

KONSTRUKSI PRIMER UNTUK MENGAMPLIFIKASI GEN TCF7L2

SKRIPSI

Diajukan Sebagai Salah Satu Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Sains



**HENGKI SAPUTRA
NIM.14032044**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2018**

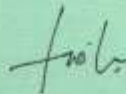
HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI

KONSTRUKSI PRIMER UNTUK MENGAMPLIFIKASI GEN TCF7L2

Nama : Hengki Saputra
NIM/TM : 14032044/2014
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 02 Agustus 2018

Disetujui Oleh :
Pembimbing



Dr. Dwi Hilda Putri, M.Biomed.
NIP. 19750815 200604 2 001

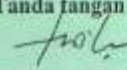
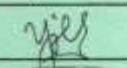
PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan didepan Tim Penguji Skripsi
Program Studi Biologi Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Judul : Konstruksi Primer untuk Mengamplifikasi Gen
TCF7L2
Nama : Hengki Saputra
NIM/TM : 14032044/2014
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institusi : Universitas Negeri Padang

Padang, 02 Agustus 2018

Tim Penguji

	Nama	Tanda tangan
1. Ketua	: Dr. Dwi Hilda Putri, M.Biomed.	1. 
2. Anggota	: Dr. Yuni Ahda, M.Si.	2. 
3. Anggota	: Dezi Handayani, M.Si.	3. 

SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Hengki Saputra
NIM/TM : 14032044/2014
Program Studi : Biologi
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya dengan judul "**Konstruksi Primer untuk Mengamplifikasi Gen TCF7L2**" adalah benar hasil karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat dari karya orang lain. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya, pendapat yang ditulis atau diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota masyarakat ilmiah.

Padang, 02 Agustus 2018

Diketahui oleh,
Ketua Jurusan Biologi

Dr. Azwir Anhar, M.Si.
NIP. 19561231 198803 1 009

Saya yang menyatakan,

Hengki Saputra
NIM. 14032044

ABSTRAK

Hengki Saputra, 2018. Konstruksi Primer untuk Mengamplifikasi Gen TCF7L2.

Diabetes Mellitus tipe 2 (DM-2) merupakan penyakit yang ditentukan oleh faktor lingkungan dan genetik. Secara genetik DM-2 disebabkan oleh adanya polimorfisme pada banyak gen yang berasosiasi dengan DM-2, salah satunya yang paling kuat adalah gen TCF7L2. Untuk dapat mendeteksi adanya polimorfisme tersebut dibutuhkan primer spesifik. Penelitian ini bertujuan untuk mendesain primer yang dapat mendeteksi gen TCF7L2.

Jenis penelitian ini adalah penelitian deskriptif. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi FMIPA Universitas Negeri Padang. Peneliti merancang primer menggunakan perangkat lunak/software komputer “*primer designer*” dan Bioedit dalam Bioinformatika.

Hasil penelitian ini didapatkan 2 buah primer, yaitu primer forward 10qF (NG_012631.1) dan primer reverse 10qR (NG_012631.1) yang mampu mengamplifikasi daerah gen TCF7L2 sepanjang 1208bp. Daerah gen yang diamplifikasi memiliki 3 SNP (polimorfisme) yang sangat erat hubungannya dengan kemunculan Diabetes Mellitus Tipe 2.

Keywords: Diabetes Melitus, Gen TCF7L2, Desain Primer.

KATA PENGANTAR



Alhamdulillah, Puji dan Syukur penulis ucapkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “Konstruksi Primer untuk Mengamplifikasi Gen TCF7L2”. Selanjutnya shalawat beriring salam kepada nabi besar Muhammad SAW.

Adapun tujuan dari penulisan skripsi ini adalah untuk memenuhi salah satu persyaratan dalam memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) di Jurusan Biologi FMIPA UNP. Dalam penulisan skripsi ini penulis mendapatkan banyak bimbingan serta arahan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada :

1. Ibu Dr. Dwi Hilda Putri, M.Biomed., selaku pembimbing yang telah banyak membantu penulis dalam penyelesaian skripsi ini dari awal sampai akhir.
2. Bapak Dr. Syamsurizal, M.Biomed., selaku Sekretaris Jurusan Biologi dan pembimbing dalam penyelesaian skripsi ini dari awal sampai akhir.
3. Ibu Dr. Yuni Ahda, M.Si., dan Ibu Dezi Handayani, M.Si., selaku tim penanggap dan dosen pengajar yang telah memberikan masukan serta ilmunya kepada penulis.
4. Ibu Irdawati, M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik (PA) yang telah banyak membantu dan memberikan masukan serta arahan selama perkuliahan.

5. Bapak Dr. Ramadhan Sumarmin, M.Si., selaku Ketua Program Studi Biologi yang telah banyak membantu dalam memotivasi perkuliahan maupun saran dalam pembuatan skripsi.
6. Pimpinan Jurusan Biologi dan semua staf pengajar Jurusan Biologi yang telah memberikan kontribusinya dalam penulisan skripsi maupun selama perkuliahan di Universitas Negeri Padang.
7. Papa, Emak, Bg Riyan, Bg Id, Bg Rival, Kak Silvia, Bg Iqbal, Kak Linda, Kak Mira, Kak Ria, Bg Yusri, Adang Minan, Syifa, Syakira, Azilla, Anggia, Nadira, Ayu dan Uti Serta Keluarga Besar yang selalu mendukung, mendoakan, memberikan semangat dan motivasi baik moril maupun material selama perkuliahan dan penulisan skripsi guna mencapai cita-cita.
8. Teman-teman seperjuangan, abang, kakak dan adik-adik di jurusan Biologi FMIPA UNP.
9. Semua pihak yang telah banyak membantu dan berkontribusi dalam perkuliahan maupun penyelesaian skripsi ini.

Semoga semua bantuan, bimbingan, dan dukungan yang telah diberikan dibalas oleh Allah SWT. Besar harapan penulis bahwa skripsi yang telah diselesaikan ini dapat bermanfaat bagi penulis sendiri maupun semua orang yang membaca, serta mengharap kritik dan saran yang membangun guna kesempurnaan skripsi ini.

Padang, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
 BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	6
C. Tujuan Penelitian.....	6
D. Manfaat Penelitian.....	6
 BAB II KAJIAN TEORI	
A. Diabetes Mellitus	7
B. Diabetes Mellitus Tipe 2.....	10
C. Gen TCF7L2.....	13
D. Konstruksi Primer.....	15
E. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	16
F. <i>Sequencing DNA</i>	18
 BAB III METODE PENELITIAN	
A. Jenis Penelitian	20
B. Waktu dan Tempat Penelitian.....	20
C. Alat dan Bahan	20

D. Prosedur Penelitian	20
E. Teknik Analisis Data	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil.....	25
B. Pembahasan	29
BAB V PENUTUP	
A. Kesimpulan.....	34
B. Saran	34
DAFTAR PUSTAKA.....	35
LAMPIRAN.....	39

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Klasifikasi diabetes mellitus berdasarkan etiologinya	9
2. Beberapa varian dari gen TCF7L2 yang berasosiasi dengan DM-2.	14
3. Karakteristik <i>sequencing</i> dengan metode Sanger	18
4. Komposisi mix PCR yang digunakan	23
5. Hasil konstruksi primer forward 10qF dan reverse 10qR.....	26

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Pemetaan SNP pada gen TCF7L2.....	25
2. Hasil <i>alignment</i> primer yang dikonstruksi dengan gen TCF7L2.....	27
3. Posisi penempelan primer	27
4. Visualisasi hasil elektroforesis primer yang dikonstruksi	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil desain awal primer menggunakan software “ <i>primer designer</i> ”	39
2. Hasil alignment primer 10qF dan primer 10qR	43
3. Sequence gen TCF7L2 yang diamplifikasi.....	45
4. Dokumentasi penelitian	47

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Diabetes Mellitus (DM) adalah penyakit yang ditandai oleh tingginya kadar gula dalam darah. Pada dasarnya, hal ini terjadi karena tubuh kekurangan hormon insulin. Kekurangan dapat berupa jumlah insulin yang memang tidak mencukupi atau tubuh tidak dapat secara efektif menggunakan insulin yang dihasilkannya (Kariadi, 2009). Kadar gula darah yang tidak terkontrol dapat meningkatkan terjadinya komplikasi. Komplikasi akibat DM dapat menyebabkan kematian pada penderitanya (Fahmiah, 2016).

Penderita DM dapat ditemukan dengan berbagai keluhan-keluhan kesehatan. Kecurigaan adanya DM perlu diperhatikan apabila terdapat keluhan berupa keluhan klasik (khas) seperti poliuria, polidipsia, polifagia dan penurunan berat badan yang tidak dapat dijelaskan sebabnya. Keluhan lainnya yang juga sering berhubungan dengan DM adalah kesemutan, gatal, mata kabur, disfungsi ereksi pada pria, dan pruritus vulva pada wanita (Perkeni, 2015).

Data terakhir dari *International Diabetes Federation* (IDF) (2015) menunjukkan bahwa pada tahun 2015 terdapat sekitar 415 juta orang dewasa (usia 20-79 tahun) di dunia menderita DM. Jumlah tersebut diperkirakan akan terus meningkat hingga mencapai 642 juta orang pada tahun 2040. *World Health Organization* (2016) mengemukakan bahwa terdapat 3,7 juta kematian akibat diabetes dan kadar glukosa tinggi. Peningkatan kasus DM juga terjadi di Indonesia. Data riset kesehatan dasar RISKESDAS (2013) menunjukkan bahwa prevalensi DM di Indonesia mencapai 1,5 persen dari total jumlah penduduk.

Diabetes Mellitus dapat diklasifikasikan atas tiga tipe umum yaitu; DM-1, Diabetes Gestational, dan DM-2 (ADA, 2017). Diabetes Mellitus tipe 1 terjadi akibat rusaknya sel beta (β) pankreas oleh virus / autoimunitas. Diabetes Gestational terjadi pada wanita yang sedang hamil (Perkeni, 2015). Sedangkan Diabetes Mellitus tipe 2 adalah penyakit gangguan metabolik yang ditandai dengan kenaikan gula darah akibat penurunan sekresi insulin oleh sel β pankreas (resistensi insulin) dan gangguan fungsi insulin. Gangguan tersebut disebabkan oleh rusaknya sel-sel β pankreas karena pengaruh dari luar (seperti: virus dan zat kimia), atau kerusakan reseptor insulin di jaringan perifer (Fatimah, 2015).

Prevalensi penderita DM-2 lebih banyak jika dibandingkan dengan penderita diabetes lainnya. Prevalensi DM-2 mencapai 90-95% dari semua penderita diabetes. Umumnya penderita DM-2 berusia diatas 45 tahun. Namun akhir-akhir ini penderita dikalangan anak-anak dan remaja ikut meningkat populasinya (Tama *et al.*, 2015).

Diabetes Mellitus Tipe 2 merupakan penyakit multifaktorial, yang ditentukan oleh faktor lingkungan dan genetik (Kaya *et al.*, 2017). Secara genetik, DM-2 disebabkan oleh adanya polimorfisme pada gen-gen yang berasosiasi dengan kemunculan penyakit DM-2. Beberapa varian gen telah menunjukkan hubungan dengan DM-2 di beberapa populasi. Varian gen tersebut diantaranya adalah polimorfisme pada gen *calpain 10* (CAPN10), *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPARG), *ATP-sensitive inwardly rectifying potassium channel subunit Kir6.2* (KCNJ11), *hepatocyte nuclear factor 4* (HNF4A), *hepatic transcription factor 1* (TCF1), dan gen *transcription factor 7-like 2* (TCF7L2)

(Sale *et al.*, 2007). Gen TCF7L2 dilaporkan berasosiasi kuat dengan DM-2 pada etnis Denmark, Kaukasia, India, dan etnis bangsa-bangsa di Asia (Radha, 2007).

Gen TCF7L2 sebelumnya dikenal sebagai TCF-4, adalah bagian dari faktor transkripsi dengan mobilitas tinggi. Gen ini terdapat pada kromosom 10q dari genom manusia. Gen TCF7L2 merupakan faktor transkripsi utama jalur pensinyalan WNT / β -catenin, yang memiliki peran penting dalam kelangsungan hidup sel beta dan regenerasinya (Yao, 2015). Jin *et al* (2008), juga mengemukakan bahwa gen TCF7L2 berperan dalam proses pensinyalan WNT selama perkembangan embrio dan dalam mengatur ekspresi gen saat dewasa. Gangguan pensinyalan WNT menjadi salah-satu penyebab resistensi insulin.

Gen TCF7L2 memiliki banyak varian yang berasosiasi dengan kemunculan DM-2. Berdasarkan penelitian Sale *et al* (2007), didapatkan bahwa beberapa varian dalam Gen TCF7L2 secara signifikan berkontribusi terhadap kerentanan diabetes pada populasi Afrika-Amerika. Hasil yang sama pada penelitian Sabbagh *et al* (2014), melaporkan bahwa dari 3286 sampel, diidentifikasi beberapa varian gen yang berasosiasi dengan DM-2. Varian dari lokus TCF7L2 rs34872471 merupakan daerah yang terlibat dalam kemunculan DM-2 pada penduduk Lebanon. Selain itu, berdasarkan hasil penelitian Votsi *et al* (2017) juga menkonfirmasi bahwa secara statistik DM-2 berasosiasi dengan lima *Single Nukleotida Polymorphism* (SNP) yang diuji pada populasi Yunani, salah satunya adalah TCF7L2 rs7901695.

Banyak studi yang menjelaskan tentang keterkaitan gen TCF7L2 sebagai salah satu penyebab munculnya penyakit DM-2. Berdasarkan studi literatur yang

dilakukan, diketahui bahwa teknik yang umum digunakan untuk mendeteksi polimorfisme gen TCF7L2 adalah *fragment length polymorphism* (RFLP) (Elrod, 2007). Kelemahan teknik yang digunakan ini adalah jumlah dari situs polimorfisme yang dapat diamati terbatas pada satu titik saja, karena pada prinsipnya metode RFLP hanya mampu mengenali polimorfisme pada perubahan situs restriksi akibat polimorfisme. Selain itu, tidak semua polimorfisme akan mempengaruhi situs restriksi pada suatu gen, sehingga teknik RFLP tidak selalu bisa digunakan dalam mendeteksi polimorfisme.

Metode lain yang dapat mendeteksi polimorfisme pada gen TCF7L2 adalah *sequencing*. Tujuan utama dari metode ini adalah untuk mengevaluasi urutan nukleotida pada suatu genom dengan akurasi yang sangat tinggi, termasuk adanya polimorfisme pada urutan tersebut (Franca, 2012). Untuk dapat melakukan *sequencing* pada gen TCF7L2 dibutuhkan fragmen gen TCF7L2 sebagai cetakan. Salah satu cara untuk mengamplifikasi fragmen DNA tersebut dari genom adalah dengan teknik *Polimerase Chain Reaction* (PCR).

Polimerase Chain Reaction merupakan suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan sekuen nukleotida tertentu secara *in vitro*. Kelebihan dari metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dengan jumlah sangat sedikit. Metode ini juga memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi dalam mengamplifikasi suatu fragmen. Spesifisitas fragmen yang akan diamplifikasi ditentukan oleh banyak faktor, salah satu faktor utamanya adalah pemilihan primer yang tepat (Yuwono, 2006).

Primer adalah suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang berfungsi untuk mengawali sintesis rantai DNA dalam reaksi berantai polimerase. Keberhasilan suatu proses PCR sangat ditentukan oleh komposisi primer (Yuwono, 2006). Dalam mendesain suatu primer untuk PCR perlu diperhatikan beberapa hal, diantaranya adalah kadungan GC masing-masing primer harus berada dalam kisaran 40-60%. Selanjutnya perlu diketahui apakah primer tidak tumpang tidih dengan primer lainnya dalam campuran reaksi, karena ini akan mendorong pembentukan primer dimer. Untuk memudahkan proses optimasi perlu digunakan perangkat lunak khusus (Borah, 2011).

Seperti yang telah disampaikan sebelumnya, terdapat beberapa polimorfisme yang diketahui berasosiasi kuat dengan DM-2. Beberapa varian tersebut berada pada posisi hampir berdekatan. Berdasarkan kajian secara bioinformatika, daerah dengan varian tersebut memiliki panjang ± 1208 bp. Untuk dapat mendeteksinya metode *sequencing* baik untuk dilaksanakan. Sebaliknya dari studi literatur, belum ada primer spesifik yang dapat digunakan pada metode tersebut.

Berdasarkan uraian di atas, maka dibutuhkan sepasang primer yang tepat untuk dapat mengamplifikasi gen TCF7L2 yang akan digunakan pada metode *sequencing*. Oleh karena itu, akan dilakukan penelitian tentang konstruksi primer untuk mengamplifikasi gen TCF7L2.

B. Rumusan Masalah

Sesuai dengan latar belakang masalah, rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana desain primer yang tepat untuk mengamplifikasi fragmen gen TCF7L2 yang akan digunakan sebagai cetakan dalam proses *sequencing*?
2. Apakah primer yang didesain mampu mengamplifikasi fragmen gen TCF7L2 yang digunakan sebagai cetakan untuk *sequencing*?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Mendesain primer yang dapat mendeteksi gen TCF7L2 pada penderita DM-2.
2. Mengetahui kemampuan primer dalam mengamplifikasi fragmen gen TCF7L2 yang berasosiasi pada kemunculan DM-2.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan untuk mengamplifikasi fragmen gen TCF7L2 pada penderita DM.
2. Bagi masyarakat, hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai salah satu alternatif deteksi dini penyakit DM-2.
3. Bagi kalangan akademik, penelitian ini tentunya bermanfaat sebagai kontribusi untuk memperkaya ilmu pada umumnya dan sebagai informasi awal dalam penelitian selanjutnya.