP Dr. M. Djamil Padang</b>	265
	<i>Surya Dharma</i>	

# KONSTRUKSI PRIMER UNTUK DETEKSI SNP RS12255372 PADA GEN TRANSCRIPTION FACTOR 7 LIKE 2 (TCF7L2) PENYEBAB DIABETES MELITUS TIPE-2 DENGAN METODE *AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM (ARMS) – PCR*

Syamsurizal<sup>1</sup>, Yanwirasti<sup>2</sup>, Asman Manaf<sup>2</sup>, dan Jamsari<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Jurusan Biologi FMIPA UNP

<sup>2</sup> Fakultas Kedokteran Universitas Andalas

<sup>3</sup> Fakultas Pertanian Universitas Andalas

## **Abstrak**

*Tujuan riset adalah untuk pengembangan sistem deteksi dini DM tipe-2 secara molekuler yang cepat, akurat sehingga dapat membantu pencegahan ataupun pengobatan DM tipe-2 pada etnik Minangkabau. Target khusus riset adalah: Mengkonstruksi primer untuk varian rs12255372 pada gen TCF7L2. Mengetahui kemampuan primer mendeteksi polimorfisme gen TCF7L2 varian rs12255372. Metode penelitian yang dipakai adalah cross sectional study, dengan langkah utama: isolasi DNA, disain primer untuk gen TCF7L2 menggunakan perangkat lunak primer designer, amplifikasi varian rs12255372 gen TCF7L2 dengan metode ARMS-PCR, dan metode direct DNA sequencing kemudian analisis bioinformatika. Berdasarkan hasil analisis data dapat disimpulkan bahwa telah berhasil dikonstruksi tiga buah primer yaitu primer forward RS12F, primer reverse RS12R dan primer forward RS12C. Ketiga primer yang dikonstruksi mampu mengenali SNP rs12255372 gen TCF7L2 dengan metode ARMS-PCR*

*Kata kunci: SNP rs12255372, gen TCF7L2 dan ARMS-PCR*

## **PENDAHULUAN**

Angka kejadian dan kematian akibat diabetes melitus sedemikian besar, sehingga sejak 2007, 14 November dijadikan sebagai hari PBB untuk diabetes melitus (*UN World Diabetes Day*). Diabetes melitus merupakan penyakit non infeksi dan tidak menular pertama yang ditetapkan mempunyai *world day* oleh PBB. Sebelumnya, PBB telah menetapkan hari TBC, Malaria, dan HIV/AIDS yang merupakan penyakit infeksi dan menular. Di Indonesia, hari diabetes melitus diperingati setiap 12 Juli.

Di seluruh dunia, diabetes melitus membunuh manusia lebih banyak dibanding HIV/AIDS. Estimasi jumlah orang meninggal karena diabetes melitus tahun 2000 mencapai 6% (3,2 juta orang). Satu dari sepuluh orang meninggal di dunia pada usia 35-64 th adalah dengan riwayat diabetes melitus (Roglic, 2005). Setiap 10 detik satu orang meninggal karena komplikasi diabetes melitus dan dalam waktu bersamaan ditemukan dua penyandang diabetes melitus baru (Adjikoesoemo, 2008).

Penderita diabetes melitus di dunia setiap tahun mengalami peningkatan, termasuk di Indonesia maupun Sumatera Barat. Prevalensi diabetes melitus di dunia tahun 2000 sebesar 2,8% (171 juta orang) dan proyeksi pada tahun 2030 sebanyak 4,4% (366 juta orang). Estimasi jumlah penderita diabetes melitus di Indonesia tahun 2000 sebesar 4,1% (8,4 juta dari 205.132.000 orang penduduk Indonesia). Proyeksi pada tahun 2030 jumlah kasus diabetes melitus di Indonesia akan meningkat mencapai 7,8% (21,3 juta dari 273.219.200 orang). Estimasi jumlah penderita diabetes melitus di

Indonesia menempati posisi keempat terbanyak setelah India, Cina dan Amerika (Perkeni, 2011; Perdomo, 2005; Wild *et al.*, 2004)

Prevalensi diabetes melitus di Sumatera Barat 5,2% (Manaf, 2007). Penduduk Sumatera Barat (etnik Minangkabau) memiliki potensi cukup tinggi untuk menderita diabetes melitus karena memiliki pola makan yang kurang baik dengan asupan banyak mengandung karbohidrat, lemak, garam dan sedikit serat. Pola garis keturunan matrikat yang membolehkan “pulang ka bako/ kawin dengan kerabat dekat” menambah peluang meningkatnya diabetes melitus. Disamping itu, gaya hidup yang serba praktis meningkatkan resiko penderita diabetes melitus.

Secara klinis diabetes melitus dibedakan menjadi empat tipe, yaitu tipe I, II, Gestasional dan tipe lain. Diabetes melitus tipe-2 merupakan jenis yang paling sering ditemukan 95% (Adam, 2000; Tjokropawiro, 2001). Diabetes melitus tipe-2 terjadi karena hormon insulin yang ada dalam darah tidak bekerja secara efektif, meskipun jumlah insulin yang diproduksi sel beta pulau Langerhans pankreas normal. Glukosa yang masuk ke dalam sel berkurang sehingga sel kekurangan sumber energi sehingga glukosa darah meningkat.

Diabetes melitus tipe-2 dipengaruhi beberapa faktor sebagai berikut: riwayat diabetes dalam keluarga, obese, gaya hidup yang berisiko, kurang istirahat, dan stres (ADA, 2008; Joshi, 2006).

Diabetes melitus tipe-2 akan muncul pada seseorang penyandang cacat genetik setelah melalui perubahan genetik dalam waktu yang panjang. Percepatan maupun perlambatan proses perubahan genetik tersebut sangat tergantung pada faktor lingkungan yang mempengaruhinya. Andaikata faktor genetik tidak berkembang kearah perburukan karena faktor lingkungan, maka secara teoritis diabetes melitus tipe-2 tidak akan muncul ke permukaan. Abnormalitas atau kelainan genetik pada tahap awal tanpa gejala apa-apa sehingga secara klinis sulit untuk dikenali (Manaf, 2004). Penanda genetik yang berkembang kearah perburukan namun belum menyebabkan toleransi gula terganggu (TGT) dapat diketahui melalui analisis DNA. Untuk melakukan analisis DNA diperlukan data genetis berupa gen-gen yang berasosiasi dengan diabetes melitus tipe-2. Beberapa suku bangsa di dunia sudah memiliki gen bank untuk diabetes melitus tipe-2 seperti Kaukasus, Denmark, USA, Inggris, Prancis dan India (Radha, 2007)

Melalui analisis gen, penyandang cacat genetik calon penderita diabetes melitus tipe-2 dapat didiagnosis lebih cepat dan tepat. Banyak orang yang tidak menyadari bahwa mereka sedang menderita diabetes melitus. Nunung (2006), melaporkan bahwa orang yang didiagnosa diabetes melitus tipe-2 sebenarnya telah dijangkiti penyakit ini sejak 8-12 tahun yang lalu. Diagnosis pada penderita diabetes melitus tipe-2 sering terlambat, sehingga sebagian besar dari mereka telah mengalami komplikasi yang serius. Pada etnik Minangkabau pasien mulai mengetahui menderita diabetes melitus pada kisaran usia 45-54 tahun dengan persentase 48% (Halifah, 2009)

Diantara gen-gen yang berasosiasi dengan diabetes melitus tipe-2 adalah gen “transcription factor 7 like 2 (TCF7L2)” pada kromosom 10q. Gen TCF7L2 berasosiasi kuat dengan diabetes melitus tipe-2 pada etnik Denmark, Kaukasia, India, dan etnik pada bangsa-bangsa di Asia (Radha, 2007). Varian gen TCF7L2 dapat dijadikan calon penanda genetik pada etnik Minangkabau penderita diabetes melitus tipe-2.

Salah satu kejutan baru yang ditemukan dalam *Human Genome Project* adalah *single nucleotide polymorphisms* (SNPs). SNPs merupakan alel minor dengan keberadaannya lebih dari 1%. Apabila SNPs terjadi pada *gene coding regions* bisa mengakibatkan *synonymous* (tidak menyebabkan perubahan asam amino) atau *non synonymous*. Akan tetapi pada penelitian beberapa tahun terakhir SNP *synonymous* mendorong terjadinya evolusi yang mendorong terjadinya suatu penyakit (Komar,

2009). SNP *synonymous* dapat mengubah struktur, fungsi, ekspresi protein. Polimorfisme *synonymous* dapat menyebabkan splicing RNA, stabilitas dan struktur protein dapat rusak. Perubahan ini dapat menyebabkan efek signifikan pada fungsi protein, perubahan respon seluler. *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) merupakan variasi sekuen DNA yang dapat dihubungkan dengan kerentanan seseorang terhadap suatu penyakit seperti diabetes mellitus tipe-2. Sebagian besar SNPs merupakan non coding region yang merupakan dasar variasi genetik pada manusia dan mengacu pada perbedaan basa tunggal antar individu (Kwook, 2003).

Penanda atau haplotype yang tepat akan dapat memberikan indikasi meningkatnya kerentanan individu terhadap diabetes melitus tipe-2. Perwujudan peningkatan kerentanan dicirikan oleh risiko relatif minimal 1,2-1,4. Varian gen TCF7L2 yang diduga paling kuat berasosiasi dengan diabetes melitus tipe-2 adalah varian rs12255372. Sekuen rs12255372 adalah TGCCCAGGAATATCCAGGCA AGAAT(G/T)ACCATATTCTGATAATTACTCAGGC, (Yu, *et al.*, 2009). Kehadiran T alel dalam rs12255372 adalah indikasi meningkatnya kerentanan terhadap diabetes melitus tipe-2, (Florez, 2006; Grant, 2006).

Tujuan riset adalah untuk pengembangan sistem deteksi dini DM tipe-2 secara molekuler yang cepat, akurat sehingga dapat membantu pencegahan ataupun pengobatan DM tipe-2 pada etnik Minangkabau. Target khusus riset adalah: mengkonstruksi primer untuk varian rs12255372 pada gen TCF7L2. Mengetahui kemampuan primer mendeteksi polimorfisme gen TCF7L2 varian rs12255372.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, dimana peneliti mendeskripsikan hasil konstruksi primer dan konfirmasi kemampuan primer mengamplifikasi daerah yang diinginkan. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biomedik FK Unand.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah waterbath, mesin thermocycler (*Polymerase Chain Reaction*), mikrosentrifus, mikropipet, tabung eppendrof, mikrotube, vortex, chamber, rak tabung mikro, power supply, magnetic stirer, tip, loop, LAFC, PCR tube, kamera. Bahan yang digunakan adalah dNTP's, taq polymerase  $\mu$ L, 10X Buffer, MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, agarose, TAE IX, gel red, aquabides, tris-base, EDTA, asam asetat glasial, 100bp DNA ladder.

Dalam penelitian ini DNA yang digunakan berasal dari darah tepi manusia. Isolat-isolat ini diperlukan untuk menguji apakah primer yang dikonstruksi dapat bekerja mengamplifikasi fragmen DNA yang diinginkan. Data dianalisis secara kualitatif, data yang dianalisis adalah hasil konstruksi primer dan kemampuan primer mengamplifikasi daerah yang diinginkan.

### **Konstruksi Primer**

Primer yang akan digunakan untuk mendeteksi SNP rs12255372 dari gen TCF7L2 dengan metode ARMS-PCR dikonstruksi menggunakan piranti lunak komputer "primer designer". Akan dihasilkan tiga buah hasil konstruksi primer yaitu primer forward RS12F, primer reverse RS12R dan primer forward RS12C. Primer RS12F, primer reverse RS12R digunakan untuk mengamplifikasi DNA yang mencakup daerah  $\pm$  838 bp (selanjutnya disebut primer eksternal). Primer RS12C dan RS12R dipakai untuk mengamplifikasi fragmen berukuran dan  $\pm$  384 bp, daerah yang meliputi SNP rs12255372 (disebut primer internal). Sekuen gen TCF7L2 yang akan digunakan untuk konstruksi primer ini diperoleh dari *gen bank* NCBI.

Konfirmasi dilakukan menggunakan *software* untuk melihat adanya kemungkinan *mispriming* primer dengan daerah-daerah lain pada gen TCF7L2 selain

daerah yang akan diamplifikasi. Jika tidak ditemukan kemungkinan adanya *mispriming* maka selanjutnya hasil konstruksi primer siap untuk disintesis menjadi oligonukleotida primer. Kemampuan primer mengamplifikasi daerah yang diinginkan. Dilakukan dengan urutan kegiatan sebagai berikut : Isolasi DNA menggunakan kit dari Invitrogen. Selanjutnya hasil isolasi DNA di elektroforesis.

Amplifikasi dengan metode ARMS-PCR. DNA yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya diamplifikasi dengan menggunakan primer yang dikonstruksi dengan mix PCR RTG/ Go Tag Green. Untuk mengetahui hasil amplifikasi, dilakukan elektroforesis pada gel agarose 1,5 %. Langkah-langkah yang akan dilakukan selama penelitian:

1. Isolasi DNA dari sampel
2. Disain primer untuk gen TCF7L2 menggunakan perangkat lunak primer designer.
3. Optimasi reaksi PCR menggunakan primer hasil rancangan
4. Amplifikasi gen TCF7L2 dengan PCR
5. ARMS-PCR dan sequencing untuk analisis situs polimorfik.
6. Analisis bioinformatika



## HASIL DAN DISKUSI

Salah satu hal yang sangat penting dalam reaksi PCR ialah konstruksi atau pemilihan primer DNA yang tepat. Primer bertanggung jawab untuk mengenali dan menandai segmen DNA *template* yang akan diamplifikasi. Pada penelitian ini dihasilkan tiga buah primer yaitu primer forward RS12F, primer reverse RS12R dan primer forward RS12C. Primer RS12F, primer reverse RS12R digunakan untuk mengamplifikasi DNA yang mencakup daerah  $\pm$  838 bp (selanjutnya disebut primer eksternal). Primer RS12C dan RS12R dipakai untuk mengamplifikasi fragmen berukuran dan  $\pm$  384 bp, untuk lebih jelas lihat table 1.

Tabel 1. Hasil rekonstruksi primer RS12C

Sequence: 5'- GGAATAGCCAGGCAAGAATG-3'			
Kriteria	Pengaturan kriteria	Hasil	Ket
% GC	Min 50, Max 60	50	YES
Tm C	Min 55, Max 80	70	YES
No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	-	YES
No 3' Dimers	Reject $\geq$ 3 matches pada ujung 3'	2	YES
No Dimers	Reject $\geq$ 7 batasan homol basa	3	YES
No Runs	Reject $\geq$ 3 basa runs	2	No
No 3'GC runs	Reject $\geq$ 3 G atau C pada ujung 3'	1	YES

Tabel 2. Hasil konstruksi primer RS12F dan RS12R

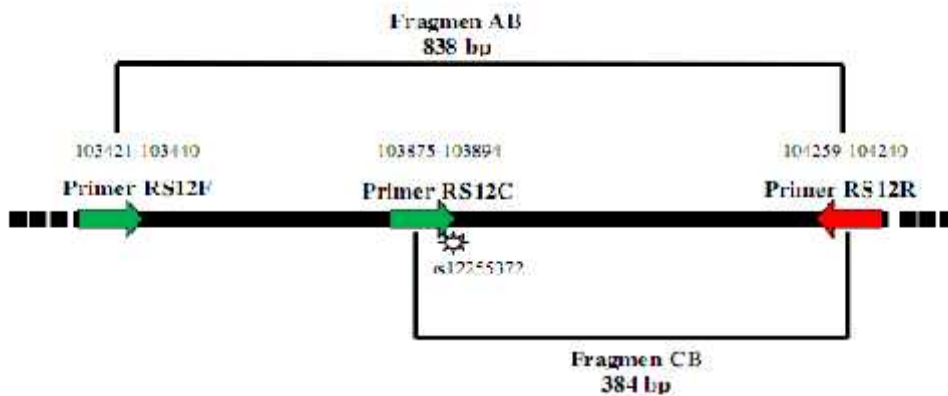
Sequence: 5'- TGTCTAATTGCCACAGCAGC -3'				
Primer RS12F	Kriteria	Pengaturan kriteria	Hasil	Ket
	% GC	Min 50, Max 60	50	YES
	Tm C	Min 55, Max 80	70	YES
	No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	-	YES
	No 3' Dimers	Reject $\geq$ 3 matches pada ujung 3'	2	YES
	No Dimers	Reject $\geq$ 7 batasan homol basa	4	YES
	No Runs	Reject $\geq$ 3 basa runs	2	YES
	No 3'GC runs	Reject $\geq$ 3 G atau C pada ujung 3'	2	YES
Sequence: 5'- CAGAGGTGGTGATAAGCGGT -3' (Complementary strand)				
Primer RS12R	Kriteria	Criteria Setting	Hasil	Ket
	% GC	Min 50, Max 60	55	YES
	Tm C	Min 55, Max 80	70	YES
	No Hairpins	Energy cutoff 0.0 kcal	-	YES
	No 3' Dimers	Reject $\geq$ 3 matches pada ujung 3'	1	YES
	No Dimers	Reject $\geq$ 7 batasan homol basa	2	YES
	No Runs	Reject $\geq$ 3 basa runs	2	YES
	No 3'GC runs	Reject $\geq$ 3 G atau C pada ujung 3'	0	YES

Spesifisitas konstruksi primer yang dibuat selanjutnya dikonfirmasi dengan *software*. Hal ini dilakukan untuk menghindari kemungkinan *mispriming* primer dengan daerah lain pada gen TCF7L2 selain daerah yang akan diamplifikasi. Hasil alignment primer dengan DNA Gen TCF7L2 dapat dilihat pada Gambar 1



Gambar 1. Hasil *alignment* primer dengan Gen TCF7L2

Dari gambar 1 bisa dilihat bahwa posisi penempelan primer rs12C berada sequence 103894 dari DNA TCF7L2. Penempelan primer pada posisi tersebut sesuai dengan yang diprediksi sebelumnya bahwa primer internal rs12C akan mengenali daerah yang mengalami SNP. Secara teoritis *annealing* primer rs12C akan dimulai dari posisi 103894 serta tidak ditemukan adanya kemungkinan *mispriming*. Posisi penempelan primer dan besarnya pita/fragmen DNA yang terbentuk secara relatif dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar. 2. Posisi penempelan primer :  Gen TCF7L2 *Homo sapiens*  Posisi rs12255372  
 Forward primer / Sense;  Reverse primer / Antisense

Gambar 2. Posisi penempelan primer dan besarnya pita/fragmen DNA yang terbentuk

Untuk mengetahui kemampuan primer yang dikonstruksi dalam mendeteksi SNP pada gen TCF7L2 khususnya SNP rs12255372, maka dilakukan pengujian dengan PCR. Prinsip PCR adalah melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuen nukleotida

tertentu secara invitro. Agar dapat mengenali sekuen yang akan dilipatgandakan dibutuhkan suatu primer yang khusus dan spesifik. Daerah yang dikenal primer inilah yang nantinya akan dilipatgandakan hingga ribuan bahkan jutaan kopi, sekitar  $10^6 - 10^7$  kali (Fatchiyah dkk, 2008;25) sehingga setelah dielektroforesis akan terlihat pita dari DNA yang diamplifikasi tersebut.

Tahap awal konfirmasi primer dilakukan secara terpisah sesuai dengan kondisi masing-masing pasangan primer. Faktor yang harus diperhatikan dalam mendapatkan hasil yang optimum dalam PCR adalah jumlah/konsentrasi mix yang digunakan. Masing-masing komponen tersebut memiliki peranan yang sangat penting dalam suatu reaksi PCR. Komposisi enzim, *template*, dNTP,  $MgCl_2$ , buffer dan primer yang tepat sangat menentukan berhasil suatu reaksi PCR. Komposisi mix yang digunakan pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Mix untuk Reaksi ARMS-PCR untuk SNP rs12255372

	Stok	Akhir	Volume
Go Tag Green MM	2 $\mu$ M	1 $\mu$ M	12,5 $\mu$ L
Primer rs-12 C	10 $\mu$ M	0,6 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
Primer rs-12 F	10 $\mu$ M	0,1 $\mu$ M	0,25 $\mu$ L
Primer rs-12 R	10 $\mu$ M	0,4 $\mu$ M	1 $\mu$ L
$MgCl_2$	50 $\mu$ M	3 $\mu$ M	1,5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O			7,25 $\mu$ L
DNA template		1	1 $\mu$ L

Produk= 25

Program PCR yang dipakai adalah Profil touchdown PCR

95°C	95°C		72°C	95°C			72°C	95°C		72°C	72°C	
3'	30"	70°C	1'	30"	70°C-60°C	1'	30"	60°C	1'	7'	12°C	
		30"			30"			30"			10'	
		5x			10x			20x				

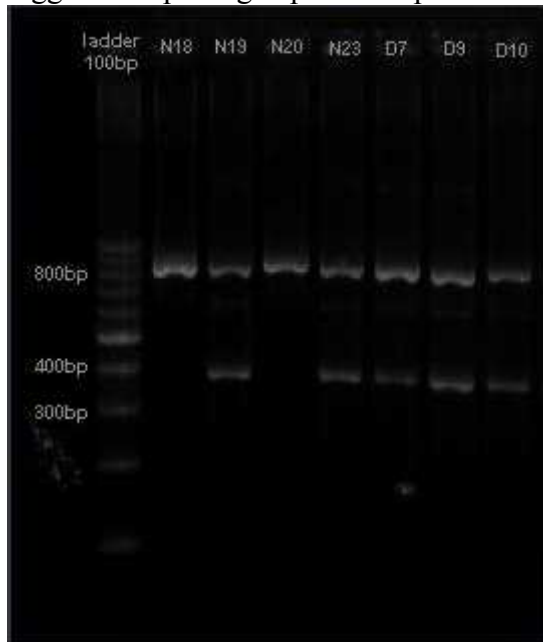
DNA yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 1,5 % untuk membuktikan keberhasilan isolasi DNA dari sampel. Untuk lebih jelasnya lihat gambar 3.



Gambar 3. Hasil isolasi DNA dari darah setelah di elektroforesis

DNA yang diperoleh dari hasil isolasi, selanjutnya diamplifikasi menggunakan primer yang dikonstruksi dengan mix PCR RTG/ Go Tag Green. Hasil amplifikasi PCR dianalisis menggunakan teknik elektroforesis pada agarose. Elektroforesis merupakan proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Kecepatan molekul yang bergerak pada medan listrik tergantung pada muatan, bentuk dan ukuran molekul

tersebut. Agarose dan poliakrilamid merupakan matriks penyangga yang banyak dipakai untuk separasi protein dan asam nukleat. Pada penelitian ini digunakan agarose 1,5 %. Menurut Sambrook and Russel (1990;6.2) agarose 1,5 % sangat cocok untuk memisahkan fragmen DNA berukuran 200–300 basa. Lokasi dari DNA yang terdapat pada gel bisa diamati dengan staining menggunakan gel red, sehingga nantinya bisa dilihat sewaktu gel diletakkan diatas GelDoc. Visualisai hasil elektroforesis produk PCR menggunakan pasangan primer dapat dilihat pada Gambar 4.

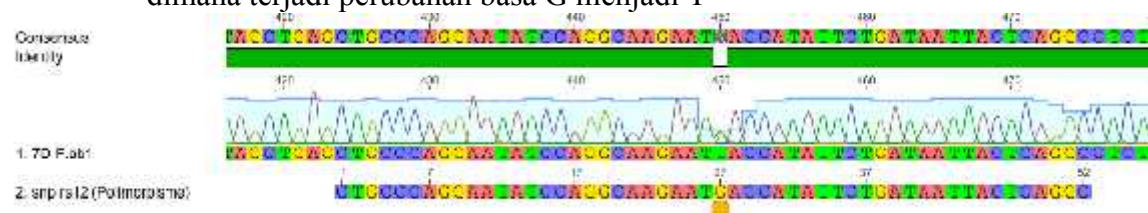


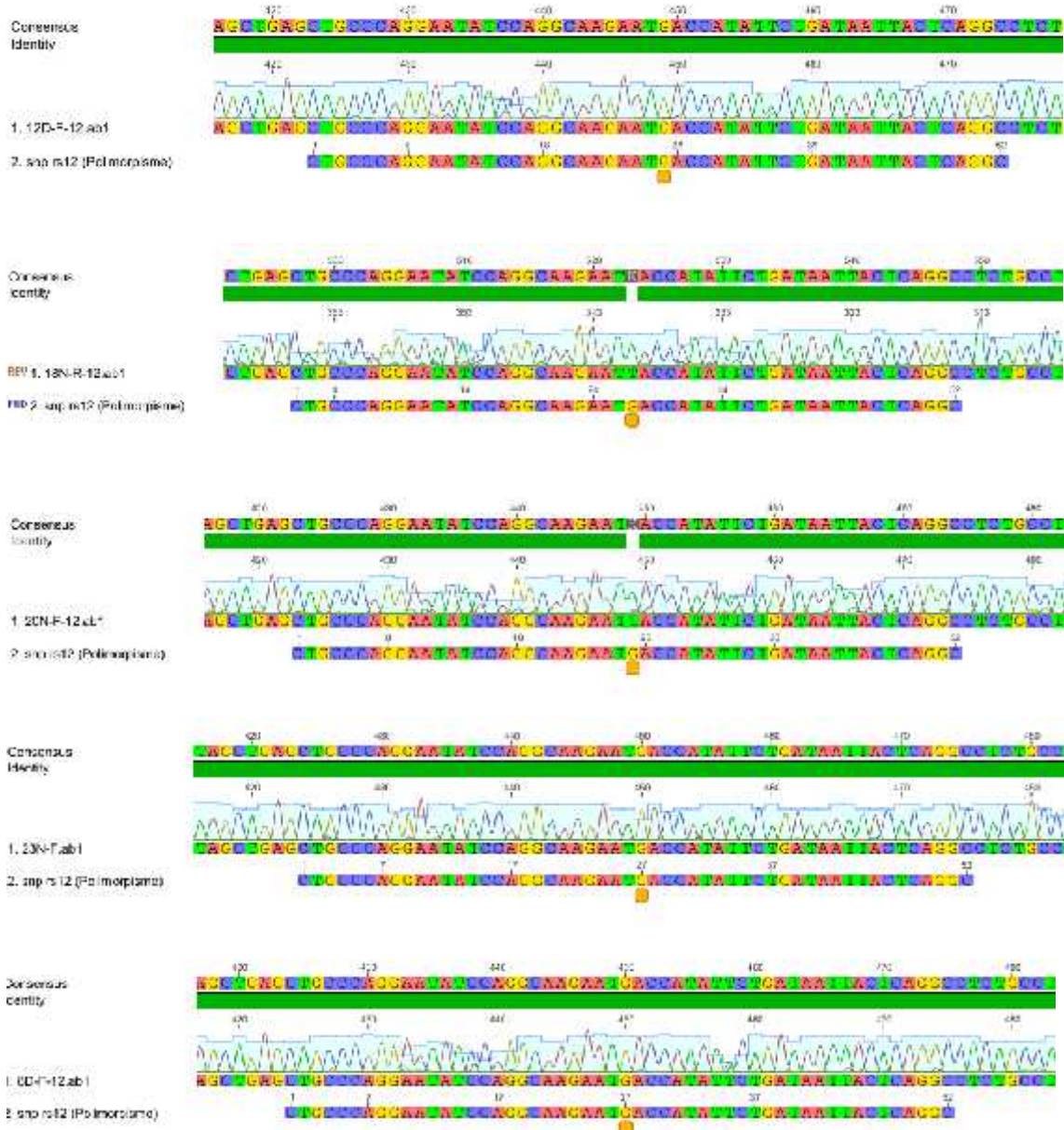
Dari data tersebut bisa diketahui bahwa reaksi ARMS-PCR yang dilakukan bisa digunakan untuk mendeteksi SNP pada gen TCF7L2 khususnya SNP rs12255372 . Tetapi metode ini memiliki keterbatasan diantaranya: reaksi ini tidak mungkin bisa mendeteksi 100 % SNP pada gen TCF7L2. Walaupun demikian spesifitas dan sensitifitasnya yang tinggi dalam mendeteksi SNP dapat dijadikan sebagai salah satu faktor mengapa metode ini bisa digunakan. Selain itu jika dibandingkan dengan metode deteksi SNP lainnya, reaksi ARMS-PCR memiliki beberapa keuntungan diantaranya lebih murah dan mudah diaplikasikan. Proses/waktu pelaksanaannya lebih singkat, mulai dari persiapan reagen, peralatan termasuk penambahan DNA genom (*template*), ARMS-PCR amplifikasi dan elektroforesis pada agarose bisa diselesaikan dalam satu hari. Pengaplikasiannya yang cepat dan metode yang mudah untuk mendeteksi SNP rs12255372 merupakan nilai yang sangat penting untuk pencegahan DMT2.

### Hasil sekuensing

Enam sampel dilakukan sekuensing untuk mamastikan akurasi dari metode ARMS-PCR. Berdasarkan hasil sekuensing terdapat kesesuaian dengan metode ARMS-PCR. Hasil sekuensing dapat dilihat pada gambar berikut:

Gambar 5 Hasil sekuensing sampel yang mengalami polimorpisme pada **rs12255372** dimana terjadi perubahan basa G menjadi T





## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisis data dapat disimpulkan bahwa telah berhasil dikonstruksi tiga buah primer yaitu primer forward RS12F, primer reverse RS12R dan primer forward RS12C. Ketiga primer yang dikonstruksi mampu mengenali SNP rs1225372 gen TCF7L2 dengan metode ARMS-PCR

## Ucapan Terimakasih

Pada kesempatan ini, Kami mengucapkan terimakasih kepada Rektor UNP yang sudah memfasilitasi penelitian ini sehingga dapat disponsori melalui hibah disertasi doktor dari Dirjen Dikti Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia. Begitu juga segenap staf di laborotorium Biomedik FK Unand yang turut membantu keberhasilan penelitian ini.



## DAFTAR PUSTAKA

- American Diabetes Association/ADA, 2010. Standards of Medical Care in Diabetes 2010. *Diab Care*: 33
- Bardakci F, 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turk J Biol* 25:185-196
- Florez JC, *et al.*, 2006. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N. Engl. J. Med.* 355, 241–250
- Grant S F, *et al.*, 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genet.* 38: 320–323
- Halifah S, 2009. *Kecendrungan Pola Pewarisan Diabetes Mellitus Pada Etnik Minangkabau Berdasarkan Analisis Pedigre*. Padang: FMIPA UNP
- Joshi, Shashank R, 2006. *Family History and Pedigree Charting- A Simple Genetic Tool For Indian Diabetics*. (<http://id.www.hindujahospital.com/IDCC2006>. diakses tanggal 10 september 2008 )
- Kahn H S, Mariaelisa Graff, Aryeh D Stein dan L H Lumey, 2009. A fingerprint marker from early gestation associated with diabetes in middle age: The Dutch Hunger Winter Families Study. *International Journal of Epidemiology* 38:101-109.
- Komar A (ed). 2009. *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols*. Cleveland, USA: Humana Press
- Kwok PY (ed). 2003. *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: © Humana Press Inc.
- Maidin MA, 2005. Harapan Dan Tantangan Aplikasi Reaksi Rantai Polimerase (PCR) Multipleks Dalam Pemberantasan Tb Paru Di Indonesia (Suatu Pendekatan Biologi Molekuler). *Suplement*: 26. No.3
- Manaf A, 2011. *Harmonizing The Metabolic Syndrome With Prediabetes*. Makalah
- Perdomo RP, 2005. *Epidemiology of Diabetes; Prevalence, Complications and Health Services Disparities*. Para Puerto Rico: Centro de Diabetes
- PERKENI, 2011. *Konsesnsus Pengelolaan dan pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*. Jakarta: PB PERKENI.
- Radha V and Mohan V, 2007. Genetic Predisposition To Type 2 Diabetes Among Asian Indians. *Mellitus. Indian J Med Res* 117: 259-274
- Radha V, Vimalaswaran KS, Deepa R & Mohan V, 2003. The Genetic of Diabetes Mellitus. *Indian J Med Res* 117: 225-238
- Roglic G, Unwin N, 2005. Global Mortality, Attributable to diabetes: time for a realistic estimate. *Diabetes Voice* 50: 33-34
- Sladek R. *et al.*, 2007. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445: 881-885
- Soegondo S, Soewondo P, Subekti I, *Penatalaksanaan Diabetes Mellitus Terpadu*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Stumvold M, Goldstein B, & Van Haeten T, 2008. *Pathogenesis of Type 2 DM*.
- Tjokroprawiro A, 2002. *Penatalaksanaan Diabetes Mellitus Terpadu*. Balai penerbit Jakarta: Balai Penerbit FKUI
- Valance O, 2006. Synalbumin Insulin Antagonism and Diabetes. *Ciba Fdn Colloq* 15: 217-234.
- WHO, 1994. *Pencegahan Diabetes Mellitus*. Hipokrates : Jakarta
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H, 2004. Global Prevalence of Diabetes, Estimate for the year 2000 and projection for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047-1053.
- Yu, J, Andrea K. Steck, Sunanda Babu, Liping Yu, Dongmei Miao, Kim McFann, John Hutton, George S. Eisenbarth, and Georgeanna Klingensmith, 2009. Single Nucleotide Transcription Factor 7-Like 2 (TCF7L2) Gene Polymorphisms in Antiislet Autoantibody-Negative Patients at Onset of Diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94:504-510

## 5. Sertifikat

**Sertifikat**

diberikan kepada:  
**Drs. SYAMSURIZAL, M Biomed**

atas partisipasinya sebagai  
**PENYAJI**

pada acara:  
**SEMINAR NASIONAL & WORKSHOP**  
**“Pelayanan Kefarmasian & Herbal Medicine”**

**PHARMACEUTICAL SAINS FARMASI dan Klinik 3**

yang diselenggarakan oleh Fakultas Farmasi Universitas Andalas  
bersama dengan Pengurus Daerah Ikatan Apoteker Indonesia Sumatera Barat  
di Conventon Hall - Universitas Andalas, Kampus Limas Manis, Padang  
pada tanggal 4-5 Oktober 2013.

Fakultas Farmasi Universitas Andalas  
Ikatan Apoteker Indonesia Sumatera Barat  
Panitia Pelaksana Seminar Nasional & Workshop

Dr. M. H. Saiful, M.Si, Apt  
Dekan

H. Zulham, R.Si, MM, Apt  
Ketua

Dr. Yudi Adi, M.Si, Apt  
Ketua

Sertifikat ini dibuat dan diterbitkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Andalas pada tanggal 20 Oktober 2013. Nomor Sertifikat: 001/2013/FF-UNDA. Untuk keperluan lain, sertifikat ini tidak berlaku. Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Kampus Limas Manis, Padang. Kontak: 075-7600000. Email: ff@unand.ac.id