

Primer Construction to detect SNP rs11196205 Transcription Factor 7 Like 2 (*TCF7L2*) Using Amplification Refractory Mutation System (ARMS) PCR to detect Type-2 Diabetes Mellitus

Elsa Badriyya^{1*}, Afifatul Achyar²

Fakultas Farmasi Universitas Andalas, Padang^{1*}

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Padang, Padang²

*Correspondence author: elsabadriyya@phar.unand.ac.id

Abstrak. Type-2 Diabetes Mellitus (T2DM) is a metabolic disease characterized by an increase of blood glucose levels. Macrovascular and microvascular complication of T2DM can increase the risk of death in patient. SNP rs11196205 Transcription Factor 7 Like 2 (*TCF7L2*) gene has been associated with T2DM in several regions like Iceland, Denmark, United State and Thailand. SNP rs11196205 is characterized by polymorphism at position 113.047.288 from nucleotide Guanine to Cytosine. Amplification Refractory Mutation System Polimerase Chain Reaction (ARMS PCR) is a method that can be used to detect mutation or polymorphism in a DNA. The aim of this research was to design a specific primer to detect SNP rs11196205 *TCF7L2* gene using ARMS PCR. Design of study was a descriptive study to determine the specific primer. The method of the research includes DNA isolation, primer design using Geneious software, amplification of targeted area using ARMS PCR, and DNA sequencing method for bioinformatic study. Based on the research, four primers to detect SNP rs11196205 *TCF7L2* gene have been successfully constructed. The primers were rs11196205-F, rs11196205-R, rs11196205-F(C) as a specific primer for C allele, and rs11196205- R(G) to detect G allele, the reaction produced 3 fragments of 856bp, 559bp, and 339bp.

Keywords: Type 2 Diabetes Mellitus, *TCF7L2*, SNP rs11196205, Primer



This is an open access article distributed under the Creative Commons 4.0 Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. ©2020 by author.

1. PENDAHULUAN

Diabetes melitus tipe 2 (DMT2) merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa darah (hiperglikemia) yang disebabkan oleh defisiensi sekresi dan/atau insufisiensi fungsi insulin. Penderita DMT2 umumnya mengalami komplikasi serius pada jantung, pembuluh darah, mata, ginjal, sistem syaraf dan gigi [1]. Prevalensi DMT2 di dunia pada tahun 2019 sekitar 9.3%. Indonesia menempati urutan ketujuh dengan perkiraan

jumlah pasien DM sekitar 10.7 juta pada tahun 2019 dan diprediksi meningkat menjadi 13.7 juta pada tahun 2030[2]

Upaya preventif merupakan salah satu usaha dalam menurunkan angka kejadian DMT2, sehingga dibutuhkan suatu marker yang dapat dijadikan parameter untuk mendeteksi dini risiko DMT2. Salah satu marker yang banyak diteliti adalah *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) pada suatu gen. SNP diharapkan memiliki asosiasi dengan risiko DMT2 sehingga dapat dilakukan upaya preventif yang lebih ekonomis dibandingkan dengan terapi seumur hidup pasien penderita DMT2.

Gen yang memiliki asosiasi terkuat dengan DMT2 adalah *Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2)* [1]. Gen *TCF7L2* mengkode faktor transkripsi *High Mobility Group* (HMG) yang berperan dalam jalur sinyal Wnt. Jalur sinyal Wnt memproduksi hormon inkretin yang mengontrol ekspresi dan fungsi beberapa hormon yang penting pada homeostasis glukosa seperti GLP-1, GIP dan insulin [3]

SNP rs11196205 pada gen *TCF7L2* merupakan polimorfisme yang terjadi pada posisi 113.047.288 dimana terjadi mutasi dari nukleotida guanin menjadi sitosin. Polimorfisme pada posisi tersebut menyebabkan peningkatan risiko kejadian DMT2 pada beberapa negara. SNP rs11196205 dilaporkan memiliki asosiasi dengan kejadian DMT2 pada Islandia, Denmark, Amerika Serikat, dan Thailand [4] [5]. SNP rs11196205 berada pada daerah intron diantara ekson 5 dan 6 yang tidak mengalami translasi, namun polimorfisme diduga mempengaruhi proses transkripsi dan splicing dari gen. [3]

ARMS PCR merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi atau polimorfisme pada suatu DNA. Pada metode ARMS PCR digunakan tiga buah primer dengan salah satu primer akan mengenali secara spesifik keberadaan suatu alel. Ujung 3' dari primer spesifik akan menempel pada DNA cetakan yang mengalami mutasi. [6]

Sebelumnya telah ditemukan asosiasi antara keberadaan SNP rs7903146 gen *TCF7L2* pada etnis Minangkabau, dimana mutasi dapat meningkatkan risiko terjadinya DMT2 [7]. Gen *TCF7L2* dilaporkan memiliki beberapa titik mutasi yang berhubungan dengan kejadian DMT2 pada beberapa etnis. Sehingga dengan penelitian ini, dapat dipetakan SNP yang secara spesifik berasosiasi dengan DMT2 pada etnis Minangkabau dan etnis lainnya.

Tujuan penelitian adalah untuk menentukan primer yang spesifik pada identifikasi keberadaan SNP rs11196205 gen *TCF7L2*. Keberadaan SNP digunakan sebagai penanda sehingga dapat digunakan sebagai metode pemeriksaan molekular dini DMT2 yang akurat. Metode pemeriksaan yang dipilih adalah ARMS PCR yang menggunakan dua pasang primer untuk mendeteksi keberadaan SNP, Hasil PCR selanjutnya akan *sequencing* untuk mengkonfirmasi kebenaran primer yang didisain. Penemuan SNP rs11196205 sebagai

marker diharapkan dapat meningkatkan kesadaran masyarakat yang memiliki risiko DMT2 untuk melakukan upaya preventif lebih dini.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang mendeskripsikan hasil disain primer yang digunakan untuk mendeteksi keberadaan SNP dan menguji kemampuan primer untuk mengamplifikasi daerah yang diharapkan. Identifikasi keberadaan SNP dan genotipe sampel dilakukan menggunakan metode ARMS PCR. Primer dirancang berdasarkan urutan gen *TCF7L2* menggunakan program Geneious. Pada penelitian digunakan dua pasang primer, masing-masing untuk deteksi keberadaan alel G dan alel C. Ukuran produk ARMS PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa 2% (Vivantis).

Primer dirancang menggunakan program Geneious berdasarkan urutan gen *Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2)* (Acc. nr. NG012631) dari situs <http://ncbi.nlm.nih.gov>. Primer yang dirancang harus memenuhi syarat tertentu yaitu memiliki suhu leleh primer (T_m) dalam rentang 50-60 °C dan tidak memiliki kecenderungan membentuk struktur *hairpin* dan/atau *self-dimer* yang stabil. Primer yang dipilih dicek pada situs <http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> untuk memastikan spesifisitas primer. Pemeriksaan dilakukan untuk memeriksa adanya kemungkinan mispriming primer dengan daerah lain pada gen *TCF7L2*. Jika primer sudah diperiksa, maka hasil disain primer siap untuk di sintesis.

Sampel yang diperoleh dari pembuluh darah vena, disimpan pada tabung yang mengandung EDTA (0,1 mmol/L). Isolasi DNA dilakukan menggunakan *Purelink Genomic DNA Kits* (Invitrogen) yang terdiri dari proteinase K, RNase A, *Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer*, *Purelink Genomic Wash Buffers I dan II*, *Purelink Genomic Elution Buffer*, Etanol 96-100%. Hasil isolasi DNA dideteksi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5% (Vivantis) dengan tegangan 100 V selama 30 menit.

Penentuan keberadaan alel C dan G pada sampel dilakukan menggunakan ARMS PCR. Formula yang digunakan pada penentuan keberadaan alel C adalah *GoTaq Green Master Mix 1X* (Promega), Primer rs11196205-F 0,05 μ M, Primer rs11196205-R 0,4 μ M, Primer Spesifik Alel C rs11196205-F(C) 1,5 μ M, $MgCl_2$ 1 mM, DMSO (Sigma) 4%, *Nuclease-Free Water* (Promega), dan 0,5 μ L DNA cetakan. Pada penentuan keberadaan alel G, formula yang digunakan adalah *GoTaq Green Master Mix 1X* (Promega) , Primer rs11196205-F 0,4 μ M, Primer rs-11196205-R 0,1 μ M, Primer Spesifik Alel G rs11196205-R(G) 0,6 μ M, $MgCl_2$ 0,6 mM, *Nuclease-Free Water* (Promega), dan 0,5 μ L DNA cetakan.

Kondisi PCR yang digunakan adalah denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 3 menit dan denaturasi tiap siklus pada suhu 95 °C selama 30 detik. Suhu penempelan primer adalah 60 °C pada 5 lima siklus pertama, lalu diturunkan 1 °C/siklus sampai suhu 50 °C, dan suhu 50 °C pada 20 siklus terakhir untuk memperoleh pita yang lebih tebal. Suhu pemanjangan produk adalah 72 °C selama 45 detik dan pemanjangan akhir pada suhu 72 °C selama 7 menit. Produk ARMS-PCR dideteksi menggunakan elektroforesis gel agarosa 2% (Vivantis).

Gel agarosa dibuat dengan menimbang sejumlah agarosa yang dicampurkan dengan TBE 0,5X, kemudian dipanaskan hingga diperoleh larutan homogen. Dapar Tris-Borat-EDTA (TBE) 0,5X mengandung 108 g Tris dan 55 g Asam Borat dalam 800 ml akuades dan 40 ml Na₂EDTA 0,5 M tiap 1 L. Konsentrasi gel agarosa yang digunakan untuk deteksi isolat DNA adalah 1,5% (1,5 g agarosa dalam 100 mL TBE), sedangkan untuk deteksi produk ARMS PCR adalah 2% (2 g agarosa dalam 100 mL TBE). Pada larutan gel agarosa ditambahkan 8 µL *Red-Safe* (Intron Biotechnology) untuk memvisualisasikan DNA saat dipaparkan sinar UV. Larutan dituang ke dalam cetakan yang telah dipasang sisir kolom, dan ditunggu hingga padat. Gel agarosa ditempatkan pada wadah elektroforesis yang berisi larutan TBE 0,5X.

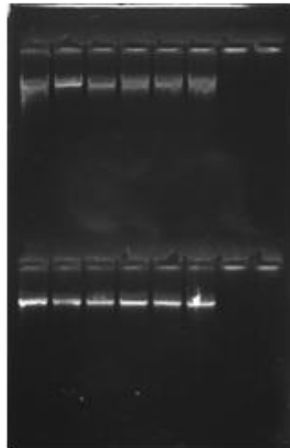
Pada deteksi isolat DNA, campuran 3 µL isolat DNA dan 2 µL *DNA loading dye* (Vivantis) dimasukkan dalam *well*. Elektroda pada wadah dihubungkan dengan dengan *power supply* dengan tegangan 100 V selama 30 menit. Pada deteksi produk ARMS-PCR, sampel dan marker dimasukkan ke dalam *Well* masing-masing 7 µL dan 4 µL dengan tegangan 120 V selama 65 menit. DNA hasil elektroforesis gel agarosa divisualisasi menggunakan alat *Gel Doc*.

Hasil ARMS PCR sampel selanjutnya *disequencing* untuk membuktikan apakah gen yang amplifikasi sudah tepat dan primer berhasil dalam mengamplifikasi daerah yang dibutuhkan. Data dianalisis secara kualitatif, data yang dianalisis adalah hasil konstruksi primer dan kemampuan primer mengamplifikasi daerah yang diinginkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel pada penelitian diperoleh dari pembuluh darah vena, disimpan pada tabung yang mengandung EDTA (0,1 mmol/L). DNA di isolasi menggunakan protokol *Purelink Genomic DNA Kits* dan hasil isolasi diuji keberadaannya menggunakan elektroforesis agarose (Gambar 1). Prinsip dasar dari isolasi DNA adalah dengan memecah serta mengekstrak jaringan hingga diperoleh DNA yang dibutuhkan.

1 2 3 4 5 6



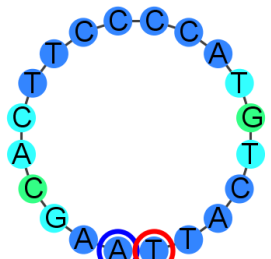
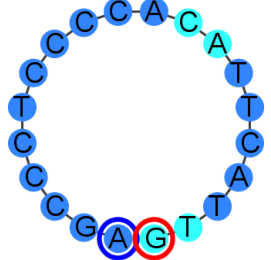
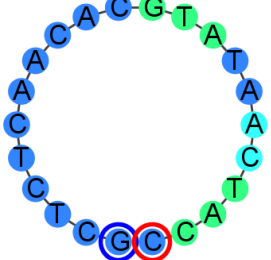
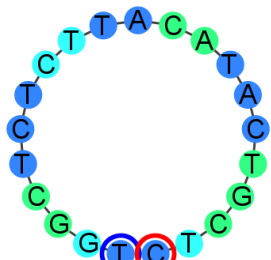
Gambar 1. Pita DNA hasil elusi pertama (atas), dan pita DNA hasil elusi ke dua (bawah)

Gen *TCF7L2* mengkode faktor transkripsi *High Mobility Group* (HMG) yang berperan dalam jalur sinyal Wnt. Jalur sinyal Wnt memproduksi hormon inkretin yang mengontrol ekspresi dan fungsi beberapa hormon yang penting pada homeostasis glukosa seperti GLP-1 dan GIP[3]. Variasi gen *TCF7L2* seperti rs11196205 diduga mempengaruhi konversi proinsulin menjadi insulin[6], penurunan produksi hormon inkretin, serta memiliki hubungan dengan penurunan sensitivitas insulin di seluruh tubuh dan insulin hepatic [1]

Pada pemeriksaan SNP menggunakan reaksi PCR perlu dilakukan konstruksi primer yang dapat mengidentifikasi keberadaan SNP. Primer dirancang menggunakan program *Geneious* berdasarkan urutan gen *TCF7L2*. Primer yang baik memiliki ukuran 18-22 pb, T_m pada rentang 52-58°C, toleransi perbedaan T_m antar primer adalah 3-5 °C, memiliki GC pada rentang 30-60 %, dan tidak membentuk *self-dimer* dan *hairpin*. *Hairpin* dan *self-dimer* merupakan struktur sekunder yang dihasilkan dari interaksi intermolekular dan intramolekular primer yang dapat mengganggu hasil PCR.

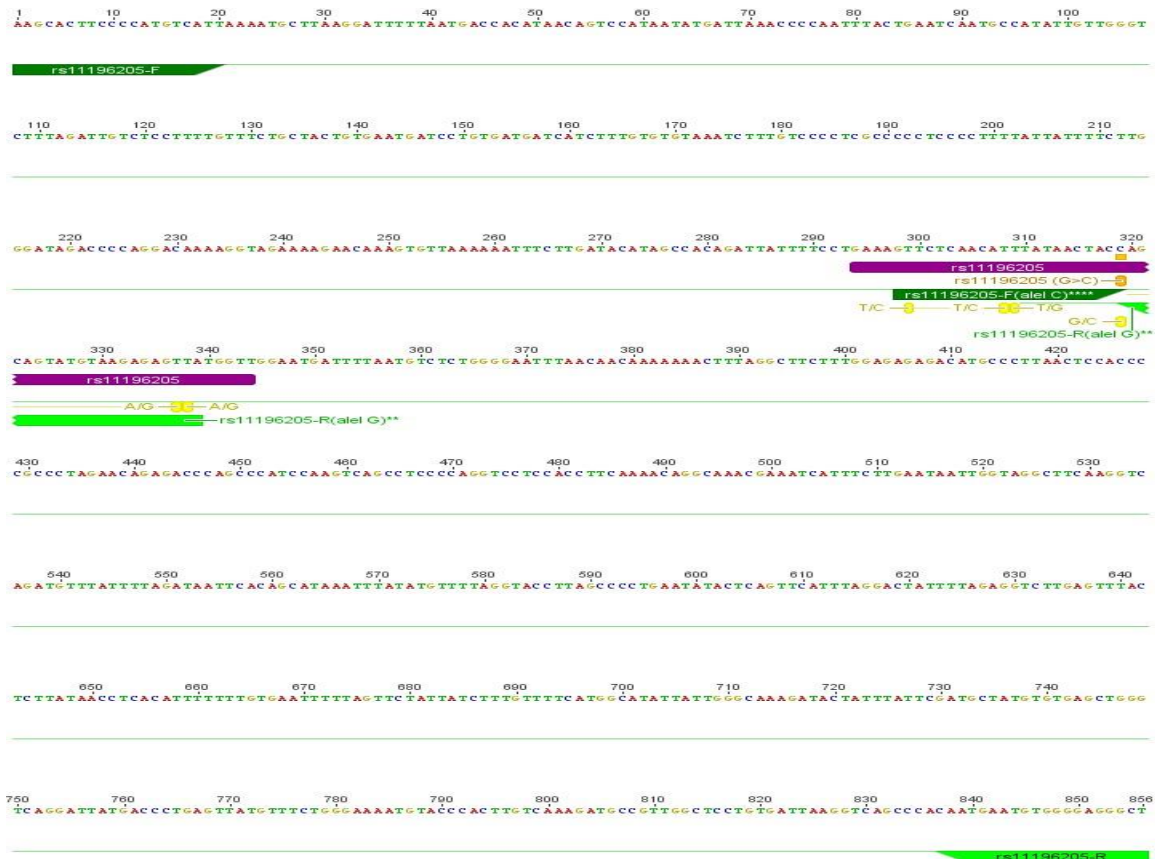
Primer yang digunakan pada penelitian adalah rs11196205-F dan rs11196205-R sebagai kontrol internal reaksi, rs11196205-F(C) sebagai primer spesifik alel C, dan rs11196205-R(G) sebagai primer spesifik alel G. SNP sebaiknya berada 300-500 pb dari primer rs11196205-F dan rs11196205-R. Ujung 3' dari primer akan mengenali secara spesifik DNA cetakan, sehingga alel G dan alel C sebaiknya berada pada ujung 3' primer rs11196205-F(C) dan rs11196205 R(G). Primer yang dihasilkan adalah rs11196205-F (5'-AAG CAC TTC CCC ATG TCA TT-3') dan rs11196205-R (5'AGC CCT CCC CAC ATT CAT TG-3'), primer spesifik alel C rs11196205-F(C) (5'-GCT CTC AAC ACG TAT AAC TAC C-3'), primer spesifik alel G rs11196205-R(G) (5'-TGG CTC TCT TAC ATA CTG CTC-3').

Primer yang dirancang memiliki ukuran 20-22 pb, Tm pada rentang 56-60 °C, perbedaan Tm antar primer adalah 4⁰C, %GC berada pada rentang 45-55 %, tidak membentuk struktur *hairpin* dan/atau *self-dimer*, maka profil primer yang digunakan pada penelitian telah sesuai dengan kriteria primer yang baik (Tabel 1).

Primer	Lipatan DNA	Karakteristik primer
rs11196205-F	 <p>5'AAGCACTTCCCCATGTCATT 3'</p>	Panjang : 20pb %GC : 45 Tm : 57,4 Tm hairpin : tidak ada Tm selfdimer : tidak ada
rs11196205-R	 <p>5'AGCCCTCCCCACATTCATTG 3'</p>	Panjang : 20pb %GC : 55 Tm : 60 Tm hairpin : tidak ada Tm selfdimer : tidak ada
rs11196205-F(C)	 <p>5'GCTCTCAACACGTATAACTACC 3'</p>	Panjang : 22pb %GC : 45,5 Tm : 56,4 Tm hairpin : tidak ada Tm selfdimer : tidak ada
rs11196205-R(G)	 <p>5' TGGCTCTCTTACATACTGCTC 3'</p>	Panjang : 21pb %GC : 47,6 Tm : 56,9 Tm hairpin : tidak ada Tm selfdimer : tidak ada

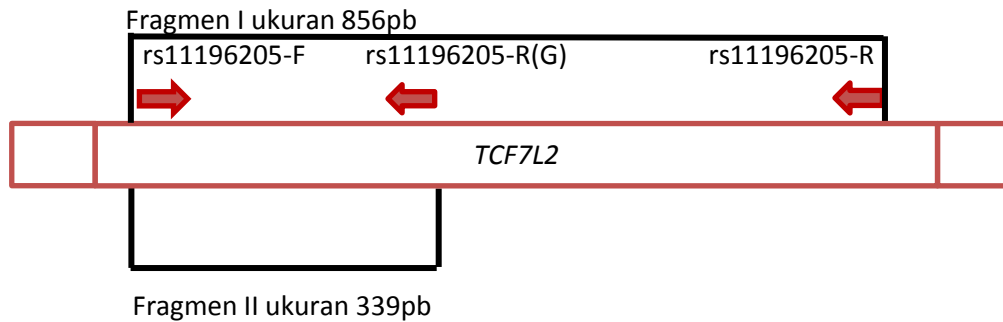
Spesifisitas primer yang didisain dikonfirmasi menggunakan *software* <http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. Fungsinya adalah untuk menghindari kemungkinan *mispriming* primer dengan daerah lain pada gen *TCF7L2* [9]. *Mispriming* primer dapat

menyebabkan primer melekat pada daerah lain sehingga reaksi PCR tidak terjadi pada daerah yang diharapkan. Hasil alignment primer dengan DNA gen TCF7L2 dapat dilihat pada gambar 2. Pada gambar dapat dibuktikan bahwa primer dapat menempel pada daerah yang diinginkan, dan primer spesifik alel C dan G diprediksi dapat mengidentifikasi adanya SNP pada gen.

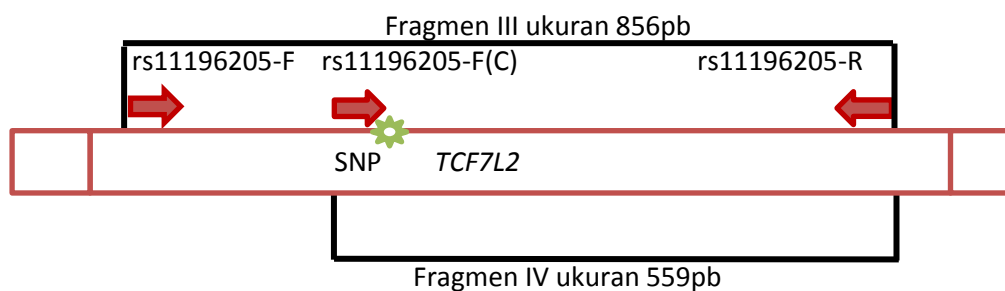


Gambar 2. Hasil alignment primer dengan gen TC7L2

Berdasarkan hasil rancangan, primer kontrol internal akan menghasilkan fragmen dengan ukuran 856 pb. Pada penentuan alel G, pasangan primer rs11196205-F dan primer rs11196205-R(G) berikatan dengan DNA cetakan menghasilkan fragmen dengan ukuran teoritis 339 pb. Pada penentuan alel C, pasangan primer rs11196205-F(C) dan primer rs11196205-R berikatan dengan DNA cetakan menghasilkan fragmen dengan ukuran teoritis 559pb. Ilustrasi posisi penempelan primer dan ukuran fragmen yang dihasilkan dapat dilihat pada gambar 3 untuk uji identifikasi alel G dan pada gambar 4 pada uji identifikasi alel C gen TCF7L2.



Gambar 3 Ilustrasi daerah pengenalan primer pada uji identifikasi alel G gen *TCF7L2*. Fragmen I kontrol internal ARMS PCR dengan ukuran 856pb, sedangkan fragmen II dengan ukuran 339pb menandakan keberadaan alel G.



Gambar 4 Ilustrasi daerah pengenalan primer pada uji identifikasi alel C gen *TCF7L2*. Fragmen III merupakan kontrol internal ARMS PCR dengan ukuran 856pb, sedangkan fragmen IV menandakan keberadaan alel C dengan ukuran 559pb.

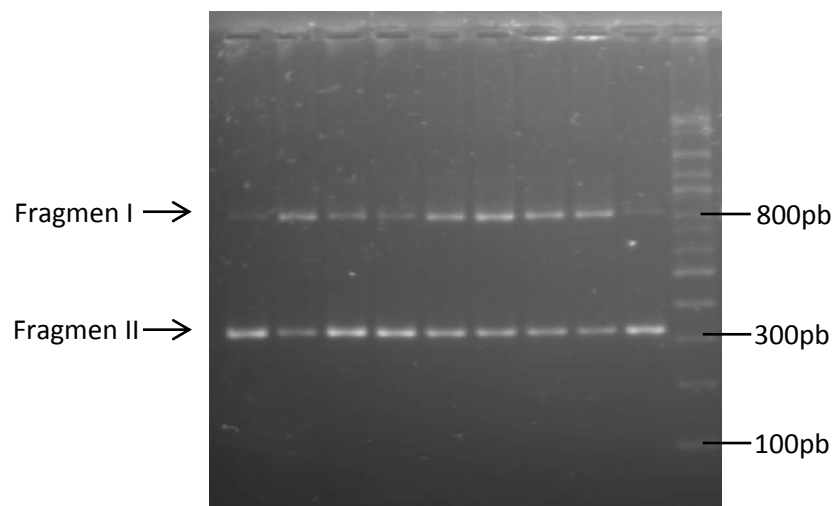
Kemampuan primer yang didisain dalam mengamplifikasi atau memperbanyak daerah yang diinginkan dapat diuji melalui reaksi PCR. Prinsip dari reaksi PCR adalah memperbanyak suatu urutan DNA secara eksponensial dengan in vitro menggunakan primer yang spesifik, yang selanjutnya akan di elektroforesis untuk mengidentifikasi pita DNA yang dihasilkan[7]. ARMS PCR merupakan salah satu metode PCR yang dapat digunakan untuk mendeteksi mutasi atau polimorfisme pada suatu DNA. Pada metode ARMS PCR digunakan tiga buah primer dengan salah satu primer akan mengenali secara spesifik keberadaan suatu alel. Ujung 3' dari primer spesifik akan menempel pada DNA cetakan yang mengalami mutasi. Identifikasi keberadaan alel ditentukan berdasarkan produk PCR yang dihasilkan [6].

Pada saat melakukan PCR perlu ditentukan kondisi optimal pemeriksaan meliputi jumlah/konsentrasi campuran/*mix* yang digunakan serta waktu dan suhu optimal saat reaksi terjadi. Masing-masing komponen PCR memiliki fungsi yang penting dalam reaksi PCR. Komposisi bahan dan kondisi optimum pemeriksaan dijelaskan secara lengkap pada bagian metode.

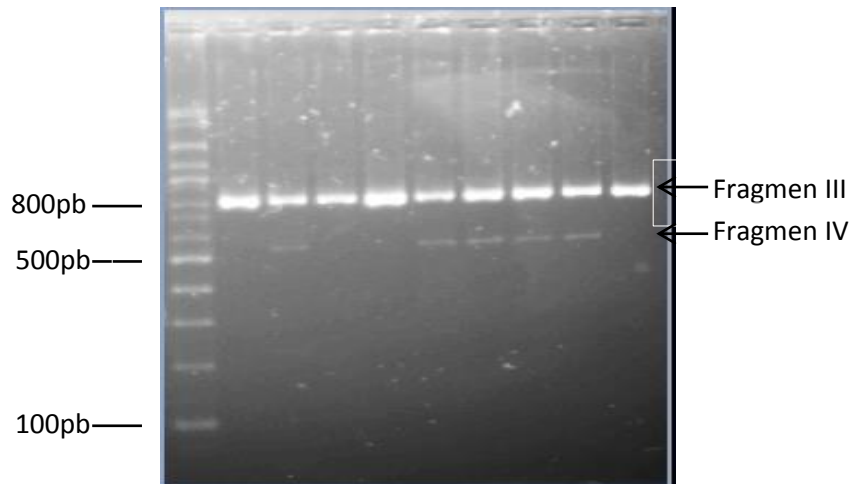
DNA yang diperoleh selanjutnya dielektroforesis pada Gel Agarosa. Elektroforesis Gel Agarosa merupakan salah satu cara yang efektif untuk memisahkan fragmen DNA dengan ukuran mulai dari 100 pasangan basa hingga 25kb. DNA dimasukkan kedalam *Well* yang

sudah disiapkan pada gel lalu diberikan arus. Fosfat pada molekul DNA bermuatan negatif, sehingga ketika ditempatkan pada medan listrik maka fragmen DNA akan bermigrasi ke anoda bermuatan positif. Molekul DNA akan dipisahkan berdasarkan ukuran, dimana jarak yang ditempuh akan berbanding terbalik dengan bobot DNA. [10] Pada penelitian digunakan gel agarosa 2%. Untuk mengetahui lokasi dari DNA pada gel agarosa maka dilakukan penambahan Red-Safe untuk memvisualisasi DNA saat diletakkan pada *Gel Doc*.

Sampel yang mengalami mutasi akan menghasilkan dua fragmen dengan ukuran yang berbeda, sedangkan sampel normal hanya akan menghasilkan satu fragmen. Metode ARMS PCR dapat digunakan untuk mendiagnosis suatu penyakit yang disebabkan oleh mutasi pada suatu gen [7]. Visualisasi hasil elektroforesis produk PCR menggunakan pasangan primer dapat dilihat pada Gambar 5 dan 6, dimana pada penentuan keberadaan alel G akan diperoleh fragmen dengan ukuran 847,471 pb dan 335,564 pb, sedangkan pada penentuan keberadaan alel C adalah 859,882 pb, dan 558,162 pb. Ukuran fragmen yang diperoleh pada penelitian mendekati ukuran teoritis produk ARMS PCR.

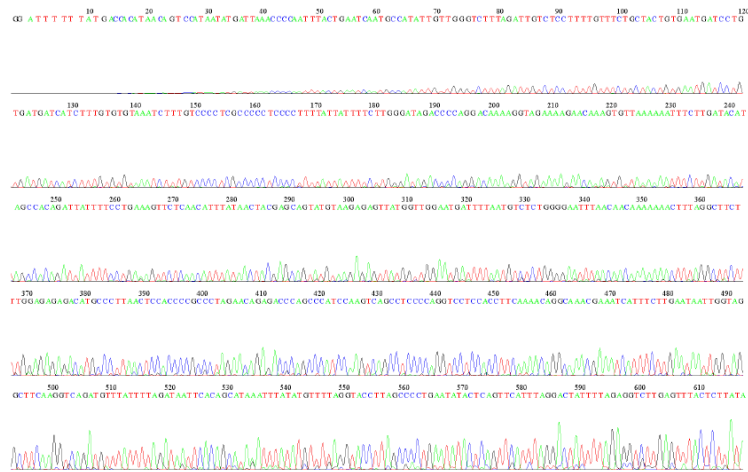


Gambar 5 Identifikasi alel G dengan ARMS-PCR menggunakan primer spesifik alel G dan primer. Produk PCR dianalisa menggunakan elektroforesis gel agarosa 2%.



Gambar 6 Identifikasi alel C dengan ARMS-PCR menggunakan primer spesifik alel C dan primer untuk kontrol internal. Produk PCR dianalisa menggunakan elektroforesis gel agarosa 2%.

Dari data diatas maka dapat diketahui bahwa reaksi ARMS PCR yang dioptimasi dapat digunakan untuk identifikasi keberadaan SNP rs11196205 gen *TCF7L2*. Selain itu untuk memastikan akurasi dari metode ARMS PCR, dilakukan *sequencing* pada beberapa sampel (Gambar 7). Hasil *sequencing* menunjukkan bahwa gen yang di amplifikasi benar *TCF7L2* dan primer melekat pada daerah yang diinginkan.



Gambar 7. Hasil sekuensing sampel yang mengalami polimorpisme pada rs11196205 dimana terjadi perubahan basa G menjadi C

Primer yang diperoleh dapat digunakan untuk menentukan keberadaan SNP pada sampel. Sehingga dapat diperoleh data SNP yang berasosiasi dengan DMT2 pada etnis tertentu. Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian yang ingin memetakan SNP yang bersosiasi dengan DMT2 di etnis Minangkabau [7]. Sehingga dapat dijadikan marker untuk DMT2 pada etnis Minangkabau.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa telah berhasil dikonstruksi empat buah primer yaitu rs11196205-F, rs11196205-R, rs11196205-F(C) untuk primer spesifik alel C, dan rs11196205- R(G) primer spesifik alel G. Primer tersebut mampu mengidentifikasi keberadaan SNP rs11196205 gen *TCF7L2* dengan metode ARMS PCR.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] C. W. Spellman, "Pathophysiology of Type 2 Diabetes: Targeting Islet Cell Dysfunction," vol. 73, no. 12, pp. 2003–2007, 2015.
- [2] Diabetes Federation International, *IDF Diabetes Atlas 2019*. 2019.
- [3] W. Ip, Y. ting A. Chiang, and T. Jin, "The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective," *Cell Biosci.*, vol. 2, no. 1, p. 1, 2012.
- [4] W. Tangjittipokin, N. Chongjarean, N. Plengvidhya, M. Homsanit, and P. T. Yenchitsomanus, "Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variations associated with earlier age-onset of type 2 diabetes in Thai patients," *J. Genet.*, vol. 91, no. 2, pp. 251–255, 2012.
- [5] S. F. A. Grant *et al.*, "Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes," *Nat. Genet.*, vol. 38, no. 3, pp. 320–323, 2006.
- [6] S. Little, " Amplification-Refractory Mutation System (ARMS) Analysis of Point Mutations ," *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 1995.
- [7] S. Syamsurizal, D. Handayani, H. Kadri, and E. Badriyya, "Genotyping SNP rs7903146 TCF7L2 gene for detection T2DM in Indonesian melayu ethnic Genotyping SNP rs7903146 TCF7L2 gene for detection T2DM in Indonesian melayu ethnic," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1317, pp. 1–8, 2019.
- [8] R. J. F. Loos *et al.*, "TCF7L2 polymorphisms modulate proinsulin levels and β -cell function in a British europid population," *Diabetes*, vol. 56, no. 7, pp. 1943–1947, 2007.
- [9] Syamsurizal and H. Kadri, "Genotyping SNP Rs12255372 TCF7L2 Gene Using Three-Primer ARMS-PCR for Detection T2DM n Indonesian Batak Ethnic," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 1040, no. 1, 2018.
- [10] P. Y. Lee, J. Costumbrado, C. Y. Hsu, and Y. H. Kim, "Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments," *J. Vis. Exp.*, no. 62, pp. 1–5, 2012.