

Polymerase chain reaction (PCR) primer design to identify SNP rs7901695 transcription factor 7 like 2 (*TCF7L2*)

Elsa Badriyya^{1*}, Afifatul Achyar²

¹Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinis, Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang, Indonesia

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang, Padang, Indonesia

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

ABSTRACT. Transcription Factor 7 Like 2 (*TCF7L2*) produces a protein that controls the expression and function of several incretin hormones. One of the primary activities of incretin hormones is to increase insulin production, which is important in glucose and energy homeostasis. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in the *TCF7L2* gene is reported to be association with Type II Diabetes Mellitus (T2DM). T2DM is featured by persistent hyperglycemia because of the decrease in insulin production, insulin resistance, or both. In patients with diabetes mellitus, chronic hyperglycemia can damage organ systems and cause metabolic abnormalities. SNP rs7901695 *TCF7L2* gene has been linked to T2DM in a number of places, including South Asia, Iceland, and the United States. The polymorphism at location 112.994.329 from nucleotide Thymine to Cytosine enables the recognition of SNP rs7901695. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to identify the polymorphism. The objective of this research was to generate a precise primer for the PCR recognition of the SNP rs7901695 in the *TCF7L2* gene. The research's methodology comprises DNA isolation, primer designing with Geneious, target amplification with PCR, and DNA sequencing for bioinformatic analysis. As the result, four primers for the SNP rs7901695 *TCF7L2* gene have been developed. The reaction obtained two fragments, sized 177 and 367 bp. The primers used were rs7901695-F, rs7901695-R, rs7901695-F(C), and rs7901695-R(T), which were used to detect the T allele.

ABSTRAK. *Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2)* penghasil protein pengontrol ekspresi dan fungsi beberapa hormon inkretin. Salah satu aktivitas utama hormon inkretin meningkatkan produksi insulin. *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) pada *TCF7L2 gene* dilaporkan adanya hubungan dengan Diabetes Mellitus Tipe II (DMT2). DMT2 ditandai dengan hiperglikemia persisten karena penurunan produksi insulin, resistensi insulin, atau keduanya. Pada penderita diabetes melitus, hiperglikemia kronis dapat merusak sistem organ dan kelainan metabolisme. Gen SNP rs7901695 *TCF7L2* dilaporkan memiliki asosiasi dengan DMT2 di sejumlah daerah, termasuk Asia Selatan, Islandia, dan Amerika Serikat. SNP rs7901695 ditandai dengan polimorfisme pada lokasi 112.994.329 dari nukleotida Timin menjadi Sitosin. Metode yang digunakan untuk mengidentifikasi polimorfisme adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan primer yang tepat untuk pengenalan PCR terhadap SNP rs7901695 pada gen *TCF7L2*. Metodologi penelitian meliputi isolasi DNA, perancangan primer dengan aplikasi Geneious, amplifikasi target dengan PCR, dan sekuensing DNA untuk analisis bioinformatik. Sebagai hasil penelitian, empat primer untuk deteksi gen SNP rs7901695 *TCF7L2* telah dikembangkan. Dua fragmen, berukuran 177 dan 367 bp, diperoleh dari reaksi tersebut. Primer yang digunakan adalah rs7901695-F, rs7901695-R, rs7901695-F(C), dan rs7901695-R(T), yang digunakan untuk mendeteksi alel T.



1. PENDAHULUAN

Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2) merupakan gen yang memiliki ukuran 217.460 pb. Gen *TCF7L2* mengkode produksi protein *High Mobility Group (HMG) box* yang berperan dalam jalur pensinyalan Wnt. Faktor transkripsi β -cat/TCF yang terdiri dari β -catenin (β -cat) dan beberapa protein TCF (TCF-1, LEF-1, TCF-3/TCF7L1, dan TCF-4/TCF7L2) merupakan beberapa faktor yang dapat mempengaruhi jalur pensinyalan Wnt. Protein TCF7L2 berperan dalam mengontrol ekspresi dan fungsi beberapa hormon inkretin seperti *Glucose Like Peptide-1 (GLP-1)* dan *Gastric Inhibitory Polipeptide (GIP)*. GLP-1 dan GIP berperan salah satunya dalam meningkatkan sekresi insulin yang penting pada homeostasis glukosa dan energi (Ip et al., 2012).

Single Nucleotida Polimorphism (SNP) pada gen *TCF7L2* dilaporkan memiliki asosiasi terbesar dengan kejadian Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2). Seluruh SNP yang berhubungan dengan DMT2, berada pada daerah intron yang tidak mengalami translasi. Mekanisme SNP menyebabkan DMT2 masih belum dapat dijelaskan, namun SNP diduga mempengaruhi proses transkripsi dan splicing (Grant, 2019). SNP pada gen *TCF7L2* telah dilaporkan mengganggu pembentukan insulin dari proinsulin, mengurangi pembentukan hormon inkretin dan mengurangi sensitivitas insulin di seluruh tubuh (Loos et al., 2007; Spellman, 2015).

SNP rs7901695 dilaporkan memiliki asosiasi yang kuat dengan kejadian DMT2 pada beberapa daerah (Benberin et al., 2021; Cai et al., 2019; Michalak-Wojnowska et al., 2016; Wrzosek et al., 2019; Xi & Ma, 2020; Xu et al., 2019). SNP ditandai dengan polimorfisme pada posisi 112.994.329 dari nukleotida Timin (T) menjadi Sitosin (C). Motif SNP rs7901695 yang dirujuk dari situs <http://ncbi.nlm.nih.gov> adalah sebagai berikut: CAT ATA AAT GGT ATC ATA AAA TCT A[T>C]G GGC TTT TGT GTC TGT CTG CTT TCA. SNP berada pada daerah intron diantara ekson 4 dan 5.

Diabetes melitus (DM) adalah kondisi hiperglikemia kronis yang disebabkan karena gangguan metabolisme yang terjadi secara kronis. Secara umum, DM dapat disebabkan karena penurunan sekresi insulin, resistensi insulin dan/atau keduanya. Kondisi hiperglikemia yang terjadi berkepanjangan dapat menyebabkan kerusakan pada berbagai sistem organ yang dapat mengancam jiwa. Komplikasi tersebut meliputi komplikasi mikrovaskular (nefropati, retinopati, dan neuropati) serta komplikasi makrovaskular yang mengakibatkan peningkatan risiko penyakit kardiovaskular hingga 4 kali lipat (Spellman, 2015), (Goyal & Jialal, 2023). Prevalensi DMT2 di dunia sekitar 9.3% dan diperkirakan 10,7 juta penduduk Indonesia menderita DM pada tahun 2019. Sehingga menyebabkan Indonesia

menempati peringkat ketujuh jumlah kejadian diabetes di dunia dan diperkirakan akan meningkat menjadi 13,7 juta pada tahun 2030 (Diabetes Federation International, 2019).

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah teknik laboratorium untuk memproduksi dengan cepat jutaan hingga miliaran salinan segmen DNA tertentu yang kemudian dapat dipelajari secara lebih rinci. PCR melibatkan penggunaan fragmen DNA sintetik pendek yang disebut primer untuk memilih segmen genom yang akan diamplifikasi, dan kemudian beberapa putaran sintesis DNA untuk memperbanyak segmen tersebut. Terdapat tiga langkah utama yang terlibat dalam teknik PCR yaitu denaturasi, penempelan dan pemanjangan. PCR saat ini menjadi teknik yang umum dan sering digunakan di laboratorium penelitian medis dan biologi untuk berbagai manfaat seperti untuk menentukan keberadaan gen yang berasosiasi dengan suatu penyakit seperti DMT2 (Ip et al., 2012), (Solanki, 2012).

DMT2 merupakan penyakit kronis dengan komplikasi yang dapat mengancam jiwa, sehingga dibutuhkan metode skrining awal untuk mencegah atau menurunkan angka kejadian penyakit tersebut. Pemeriksaan gen merupakan salah metode terbaru untuk menentukan apakah seseorang memiliki faktor risiko untuk mengalami DMT2. Sehingga peneliti melakukan penelitian dengan tujuan untuk menentukan primer yang spesifik yang dapat mengidentifikasi keberadaan polimorfisme rs7901695 pada gen *TCF7L2*. Hubungan antara keberadaan SNP dan kejadian DMT2 pada suatu daerah, dapat digunakan sebagai metode skrining awal yang akurat untuk kejadian DMT2.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang menggambarkan hasil konstruksi primer dan menguji kebenaran primer dalam memperbanyak daerah yang diinginkan. Primer didesain menggunakan program Geneious berdasarkan urutan gen *Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2)*. Empat buah primer dirancang dalam penelitian ini, dan primer yang dihasilkan selanjutnya diujikan menggunakan metode PCR untuk menentukan genotip dari sampel. Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk menganalisis ukuran produk PCR.

2.1. Bahan

Bahan yang digunakan untuk proses isolasi DNA adalah *Purelink Genomic DNA kits* (Invitrogen) yang terdiri dari proteinase K, RNase A, *wash buffers I dan II*, *lysis/binding buffer*, *elution buffer*, etanol 96-100%. Bahan yang digunakan dalam proses PCR adalah dapar Tris EDTA 1X (Promega), *GoTaq Green master mix 2X* (Promega), MgCl₂ 50mM, dimetil sulfoksida (Sigma), air bebas nuklease (Promega). Elektroforesis menggunakan gel agarosa (Vivantis), *Red safe 20.000X* (Intron Biotechnology), VC 100bp plus DNA Ladder

(Vivantis), DNA *loading dye* (Vivantis), dapar Tris-Borat-EDTA (TBE) 0,5X yang tiap 1 L mengandung 55 g asam borat dan 108 g tris dan ditambah 800 ml akuades dan 40 mL Na₂EDTA 0,5 M.

2.2. Alat

Thermal cycler (Bio Rad), alat elektroforesis agarosa (Bio Rad), Gel doc XR+ (Bio Rad), mikropipet (Bio Rad, Eppendorf), vortex maxi mix II (Barnstead), autoklaf (Hirayama), universal inkubator (Mettler), lemari pendingin, *icemaker* (GEA), sentrifuga (Thermo scientific), *microplate incubator/shaker HT* (Labnet), *spindown* (Thermo scientific, Bio rad), *Accu block digital dry bath* (Labnet), *microwave* (LG), lemari asam, dan timbangan digital, oven (Mettler). Program dan website yang digunakan dalam proses perancangan primer adalah program Geneious, situs <http://ncbi.nlm.nih.gov> dan <http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>.

2.3. Isolasi DNA

Protokol *Purelink Genomic DNA kits* digunakan untuk isolasi DNA dari sampel. Sampel darah sebanyak 200 µL ditambahkan 20 µL proteinase K 20mg/mL dan 20 µL RNase A 20mg/mL; diinkubasi pada suhu ruang selama 2 menit. Setelah itu, ditambahkan 200 µL *lysis/binding buffer*, divortex dan diinkubasi pada suhu 55 °C selama 10 menit. Etanol 96% sebanyak 200 µL ditambahkan pada campuran lalu divortex selama 5 detik. Lisat yang diperoleh dipindahkan ke kolom, disentrifuga dengan kecepatan 10.000xg selama 1 menit. Filtrat pada tabung penampung dibuang, lalu ke dalam kolom ditambahkan 500 µL *wash buffer I* dan disentrifuga pada 10.000xg selama 1 menit. Filtrat dalam tabung penampung dibuang lagi dan ke dalam kolom ditambahkan 500 µL *wash buffer II* dan disentrifuga dengan kecepatan 20.000xg selama 3 menit. DNA yang diperoleh dielusi menggunakan 50 µL *Purelink genomic elution*, diinkubasi pada suhu ruang selama 1 menit dan disentrifuga dengan kecepatan 20.000xg selama 1 menit. DNA hasil isolasi dianalisa menggunakan elektroforesis agarosa 1,5%.

2.4. Perancangan Primer

Primer oligonukleotida diperlukan saat menjalankan reaksi PCR. Primer disintesis secara kimiawi dengan menggabungkan nukleotida bersama. Sifat utama dari primer adalah harus sesuai dengan urutan pada molekul cetakan. Program Geneious dapat digunakan untuk mengkonstruksi primer berdasarkan urutan gen *TCF7L2* (Acc. nr. NG012631) yang diperoleh dari situs <http://ncbi.nlm.nih.gov>. Primer yang baik memiliki panjang 18-24 basa, jumlah basa G/C sekitar 40-60%, suhu leleh 50-60 °C (T_m), jarak T_m antar pasangan primer hanya

sekitar 5°C dan tidak memiliki kecenderungan membentuk struktur *self-dimer* dan *hairpin*. Hasil konstruksi primer diperiksa spesifisitasnya pada situs <http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. Pemeriksaan tersebut bertujuan untuk mendeteksi adanya kemungkinan salah penempelan primer dengan daerah lain pada gen *TCF7L2*. Disain primer siap untuk di sintesis jika hasil pemeriksaan sudah sesuai.

2.5. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR digunakan untuk menentukan genotipe atau keberadaan dari alel C dan T pada sampel. *GoTaq green master mix*, primer rs7901695-F 0,5 µM, primer rs7901695-R(T) 0,5 µM, 0,5 µL DNA cetakan Formula, dan *free nuclease water* digunakan dalam menentukan keberadaan alel T rs7901695. Sedangkan untuk mengidentifikasi keberadaan alel C, dibutuhkan formula *GoTaq green master mix* 1X, primer rs7901695-R 0,5 µM, primer rs7901695-F(C) 0,5 µM, 0,5 µL DNA cetakan, dan *free nuclease water*.

Alat PCR diatur berdasarkan kondisi optimum amplifikasi sampel yang kita uji. Suhu diatur pada 95 °C selama 3 menit untuk tahap denaturasi awal, dilanjutkan dengan suhu 95 °C dengan durasi 30 detik untuk tiap siklus untuk tahap denaturasi. Suhu penempelan primer adalah 63 °C selama 30 detik. Suhu elongasi produk adalah 72 °C selama 45 detik , dan dilanjutkan dengan elongasi akhir pada suhu 72 °C selama 5 menit. Total siklus PCR yang dilakukan adalah 35 siklus.

2.6. Elektroforesis Agarosa

Gel agarosa dibuat dengan mencampurkan agarosa dengan TBE 0,5X. Larutan buffer Tris-Borate-EDTA (TBE) 0,5X dibuat dengan menambahkan 55 g asam borat dan 108 g Tris dalam 40 ml 0,5 M Na₂EDTA dan 800 ml air suling dan untuk satu liter. Gel agarosa 1,5% (1,5 g agarosa dalam 100 ml TBE) digunakan untuk mendeteksi DNA hasil isolasi dan produk PCR. 8 µl *Red-Safe* ditambahkan ke dalam larutan gel agarosa untuk memvisualisasikan DNA ketika diberikan sinar UV. Larutan dituangkan ke dalam cetakan yang telah ditempatkan kolom sisir hingga memadat. Gel agarosa diletakkan dalam wadah elektroforesis yang sudah ditambahkan larutan TBE 0,5X hingga menutupi permukaan agarosa.

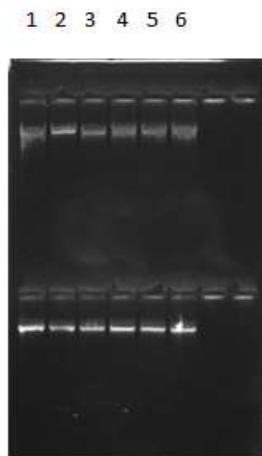
Campuran 2 µl DNA *loading dye* dan 3 µl isolat DNA ditambahkan ke dalam sumur untuk mendeteksi isolat DNA. Elektroda wadah dihubungkan ke tegangan 100 V selama 30 menit. Untuk mendeteksi produk PCR, sampel dan marker ditambahkan ke sumur sejumlah 7 µl dan 4 µl pada tegangan 120 V dan durasi elektroforesis 65 menit. Hasil elektroforesis gel agarosa DNA divisualisasikan menggunakan alat Gel Doc.

2.7. Sequencing

DNA *sequencing* merupakan suatu teknik untuk menentukan urutan yang tepat dari nukleotida, atau basa, dalam molekul DNA. Menetapkan urutan DNA dapat digunakan untuk membuktikan kebenaran primer dalam menentukan keberadaan suatu polimorfisme pada suatu gen. Sehingga untuk membuktikan keberhasilan primer SNP rs7901695 yang telah dirancang, dilakukan *sequencing* dari hasil PCR tersebut. Hasil disain primer dan kemampuan primer memperbanyak daerah yang diinginkan dianalisis secara kualitatif.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel dalam penelitian diambil dari pembuluh vena dan dimasukkan kedalam tabung yang berisi EDTA (0,1 mmol/L). DNA diisolasi menggunakan protokol *Purelink Genomic DNA Kits*. Isolasi DNA berkualitas baik merupakan prasyarat untuk penelitian molekuler (Heikrujam et al., 2020). Lima prinsip dasar ekstraksi DNA yaitu: 1) disrupti struktur seluler untuk memperoleh lisat, 2) memisahkan DNA yang terlarut dari debris sel dan bahan tidak larut lainnya, 3) mengikatan DNA yang diharapkan pada suatu matriks, 4) membersihkan protein dan kontaminan lainnya dari matriks dan 5) elusi DNA. Setelah DNA berhasil diisolasi, elektroforesis agarosa digunakan untuk menguji keberadaan DNA yang diharapkan (Gambar 1)(Griffiths & Chacon-Cortes, 2014; SUGUNA et al., 2014).




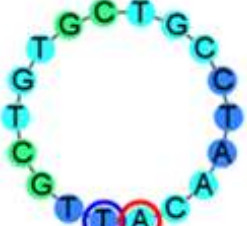
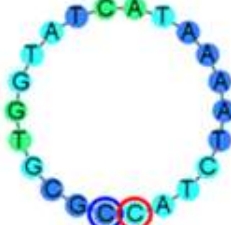
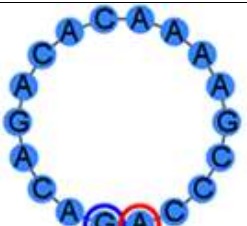
Gambar 1. Hasil elektroforesis pita DNA hasil elusi pertama (atas) dan elusi ke dua (bawah) Gen *Transcription Factor 7 Like 2 (TCF7L2)* mengkode faktor transkripsi *High Mobility Group (HMG)* yang berperan dalam pensinyalan Wnt. Jalur pensinyalan Wnt adalah serangkaian jalur pensinyalan yang aktif ketika ligan Wnt berikatan dengan reseptor protein di membran. Jalur pensinyalan Wnt mengatur ekspresi protein dan memainkan peran penting dalam melindungi metabolisme fisiologis normal tubuh. Sehingga jalur pensinyalan Wnt ini memiliki peran dalam kejadian dan perkembangan Diabetes Melitus Tipe 2 (DMT2).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa jalur pensinyalan Wnt/c-Jun N-terminal kinase terkait erat dengan resistensi insulin, respon inflamasi, serta disfungsi sel β pankreas dan endotel. β -catenin / TCF7L2 dan faktor kalsineurin / nuklir dari gen target yang dimediasi sel T aktif terlibat dalam sintesis dan sekresi insulin, degradasi insulin, pertumbuhan dan regenerasi sel β pankreas, dan fungsional dari sel β pankreas (Spellman, 2015). Selain itu, polimorfisme pada gen TCF7L2 dapat meningkatkan risiko DM2 yang ditandai dengan fungsi sel β pankreas yang abnormal dan gangguan toleransi glukosa pada pasien dengan DM2 (Chen et al., 2021).

Proses identifikasi keberadaan SNP menggunakan PCR harus dilengkapi dengan primer yang akan berikatan secara spesifik pada daerah yang diharapkan. Primer adalah oligonukleotida sintetik pendek yang digunakan dalam banyak teknik molekuler dari PCR hingga sekuensing DNA. Primer ini dirancang untuk memiliki urutan yang merupakan komplemen terbalik dari suatu wilayah cetakan atau DNA target. Primer dapat dirancang menggunakan program Geneious. Beberapa yang harus diperhatikan saat mendesain primer adalah ukuran primer sebaiknya antara 17-28 pb, komposisi basa G/C pada rentang 50-60%, T_m pada suhu 55-80 °C, serta tidak membentuk *hairpin* dan *selfdimer*. Self-dimers terjadi ketika beberapa bagian oligonukleotida saling berinteraksi dengan dirinya sendiri, menghasilkan molekul oligonukleotida yang dapat berhibridisasi dengan molekul oligonukleotida lain dengan urutan yang persis sama.

Berikut merupakan hasil disain primer menggunakan program Geneious, sebagai kontrol internal reaksi dirancang primer rs7901695-F dan rs7901695-R, rs7901695-R(T) sebagai primer spesifik alel T, dan rs7901695-F(C) sebagai primer spesifik alel C. SNP sebaiknya berada 300-500 pb dari primer rs7901695-F dan rs7901695-R. Ujung 3' primer secara khusus mengenali DNA cetakan, oleh karena itu alel T dan C harus berada di ujung 3' primer rs7901695-F (C) dan rs7901695 R (T). Primer yang berhasil didisain adalah rs7901695-F (5'-ATC CAC ACC CTC TAA CTC CA-3'), rs7901695-R (5'-TTG CTG TGC TGC CTA ACA-3'), primer spesifik alel T rs790169-R(T) (5'-GAC AGA CAC AAA AGC CCA-3'), dan primer spesifik alel C rs790169-F(C) (CGC GTG GTA TCA TAA AAT CTA C-3'). Primer yang digunakan dalam penelitian memenuhi kriteria primer yang baik (Tabel 1).

Tabel 1. Profil Primer untuk Mendeteksi SNP rs7901695

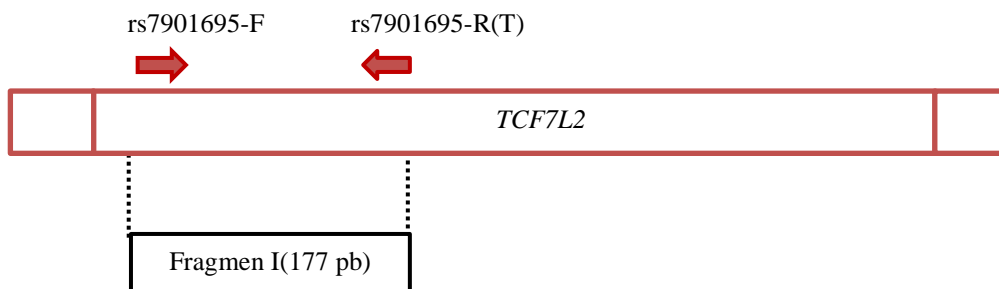
Nama Primer	Urutan Basa	Profil primer
rs7901695-F	 <p>5' ATCCACACCTCTAACTCCA 3'</p>	Panjang : 22pb %GC : 45,5 Tm : 56,5 Tm hairpin : - Tm selfdimer : -
rs7901695-R	 <p>5' TTGCTGTGCTGCCTAACA 3'</p>	Panjang : 19pb %GC : 47,4 Tm : 56,3 Tm hairpin : - Tm selfdimer : -
rs7901695-F(C)	 <p>5' CGCGTGGTATCATAAAAATCTAC 3'</p>	Panjang : 20pb %GC : 45 Tm : 56,2 Tm hairpin : - Tm selfdimer : -
rs7901695-R(T)	 <p>5' GACAGACACAAAAGCCCA 3'</p>	Panjang : 17pb %GC : 58,8 Tm : 56,5 Tm hairpin : - Tm selfdimer : 14,8

Kekhususan primer yang dirancang diperiksa menggunakan perangkat lunak <http://ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>. Primer-BLAST memungkinkan peneliti untuk merancang primer spesifik serta untuk memeriksa spesifisitas primer (Ye et al., 2012). Primer-BLAST juga mendukung penempatan primer berdasarkan lokasi ekson/intron, dan mencegah potensi penempelan primer dengan daerah lain pada gen yang sama [9]. Kesalahan pada lokasi penempelan primer dapat menyebabkan primer menempel pada daerah lain sehingga hasil pemeriksaan menjadi tidak sesuai. Hasil penyelarasan primer dengan DNA gen TCF7L2 ditunjukkan pada Gambar 2. Pada gambar dapat ditunjukkan bahwa primer dapat berikatan dengan daerah yang diinginkan, dan diperkirakan bahwa alel C dan T dari primer spesifik mengenali keberadaan SNP pada gen.

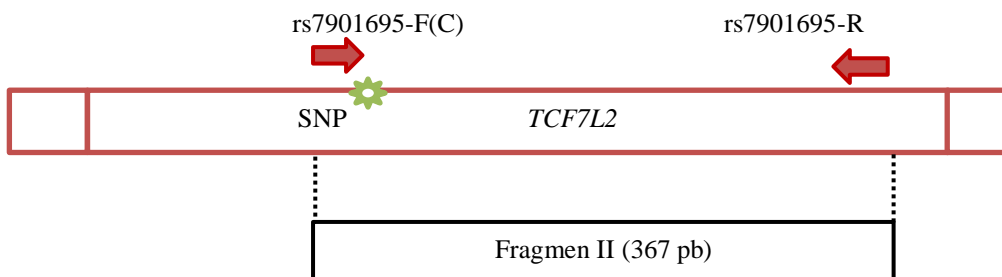


Gambar 2. Hasil alignment primer menggunakan Primer Blast

Berdasarkan hasil desain primer, identifikasi alel T ditentukan menggunakan pasangan primer rs7901695-F dan primer rs7901695-R(T). Kedua primer ini berikatan dengan DNA cetakan untuk menghasilkan fragmen dengan ukuran 177 pb (fragmen I), sedangkan dalam identifikasi alel C, pasangan primer rs7901695-F(C) dan primer rs7901695-R berikatan dengan DNA cetakan menghasilkan fragmen dengan ukuran 367 bp (fragmen II). Gambar dari situs perlekatan awal dan ukuran fragmen yang dihasilkan ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Gambaran wilayah pengenalan primer pada analisis keberadaan alel T rs7901695. Fragmen I menunjukkan keberadaan alel T



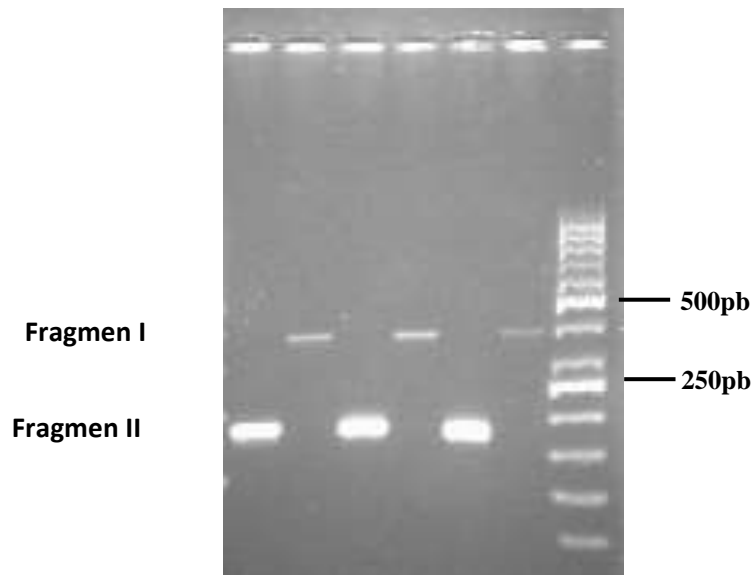
Gambar 4. Gambaran wilayah pengenalan primer pada analisis keberadaan alel C rs7901695. Fragmen II menunjukkan keberadaan alel C

Kemampuan primer yang dirancang untuk mengamplifikasi atau memperkuat daerah yang diinginkan dapat diuji dengan menggunakan reaksi PCR. PCR didasarkan pada kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis untai DNA baru yang melengkapi untai cetakan yang diinginkan. Prinsip reaksi PCR adalah amplifikasi eksponensial sekuens DNA secara *in vitro* menggunakan primer spesifik, yang kemudian dilakukan elektroforesis untuk mengidentifikasi kelompok DNA yang dihasilkan (Syamsurizal et al., 2019). Ujung 3' dari primer spesifik berikatan dengan DNA cetakan yang bermutasi. Identifikasi keberadaan alel ditentukan berdasarkan produk PCR yang diperoleh (Chubarov et al., 2023).

Kondisi optimum serta konsentrasi campuran yang diperlukan pada reaksi PCR merupakan hal yang perlu diperhatikan. Komponen reaksi PCR terdiri dari cetakan DNA dari sampel DNA yang berisi urutan target. Pada awal reaksi, suhu tinggi diaplikasikan pada molekul DNA beruntai ganda untuk memisahkan untai DNA satu sama lain. DNA polimerase adalah enzim yang mensintesis untai DNA baru yang berpasangandengan cetakan DNA. Enzim yang paling umum digunakan adalah TaqDNA polimerase. Enzim tersebut dapat menghasilkan untai DNA baru menggunakan cetakan DNA dan primer dan tahan panas. DNA Polimerase mulai mensintesis DNA baru dari ujung primer. Nukleotida (dNTP atau deoksinukleotida trifosfat) - unit tunggal dari basa A, T, G, dan C, merupakan "blok bangunan" untuk untai DNA baru (Barudin et al., 2019).

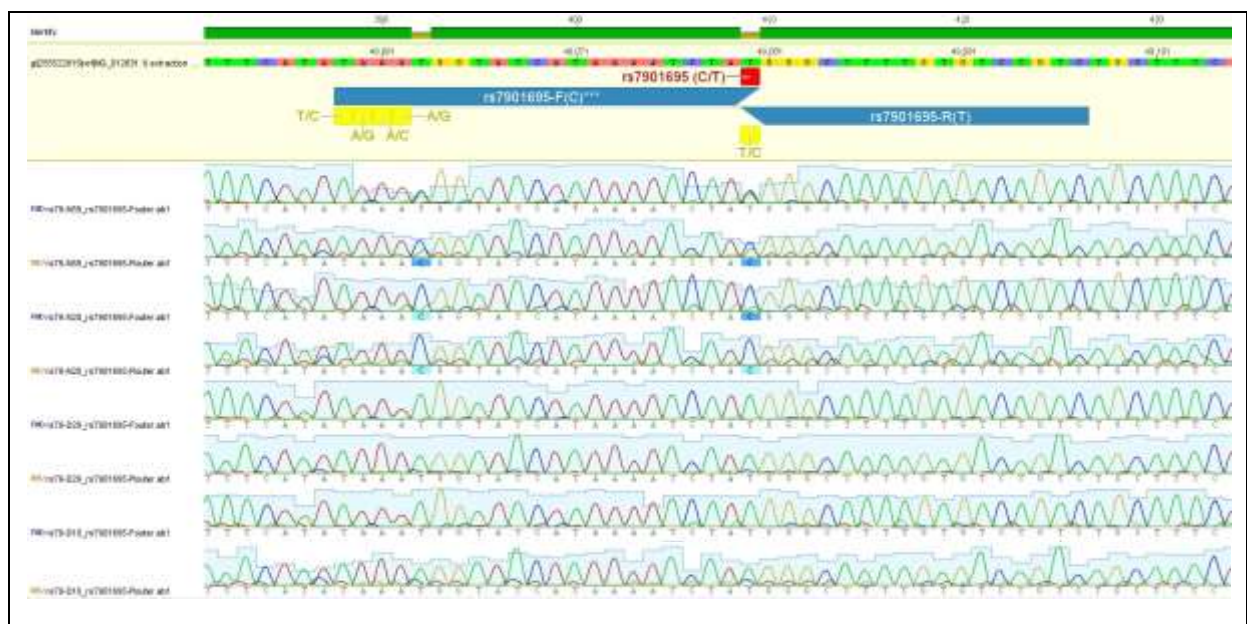
DNA yang dihasilkan kemudian di elektroforesis pada gel agarosa. Elektroforesis gel agarosa dapat memisahkan fragmen DNA dengan ukuran mulai dari 100 pb hingga 25 kb. Molekul DNA dipisahkan berdasarkan ukuran, dimana jarak yang ditempuh berbanding terbalik dengan berat DNA (Lee et al., 2012). Gel agarosa 1,5% digunakan dalam penelitian ini. Untuk mengetahui posisi DNA pada gel agarose ditambahkan Red-Safe untuk memvisualisasikan DNA saat diletakkan pada Gel Doc.

Sampel dengan mutasi akan menghasilkan satu atau dua fragmen dengan ukuran 177 dan 367 pb atau hanya 367 pb, sedangkan sampel normal hanya akan menghasilkan satu fragmen dengan ukuran 177 pb (Syamsurizal et al., 2019). Hasil elektroforesis produk PCR dengan pasangan primer ditunjukkan pada Gambar 5. Sampel dengan genotipe TT menghasilkan produk PCR dengan ukuran 177 pb, sampel dengan genotipe TC dengan ukuran 177 pb dan 367 pb, serta sampel dengan genotipe CC dengan ukuran 367 pb. Berdasarkan hasil deteksi produk PCR, ukuran fragmen I dan II yang diperoleh adalah 180,17 pb dan 370,382 pb dan mendekati nilai teoritis produk PCR.



Gambar 5 Identifikasi alel T dan C menggunakan primer spesifik alel. Produk PCR dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,5%.

Untuk menentukan akurasi dari primer dan metode yang dikembangkan, dilakukan *sequencing* dari sampel hasil PCR. *DNA sequencing* adalah proses penentuan urutan asam nukleat – urutan nukleotida dalam DNA. Proses ini mencakup metode untuk menentukan urutan empat basa: adenin, guanin, sitosin, dan timin. Hasil *sequencing* dari sampel dapat dilihat pada Gambar 6. Hasil dari penentuan urutan DNA membuktikan bahwa daerah yang di amplifikasi sudah sesuai.



Gambar 6. Hasil sekuensing sampel untuk identifikasi SNP rs7901695 (T > C)

4. KESIMPULAN

Primer rs7901695-F, primer rs7901695-R, primer spesifik alel C rs7901695-F(C) dan primer spesifik alel T rs7901695-R (T) telah berhasil dirancang dan dapat digunakan untuk menentukan keberadaan SNP rs7901695 dengan metode PCR.

DAFTAR PUSTAKA

- Barudin, M. A., Isa, M. L. M., & Yusof, A. M. (2019). Chemical components of polymerase chain reaction in 18s rRNA for detection of *Cryptosporidium* from river water samples. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 23(3), 401–406. <https://doi.org/10.17576/mjas-2019-2303-04>
- Benberin, V. V., Vochshenkova, T. A., Abildinova, G. Z., Borovikova, A. V., & Nagimtayeva, A. A. (2021). Polymorphic genetic markers and how they are associated with clinical and metabolic indicators of type 2 diabetes mellitus in the Kazakh population. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 20(1), 131–140. <https://doi.org/10.1007/s40200-020-00720-z>
- Cai, J., Zhang, Y., Nuli, R., Zhang, Y., Abudusemaiti, M., Kadeer, A., Tian, X., & Xiao, H. (2019). Interaction between dietary patterns and TCF7L2 polymorphisms on type 2 diabetes mellitus among Uyghur adults in Xinjiang Province, China. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity : Targets and Therapy*, 12, 239–255. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S191759>
- Chen, J., Ning, C., Mu, J., Li, D., Ma, Y., & Meng, X. (2021). Role of Wnt signaling pathways in type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476(5), 2219–2232. <https://doi.org/10.1007/s11010-021-04086-5>
- Chubarov, A. S., Ocorbin, I. P., Novikova, L. M., Filipenko, M. L., Lomzov, A. A., & Pysnyi, D. V. (2023). Allele-Specific PCR for PIK3CA Mutation Detection Using Phosphoryl Guanidine Modified Primers. *Diagnostics*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/diagnostics13020250>
- Diabetes Federation International. (2019). IDF Diabetes Atlas 2019. In *International Diabetes Federation*. <http://www.idf.org/about-diabetes/facts-figures>
- Goyal, R., & Jialal, I. (2023). *Diabetes Mellitus Type 2*. StatPearls Publishing [Internet].
- Grant, S. F. A. (2019). The TCF7L2 locus: A genetic window into the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 42(9), 1624–1629. <https://doi.org/10.2337/dci19-0001>
- Griffiths, L., & Chacon-Cortes, D. (2014). Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*, 1. <https://doi.org/10.2147/bsam.s46573>
- Heikrujam, J., Kishor, R., & Mazumder, P. B. (2020). *The Chemistry Behind Plant DNA Isolation Protocols* (O.-M. Boldura, C. Baltă, & N. S. Awwad (eds.); p. Ch. 8). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92206>
- Ip, W., Chiang, Y. ting A., & Jin, T. (2012). The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective. *Cell and Bioscience*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-28>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62, 1–5. <https://doi.org/10.3791/3923>

- Loos, R. J. F., Franks, P. W., Francis, R. W., Barroso, I., Gribble, F. M., Savage, D. B., Ong, K. K., O'Rahilly, S., & Wareham, N. J. (2007). TCF7L2 polymorphisms modulate proinsulin levels and β -cell function in a British europid population. *Diabetes*, 56(7), 1943–1947. <https://doi.org/10.2337/db07-0055>
- Michalak-Wojnowska, M., Gorczyca-Siudak, D., Gorczyca, T., Mosiewicz, B., Kwaśniewska, A., Filip, A., & Mosiewicz, J. (2016). Association between rs7901695 and rs7903146 polymorphisms of the TCF7L2 gene and gestational diabetes in the population of Southern Poland. *Ginekologia Polska*, 87(11), 745–750. <https://doi.org/10.5603/GP.2016.0081>
- Solanki, G. (2012). Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Pharmacological Research*, 2(3), 81–82. <https://doi.org/10.7439/ijpr.v2i3.514>
- Spellman, C. W. (2015). *Pathophysiology of Type 2 Diabetes: Targeting Islet Cell Dysfunction*. 73(12), 2003–2007. <https://doi.org/10.1093/med/9780199235292.003.1336>
- SUGUNA, S., DH, N., KAMBLE, S., BHARATHA, A., & KUNKULOL, R. (2014). GENOMIC DNA ISOLATION FROM HUMAN WHOLE BLOOD SAMPLES BY NON ENZYMATIC SALTING OUT METHOD SAJJA SUGUNA 1* , NANDAL D H 2 , SURESH KAMBLE 3 , AMBADASU BHARATHA 4 , RAHUL KUNKULOL 5 1* Tutor, Professor & Head 2 , Professor 5 , Dept. of Pharmacology, Rura. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(6), 0–1. <http://www.ijpsjournal.com/Vol6Issue6/9478.pdf>
- Syamsurizal, & Kadri, H. (2018). Genotyping SNP Rs12255372 TCF7L2 Gene Using Three-Primer ARMS-PCR for Detection T2DM n Indonesian Batak Ethnic. *Journal of Physics: Conference Series*, 1040(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1040/1/012003>
- Syamsurizal, S., Handayani, D., Kadri, H., & Badriyya, E. (2019). Genotyping SNP rs7903146 TCF7L2 gene for detection T2DM in Indonesian melayu ethnic Genotyping SNP rs7903146 TCF7L2 gene for detection T2DM in Indonesian melayu ethnic. *Journal of Physics: Conference Series*, 1317, 1–8. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1317/1/012090>
- Wrzosek, M., Sawicka, A., Wrzosek, M., Piątkiewicz, P., Tałałaj, M., & Nowicka, G. (2019). Age at onset of obesity, transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) rs7903146 polymorphism, adiponectin levels and the risk of type 2 diabetes in obese patients. *Archives of Medical Science : AMS*, 15(2), 321–329. <https://doi.org/10.5114/aoms.2017.69638>
- Xi, X., & Ma, J. (2020). A meta-analysis on genetic associations between Transcription Factor 7 Like 2 polymorphisms and type 2 diabetes mellitus. *Genomics*, 112(2), 1192–1196. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.07.004>
- Xu, L., Wang, X., Li, T., Liuzzi, J., Narayanan, V., & Huffman, F. (2019). The Variants in the TCF7L2 Gene Increases the Risk of Type 2 Diabetes in Cuban American by Impairing Glucose Homeostasis (P15-021-19). In *Current Developments in Nutrition* (Vol. 3, Issue Suppl 1). <https://doi.org/10.1093/cdn/nzz037.P15-021-19>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>