

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

by Hindah Sabrina Amin

Submission date: 14-Feb-2021 10:30PM (UTC+0700)

Submission ID: 1509157478

File name: Artikel_29.docx (2.07M)

Word count: 1324

Character count: 8306

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

Diabetes Mellitus adalah keadaan dimana terjadi peningkatan kadar glukosa darah yang ditandai dengan gangguan produksi insulin atau ketidak mampuan 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 Reverse 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 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, Sekuensing, Mutasi, NADH Dehydrogenase 1*

PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus merupakan suatu kondisi kronis yang ditandai dengan gangguan produksi insulin atau ketidak mampuan 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) (Kadowaki et al., 1994). Pada titik tersebut juga diduga berkaitan erat dengan DM type 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).

Risiko terjadinya DM berbeda beda setiap orang. Banyak factor 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 Dehidrogenase 1 (ND1)* dari sampel darah

METODE

Penelitian bersifat *Deskriptive eksplorative*. sampel berasal dari keluarga yang memiliki riwayat DMT2 didapatkan dengan *Purposive sampling*. Ekstraksi DNA menggunakan protocol standart GeneAid kemudian dilakukan pengecekan konsentrasi menggunakan menggunakan UV Vis Spektrofotometer. Proses PCR dilakuan 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 Predenaturasi 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.

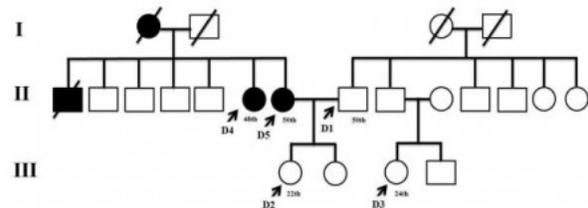
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 5 sampel digunakan dalam penelitian ini yang terdiri dari 3 sampel yang terdiagnosis negative DMT2 dan 2 sampel yang

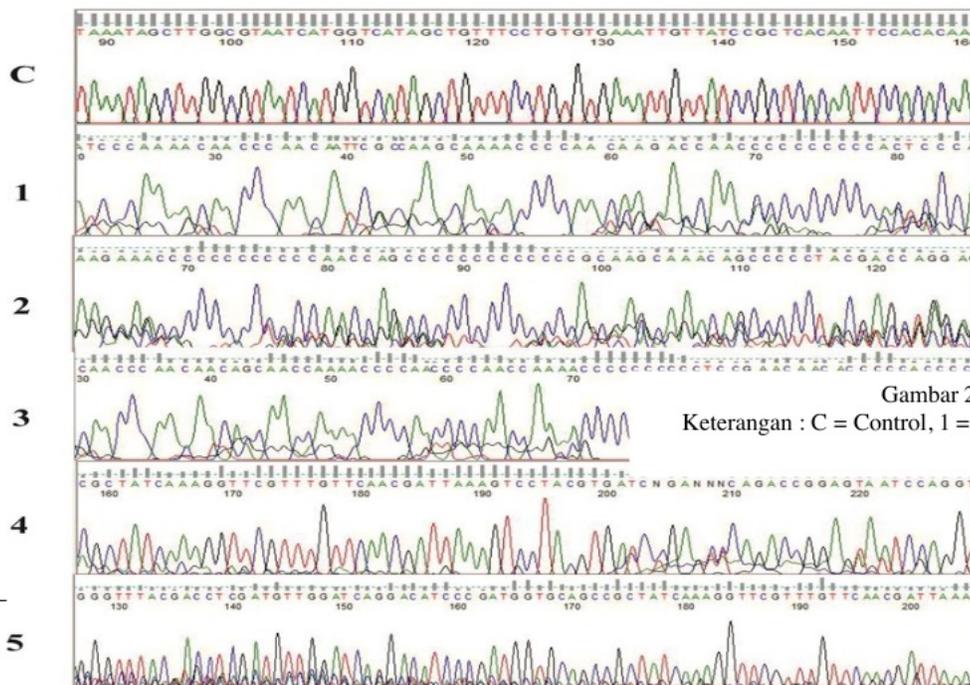
terdiagnosis positif DMT2. Pendeteksi sampel positif berdasarkan surat keterangan dokter sedangkan sampel negatif dilihat berdasarkan hasil pemeriksaan gula darah acak.

Table 1. Kharakteristik gula darah dan status DMT2 sampel

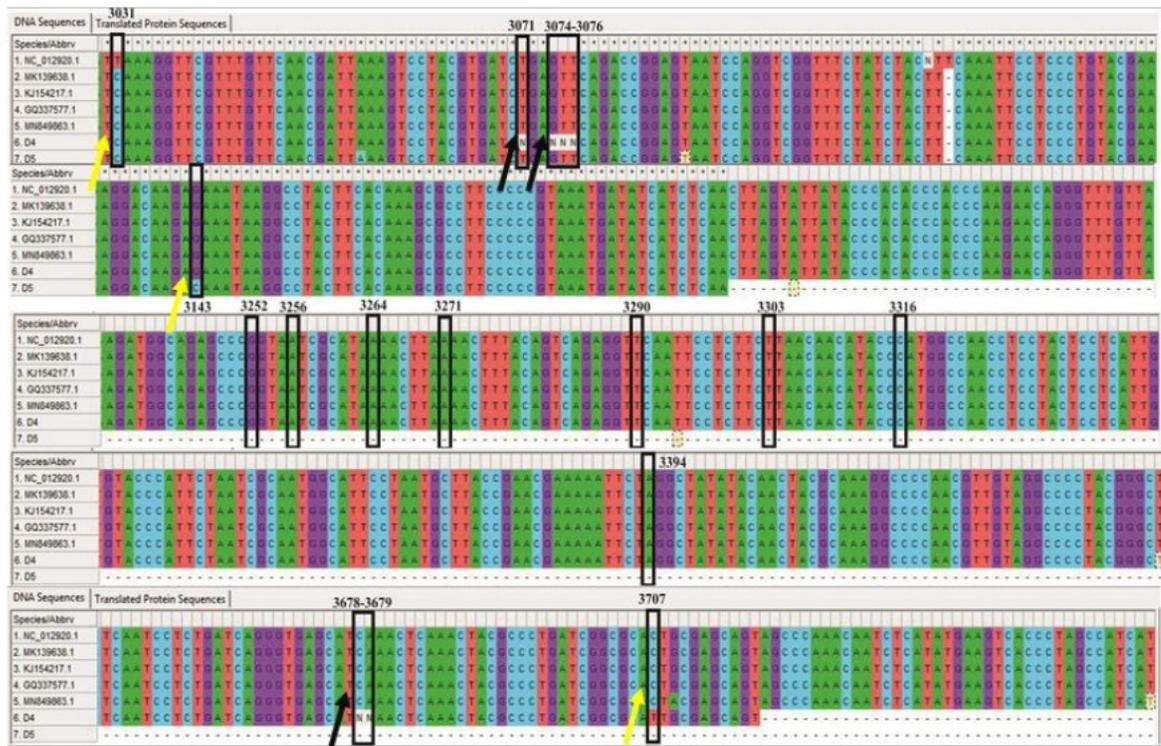
Kode Sampel	GDA(mg/dL)	Status Responden
D1	100	Negatif DM
D2	80	Negatif DM
D3	85	Negatif DM
D4	210	Positif DM
D5	200	Positif DM



Gambar 1. Pedigree keluarga DM type II yang digunakan sebagai sampel. Keterangan tanda panah merupakan sampel yang dijadikan sampel.



Gambar 2. Potongan Hasil Kron
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 1 dari NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/51>) ket. Keterangan: Panah Hitam Kegagalan pembacaan Nukleotida; Panah Kuning: Mutasi genom mitokondria.

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 sekuensing 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 yang dihasilkan pada semua sampel menunjukan 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 menunjukan bahwa hasil sekuen sampel D1, D2, & D3 tidak termasuk dalam genome

Munurut 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 ketidak berhasilan Amplifikasi hingga Sekuensing karena minimnya jumlah DNA Mitokondria 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 Wholeblood 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 pancreas. 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 Timinin 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, A1026G, 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.

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 dana melalui dana hibah 2020 dan Lab Biologi Mlekular UMSIDA yang telah memberi fasilitas penelitian

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

ORIGINALITY REPORT

2%

SIMILARITY INDEX

0%

INTERNET SOURCES

2%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

Liao, Wen-Qiang, Yan Pang, Chang-An Yu, Jian-Yan Wen, Yi-Guan Zhang, and Xiao-Hui Li. "Novel Mutations of Mitochondrial DNA Associated with Type 2 Diabetes in Chinese Han Population", *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 2008.

Publication

2%

Exclude quotes On

Exclude bibliography On

Exclude matches < 2%