Lampiran 1. Pembuatan Reagen dan Desain Primer

1. Pembuatan Buffer Lisis

Larutan *stock* Tris-Cl 1 M pH 8, EDTA 2-Na 0.5 M pH 8 dan NaCl 5 M masing-masing sebanyak 30 mL serta SDS 10% sebanyak 20 mL.

Tris-Cl 1 M pH 8 30 ml (0.03 liter); Mr Tris-Cl (121.14) :
Gram = M x Mr x V
= 1 x 121.14 x 0.03
= 3.6342 gram Tris-Cl + 30 ml dH_2O & di*adjust* pH hingga 8
EDTA 2-Na 0.5 M pH 8 (0.03 liter); Mr EDTA 2-Na (372.24)
Gram = M x Mr x V
= 0.5 x 372.24 x 0.03
= 5.5836 gram EDTA 2-Na + 30 ml dH_2O & di*adjust* pH hingga 8
NaCl 5 M 30 mL (0.03 liter); Mr NaCl (58.44)
Gram = M x Mr x V
= 5 x 58.44 x 0.03
= 8.766 gram NaCl + 30 ml dH_2O
SDS 10% 20 mL (0.02 liter); Mr SDS (288.38)
10% x 20 mL = 2 ml (jika dalam bentuk *liquid*) + 20 ml dH_2O
10% x 20 mL = 2 gram (jika dalam bentuk serbuk) + 20 mL dH_2O

Buffer lysis (Tris-Cl 10 mM, EDTA 2-Na 25 mM, NaCl 100 mM, SDS 1% & Pro-K) 12 mL (untuk 8 sampel sebanyak 3 ulangan)

Tris-Cl 10 mM
$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$
10 mM x 12 mL = 1 M x X
X = 0,12 ml (120 µl) Tris-Cl 1 M pH 8 dari *stock*

EDTA 2-Na 25 mM

$M_1 \times V_1$	$= M_2 \times V_2$
25 mM x 12 ml	= 0.5 M x X
X	= 0,6 mL (600 µl) EDTA 2-Na 0.5 M pH 8 dari *stock*
NaCl 100 mM	
$M_1 \times V_1$	$= M_2 \times V_2$
100 mM x 12 ml	= 5 M x X
X	= 0,24 ml (240 µl) NaCl 5 M dari *stock*
SDS 1%	
$M_1 \times V_1$	$= M_2 \times V_2$
1% x 12 ml	= 10% x X
X	= 1,2 ml (1200 µl) SDS 10% dari *stock*
Proteinase-K (Pro-K)	
Stock	= 20 mg/ml
Pro-K : buffer lysis	= 1: 40
	= 300 : 12000 (untuk 10 mg/ml)
	= 150 : 12000 (untuk 20 mg/ml)

2. Pembuatan PCI (*Phenol* : *Chloroform* : *Isoamyl Alcohol*) (25:24:1) untuk 1 ml (1000 µl)

Phenol	$= \frac{25}{50} \times 1000$
	= 500 µl
Chloroform	$= \frac{24}{50} \times 1000$
	= 480 µl
Isoamyl Alcohol	$= \frac{1}{50} \times 1000$
	= 20 µl

3. Pembuatan NaOAc 3 M pH 5.2 30 ml (0.03 liter); Mr NaOAc (82.03)

Gram = M x Mr x V

= 3 x 82.03 x 0.03
= 7.3827 gram NaOAc + 30 mL dH_2O & di*adjust* pH hingga 5.2

4. Pembuatan Buffer TE pH 7.6 20 mL (10 mM Tris-Cl & 1 mM EDTA 2-Na)

Stock
Buffer TE pH 7.6
Tris-Cl 1 M pH 8 — Tris-Cl 10 mM pH 8
EDTA 2-Na 0.5 M pH 8 — EDTA 2-Na 1 mM pH 8
dH_2O — dH_2O lalu di*adjust* pH

Tris-Cl 10 mM pH 8
$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$
10 mM x 20 ml = 1 M x X
X = 0.2 mL (200 µl) Tris-Cl 1 M pH 8 dari *stock*

EDTA 2-Na 1 mM pH 8
$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$
1 mM x 20 ml = 0.5 M x X
X = 0.04 mL (40 µl) EDTA 2-Na 0.5 M pH 8 dari *stock*

Ditambah dengan dH_2O hingga volumenya menjadi 20 ml lalu di*adjust* pH hingga 7.6

5. Pembuatan Buffer TBE 10x pH8 500 ml (0,05 M Tris-Cl; 0,05 M Asam Boric; 0,01M EDTA 2-Na)

Tris-Cl (Mr 121,14)
gr = M x V x Mr
gr = 0,05 M x 0,5 L x 121,14
gr = 3, 035 gr (1x) = 30,3 (10x)
Boric acid (Mr 61,83)
gr = M x V x Mr
gr = 0,05 M x 0,5 L x 61,83
gr = 1,54 gr (1x) = 15,4 gr (10x)

EDTA 2-Na (Mr 372,24)

gr	= M x V x Mr
gr	= 0,01 M x 0,5 L x 121,14
gr	= 0,19 gr (1x) = 1,9 gr (10x)

Ditambah dengan dH_2O hingga volumenya menjadi 500 ml lalu *diadjust* pH hingga 7.6

6. Pengenceran Primer

Membuat *stock* primer exon 2 dan exon 4 100 pmol/µl:

Primer *forward* exon 2 (23.6 nmol)

23.6 nmol = 23.6×10^{-9} mol

M = $\frac{mol}{V}$

$10^{-4} = \frac{23.6 \times 10^{-9}}{V}$

V = 23.6×10^{-5} L

V = 236 µl ddH_2O yang ditambahkan untuk melarutkan 23.6 nmol primer

Primer *reverse* exon 2 (22.9 nmol)

22.9 nmol = 22.9×10^{-9} mol

M = $\frac{mol}{V}$

$10^{-4} = \frac{22.9 \times 10^{-9}}{V}$

V = 22.9×10^{-5} L

V = 229 µl ddH_2O yang ditambahkan untuk melarutkan 22.9 nmol primer

Primer *forward* exon 4 (20.2 nmol)

20.2 nmol = 20.2×10^{-9} mol

M = $\frac{mol}{V}$

$10^{-4} = \frac{20.2 \times 10^{-9}}{V}$

V = 20.2×10^{-5} L

V = 202 µl ddH_2O yang ditambahkan untuk melarutkan 20.2 nmol primer

Primer *reverse* exon 4 (24.6 nmol)

24.6 nmol = 24.6×10^{-9} mol

M = $\frac{mol}{V}$

10^{-4} = $\frac{24.6 \times 10^{-9}}{v}$

V = 24.6×10^{-5} L

V = 246 µl ddH_2O yang ditambahkan untuk melarutkan 24.6 nmol primer

Jika ingin membuat primer 10 pmol dalam 50 µl:

$M_1 \times V_1$ = $M_2 \times V_2$

100 pmol x V_1 = 10 pmol x 50 µl

V_1 = 5 µl primer *forward* dan *reverse* pada masing-masing exon dari *stock*, lalu ditambah dengan ddH_2O hingga volumenya mencapai 50 µl.

7. Pembuatan PCR Mix (10 ml.)

Primer *forward*	= 0,5 µl
Primer *reverse*	= 0.5 µl
ddH_2O	= 3,5 µl
PCR *mix solution*	= 5 µl
DNA	= 0,5 µl

8. Sekuen Exon 2 Gen *Hnf1α*

Terdiri dari 199 bp dimulai pada urutan 10880-11079:

10741 catgtataca cacgtgtcct ggtatggaac ccgagtacaa gtcctaccca cagaggaggg

10801 ccctagtctc cagaacccca gcatcgcctt aggggtcagg aagggccatt gaacagaccc

10861 tgtccttgct cccctccagg gaggacccat ggcgcgtggc aaagatggtc aagtcgtacc

10921 tgcagcaaca caacatcccc cagcgggagg tggtggacac tacgggtctc aaccagtccc

10981 acctgtccca gcacctcaac aagggcaccc ccatgaagac gcagaagcgg gccgcgctgt

11041 acacctggta cgtccgcaag cagcgagagg tggctcagcg taagtaacga ccccagcctg

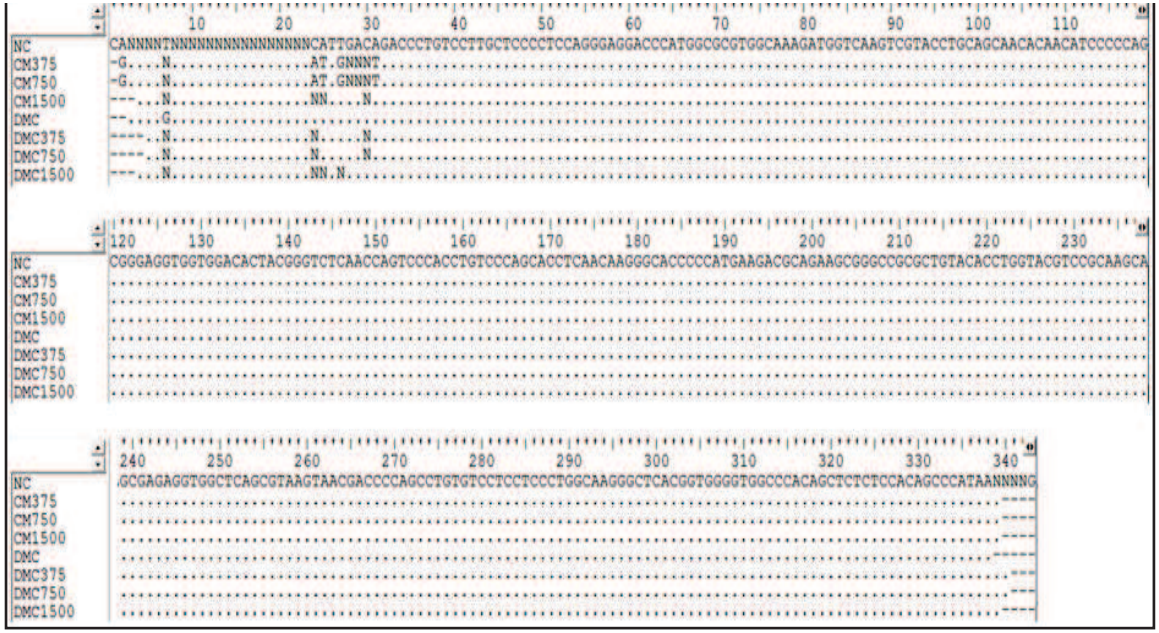
11101 tgtcctcctc cctggcaagg gctcacggtg gggtggccca cagctctctc cacagcccat
11161 agggtgagag cgttaccccc tcccccatct cgtagattcg tgagactgag aggtacaaga
11221 aaggggtcct cggacttacc gtgcattctg cacgaggtgc cgagggaagg gagcggatgg

9. Sekuen Exon 4 Gen *Hnf1α*

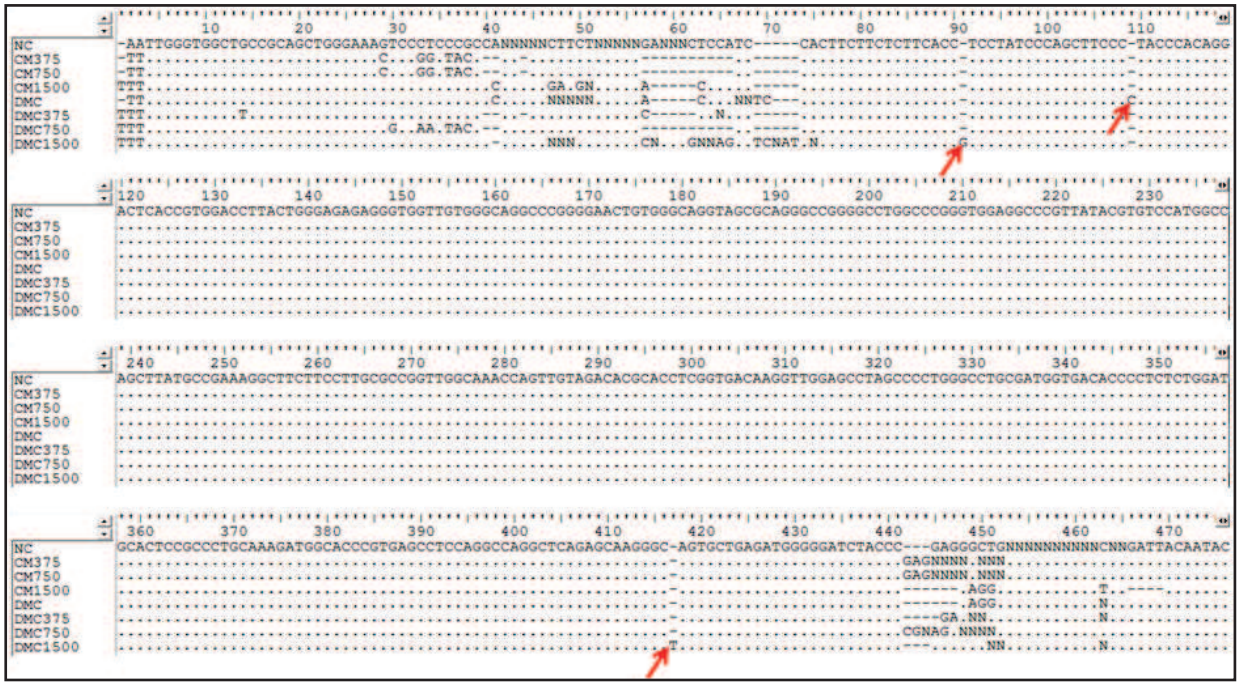
Terdiri dari 241 bp dimulai pada urutan 16994-17235:

16801 gctttcggac cattcatctc atttcatctc caattcagcc ctatggctgt tttgtcctct
16861 gagaggctaa gtcacttgcc caaggtcacg cagcagggct ggtattgtaa tccagccctc
16921 gggtagatcc cccatctcag cactgccctt gctctgagcc tggcctggag gctcacgggt
16981 gccatctttg cagggcggag tgcatccaga gaggggtgtc accatcgcag gcccaggggc
17041 taggctccaa ccttgtcacc gaggtgcgtg tctacaactg gtttgccaac cggcgcaagg
17101 aagaagcctt tcggcataag ctggccatgg acacgtataa cgggcctcca cccgggccag
17161 gccccggccc tgcgctacct gcccacagtt ccccgggcct gcccacaacc accctctctc
17221 ccagtaaggt ccacggtgag tcctgtgggt agggaagctg ggataggagg tgaagagaag
17281 aagtggatgg gtagaagggc gggagggact ttcccagctg cggcagccac ccaaaaaatg

Lampiran 2. Hasil Penyejajaran Sekuen gen *Hnf1α*



Gambar 10. Gen *Hnf1α* exon 2



Gambar 11. Gen *Hnf1α* exon 4