

Optimasi Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Untuk Identifikasi Polimorfisme Gen *SLCO1B1* Sebagai Farmakogen Statin

Febriani Saputri*, Bertha Rusdi, Miswar Fattah

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Indonesia.

*febrianisptr@outlook.com, bertha.rusdi78@gmail.com, miswar.fattah@prodia.co.id

Abstract. Pharmacogenomics is a science using genetic information that aims to reduce the adverse effects of drugs. The genetic information used is usually in the form of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), one of which is *SLCO1B1*. *SLCO1B1* is one of the genetic variations that can affect the toxicity of a drug, one of which is statins. Statins are known as drugs that have side effects in the form of myopathy. The *SLCO1B1* allele variant often associated with statins is rs4149056 or *SLCO1B1**5. This study aims to create a specific primer to identify the *SLCO1B1* (rs4149056) gene polymorphism and establish the optimum conditions of the appropriate PCR method on the identification of *SLCO1B1* gene polymorphisms in statins. The research was conducted in silico and wet lab at Prodia Jakarta. The results showed that the forward primer 5'-GGT TGT TTA AAG GAA TCT GGG TCA T-3' and the reverse primer 5'-GCA GCA GCC ACA AGA AGA CT-3' that had been designed were able to identify *SLCO1B1* gene polymorphism (rs4149056) under optimal conditions of template DNA concentration of 10 ng/5 µl and annealing temperature of 59 °C. Thus, it can be concluded that the polymorphism of the *SLCO1B1* gene (rs4149056) has an effect as a statin pharmacogen.

Keywords: *Pharmacogenomic, Statin, SLCO1B1, Polymorphism.*

Abstrak. Farmakogenomik merupakan suatu ilmu dengan menggunakan informasi genetik yang bertujuan untuk mengurangi efek obat yang merugikan. Informasi genetik yang digunakan biasanya dalam bentuk *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), salah satunya yaitu *SLCO1B1*. *SLCO1B1* merupakan salah satu variasi genetik yang dapat mempengaruhi toksisitas suatu obat, salah satunya yaitu statin. Statin dikenal sebagai obat yang memiliki efek samping berupa miopati. Varian alel *SLCO1B1* yang sering dikaitkan dengan statin adalah rs4149056 atau *SLCO1B1**5. Penelitian ini bertujuan untuk membuat primer yang spesifik untuk mengidentifikasi polimorfisme gen *SLCO1B1* (rs4149056) dan menetapkan kondisi optimum dari metode PCR yang sesuai pada identifikasi polimorfisme gen *SLCO1B1* dalam statin. Penelitian dilakukan secara *in silico* dan lab basah di Prodia Jakarta. Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer *forward* 5'-GGT TGT TTA AAG GAA TCT GGG TCA T-3' dan primer *reverse* 5'-GCA GCA GCC ACA AGA AGA CT-3' yang telah didesain mampu mengidentifikasi polimorfisme gen *SLCO1B1* (rs4149056) pada kondisi optimal konsentrasi DNA *template* 10 ng/5 µl dan suhu *annealing* 59°C. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa polimorfisme gen *SLCO1B1* (rs4149056) berpengaruh sebagai farmakogen statin.

Kata Kunci: *Farmakogenomik, Statin, SLCO1B1, Polimorfisme.*

A. Pendahuluan

Farmakogenomik merupakan salah satu cabang ilmu yang menggunakan informasi genetik, yang bertujuan untuk menghindari reaksi obat yang merugikan atau obat yang berpotensi mengakibatkan toksisitas dengan mengindividualisasikan pemilihan obat dan penggunaan obat sehingga dapat memaksimalkan efek terapeutik dari suatu obat (14). Hal tersebut disebabkan variasi genetik, biasanya dalam bentuk *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) yang dapat menyebabkan perubahan respon metabolik sehingga pada akhirnya mempengaruhi farmakokinetik obat (9). Pengaruh terhadap farmakokinetika obat tersebut akhirnya akan menentukan dosis obat yang diperlukan oleh setiap individu.

Salah satu obat yang toksisitas dan dosisnya dipengaruhi oleh SNP adalah statin. Obat ini metabolismenya dipengaruhi oleh SLCO1B1. SLCO1B1 merupakan variasi genetik pada gen pengkode protein polipeptida anion organik 1-B1 atau OATP1B1, yang terletak pada membran basolateral hepatosit manusia. Varian alel SLCO1B1 yang paling umum adalah SLCO1B1*5 (rs4149056) yang didefinisikan sebagai polimorfisme nukleotida tunggal (rs4149056, T>C) penghasil substitusi asam amino valin pada posisi 174 menjadi asam amino alanin (p.Val174Ala) (9). Varian alel tersebut menghasilkan struktur protein OATP1B1 yang berbeda, sehingga penyerapan atau aktivitas transportasi statin dan metabolitnya ke dalam hati menurun yang pada akhirnya menyebabkan variasi konsentrasi plasma statin (8). Penurunan konsentrasi hepatoseluler statin tersebut dapat menghasilkan efektivitas statin yang lebih rendah dalam mengurangi *Low Density Lipoprotein* (LDL) karena statin bekerja menurunkan LDL dengan menginhibisi *cholesterol-synthesizing enzyme* HMGCR yang terdapat di dalam hepatosit secara kompetitif. Kemudian, peningkatan kadar statin sistemik dapat meningkatkan risiko pengembangan kelemahan otot dan nyeri otot (miopati) (11).

Metode yang digunakan untuk mendeteksi adanya polimorfisme gen SLCO1B1 adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR). PCR merupakan salah satu metode untuk mengamplifikasi DNA atau menduplikasi DNA hingga jutaan kali dalam waktu yang singkat, dengan menggunakan enzim DNA polymerase (13). Tahapan PCR terdiri dari denaturasi, *annealing*, dan pemanjangan DNA. Faktor-faktor yang mempengaruhi PCR diantaranya jenis dan konsentrasi DNA polymerase, konsentrasi dapar yang digunakan pada PCR, dan suhu *annealing* primer. Jika suhu *annealing* terlalu tinggi akan mengakibatkan amplifikasi menjadi gagal karena tidak terjadi penempelan primer, sedangkan jika terlalu rendah menyebabkan primer akan menempel pada sisi lain genom sehingga mengakibatkan DNA yang terbentuk memiliki spesifitas yang rendah (4). Selain hal-hal tersebut, saat amplifikasi DNA dilakukan hal yang juga tak kalah penting adalah menggunakan primer yang tepat. Primer yang tepat didapatkan melalui proses desain primer (6). Dengan demikian, optimasi metode PCR dan juga desain primer sangat penting dilakukan untuk memastikan produk PCR yang tepat dalam jumlah yang optimal.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka perumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut: “Bagaimana kondisi optimal yang PCR untuk identifikasi gen SLCO1B1 dari metode PCR pada kondisi tersebut?”. Selanjutnya, tujuan dalam penelitian ini diuraikan dalam pokok-pokok sebagai berikut.

1. Untuk membuat primer yang spesifik dalam mengidentifikasi polimorfisme gen SLCO1B1 (rs4149056).
2. Untuk menetapkan kondisi optimum dari metode PCR yang sesuai pada identifikasi polimorfisme gen SLCO1B1 dalam statin.

B. Metodologi Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara *in silico* dan eksperimental laboratorium di Prodia Jakarta. Penelitian yang dilakukan secara *in silico* ini dilakukan untuk mendapatkan primer yang spesifik untuk gen SLCO1B1 (rs4149056). Sedangkan, penelitian yang dilakukan di Prodia Jakarta dilakukan beberapa tahapan kerja diantaranya ekstraksi DNA menggunakan *Geneaid Genomic DNATM Mini Kit (Blood/Culture Cells)* GB 100/GB300, pengujian nilai konsentrasi dan kemurnian DNA dengan menggunakan *NanoDropTM One/One C Microvolume UV-Vis Spectrophotometer*, dan dilakukan optimasi kondisi PCR dengan memvariasikan konsentrasi reagen PCR dan juga suhu *annealing*.

C. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Desain Primer Gen SLCO1B1 (rs4149056) Secara *In Silico*

Dilakukan dengan mencari primer spesifik dari gen SLCO1B1 (rs4149056) pada laman web NCBI. Kemudian, setelah primer spesifik tersebut didapat dilakukan analisis primer yang bertujuan untuk menentukan primer yang paling baik dengan menggunakan *Oligo Analyzer Tool* yang dapat diakses melalui situs web IDT dan *PCR PrimerStats Tool* yang dapat diakses melalui situs web ([PCR Primer Stats \(bioinformatics.org\)](http://PCRPrimerStats.bioinformatics.org)). *Tool* tersebut menampilkan karakteristik primer meliputi berat molekul, komposisi primer (%GC), dan *Melting Temperature* (T_m), *GC Clamp*, *Self annealing*, dan *Hairpin formation*. Berikut merupakan primer yang telah didesain, yang dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil Desain Primer Gen SLCO1B1 (rs4149056)

Primer Forward	Primer Reverse
5'- GGT TGT TTA AAG GAA TCT GGG TCA T -3'	5'- GCA GCA GCC ACA AGA AGA CT -3'

Ekstraksi DNA dari Sampel Darah

Ekstraksi DNA bertujuan untuk memisahkan DNA dari sel dan komponen lainnya seperti protein dan RNA (1). Sampel yang digunakan pada ekstraksi DNA yaitu *whole blood* dan *buffy coat* yang diambil dari sel darah merah dan menggunakan protokol *Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) Fresh Blood* dan *Buffy Coat Protocol*. Prinsip dalam melakukan ekstraksi DNA yaitu berdasarkan prinsip sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip sentrifugasi didasarkan pada pemisahan berat jenis molekul dengan memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang memiliki berat jenis molekul lebih besar akan berada di dasar larutan sedangkan substansi dengan berat jenis molekul lebih kecil akan berada pada permukaan larutan. Kemudian untuk prinsip presipitasi/pengendapan didasari pada pengendapan yang membentuk dua lapisan dalam larutan, yaitu supernatan (substansi berupa larutan) dan pelet (substansi berupa endapan) (3). Berikut merupakan hasil pengujian konsentrasi dan kemurnian DNA menggunakan *NanoDrop* yang tertera pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil Uji Konsentrasi dan Kemurnian DNA dengan *NanoDrop*

Nama Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	A260/A280	A260/A230
K1F (<i>whole blood</i>)	20,5	1,77	1,44
K2F (<i>whole blood</i>)	47,8	1,82	2,38
M1 (<i>buffy coat</i>)	67,9	1,84	2,29
M2 (<i>buffy coat</i>)	48,6	1,86	2,14
A1 (<i>buffy coat</i>)	45,0	1,83	2,55
A2 (<i>buffy coat</i>)	63,4	1,85	2,42
F1 (<i>buffy coat</i>)	45,7	1,85	2,27
F2 (<i>buffy coat</i>)	12,6	1,86	1,06

Perbandingan hasil pembacaan pada panjang gelombang 260 dengan 280 nm dikatakan baik apabila rasio kemurnian A260/A280 yang didapat diantara 1,8 – 2,0 dan rasio kemurnian A260/230 terdapat pada rentang 2,0 – 2,2. Berdasarkan hasil uji konsentrasi dan kemurnian DNA pada **Tabel 2**, pada pengukuran rasio kemurnian A260/A280 rata-rata sampel hasil ekstraksi DNA berada di dalam rentang kemurnian sehingga menunjukkan bahwa sampel bebas dari pengotor protein dan DNA (5).

Selain itu, pada pengukuran rasio kemurnian A260/A230 dengan absorbansi 230 nm dilakukan sebagai hasil dari kontaminasi lain yang tidak termasuk pada absorbansi 260 dan 280 nm. Hasil yang ditemukan pada pengujian A260/A230 dapat terlihat pada **Tabel 2**. didapatkan hasil bahwa pada hampir rata rata keseluruhan sampel tidak masuk rentang nilai dimana didapatkan hasil yang lebih tinggi dari rentang nilai dan sampel nomor K1F dan F2 memiliki nilai yang lebih rendah. Rasio nilai yang rendah pada pengukuran A260/A230 disebabkan oleh terdapatnya residu fenol sisa dari ekstraksi DNA, residu guanidin pada saat menggunakan kolom di prosedur ekstraksi DNA dan residu glikogen, sedangkan rasio nilai yang lebih tinggi pada pengukuran A260/A230 disebabkan oleh alas pada saat pengukuran blanko yang tidak bersih atau menggunakan blanko yang berbeda pada saat pengukuran dan saat ekstraksi (5).

Optimasi Kondisi PCR

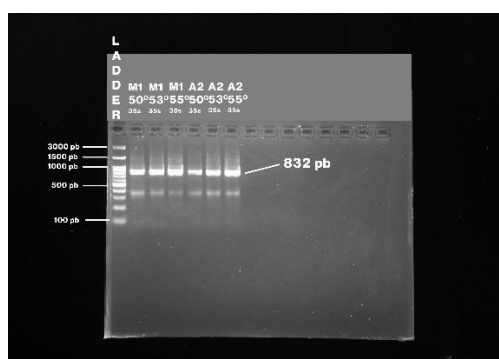
Pada tahapan proses optimasi kondisi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) digunakan dua optimasi, yaitu konsentrasi *template* DNA dan suhu *annealing*. Tahap pertama dalam proses optimasi kondisi PCR konsentrasi *template* DNA dengan komposisi awal reagen-reagen PCR yang tertera pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Optimasi Reagen PCR

Reagen PCR	Jumlah (Optimasi 1)	Jumlah (Optimasi 2)
Template	20 ng/5 μ l	10 ng/5 μ l
Primer	1 μ l	1 μ l
MyTaq HS Mix	12,5 μ l	12,5 μ l

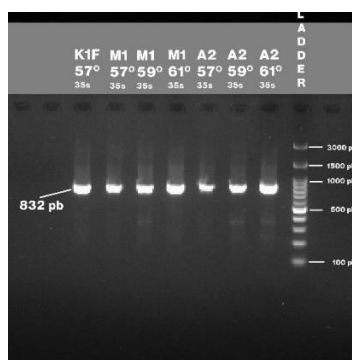
Template DNA yang digunakan yaitu 20 ng/5 µl seperti pada percobaan optimasi 1 dan 2 yang ditunjukkan pada **Tabel V.3**. Hasil yang terlihat pada visualisasi elektroforesis terdapat adanya *smear* dibagian bawah pita, hal tersebut kemungkinan menunjukkan bahwa konsentrasi *template* DNA yang digunakan terlalu besar. *Template* DNA yang terlalu sedikit akan menyebabkan DNA target tidak teramplifikasi, sedangkan *template* DNA yang terlalu besar tidak akan menghasilkan produk PCR yang baik (12). Sehingga pada percobaan 3 dilakukan pengurangan konsentrasi *template* DNA menjadi 10 ng/5 µl. Hasil elektroforesis pada percobaan 3, menunjukan *smear* yang berkurang dibandingkan dengan hasil elektroforesis percobaan sebelumnya. *Smear* merupakan noda pada pita DNA yang terbentuk secara tebal, mengumpul, dan tidak menyebar dapat disebabkan karena masih terdapatnya kontaminan seperti protein saat proses ekstraksi (7; dan 2).

Kemudian untuk proses optimasi kedua yaitu optimasi suhu *annealing* menggunakan metode gradient PCR. Gradient PCR merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengetahui optimasi temperatur *annealing* pada DNA dengan menggunakan berbagai variasi suhu (10). Gradient PCR yang digunakan pada penelitian kali ini dimulai dari suhu 50°C - 61°C, Hasil optimasi diperoleh melalui PCR dan visualisasi dengan elektroforesis. Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis untuk optimasi PCR yang ditunjukan pada **Gambar 1**, dimana pada optimasi suhu 50, 53 dan 55°C masih belum terbentuk *single band*/pita tunggal, yaitu terbentuk dua pita yang terlihat pada ladder ukuran 300-400 bp dan 700-800 bp.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis pada suhu 50°C, 53°C, dan 55°C

Selanjutnya, dilakukan optimasi suhu *annealing* pada suhu yang lebih tinggi yaitu pada suhu 57°C, 59°C, dan 61°C terlihat pita-pita DNA berhenti pada *ladder* ukuran 832 pb pada ukuran *ladder* 800-900 pb yang tertera pada **Gambar 2**. Pada suhu 57°C dan 61°C, masih terlihat bahwa pita yang dihasilkan masih terdapat *smear* tipis pada bagian bawah. Lalu, pada suhu 59°C sudah mulai terbentuk *single band*.



Gambar 2. Hasil Elektroforesis pada suhu 57°C, 59°C, dan 61°C

Berikutnya, dilakukan optimasi suhu *annealing* kembali pada suhu 57°C dan 59°C, terlihat pita-pita DNA berhenti pada *ladder* ukuran 832 pb pada ukuran *ladder* 800-900 pb. Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis yang tertera pada **Gambar 3**, dapat dilihat bahwa pada suhu 57°C, masih terlihat bahwa pita yang dihasilkan masih terdapat *smear* tipis pada bagian bawah. Sedangkan, pada suhu 59°C sudah mulai terbentuk *single band* yang bersih.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis pada suhu 57°C dan 59°C

Berdasarkan hasil optimasi kondisi PCR diatas, maka didapatkan kondisi siklus PCR yang paling optimum untuk dijadikan sebagai protokol yang dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Siklus Reaksi PCR

Step	Suhu	Waktu
Pra denaturasi	95°C	1 menit
Denaturasi	95°C	15 detik
<i>Annealing</i>	59°C	15 detik
Elongasi	72°C	10 detik

D. Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan dalam penelitian ini, peneliti menarik kesimpulan beberapa hasil penelitian, diantaranya adalah sebagai berikut:

1. Pada penelitian ini berhasil dirancang kandidat primer terbaik untuk identifikasi polimorfisme gen SLCO1B1 (rs4149056) yaitu dengan primer *forward* 5'-GGT TGT TTA AAG GAA TCT GGG TCA T-3' dan primer *reverse* 5'-GCA GCA GCC ACA AGA AGA CT-3'.
2. Kondisi optimum dari metode PCR untuk identifikasi polimorfisme gen SLCO1B1 (rs4149056) yaitu pada konsentrasi template DNA sebesar 10 ng/5 µl dan suhu *annealing* pada suhu 59°C.

Acknowledge

Terima kasih kepada Bapak Abdul Kudus, M.Si., Ph.D. selaku Dekan Fakultas MIPA UNISBA, Ibu apt. Sani Ega Priani, M.Si. selaku ketua Prodi Farmasi UNISBA, Bapak Budi Prabowo Soewondo, M.Sc. sebagai dosen wali, Ibu apt. Bertha Rusdi, Ph.D. dan Bapak Dr. Miswar Fattah, M.Si. selaku dosen pembimbing utama dan serta, kepada

kedua orang tua yang sudah memberikan dukungan, serta teman-teman yang sudah membantu dalam menyelesaikan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] Hutami, R., Idzni, N., Ranasasmita, R., & Suprayatmi, M. (2017). DNA EXTRACTION METHOD FOR MOLECULAR DETECTION Gel for Electrophoresis Materials Result. *Jurnal Pertanian*, 8(2), 106–112. Djaslim S. *Intisari Pemasaran dan Unsur-unsur Pemasaran*. Bandung: Linda Karya; 2003.
- [2] Iqbal, M., Buwono, I. D. and Kurniawati, N. (2016) ‘Analisis Perbandingan Metode Isolasi DNA Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus (WSSV) Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*) Comparative Analysis of DNA Isolation Methods for Detection White Spot Syndrome Virus (WSSV) in White Shrimp (*Litopenaeus vann*’, *Jurnal Perikanan Kelautan*, VII(1), pp. 54–65.
- [3] Kurniawati, M. D., Sumaryam, dan Nurul H. (2019). Aplikasi Polymerase Chain Reaction (PCR) Konvensional dan Real Time-PCR untuk Deteksi Virus VNN (Viral Nervous Necrosis) pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Jurnal Techno-Fish*, Vol. 3. No. 1, 2581-1592, E-ISSN: 2581-1665.
- [4] Ludyasari, A. (2014). Skripsi: *Pengaruh Suhu Annealing pada Program PCR Terhadap Keberhasilan Amplifikasi DNA Udang Jari (Metapenaeus Elegan) Laguna Segara Anakan Cilacap Jawa Tengah*. Malang: Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang.
- [5] Matlock, B. (2015) ‘Assessment of Nucleic Acid Purity’, *Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers*, pp. 1–2.
- [6] Nuryady, M. M., Husamah, H., Miharja, F. J., Hindun, I., & Patmawati, P. (2020). Desain dan Optimasi Primer Gen Pengkode MRPA Trypanosoma evansi dan Penerapan pada Pembelajaran Biologi Molekuler. *Jurnal Penelitian Dan Pengkajian Ilmu Pendidikan: E-Saintika*, 4(2), 211. Doi: 10.36312/e-saintikav4i2.217
- [7] Rahman, M. T. et al. (2013) ‘Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review’, *Anwer Khan Modern Medical College Journal*, 4(1), pp. 30–36. doi: 10.3329/akmmcjv4i1.13682.
- [8] Ramakumari, N., Indumathi, B., & Krishna, S. (2018). Impact of pharmacogenetics on statin-induced myopathy in South-Indian subjects. *Indian Heart Journal*, 70, S120–S125. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2018.07.009>
- [9] Robledo, M., dkk. (2019). Utilidad del gen SLCO1B1 como marcador de interés en la farmacogenómica de las estatinas. *Revista Colombiana de Cardiología*, Vol. 26. No. 1. pp. 24 – 30. doi: 10.1016/j.rccar.2018.05.006.
- [10] Sambrook, J. and Russel, D. W. (2001) *Molecular Cloning A Laboratory Manual Volume 2*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. doi: 10.3724/sp.j.1141.2012.01075.
- [11] Turkmen, et al. (2021). Statin treatment effectiveness and the SLCO1B1*5 reduced function genotype: long-term outcomes in women and men. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.12.21264886>, Available at: medrxiv.org.
- [12] Turrahmi, M., Nurhidayani, N., Hasyimuddin, H., & Pabendon, M. B. (2021). Uji kualitas dan kuantitas tanaman jewawut (*setaria italic*) di Balai Penelitian Tanaman Serealia Kabupaten Maros. *Filogeni: Jurnal Mahasiswa Biologi*, 1(2), 57–62. <https://doi.org/10.24252/filogeni.v1i2.23803>.
- [13] Verma et al. (2014). Review Article: Scientific Concepts Of Polymerase Chain

- Reaction (PCR). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol. 5. No. 8. pp. 3086 – 3095. E-ISSN: 0975-8232; P-ISSN: 2320-5148.
- [14] Weinshilboum, R. M., MD dan Liewei W., MD, PhD. (2017). Pharmacogenomics: Precision Medicine and Drug Response. *Mayo Clin Proceedings*, Vol. 92, No. 11. pp. 1711 – 1722. doi: 10.1016/j.mayocp.2017.09.001.