



Identification of the ND1 Mitochondrial Genes Carriers of Type 2 Diabetes Mellitus with Blood Sample

Identifikasi Gen ND1 Mitokondria Pembawa Sifat Diabetes Mellitus Tipe 2 dengan Sampel Darah

Hindah Sabrina Amin*, Miftahul Mushlih

Teknologi Laboratorium Medis, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Jl. Raya Rame Pilang No. 4 Wonoayu, Sidoarjo, 61261, Jawa Timur, Indonesia. Tel.: (031) 8962733

Diabetes Mellitus is a condition where there is an increase in blood glucose levels which is characterized by impaired insulin production or the inability of target tissues to respond to insulin. The purpose of this study was to determine the characteristics of the NADH Dehydrogenase 1 gene in the family of Type 2 Diabetes Mellitus patients. This study used a descriptive exploratory method. The sample came from a family of 5 people with T2D in Sidoarjo. Mitochondrial Genotype Analysis using PCR-Primary Sequencing Forward 5'GAGCAGAACCCAACCTCCGAGCAG3' (nt2826–2849) and Primary Rivers 5'GATTGTTTGGGCTACTGCTCG3' (nt3728 - 3749). Analysis of the 5 samples used obtained 2 samples that can be analyzed with a band length of 690 bp and 84 bp. Based on the results of primary research the sample used is difficult to get good amplification results. Only one out of five samples can be amplified properly. The variation of the amplified ND1 gene was found at positions T3031C, G3143C, A3252G, C3303T, C3707T.

Keywords: diabetes mellitus type 2, DNA mitochondria, NADH Dehydrogenase 1, sequencing, mutation

Diabetes Mellitus adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar glukosa darah yang ditandai dengan gangguan produksi insulin atau ketidakmampuan jaringan target untuk merespon insulin. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui karakteristik gen NADH Dehydrogenase 1 pada keluarga pasien Diabetes Mellitus tipe 2. Penelitian menggunakan metode deskriptif eksploratif. Sampel berasal dari satu keluarga penderita T2D sebanyak 5 orang di Sidoarjo. Analisis Genotipe Mitokondria dengan menggunakan PCR-Sekuensing Primer Forward 5'GAGCAGAACCCAACCTCCGAGCAG3' (nt2826–2849) dan Primer Rivers 5'GATTGTTTGGGCTACTGCTCG3' (nt3728 – 3749). Analisis terhadap 5 sampel yang digunakan didapatkan 2 sampel yang dapat dianalisis dengan panjang band 690 bp dan 84 bp. Berdasarkan hasil penelitian primer sample yang digunakan sulit

OPEN ACCESS

ISSN 2580-7730 (online)

Edited by:

Andika Aliviameita

Reviewed by:

Wimboh Tri Widodo

*Correspondence:

Hindah Sabrina Amin

hindahsabrina@gmail.com

Received: 19 Agustus 2020

Accepted: 23 September 2020

Published: 31 Desember 2020

Citation:

Amin HS and Mushlih M (2020)

Identification of the ND1

Mitochondrial Genes Carriers of

Type 2 Diabetes Mellitus with Blood

Sample

Medicra (Journal of Medical

Laboratory Science/Technology).

3:2.

doi:

10.21070/medicra.v3i2.873

mendapatkan hasil amplifikasi yang baik. Hanya satu dari lima sample yang dapat diamplifikasi dengan baik. Variasi gen ND1 hasil amplifikasi terdapat pada posisi T3031C, G3143C, A3252G, C3303T, C3707T.

Kata Kunci: diabetes mellitus tipe 2, DNA mitokondria, NADH Dehydrogenase 1, sekuensing, mutasi

PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus merupakan suatu kondisi kronis yang ditandai dengan gangguan produksi insulin atau ketidakmampuan jaringan target untuk merespon insulin [Andersson & Petersson \(2004\)](#). DM bersifat poligenetik [Lyssenko & Laasko, \(2013\)](#) dan dapat disebabkan dari faktor lingkungan [Asif \(2014\)](#). Salah satu gen yang diduga berkorelasi dengan kejadian Diabetes Mellitus tipe 2 adalah gen *NADH dehydrogenase 1* [Anani \(2008\)](#). Mutasi mt-DNA pertama kali dilaporkan pada A3243G yang berhubungan dengan sindrom MELAS (*encephalomyopathy, lactic acidosis, dan stroke-like episodes syndrome*). Pada titik tersebut juga diduga berkaitan erat dengan DM tipe II (DMT2) [Maksum et al. \(2010\)](#); [Sriwidodo et al. \(2008\)](#).

Protein ND1 merupakan sub unit dari *dehydrogenase NADH*, yang terletak di membran dalam mitokondria. Varian gen MT-ND 1 dikaitkan dengan kelainan yang disebabkan oleh cacat pada genome mitokondria yang diwariskan murni dari induk betina [Ishak et al. \(2014\)](#). Mekanisme fosforilasi oksidatif di dalam sel beta pankreas mengalami gangguan pada saat pengeluaran insulin sehingga kadar glukosa darah meningkat. Pada Proses fosforilasi oksidatif, mitokondria menghasilkan Adenosin Trifosfat (ATP) yang mengalami peningkatan sehingga beberapa senyawa kimia yang terkandung dalam ATP meningkat menyebabkan proses pengeluaran hormon insulin [Surudarma et al. \(2016\)](#).

Resiko terjadinya DM berbeda-beda setiap orang. Banyak faktor yang memicu kejadian sehingga seseorang didiagnosa menderita DMT2. Hasil laporan beberapa penelitian juga menunjukkan hasil yang berbeda beda terkait dengan hubungan mutasi gen ND 1 dengan DMT2. Analisa terhadap etnis Jawa menunjukkan tidak ditemukannya mutasi pada lokasi tersebut [Ishak et al. \(2014\)](#). Peneliti lain menunjukkan mutasi titik pada ND1 hanya ditemukan 20 persen dari penderita [Majamaa et al. \(1998\)](#). Penggunaan sampel untuk penelitian ini juga bermacam macam. Hal ini terkait dengan keberhasilan mendapatkan hasil yang baik. Berdasarkan latar belakang di atas tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi kelainan DNA Mitokondria pada gen *NADH Dehydrogenase 1 (ND1)* dari sampel darah.

METODE

Penelitian bersifat *Descriptive eksplorative*. sampel berasal dari keluarga yang memiliki riwayat DMT2 didapatkan dengan *Purposive sampling*. Ekstraksi DNA menggunakan protocol standart GeneAid kemudian dilakukan pengecekan konsentrasi menggunakan penggunaan UV Vis Spektrofotometer. Proses PCR dilakukan dengan volume 25µl dengan komposisi 13µl PCR, 6µl DNA, 3µl Primer F 5'-GAGCAGAACCCAACCTCCGAGCAG-3' dan 3 µl Primer R 5'-GATTGTTTGGGCTACTGCTCG-3'. Proses PCR dilakukan dengan Biorad T100 thermocycler dengan rincian

Pre-denaturasi 95°C, 5 menit; Denaturasi 95°C, 1 menit; Annealing 56°C, 1 menit; Extension 72°C, 1 menit; post extension 72°C, 10 menit sebanyak 45 siklus. Produk PCR kemudian dilakukan elektroforesis menggunakan gel agarosa 2%. Data diolah menggunakan Alignment Mega 6.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada Tabel 1, menunjukkan sebanyak 5 sampel digunakan dalam penelitian. 3 sampel yang terdiagnosis negatif DMT2 dan 2 sampel yang terdiagnosis positif DMT2. Pendeteksi sampel positif berdasarkan surat keterangan dokter sedangkan sampel negatif dilihat berdasarkan hasil pemeriksaan glukosa darah acak. Sedangkan pedigree keluarga DM tipe II yang digunakan sebagai sampel ada pada Gambar 1.

Sampel yang digunakan adalah *whole blood* dan menggunakan metode standart isolasi DNA GeneAid. Sampel kemudian diekstraksi, dan di PCR kemudian yang selanjutnya di sekuensing. Hasil sekuensing dianalisis berdasarkan Alignment Mega 6.0. hasil sekuen didapatkan panjang band 197bp pada sampel D1, 680 bp pada sampel D2, 221 bp sampel D3, 860 bp sampel D4, dan 430 bp sampel D5. Hasil kromatogram (Gambar 2) yang dihasilkan pada semua sampel menunjukkan 3 hasil yang kurang stabil yaitu pada sampel D1, D2, dan D3. Hasil kromatogram yang stabil pada sampel D4 dan D5. Analisis menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) digunakan untuk melihat bahwa sekuen yang di hasilkan merupakan bagian dari gen pada DNA mitokondria. Berdasarkan gambar analisis hasil BLAST dari NCBI menunjukkan bahwa hasil sekuen sampel D1, D2, & D3 tidak termasuk dalam genome mitokondria karena tidak didapatkan hasil yang sesuai. Sedangkan pada sampel D4 dan D5 menunjukkan bahwa sekuen tersebut termasuk dalam genome mitokondria.

Menurut [Santoso & Santri \(2016\)](#) mitokondria merupakan organel bermembran ganda yang berperang sebagai pembangkit energi, hasilnya yaitu terbentuknya ATP yang berperan sebagai simpanan energi sel. Mitokondria terdapat ditempat dimana ATP diperlukan, seperti dalam sel otot jantung dan leher sperma [Santoso & Santri \(2016\)](#). Berdasarkan pernyataan tersebut, kemungkinan ketidakberhasilan amplifikasi hingga sekuensing karena minimnya jumlah DNA mtokondria dari sampel genom yang diisolasi.

Penelitian sebelumnya pemeriksaan pada DNA mitokondria digunakan sampel sel epitel. Pada penelitian [Satiyarti \(2017\)](#) identifikasi fragmen DNA mitokondria pada satu garis keturunan ibu digunakan sampel dari sel epitel rongga mulut dan sel folikel akar rambut. Dengan menggunakan metode standart penggunaan *whole blood* dari darah untuk mengisolasi DNA mitokondria mungkin kurang disarankan karena jumlah serta target yang dihasilkan relatif sedikit. Pada saat penelitian yang sama dan menggunakan

sampel yang sama sebenarnya dilakukan PCR untuk gen lain pada inti sel namun menunjukkan hasil yang berbeda. Kegagalan tersebut dapat diakibatkan oleh primer yang kurang spesifik. Diabetes Mellitus didominasi oleh resistensi insulin disertai oleh gangguan fungsi insulin. Kaitannya dengan mutasi pada DNA mitokondria karena pada proses produksi insulin berkaitan dengan mekanisme fosforilasi oksidatif didalam sel beta pankreas. Peningkatan ATP menyebabkan peningkatan beberapa senyawa dalam ATP dan peningkatan tersebut memicu pengeluaran insulin [Surudarma \(2017\)](#).

Hasil alignment susunan nukleotida terhadap sampel dari GenBank dengan program Mega Software 6.0 disajikan pada Gambar 3. Hasil tersebut digunakan untuk melihat adanya mutasi pada sampel yang diperiksa. Pada sampel D4 dengan panjang sekuen 690 bp yang sudah disejajarkan diduga terjadi mutasi pada T3028C dan C3707T (Gambar 3. Kotak dengan panah warna kuning). Mutasi pada titik 3028 terjadi perubahan basa nukleotida dari Timin menjadi Cytosin. Sedangkan pada titik 3707 terjadi perubahan basa nukleotida dari Cytosin menjadi Timin. Hasil sekuen tersebut error pada titik 3071, 3074, 3075, 3076, 3678, dan 3679. Adapula ditemukan delesi pada hasil sekuens pada titik 3113.

Pada sampel D5 dengan panjang sekuen 84 bp yang sudah disejajarkan, terjadi mutasi pada T3028C dan G3143C. Berbagai mutasi yang telah dilaporkan berkaitan dengan Diabetes Mellitus diantaranya A3243G [Maksum et al. \(2010\)](#).

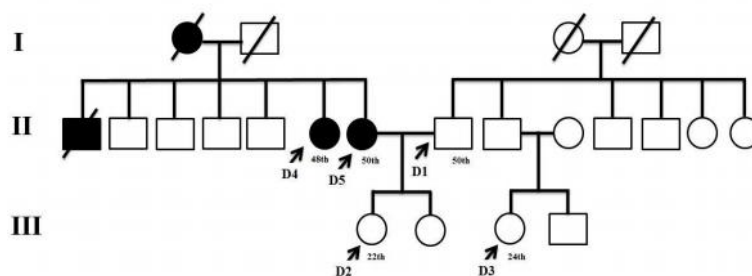
T3200C [Ishak et al. \(2014\)](#); [Maksum et al. \(2010\)](#) G3316A [Alexandar et al. \(2017\)](#) serta beberapa titik lain C1310T, A1382C, G1438A, A1202G, A3252G, A3256T, A3264C, A3271C, T3290C, C3303T, T3394C, A8296G, A8344G, G11778A, A12026G, C11258A, T14577C, T14709C, T16189C [Tang et al. \(2006\)](#); [Surudarma et al. \(2015\)](#). Mutasi yang paling dinyatakan berkaitan dengan DMT2 adalah A3243G namun pada penelitian ini tidak ditemukan mutasi tersebut. Mutasi Pada titik A3252G dan C3303T mungkin dapat dijadikan penciri Diabetes Mellitus pada populai tertentu di wilayah Sidoarjo. Dari hasil mutasi yang didapatkan pada sampel D4 Dan D5 keempat titik yang mengalami mutasi tidak termasuk dalam titik yang diduga telah dilaporkan berkaitan dengan Diabetes Mellitus.

KESIMPULAN

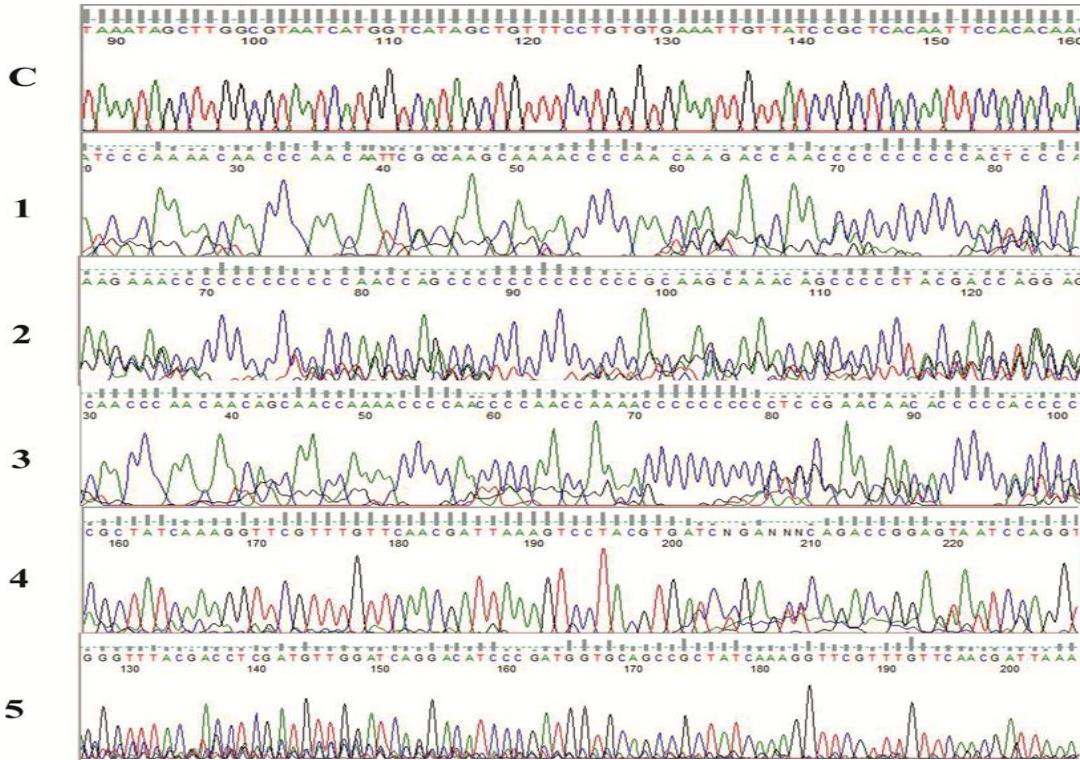
Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan hasil analisis menunjukkan Adanya dugaan mutasi pada titik T3031C, G3143C, A3252G, C3303T, dan C3707T akan tetapi tidak ditemukan mutasi pada titik A3256T, A3264C, A3271C, T3290C, G3316A, dan T3394C yang diduga berkaitan dengan Diabetes Mellitus.

Tabel 1 | Karakteristik Glukosa Darah Acak dan Status Sampel DMT2

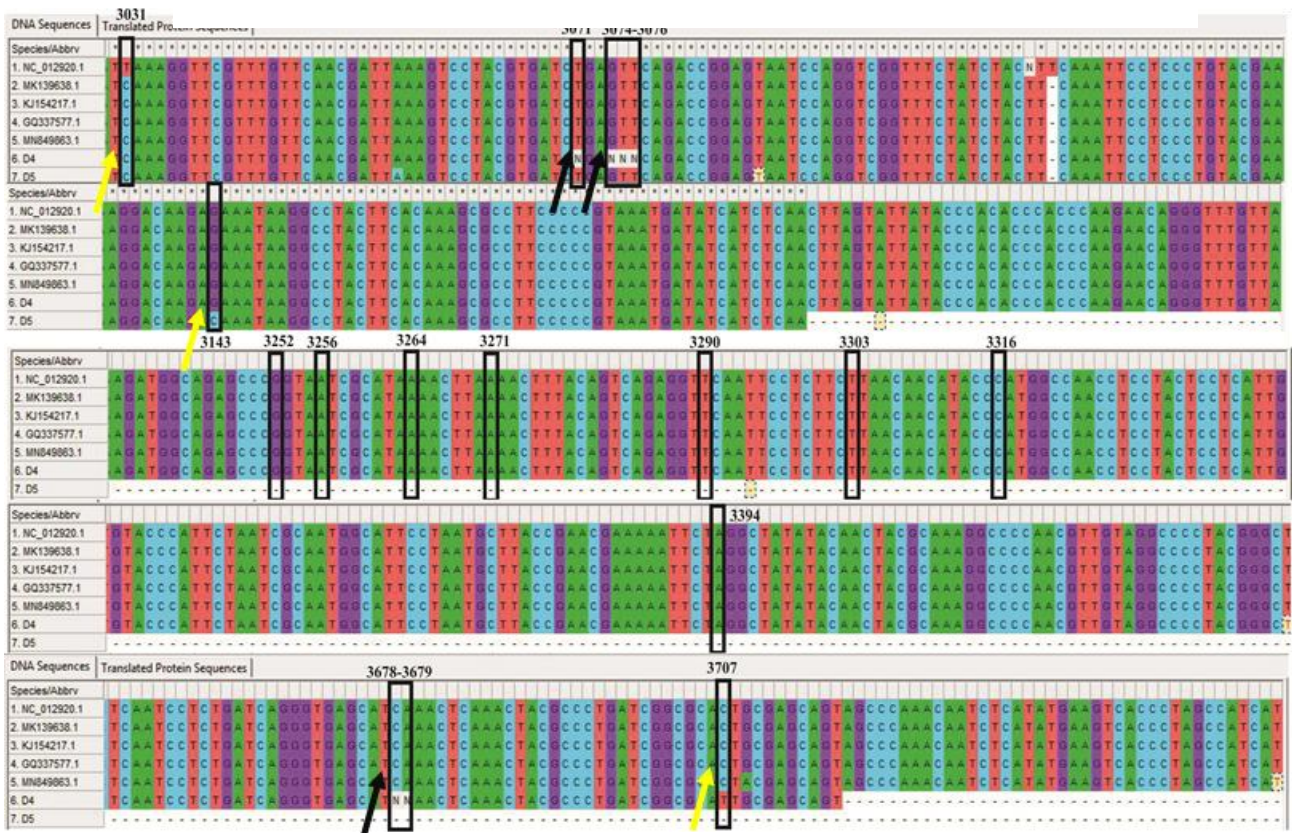
Kode Sampel	GDA(mg/dL)	Status Responden
D1	100	Negatif DM
D2	80	Negatif DM
D3	85	Negatif DM
D4	210	Positif DM
D5	200	Positif DM



Gambar 1 | Pedigree keluarga DM tipe 2 yang digunakan sebagai sampel. Keterangan tanda panah merupakan sampel yang dijadikan sampel.



Gambar 2 | Potongan Hasil Kromatogram hasil proses Sekuensing
 Keterangan : C = Control, 1 = Sampel D1, 2 = Sampel D2, 3 = Sampel D3, 4 = Sampel D4, 5 = Sampel D5



Gambar 3 | Hasil Alignment Sekuen gen NADH Dehydrogenase 1 di bandingkan dengan normal sekuen gen NADH Dehydrogenase 1dari (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/51>)
 Keterangan: Panah Hitam Kegagalan pembacaan Nukleotida; Panah Kuning: Mutasi

KONTRIBUSI PENULIS

Penulis pertama melakukan pengumpulan data, dan penyusunan artikel oleh penulis kedua

PENDANAAN

Penelitian dibiayai oleh institusi UMSIDA

REFERENSI

- Alexandar, S. P., Dhinakaran, I., Ravi, V., Parthasarathy, N., Ganesan, S., Bhaskaran, M., & Arun Kumar, G. P. (2017). Meta-Analysis of Association of Mitochondrial DNA Mutations with Type 2 Diabetes and Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Human Genetics*, 17(4), 177–190. doi: 10.1080/09723757.2018.1430110
- Anani, L. (2008). *Prevalence of 15 Mitochondrial DNA Mutations Among Type 2 Diabetic Patients with or without Clinical Characteristics of*. 1228–1235.
- Andersson, D. K., & Petersson, C. (2004). Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 27 (Suppl 1), S11-14. doi: 10.2337/diacare.27.2007.S11
- Asif, M. (2014). The prevention and control the type-2 diabetes by changing lifestyle and dietary pattern. *Journal of Education and Health Promotion*, 3(1), 1. doi: 10.4103/2277-9531.127541
- Ishak, A. R., Puspitaningrum, R., Utari, R. D., Feranita, M., Adhiyanto, C., Nitta, T., Susanto, A. B., Yukio, H., & Yamashiro, Y. (2014). Mutation of mtDNA ND1 Gene in 20 Type 2 Diabetes Mellitus Patients of Gorontalo and Javanese Ethnicity. *HAYATI Journal of Biosciences*, 21(4), 159–165. doi: 10.4308/hjb.21.4.159
- Lyssenko, V., & Laasko, M. (2013). Genetic Screening for the Risk of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, 36, 120–126. doi: 10.2337/dcS13-2009
- Majamaa, K., Moilanen, J. S., Uimonen, S., Remes, A. M., Salmela, P. I., Kärppä, M., Majamaa-Voltti, K. A. M., Rusanen, H., Sorri, M., Peuhkurinen, K. J., & Hassinen, I. E. (1998). Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: Prevalence of the mutation in an adult population. *American Journal of Human Genetics*, 63(2), 447–454. doi: 10.1086/301959
- Maksum, I. P., Sriwidodo, Suprijana, O., Natadisastra, G., Nuswantara, S., & Noer, A. S. (2010). Identification of the a3243G Heteroplasmy Mutation and Study of Maternal Inheritance in the Type-2 Diabetes Mellitus Patients. *Bionatura-Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati Dan Fisik*, 12(2), 78–85.
- Santoso dan Santi, (2016). *Biologi Molekular Sel*. Jakarta : Salemba Tanika
- Satiyarti, R. B., Nurmilah, N., & Rosahdi, T. D. (2017). Identifikasi Fragmen Dna Mitokondria Pada Satu Garis Keturunan Ibu Dari Sel Epitel Rongga Mulut Dan Sel Folikel Akar Rambut. *Biosfer: Jurnal Tadris Biologi*, 8(1), 13–27. doi: 10.24042/biosf.v8i1.1260
- Sriwidodo, Suprijana, O., Subroto, T., & Maksum, I. P. (2008). Studi Mutasi Titik a3243G Dna Mitokondria Penyebab Maternaly. *Pharmaceutical Sciences and Research*, V(3), 121–129.
- Surudarma, I. W., Wihandani, D. M., & Dwipayana, I. M. P. (2015). Identifikasi Mutasi Heteroplasmi A3243G mtDNA dengan Metode PCR Allele ' s Specific Amplification (PASA) pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2 Suku Bali. 1–22. Retrieved from <https://repository.unud.ac.id/protected/storage/upload/penelitianSimdos/e37b7180ab0cb37cda0c013c6c159740.pdf>
- Tang, D. L., Zhou, X., Li, X., Zhao, L., & Liu, F. (2006). Variation of mitochondrial gene and the association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Diabetes research and clinical practice*, 73(1), 77–82. doi: 10.1016/j.diabres.2005.12.001

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih diucapkan kepada tim biologi Molekular Umsida Fitri, Bayu, Cintya, dan Ana yang telah berkerja keras. Terimakasih pula pada DRPM Umsida yang telah mensupport melalui dana hibah 2020 dan Lab Biologi Molekular UMSIDA yang telah memberi fasilitas penelitian.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Amin and Mushlih. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.