

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA

Konsentrasi DNA yang terdapat pada sampel memiliki nilai yang berbeda-beda dengan rentang 461,33 – 5625,12 ng/μl. Konsentrasi terendah terdapat pada sampel DMC1500 dan konsentrasi tertinggi pada sampel CM750. Pada uji kuantitatif sampel DNA dihasilkan konsentrasi dan kemurnian dari masing-masing sampel. Kemurnian dari keseluruhan sampel berkisar antara 1,04 – 1,98. Kemurnian terendah terdapat pada sampel CM750 dan tertinggi pada sampel NC atau kontrol. Tingkat kemurnian dan konsentrasi dari masing-masing sampel yang bervariasi (Tabel 3) disebabkan oleh adanya beberapa faktor.

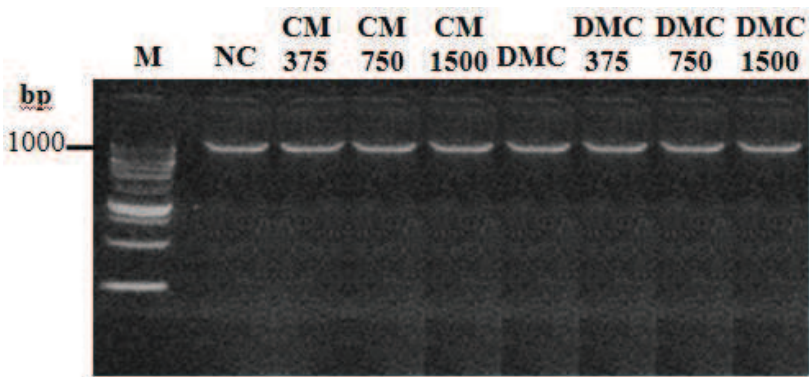
Tabel 3. Kemurnian dan konsentrasi sampel DNA

<b>Perlakuan</b>	<b>Kemurnian (260Å/280Å)</b>	<b>Konsentrasi (ng/μl)</b>
NC	1,98	985,34
CM375	1,06	5535,98
CM750	1,04	5625,12
CM1500	1,85	4211,23
DMC	1,76	5171,17
DMC375	1,05	5586,83
DMC750	1,38	5509,26
DMC1500	1,96	461,33

Terdapat beberapa faktor yang dapat memengaruhi konsentrasi DNA yaitu proses presipitasi dan kelarutan sampel. Proses presipitasi bertujuan untuk mengendapkan DNA yang telah dipisahkan dari kontaminan sehingga dihasilkan ekstrak DNA murni. Pada proses presipitasi terjadi penambahan larutan kimia seperti etanol absolut dan garam dengan konsentrasi tinggi. Konsentrasi senyawa kimia

untuk presipitasi DNA yang semakin tinggi akan meningkatkan kelarutan DNA, akan tetapi pada konsentrasi yang terlalu tinggi akan menyebabkan sampel DNA terlalu pekat dan memengaruhi viskositas sampel (Khare dkk., 2014). Kondisi ini dapat berpengaruh terhadap kemurnian DNA. Nilai kemurnian DNA berkisar antara 1,8 – 2,0. Apabila kemurnian sampel kurang dari 1,8 mengindikasikan adanya kontaminasi protein, atau kontaminasi RNA pada kemurnian lebih dari 2,0 (Fatchiyah dkk., 2011). Kemurnian DNA yang tidak maksimal dapat disebabkan oleh proses purifikasi yang kurang optimal. Adanya kontaminan berupa molekul non-DNA dapat disebabkan kombinasi larutan purifikasi yang tidak tepat. Selain itu faktor penting lainnya dalam proses isolasi asam nukleat adalah denaturasi protein yang dapat dilakukan menggunakan proteinase-K (pro-K) (Lever dkk., 2015).

Separasi pita yang terbentuk pada masing-masing sampel, berdasarkan uji kualitatif menunjukkan adanya satu pita DNA yang berada di atas marker (Gambar 6).



Gambar 6. Produk isolasi total DNA yang divisualisasi menggunakan gel agarosa 1%.

Uji kualitatif akan menampilkan visualisasi pita fragmen produk isolasi DNA total (*whole genome DNA*). Pita yang terbentuk berada di atas marker atau berdasarkan ukuran marker pita DNA yang

terbentuk berukuran lebih dari 1000 bp (Alberts dkk., 2002). Pada uji kualitatif menggunakan gel agarosa dilengkapi dengan penambahan pewarna etidium bromida (EtBr). Pewarnaan EtBr membantu identifikasi fragmen DNA yang terseparasi dalam gel. EtBr yang mengandung zat fluoresen akan terikat pada untai ganda DNA dan menyebabkan pendaran (Fatchiyah dkk., 2011).

#### **4.2 Amplifikasi Gen *Hnfla***

Masing-masing sampel telah berhasil diamplifikasi dan menunjukkan perbedaan panjang basa. Gen *Hnfla* pada exon 2 teramplifikasi pada panjang 357 bp, sedangkan exon 4 pada panjang 456 bp (Gambar 7). Pita DNA yang terbentuk pada masing-masing sampel baik exon 2 dan exon 4 terlihat sejajar dengan pita pada marker sesuai dengan ukurannya meskipun pada exon 2 pita DNA yang terbentuk terlihat tipis. Hal ini dapat dipengaruhi oleh konsentrasi DNA yang terlalu kecil sehingga saat divisualisasikan terlihat tipis. Menurut Garibyan & Avashia (2013) amplifikasi pada teknik analisis DNA digunakan untuk mendapatkan sekuen target dari sampel *whole genome* sehingga selanjutnya dapat dilakukan proses sekuensing untuk mengetahui susunan basa DNA dari masing-masing sampel. Dengan menggunakan bantuan primer yang bersifat komplemen terhadap sekuen target dalam ekstrak *whole genome* DNA, proses amplifikasi hanya akan berlaku pada sekuen yang spesifik terhadap primer. Melalui prinsip inilah hasil amplifikasi apabila diuji secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarosa akan menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran tertentu sesuai panjang sekuen yang telah diamplifikasi. Ukuran sekuen yang diamplifikasi, agar dapat divisualisasikan memerlukan penentuan konsentrasi gel agarosa yang tepat. Struktur molekul DNA yang besar seperti DNA total membutuhkan konsentrasi gel agarosa yang rendah. Sedangkan hasil amplifikasi dengan ukuran yang lebih kecil menggunakan konsentrasi gel yang tinggi antara 1,5 – 2% (Fatchiyah dkk., 2011).

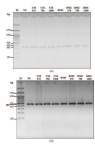


Figure 1. The protein levels of the indicated proteins were analyzed by Western blotting. The blots were probed with anti-*h*MDM2 and anti-*h*MDM4 antibodies. The blots were probed with anti-*h*MDM2 and anti-*h*MDM4 antibodies. The blots were probed with anti-*h*MDM2 and anti-*h*MDM4 antibodies. The blots were probed with anti-*h*MDM2 and anti-*h*MDM4 antibodies.

**4. Tabel dan Grafik (20 Soal)**

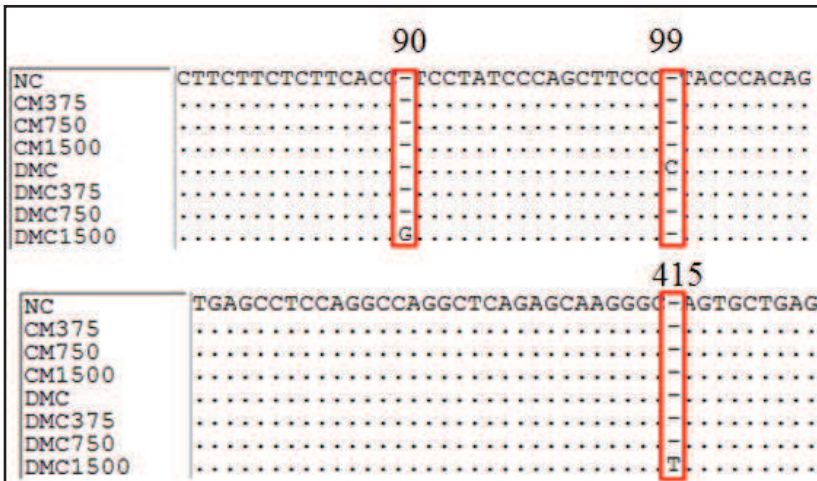
Salah satu cara untuk menyajikan data adalah dengan menggunakan tabel. Tabel adalah kumpulan data yang disusun secara sistematis. Tabel dapat digunakan untuk menyajikan data yang banyak dan kompleks. Tabel juga dapat digunakan untuk menyajikan data yang sederhana dan mudah dimengerti.

1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16
17	18	19	20

Gambar 1. Tabel dengan 4 kolom dan 5 baris.

Salah satu cara untuk menyajikan data adalah dengan menggunakan grafik. Grafik adalah kumpulan data yang disajikan secara visual. Grafik dapat digunakan untuk menyajikan data yang banyak dan kompleks. Grafik juga dapat digunakan untuk menyajikan data yang sederhana dan mudah dimengerti.

insersi basa sitosin pada kelompok DMT2 (DMC) setelah dibandingkan dengan kelompok kontrol normal (NC) yang tidak terjadi mutasi pada urutan ke-99. Pada kelompok normal pemberian protein CSN1S2 tidak menunjukkan perubahan sekuen. Pada kelompok DMT2 pemberian protein CSN1S2 menunjukkan perbedaan sekuen apabila dibandingkan dengan DMC akan tetapi tidak menunjukkan perbedaan dengan susunan basa pada NC.



Gambar 9. Susunan basa exon 4 menunjukkan adanya insersi di daerah tertentu pada DMC dan DMC1500. Insersi T<sub>99</sub> → C<sub>99</sub> pada sampel DMC, T<sub>90</sub> → G<sub>90</sub> dan A<sub>415</sub> → T<sub>415</sub> pada sampel DMC1500.

Kondisi ini menunjukkan bahwa protein CSN1S2 dapat menghambat terjadinya mutasi gen *Hnflα* exon 4 sehingga kembali ke keadaan normal. Kondisi tersebut ternyata hanya berlaku pada pemberian protein CSN1S2 dosis 375 dan 750 kg/mg BB (DMC375 dan DMC750). Tampak pada DMC1500 yang menunjukkan terjadinya mutasi di daerah lain yaitu insersi guanin T<sub>90</sub> → G<sub>90</sub> dan timin A<sub>415</sub> → T<sub>415</sub>. Adanya mutasi ini menunjukkan bahwa

pemberian dosis tinggi tidak aman bagi DNA. Sejalan dengan hal tersebut Agustina dkk., (2015) juga mengungkapkan bahwa pemberian protein CSN1S2 pada konsentrasi tinggi yaitu 4000 mg/kg dapat menyebabkan kerusakan jaringan dan pengurangan mineral selenium dalam ileum tikus betina normal.

Kondisi yang terjadi pada exon 4 yaitu adanya penambahan basa lain dalam sekuen atau disebut juga insersi. Insersi termasuk dalam jenis *frameshift mutation* dan biasanya terjadi pada penderita penyakit degeneratif (*genetic disorder*). Sesuai dengan apa yang ditemukan oleh Colclough dkk., (2013) pada penderita DMT2 banyak terjadi mutasi pada exon 4 yang merupakan *transactivation domain* pada gen *Hnfla* dengan salah satu jenis mutasi yang terjadi adalah insersi. Menurut Richards & Hawley (2011) insersi basa pada suatu sekuen DNA dapat menyebabkan pergeseran triplet kodon sehingga terjadi kesalahan *reading frame* pada mRNA yang dapat merubah asam amino pada daerah setelah terjadinya insersi. Perubahan asam amino tersebut akan membentuk protein yang berbeda dari protein normal dan umumnya bersifat nonfungsional.

#### **4.4 Perbaikan Kerusakan Gen *Hnfla* oleh Protein CSN1S2**

Pengaruh hiperkolesterol akibat pemberian pakan tinggi lemak (*high fat diet*) dapat memicu penumpukan asam lemak dan trigliserida yang menjadi radikal bebas yang kemudian akan memengaruhi proses fisiologi sel  $\beta$  pankreas (Meshram dkk., 2016). Sehingga sel  $\beta$  pankreas tidak dapat menyintesis insulin secara normal, sehingga terjadi peningkatan kadar gula dalam darah atau disebut hiperglikemia (Nessa dkk., 2016). Pada prinsip pembuatan hewan coba DMT2, pemberian STZ pada dosis rendah akan berperan dalam menyetabilkan kondisi hiperglikemia yang terindikasi pada penderita DMT2 (Goyal dkk., 2015). Selain itu STZ yang terakumulasi dalam sel  $\beta$  pankreas akan menghasilkan reaksi kimia toksik dan menyebabkan kerusakan pada DNA melalui alkilasi. Kinerja toksik STZ memerlukan proses *uptake* ke dalam sel. Melalui injeksi intraperitoneal, molekul STZ akan memasuki membran peritoneal melalui proses difusi (Szkudelski, 2001). Proses penyerapan akan terjadi secara difusi ke dalam pembuluh mesenterik yang mengalir ke pembuluh darah portal yang melalui hati sebelum diedarkan ke berbagai organ (Lukas dkk., 1971; Turner dkk., 2011).

Setelah mencapai sel  $\beta$  pankreas, molekul STZ akan lebih mudah terakumulasi dalam sel melalui GLUT2.

Interaksi STZ dengan DNA pada penderita DMT2 dapat melalui beberapa mekanisme. Sebagai agen alkilasi, STZ akan berinteraksi pada bagian cincin nitrogen dan atom oksisiklik DNA dan menghasilkan lesi DNA (DNA *lesions*) yaitu 7-metilguanin, 3-metiladenin dan O<sup>6</sup>-metilguanin. Sebagai sumber radikal bebas, STZ dapat menginduksi peningkatan reaksi oksidasi pada DNA dengan menghasilkan senyawa 8-oxoG (8-oxoguanin). Adanya lesi tersebut selain bersifat toksik dan mutagenik juga dapat menghambat DNA polimerase (Brenerman dkk., 2014; Kondo dkk., 2010). *Strand* DNA yang rusak akan menyebabkan overaktivasi PARP (*poly* (ADP-*ribose*) *polymerase*) yang merupakan kompleks protein dan terdiri dari XRCC1 (*X-ray repair cross complementing protein 1*), DNA polimerase  $\beta$  dan DNA ligase III. Kompleks protein tersebut dibutuhkan untuk proses sintesis dan pelekatan segmen DNA pada mekanisme *repairing* DNA yang mengalami kerusakan (Dantzer dkk., 2000). Overaktivasi PARP ini menyebabkan penurunan level NAD<sup>+</sup> seluler (*cellular nicotinamide adenine dinucleotide*) dan penurunan ATP sehingga berakibat pada inhibisi sintesis insulin (Goyal dkk., 2015).

Secara alami DNA yang mengalami kerusakan dapat dideteksi dan diperbaiki melalui mekanisme *proofreading* oleh DNA polimerase sehingga dapat menjadi normal. Penghambatan perbaikan oleh DNA polimerase menyebabkan *strand* yang rusak berubah menjadi mutasi. Adanya mutasi ini dapat bersifat *deleterious* dengan mengubah susunan protein menjadi non-fungsional. Pemberian protein CSN1S2 sebagai antioksidan diduga dapat menghambat peningkatan ROS (*reactive oxygen spesies*) dan menginduksi aktivasi DNA polimerase untuk melakukan perbaikan pada *strand* DNA yang rusak. Pada pemberian protein CSN1S2 secara oral akan melalui *gastrointestinal tract* kemudian di dalam sistem pencernaan protein CSN1S2 tersebut akan dipecah menjadi beberapa bioaktif peptida oleh enzim protease di usus halus. Bioaktif peptida hasil pencernaan ini terdiri dari berbagai macam asam amino yang kemudian diserap oleh jonjot-jonjot usus pada dinding ileum untuk diedarkan ke seluruh sel tubuh melalui aliran darah (Singh, 2011).

Bioaktifitas peptida sebagai molekul pensinyalan memiliki peran penting dalam fungsi fisiologis dan patogenesis (Sharma dkk., 2011;



Fadaei, 2012). Salah satu peranan bioaktif peptida dalam patogenesis DMT2 menurut Fatchiyah dkk., (2015b) adalah dari delapan bioaktif peptida yang teridentifikasi pada protein CSN1S2 3 diantaranya fragmen 41-47 (CSN1S2 f41-47), fragmen 182-189 (CSN1S2 f182-189) dan fragmen 214-221 (CSN1S2 f214-221) dapat berinteraksi dengan RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) pada C-domain sehingga menghambat interaksi RAGE-AGE. Penghambatan interaksi tersebut berakibat pada penurunan ROS (*reactive oxygen spesies*) dan penghambatan aktivasi jalur pro-inflamatori. Penurunan ROS oleh bioaktif peptida dari CSN1S2 dapat meminimalkan paparan toksik terhadap DNA. Aktivasi DNA polimerase akan mengenali *strand* DNA yang mengandung lesi dan melalui aktifitas enzim exonuklease terjadi pemotongan gula fosfat pada lesi DNA. Sintesis basa sesuai dengan template yang normal akan dilakukan oleh DNA polimerase dan dilanjutkan dengan DNA ligase untuk pelekatan *strand* DNA baru. Setelah melalui perbaikan *strand* kembali normal dan mengembalikan stabilitas genetik sehingga meminimalkan terjadinya mutasi (Sukhanova dkk., 2005; Beard & Wilson, 2006; Crespan dkk., 2011; Krokan dkk., 2013).