



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Jalan Gajayana 50 Malang Telepon (0341) 558915, 551354 Faksimile 572533
Website : lp2m.uin-malang.ac.id Email : lp2m@uin-malang.ac.id

LAPORAN PENELITIAN
TAHUN ANGGARAN 2022

Identifikasi Single Nucleotida Polymorfism (SNP) pada -45 exon 2 gen adipog pada penderit diabetes melitus type 2

Nomor DIPA	DIPA BLU-DIPA 025.04.2.423812/2022
Tanggal	7 November 2021
Satker	(4238120) UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
Kode Kegiatan	(2132) Peningkatan Akses, Mutu, Relevansi dan Daya Saing Pendidikan Tinggi Keagamaan Islam
Kode Output Kegiatan	(050) PTKIN Penerima BOPTN
Sub Output Kegiatan	(514) Penelitian (BOPTN)
Kode Komponen	(004) Dukungan Operasional Penyelenggaraan Pendidikan
Kode Sub Komponen	A Penelitian Pengembangan/Kapasitas B Penelitian Dasar Program Studi C Penelitian Dasar Interdisipliner D Penelitian Pengembangan Pendidikan Tinggi E Penelitian Terapan Kajian Strategis Nasional

Oleh:

TYAS NYONITA PUNJUNGSARI (19920507 201903 2 026)



KEMENTERIAN AGAMA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT (LP2M)
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

2022

HALAMAN PERSETUJUAN

Laporan penelitian dengan judul “Identifikasi Single Nucleotida Polymorfism (SNP) pada -45 exon 2 gen *adipoq* pada penderita diabetes melitus type 2”

Oleh:

TYAS NYONITA PUNJUNGSARI (19920507 201903 2 026)

Telah diperiksa dan disetujui *reviewer* dan komite penilai pada tanggal 7 November 2022

Malang, 7 November 2022

Reviewer 1,

Reviewer 2,

.....

.....

Komite Penilai,

.....



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Jalan Gajayana 50 Malang Telepon (0341) 558915, 551354 Faksimile
572533

Website : lp2m.uin-malang.ac.id Email : lp2m@uin-malang.ac.id

HALAMAN PENGESAHAN

Laporan Penelitian ini disahkan oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada
Masyarakat Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Pada tanggal 7 November 2022

Peneliti

Ketua : Nama : Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc.
NIP : 19920507 201903 2 026

Tanda Tangan

Anggota I : Nama
NIP
Tanda Tangan

Anggota II : Nama
NIP
Tanda Tangan

Ketua LP2M
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Prof. Dr. H. Agus Maimun, M.Pd.
NIP. 19650817 199803 1 003



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Jalan Gajayana 50 Malang Telepon (0341) 558915, 551354 Faksimile
572533

Website : lp2m.uin-malang.ac.id Email : lp2m@uin-malang.ac.id

PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN

Kami yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc
NIP : 19920507 201903 2 026
Pangkat /Gol.Ruang : Asisten Ahli/III-B
Fakultas/Program Studi : F.Saintek/S1-Biologi
Jabatan dalam Penelitian : Ketua Peneliti

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa dalam penelitian ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis disebutkan dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila dikemudian hari ternyata dalam penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur penjiplakan dan pelanggaran etika akademik, maka kami bersedia mengembalikan dana penelitian yang telah kami terima dan diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 7 Nomor 2022
Ketua Peneliti,

Materai Rp. 10.000,-

(Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc.)
NIP. 19920507 201903 2 026



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Jalan Gajayana 50 Malang Telepon (0341) 558915, 551354 Faksimile
572533

Website : lp2m.uin-malang.ac.id Email : lp2m@uin-malang.ac.id

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINAL PENELITIAN	iv
DAFTAR ISI	v
KATA PENGANTAR	vi
ABSTRAK	vii
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Diabetes Melitus Type 2	4
2.2 Adiponektin	5
2.3 SNPs	7
2.4 SNPs Adiponectin terhadap T2D	
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat Penelitian	8
3.2 Alat dan Bahan	9
3.3 Prosedur Kerja	9
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
Identifikasi SNPs pada penderita T2D	11
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	15
5.2 Saran	15
DAFTAR PUSTAKA	16



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Jalan Gajayana 50 Malang Telepon (0341) 558915, 551354 Faksimile
572533

Website : lp2m.uin-malang.ac.id Email : lp2m@uin-malang.ac.id

KATA PENGANTAR

Puji syukur selalu kami panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan nikmat berupa rahmat dan hidayah-Nya sehingga bisa melaksanakan penelitian pembinaan/kapasitas pemula. Penelitian pembinaan/kapasitas pemula yang diselenggarakan oleh LP2M Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang ini berkonsentrasi pada Identifikasi Single Nucleotide Polymorfism (SNP) -45 exon 2 Gen ADIPOQ (Adiponectin) pada Penderita Diabetes Melitus Type 2. Kegiatan ini dapat berjalan lancar berkat adanya koordinasi dan kerjasama yang baik dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA selaku Rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. H. Agus Maimun, M.Pd., ketua LPM UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian.
3. Dr. Hj. Ilfi Nurdiana, S.Ag., M.Ag komite penilai UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian.
4. Dr. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang senantiasa memberikan dukungan.
5. Prof. Dr. Roihatul Mutiah dan Dr. Zainabur Rahmah yang selaku reviewer 1 dan 2 yang telah berkenan dengan penuh kesabaran memberikan pengarah, bimbingan, saran, motivasi dan nasehat selama persiapan penelitian sampai selesainya penyusunan naskah penelitian ini.

Demikian laporan kegiatan pengabdian kepada masyarakat ini disusun, semoga kegiatan pengabdian ini menjadi kegiatan yang bermanfaat dan senantiasa berkelanjutan.



KEMENTERIAN AGAMA REPUBLIK INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

Jalan Gajayana 50 Malang Telepon (0341) 558915, 551354 Faksimile
572533

Website : lp2m.uin-malang.ac.id Email : lp2m@uin-malang.ac.id

ABSTRAK

Diabetes adalah satu penyakit yang paling mengancam manusia, menurut WHO pada tahun 2014 tercatat ada 422 juta orang dewasa mengidap diabetes melitus, sebagian besar penderita diabetes melitus merupakan kelompok penderita diabetes melitus type 2. Diabetes melitus type merupakan keadaan dimana penderita mengalami resistensi insulin. Resistensi insulin dipengaruhi oleh beberapa factor salah satunya adalah adanya perubahan satu nukelotida pada sequence nomor 45 gen adiponectin atau sering disebut SNP +45 ADIPOQ. Penelitian ini dilakukan dengan mengambil sampel sel epitel dari responden penderita diabetes dan responden normal. Ekstraksi DNA sampel menggunakan kit NEx. Prosedur amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR Master Mix Nexpro dan primer SNP 45 Forward (5' GGCTCAGGATGCTGTTGCTGG3') dan SNP 45 Reverse (5' GCTTTGCTTTCTCCC TGTGTCT 3'). Sequence gen adipoQ ditemukan dari 7 sampel sedang untuk 1 sampel dengan kode AKT 1 multiband, SNP +45 ditemukan pada ke tujuh sampel.

Keywords: Diabetes melytus type 2 (T2D), SNP 45, ADIPOQ, Adiponectin.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diabetes adalah satu penyakit yang paling mengancam manusia, menurut WHO pada tahun 2014 tercatat ada 422 juta orang dewasa mengidap diabetes melitus. Pada tahun 2030 diperkirakan penderita diabetes melitus mencapai 69 % dari keseluruhan populasi orang dewasa yang ada di seluruh dunia (Tan, et.al. 2020), di Indonesia penderita diabetes melitus mencapai 10 juta orang yang menjadikannya sebagai penyakit nomor tiga yang paling mematikan (P2ptm.kemkes, 2018).

Diabetes melitus dibedakan menjadi beberapa kelompok, salah satunya adalah diabetes melitus type 2. Diabetes melitus type 2 terjadi ketika penderita mengalami hyperinsulinemia, namun insulin tidak dapat membawa glukosa masuk ke dalam jaringan karena adanya resistensi insulin. Resistensi insulin akan menyebabkan berkurangnya sekresi insulin ketika ada glukosa, sehingga sel β pancreas akan mengalami densitisasi terhadap adanya glukosa.

Pada beberapa penelitian diketahui bahwa jaringan adiposa merupakan organ endocrine yang berperan dalam mengatur produksi insulin, metabolisme dan memberikan sinyal ketika terjadi inflammatory. Adipositokin merupakan salah satu protein aktif yang disekresi oleh jaringan adiposit. Dari berbagai jenis adipositokin, adiponectin adalah protein yang berfungsi sebagai hormone anti-inflammatory, antidiabetes, pensinyal insulin yang sensitive, dan memiliki peran penting dalam berbagai proses metabolisme termasuk control glukosa serta katabolisme asam lemak (Fruebis, et.al., 2010). Oleh karena itu, adiponektin tampaknya merupakan modulator utama kerja insulin, yang kadarnya berkurang pada penderita diabetes type 2 (T2D), yang dalam kondisi ini dapat menyebabkan resistensi insulin perifer. Protein adiponectin dikodekan oleh gen APMI/ADIPOQ yang terdiri dari 3 ekson dan 2 intron yang terletak pada kromosom 3q27 pada lokus yang sama terhadap mapping kerentanan diabetes melitus (Gu, 2009).

Beberapa polymorphism mempengaruhi kerja dari gene ADIPOQ untuk proses metabolisme adiponectin dan jumlah adiponectin itu sendiri. Polymorphism yang dianggap sangat berpengaruh terhadap kerja gen ADIPOQ adalah SNPs (Single

Nucleotida Polymorphism). Menurut Zacharova (2005), SNPs -45 pada exon 2 gen adiponectin berhubungan dengan obesitas, insulin resisten dan diabetes melitus type 2 (T2D) pada sampel darah penderita resisten insulin di German, Swedia dan Taiwan, serta sampel T2D dari Perancis dan Jepang. Berdasar latar belakang ini maka dipandang perlu untuk melakukan eksplorasi Single Nucleotida Polymorfism (SNP) pada -45 exon 2 gen adipoq pada penderita diabetes melitus type 2.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka penelitian mempunyai permasalahan yang perlu dikaji sebagai berikut: Apakah terdapat SNP pada -45 exon 2 gen adiponectin pada penderita T2D?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang tersebut maka penelitian mempunyai permasalahan yang perlu dikaji sebagai berikut: Untuk mengetahui keberadaan SNP pada -45 exon 2 gen adiponectin pada penderita T2D.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini mempunyai manfaat sebagai berikut:

1. Pengembangan informasi tentang polymorphism pada gen ADIPOQ penderita diabetes melitus type 2.
2. Mendapatkan Informasi hubungan SNP -45 exon 2 gen ADIPOQ dengan diabetes melitus type 2.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Melitus Type 2

Diabetes melitus merupakan penyakit yang ditandai dengan hiperglikemia dan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang dikaitkan dengan kerja serta sekresi insulin (Rahmasari dan Wahyuni, 2019). Kerja dari insulin dalam mengenali glukosa bisa digunakan untuk dasar membedakan penyakit diabetes yang sedang diderita oleh seseorang, misalnya adalah diabetes melitus tipe 2 (T2D).

Diabetes melitus tipe 2 terjadi karena adanya hiperinsulinemia, namun insulin tidak bisa membawa glukosa masuk ke dalam jaringan karena terjadi resistensi insulin. Resistensi insulin adalah keadaan dimana kemampuan insulin dalam merangsang pengambilan glukosa pada jaringan perifer menurun ditandai dengan berkurangnya sekresi insulin pada rangsangan glukosa. T2D lebih dari 90% dari keseluruhan populasi penderita diabetes. Menurut IDF (International Diabetes Federation) pada tahun 2011 ada 336 juta orang di seluruh dunia mengidap T2D, serta penyakit ini menjadi penyebab dari 4,6 juta kematian tiap tahunnya).

2.2 Adiponektin

Penelitian saat ini telah menunjukkan bahwa jaringan adiposa tidak hanya berfungsi sebagai tempat penyimpanan lipid, tetapi juga organ endokrin penting yang memainkan peran kunci dalam mengintegrasikan sinyal endokrin, metabolik, dan inflamasi serta mengatur homeostasis energi. Protein bioaktif yang berbeda secara kolektif disebut adipocytokines atau adipokines, telah terbukti mengeluarkan dari adiposit ke dalam sirkulasi. Di antara banyak adipositokin, adiponektin - protein sirkulasi paling melimpah yang disintesis hanya di jaringan adiposa yang bertindak sebagai hormon dengan anti-inflamasi, antidiabetes dan sifat sensitisasi insulin, diketahui memainkan peran penting dalam berbagai proses metabolisme termasuk kontrol glukosa dan katabolisme asam lemak. Penurunan kadar adiponektin plasma adalah sangat berkorelasi dengan patogenesis diabetes mellitus tipe 2 (T2DM) dan obesitas (D. Biswas, 2011).

Studi metabolisme hewan dan manusia menyarankan beberapa mekanisme dimana adiponektin dapat menurunkan risiko T2DM termasuk supresi glukoneogenesis hepatic, stimulasi oksidasi asam lemak di hati, stimulasi oksidasi asam lemak dan pengambilan glukosa di otot rangka, dan stimulasi insulin sekresi. Oleh karena itu, adiponektin tampaknya menjadi modulator utama kerja insulin dan kadarnya berkurang pada diabetes, yang dalam kondisi ini dapat menyebabkan resistensi insulin perifer (Tan JiaoJiao, 2020)

Adiponektin, protein 30kDa, dikodekan oleh gen APM1/ADIPOQ terdiri dari tiga ekson dan dua intron yang terletak pada kromosom 3q27, di mana lokus kerentanan diabetes dipetakan. Sampai sekarang, 19 polimorfisme umum dari 14 gen kandidat yang diketahui telah dianalisis di seluruh dunia untuk kontribusi mereka terhadap prevalensi dan kejadian intoleransi glukosa (Howlader, 2016). Meskipun ada bukti kuat bahwa beberapa polimorfisme bertanggung jawab untuk variasi adiponektin plasma, mekanisme yang tepat yang mendasari asosiasi varian genetik ini dalam adiponektin dengan kadar adiponektin yang bersirkulasi dan metabolismeciri-cirinya masih belum jelas dan belum dikenali.

2.3 Single Nucleotide Polymorphism (SNPs)

Single Nucleotide Polimorfism (SNPs) adalah perubahan pasangan basa tunggal dalam a urutan DNA yang merupakan varian genetic dengan frekuensi >1% dari yang besar populasi. 99,9% DNA manusia urutannya identik dan hanya ada 0,1% polimorfisme yang memberikan karakteristik unik dari setiap individu. Ada sekitar 10 juta SNP menyebar ke seluruh genom manusia, yang berarti bahwa SNP hadir di setiap 300 bp urutan DNA1 (LaFramboise, 2009).

Sebagian besar SNP (2/3) berlokasi di daerah non-coding (intron), dan sisanya berada di wilayah pengkodean. Di dalam umum satu SNP memiliki dua kemungkinan genotipe/alel (A/T atau C/G atau disebut 'A' atau 'B'), tetapi meskipun tri- atau empat-alel adalah langka, mereka memang ada. Alel ditugaskan ke kromosom yang membentuk apa disebut haplotipe, dan setiap individu memiliki dua haplotipe. Haplotipe adalah didefinisikan sebagai kombinasi dari himpunan SNP/alel yang muncul sebagai "terkait" blok” pada satu kromosom yang cenderung diwarisi bersama (Crawford dan Nickerson, 2005).

Blok haplotipe SNP ini dapat sebagai penanda genetik untuk melacak penyakit tertentu (berarti tidak langsung) melacak gen penyebab). Sebagai SNP dapat digunakan sebagai penanda genetik, dan teknologi canggih seperti susunan SNP platform (gambar 1) dirancang untuk mengidentifikasi SNP secara keseluruhan genom (Alkuraya, 2010).

2.3 Polimerfisme adiponectin gen yang berpengaruh terhadap diabetes tipe 2.

Pada penderita diabetes tipe 2 level plasma adiponectin lebih rendah jika dibandingkan dengan orang yang normal. Resistensi insulin dan diabetes melitus diketahui berkorelasi dengan jumlah adiponectin yang rendah. Beberapa SNP pada gen adipoQ (adiponectin gen) diketahui berhubungan terhadap fenomena ini.

SNP pada gen adipoQ berkorelasi dengan BMI, sensitivitas insulin dan diabetes tipe 2 SNP rs266729 dan rs17300539 baru-baru ini dipelajari secara ekstensif dipromotor gen ADIPOQ untuk diabetes tipe 2 (Stumvoll, et al., 2002). Mutasi missense dalam adiponektin telah diidentifikasi pada subjek dengan diabetes tipe 2. dan hipoadiponektinemia, dan beberapa mutasi ini telah terbukti menghambat multimerisasi dan sekresi adiponektin, konsisten dengan peran penyebab dalam diabetes

(Hara, et al., 2002). Banyak pekerjaan pada genetika polimorfisme yang terkait dengan diabetes juga sedang dilakukan. Ini Penelitian bertujuan untuk menentukan distribusi polimorfisme gen adiponectin dan juga meningkatkan tingkat pemahaman hubungan polimorfisme gen adiponektin dengan diabetes mellitus. Mungkin, ini adalah studi pertama yang menggambarkan semua SNP di adiponectin gen yang secara signifikan terkait dengan berbagai bentuk diabetes.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental berbasis laboratorium. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Pusat Studi (PS) Biologi Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spuit, jarum suntik, penampung darah, vacuum tube, turniket, tabung kultur darah, tabung koagulasi, tabung serum, tabung heparin, tabung EDTA, inhibitor glikolisis, PCR, Laminar air flow, 1,5 ml microfuge tube, micropipette (10 μ L, 100 μ L, dan 1000 μ L), thermal mixer, purification column, Centrifuge, waterbath sarung tangan latex, masker k-95, surat persetujuan patient diabetes melitus RS. Ngudi Waluyo Blitar untuk diambil sampel darah, g Eppendorf, mikropipet, tip, mortat, tabung Erlenmeyer, gelas ukur, penangas air (dengan suhu 80°C), magnetic stirrer, magnetic bar, sentrifuga, pinset, timbangan, pompa vacum, cetakan gel 20 x 16 x 1 cm³, timer, meja pendingin pembungkus plastik, freezer, kawat halus, inkubator, power supply, pisau, penggaris, spidol, kantong plastik tebal, pewarnaan, nampan plastik, spons.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah darah patient diabetes melitus type 2 di RS Ngudiwaluyo Blitar, SDS (Sodium Dodecyl Sulphate), Guanidine thiocyanate, Phenol, Phenol chloroform, isoamyl alcohol, ethanol, isopropanol, kapas alcohol, plester, EDTA, dNTP, Tris-HCl, KCL, MgCl₂, Polyacrylamide gel, primer forward, 5'-GGCTCAGGATGCTGTTGCTGG-3', dan reverse, 5'-GCT TTG CTT TCT CCC TGT GTC T-3' (amplifikasi 328 bp DNA); primer 5'-CTGCTATTAGCTCTGCCCGG-3' (primer sSNP pada +45), Snapshot Ddntp Primer Extension Kit, buccal swap, VTM.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan buccal swap dengan target sel epitel dinding pipi. Penderita diabetes melitus diminta untuk menggosok dinding pipi sebelah dalam masing-masing 12x. Buccal swap yang sudah digosokkan pada epitel pipi kemudian dimasukkan pada tabung VTM (Virus transfer media) dan disimpan pada termos dingin untuk dibawa ke laboratorium.

3.3.2 Estraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan kit NEx, dengan prosedur mengambil 200 µl vtm kemudian dipindahkan pada 1,5 ml tube. Ditambahkan Buffer GT1 sebanyak 200 µl pada tube, kemudian di vortex. Ditambahkan 200 µl buffer GT2 dan 20 µl Proteinase K, di mix menggunakan vortex. Diinkubasikan pada suhu 56°C selama 10 menit, selama inkubasi tube di bolak-balik setiap 5 menit. Ditambahkan 200 µl etanol absolut dan kemudian di vortex secara singkat. Dimasukkan sampel pada Spin Column dan sentrifuge selama 1 menit, kecepatan 13.000 rpm. Dibuang flow-through dan ditambahkan 500 µl buffer W1 pada Spin Column, kemudian disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Membuang flow-through dan tambahkan 700 µl buffer W2 (yang sudah ditambahkan ethanol) dan disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Dibuang flow-through kembali dan disentrifuge lagi selama 2 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Dipindahkan DNA pada Spin Column pada tube baru 1.5 ml. Ditambahkan 50 – 100 µl Elution Buffer dan inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit. Disentrifuge selama 1 menit dengan kecepatan 13.000 rpm. Dibuang DNA Spin Column dan dipurifikasi DNA untuk step selanjutnya. DNA disimpan pada -20oC dalam beberapa hari, -70oC untuk penyimpanan jangka panjang..

3.3.3 Amplifikasi PCR

Hasil isolasi kemudian di amplifikasi menggunakan mesin PCR Master Mix Nexpro dalam 30 µl larutan yang terdiri dari 15 µl PCR Master Mix Nexpro, 2,5 µl sampel DNA Template (100 ng/µl), 7,5 µl Water, 2,5 µl primer (10 pmol setiap primer forward dan reverse). Primer yang digunakan dalam uji ini adalah SNP 45 Forward (5' GGCTCAGGATGCTGTTGCTGG3') dan SNP 45 Reverse (5' GCTTTGCTTTCTCCC TGTGTCT 3'). Hasil PCR kemudian disekuensing menggunakan jasa sekuensing 1stBASE Laboratories Sdn Bhd.

Amplifikasi dilakukan dengan pengaturan suhu sebagai berikut, pre-denaturasi pada suhu 94 °C selama 4 menit, kemudian dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi suhu 94°C selama 30 detik, annealing pada suhu 57°C selama 30 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 30 detik. Selanjutnya dilakukan proses post elongation dengan suhu 72 °C selama 4 menit. Hasil PCR kemudian disekuensing menggunakan jasa sekuensing 1stBASE Laboratories Sdn Bhd.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi SNPs AdipoQ gene Adiponectin Penderita Diabetes Melitus tyoe 2

Sampel DNA diperoleh dari 8 penderita diabetes melitus type 2 di Desa Gledug kecamatan sanankulon berdasarkan data posyandu desa gledug. Berdasarkan program kerja dari Dinas kesehatan memang dilakukan pendataan dan pemantauan terhadap kondisi masyarakat yang menderita diabetes melitus type 2 di wilayah Kabupaten Blitar, salah satunya adalah untuk warga Desa gledug. Dari 20 orang yang terdata positive diabetes melitus tipe 2 hanya 8 orang yang setuju untuk menandatangani letter of concern dan dari 8 penderita tersebut hanya boleh diambil specimen berupa epitel bagian dalam dinding pipi menggunakan buccal swap, data konsentrasi gula darah penderita dengan anonym disediakan pada tabel 4.1

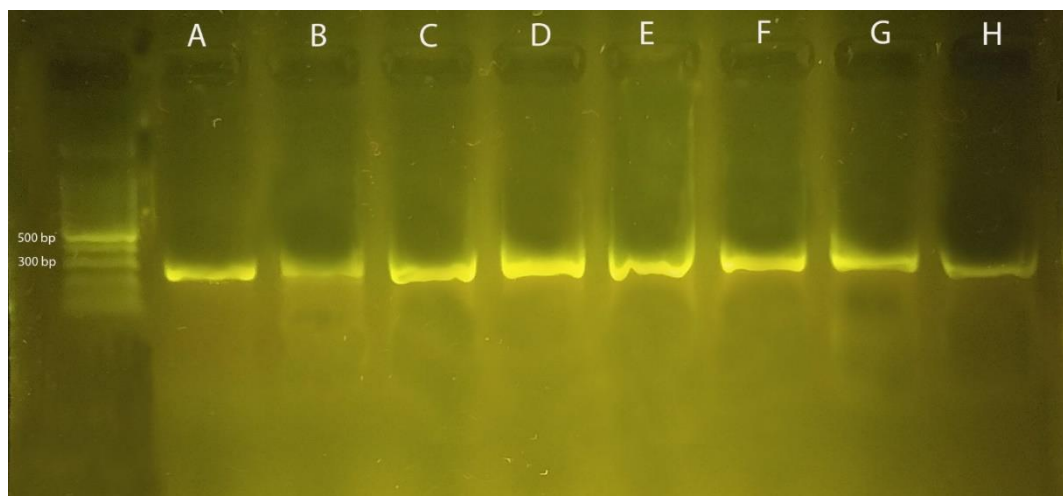
Tabel 4.1. Informasi data penderita dengan anoni

No	Anonim	Jenis kelamin	Usia (th)	Kadar gula (mg/dl)	Obat yag dikonsumsi	Konsumsi
1.	SR	P	55	160	Metformin	Tanpa nasi putih
2.	ASR	L	35	140	Metformin	Nasi
3.	KT	P	52	190	-	Tanpa nasi putih
4.	AKT	P	26	140	Amaryl	Nasi Putih
5.	BY	L	55	140	-	Tanpa Nasi Putih
6.	Y AB	P	13	180	-	Nasi Putih
7.	ST	P	53	170	Metformin	Nasi putih
8.	AST	L	81	140	-	Nasi Putih

Dari 8 responden yang tercatat sebagai penderita diabetes melitus ketika pengukuran gula darah sebelum dilakukan pengambilan sampel sel dinding pipi bagian dalam menunjukkan kadar gula dalam darah masih tidak begitu tinggi < 200 mg/dL (tabel 4.1). Kadar gula darah yang cukup rendah dari responden bisa dikarenakan karena pola makan yang sudah diperbaiki dan ataupun konsumsi obat penurun gula darah. Misalnya pada responden SR menurut data posyandu kesehatan desa gledug diketahui menderita diabetes melitus cukup lama, namun ketika pengambilan sampel yang bersangkutan memberikan diskripsi bahwa sudah tidak makan nasi putih, hanya mengkonsumsi nasi merah dan sayur mayor dengan porsi yang lebih kecil dari sebelumnya, bahkan yang bersangkutan menunjukkan bahwa mendapat resep dari bidan puskesmas berupa “Metformin” (obat penurun kadar gula darah).

Data screening responden ini digunakan untuk tambahan data dalam mengkaji hasil uji polimorfisme pada sampel sel epitel dinding pipi bagian dalam. Identifikasi polimorfisme menggunakan metode ekstraksi DNA yang dilanjutkan dengan PCR, pemurnian dengan gel electrophoresis (gambar 4.1.), sequencing (gambar 4.2.) dan identifikasi hasil sekuens menggunakan blast NCBI (tabel 4.2.)

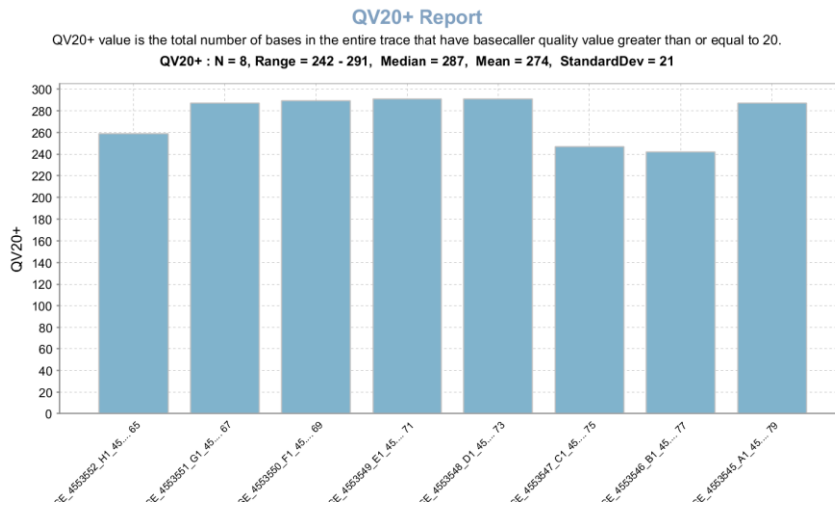
Ekstraksi DNA spesimen dilakukan dengan menggunakan kitNEX. DNA hasil isolasi kemudian diamplifikasi menggunakan mesin PCR Master Mix Nexpro dengan menggunakan primer spesifik untuk mengkopi region khusus gen adipoQ. Primer yang digunakan dalam uji ini adalah SNP 45 Forward (5' GGCTCAGGATGCTGTTGCTGG3') dan SNP 45 Reverse (5' GCTTTGCTTTCTCCC TGTGTCT 3'). Hasil amplifikasi diidentifikasi kemurniannya dengan menggunakan gel elektroforesis (Gambar 4.1), setelah didapatkan hasil bahwa yang teramplifikasi adalah gene target selanjutnya sampel DNA disekuensing menggunakan jasa sekuensing 1stBASE Laboratories Sdn Bhd.



Gambar 4.1. Hasil Elektroforesis

Keterangan A: ABY, B: AKT, C: AST, D: SR, E: ST, F: KT, G: BY, H:ASR

Delapan sampel yang diidentifikasi didapatkan hanya tujuh sampel yang sesuai dengan panjang sequence control (gambar 4.1) sedangkan satu sampel tidak bisa terbaca “smear”, sehingga hanya tujuh sampel yang dilanjutkan dengan sekuensing. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan jasa sekuensing 1stBASE Laboratories Sdn Bhd.



Gambar. 4.2. Hasil sequencing QV 20+

Gen SNP45 berhasil disekuensing dengan baik yang ditunjukkan dengan nilai Qv20+ sama dengan panjang basepair hasil sekuensing yaitu kurang lebih 242-291 base pair (gambar.4.2).



Gambar 4.3. The potential polymorphism on single nucleotide of the sample sequence. A the alignment result of gen ADIPOQ and SNP sequence sample SR, B the alignment result of gen ADIPOQ and SNP sequence sample KT, C the alignment result of gen ADIPOQ and SNP sequence sample ST

Alignment sequence sample dan sequence control gen ADIPOQ dengan nomor akses NG_021140.1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) diperoleh tiga kandidat polimorfisme dalam satu sekuens nukleotida SR, KT dan ST. Kandidat SNP dalam sekuens SR, KT dan ST semuanya tidak memiliki satu nukleotida adenin (A) dalam tiga sekuens. Proses tidak adanya nukleotida ini juga dikenal sebagai penghapusan (delesi)

Identifikasi SNP sering dilakukan dengan pencarian genetik untuk penyebab penyakit tertentu, adanya kelainan yang disebabkan oleh perubahan satu basa nukleotida dari gen tersebut. Penelitian ini berusaha untuk mengidentifikasi ada tidaknya kelainan pada gen seseorang yang pernah menderita diabetes melitus tipe 2 (DMT2).

Diabetes melitus tipe 2 disebabkan oleh gangguan sintesis hormon insulin. Sintesis hormon insulin dipengaruhi oleh beberapa gen, salah satunya adalah gen ADIPOQ atau APM1 atau disebut juga adiponektin. HMW adiponektin, yang memediasi sensitivitas insulin di jaringan perifer, adalah bentuk yang paling aktif secara fisiologis dalam hal homeostasis glukosa. Rasio kadar adiponektin

plasma HMW terhadap kadar adiponektin total (HMWR) jauh lebih efektif untuk memantau peningkatan sensitivitas insulin pada pasien diabetes tipe 2 yang menanggapi thiazolidinediones.

Dalam prosesnya, tiga kandidat SNP telah diperoleh (Gambar 4.3). Berdasarkan proses tersebut dapat diketahui bahwa kelainan pada sekuen sampel dibandingkan dengan sekuens kontrol adalah tidak adanya satu basa nukleotida adenin pada sekuen SR, KT, dan ST. Menurut database HapMap (<https://hapmap.ncbi.nlm>), ada lebih dari 100 SNP yang memetakan dan membentuk 2 blok haplotipe utama dalam lokus adiponektin. Polimorfisme ini, termasuk varian yang tidak umum dengan frekuensi alel minor (MAF) < 5 persen, diwakili oleh 21 tanda SNP (berhubungan dengan $r^2 > 0,8$). Berdasarkan database NCBI (<https://www.ncbi.nlm>), terdapat 29 SNP di daerah pengkodean adiponektin dimana 20 di antaranya merupakan mutasi missense. SNP yang berbeda dilaporkan dalam ADIPOQ terkait dengan kadar adiponektin dan/atau diabetes tetapi dengan temuan yang tidak konsisten.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari delapan spesimen sel mukosa mulut, DNA-nya berhasil diekstraksi dan setelah proses pemurnian, diperoleh tujuh sampel DNA yang siap untuk diurutkan. Berdasarkan hasil sekuensing, ketujuh sekuens tersebut memiliki nilai Qv20+ yang sama dengan pasangan basa sekuens yaitu 241-291 pasangan basa. Dan berdasarkan analisis keselarasan menggunakan blast, jika dibandingkan dengan sekuens gen adipoQ dengan nomor aksesori NG_021140.1, didapatkan bahwa sekuens KT, SR dan BP memiliki tingkat kemiripan 100%. Identifikasi kandidat SNP dengan tidak adanya nukleotida adenin ditemukan pada sekuens SR, KT dan ST.

5.2 Saran

Saran yang diajukan dari penelitian ini adalah perlu dilakukan analisis lebih jauh terhadap korelasi penggunaan obat penurunan gula darah dengan SNP 45 pada ADIPOQ dan kemungkinan diturunkannya SNP 45 ke keturunan.

DAFTAR PUSTAKA

- Baynes, H.W. "Classification, pathophysiology, diagnosis and management of diabetes mellitus." *Diabetes Metabol* 6, 2015: 1-9.
- D. Biswas, V. Vettriselvi, J. Choudhury, R. Jothimalar. " Adiponectin gene polymorphism and its association with type 2 diabetes mellitus." *Clin. Biochem.* 26, 2011: 172-177.
- FS, Alkuraya. " Homozygosity mapping: one more tool in the clinical geneticist's toolbox." *Genet Med* 12 (4), 2010: 236-391.
- Gu, H.F. "Biomarkers of adiponectin: plasma protein variation and genomic DNA polymorphisms." *Insights* 4, 2009: 34-53.
- Howlader, Mithu, Farzana Akter Mst Irin Sultana, and Md. Murad Hossain. "Adiponectin gene polymorphisms associated with diabetes mellitus: A descriptive review ." Department of Biotechnology and Genetic Engineering, Noakhali Science and Technology University, No, 20, 2016:1-58
- J. Fruebis, T.-S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M.R.S. Erickson, F.T. Yen, et al.,. "Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice." *Proc.Natl.Acad.Sci.Unit.States Am.* 98, 2001: 2005-2010.
- J.N.D. Altshuler, M.Hirschhorn, Klannemark, C.M. Lindgren, M.-C. Vohl, J. Nemesh, et al.,. "The common PPAR α Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes." *Nat. Genet*, 2000: 76-80.
- K. Hara, P. Boutin, Y. Mori, K. Tobe, C. Dina, K. Yasuda, et al.,. "Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population." *Diabetes* 51, 2002: 536-540.
- Stumvoll M, Tschritter O, Fritsche A, Staiger H, Renn W, Weisser M, Machicao F, Haring H. "Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes." *Diabetes*, 2002: 37-41.
- Tan Jiaojiao, Lv Haihong, * , Ma Yuping, Liu Chunhua, Li Qian, Wang Chenyi. "Analysis of angiographic characteristics and intervention of vitamin D in type 2 diabetes mellitus complicated with lower extremity arterial disease." Elsevier, 2020: 750-800.
- Ukkola O, Ravussin E, Jacobson P, Sjostrom L, Bouchard C. " Mutations in the adiponectin gene in lean and obese subjects from the Swedish obese subjects cohort." *Metabolism* 52, 2003: 881-884.