

“Optimasi Kecepatan Sentrifugasi Sampel Darah Untuk Pemeriksaan Diabetes Melitus Tipe 2 (T2D) Berbasis Molekuler”

Fitrian Desi Prameswari/ 201335300038

Dosen Pembimbing:

Miftahul Mushlih S.Si., M.Sc

D-IV Teknologi Laboratorium Medis

Universitas Muhammadiyah Sidoarjo

Juli, 2024





Latar Belakang

1

Penyakit (T2D)/penyakit multifaktorial : gangguan sekresi insulin oleh sel β pankreas.

2

Profil Kesehatan Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur (2021), Jumlah penderita DM dalam 3 tahun (2019-2021) terakhir mengalami peningkatan di tahun 2021 867.257 kasus

3

Gen yang terlibat dalam penyakit T2D cukup banyak, Perkembangan bidang molekuler membawa terobosan dalam deteksi biomarker dan diagnosis yang tepat

4

Prinsip-prinsip isolasi DNA adalah proses sentrifugasi,
-Sentrifugasi singkat (tidak terpisah sempurna)
-Sentrifugasi lama (hemolisis, merusak komponen zat)

5

Kurangnya informasi standart dari penggunaan kecepatan sentrifugasi sampel darah penderita T2D.



Metode Penelitian



Uji Etik

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya
dengan nomor 0597/HRECC.FODM/VI/2024.



Desain Penelitian

Deskriptif Eksperimental



Populasi dan Sampel

P : Penderita T2D yang berada di RS Bhayangkara Pusdik
Sabhara Porong,

S : Jumlah 5 sampel darah penderita TD2M berdasarkan rumus
Federer

Rumus Federer :

$$(r-1)(t-1) \geq 15$$

$$(r-1)(5-1) \geq 15$$

$$(4)(r-1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 15 + 4$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 \sim 5$$

Keterangan :

r = Jumlah pengulangan sampel

t = Jumlah perlakuan



Metode Penelitian



Teknik Sampling

Purposive Sampling : penderita T2D, berusia ≥ 20 tahun, laki-laki atau perempuan dan bersedia menjadi subjek penelitian



Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel : RS Bhayangkara Pusdik
Sabhara Porong

Penelitian : Lab. Biomol Umsida

Waktu : Bulan April-Juni 2024



Metode Penelitian



Alat dan Bahan

Alat : sentrifus, vortex, waterbath, microwave, mikrosentrifugator, Spektrofotometer UV-Vis Thermo Scientific *double beam* tipe *evolution* 201, elektroforesis set dan UV transilluminator

Bahan : sampel darah EDTA penderita Diabetes Melitus Tipe II, reagen DNA Kit, reagen elektroforesis kit

Metode Penelitian



Tahapan Penelitian

1 Preparasi Sampel

Perlakuan :

1. Tanpa disentrifugasi
2. Sentrifugasi 500 rpm 5 menit.
3. Sentrifugasi 1500 rpm 5 menit.
4. Sentrifugasi 3000 rpm 5 menit.
5. Sentrifugasi 4500 rpm 5 menit.

2 Isolasi DNA

1. Pelisisan sel
2. Pengikatan DNA
3. Elusi DNA

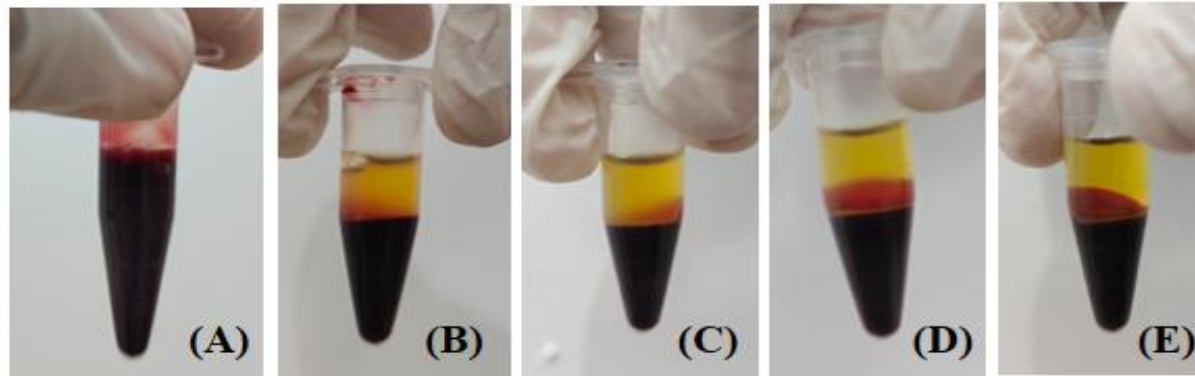
3 Uji Kualitatif DNA

Elektroforesis 30
menit 100 volt

4 Uji Kuantitatif DNA

Spektrofotometer UV-Vis
Thermo Scientific *double
beam tipe evolution 201*
panjang gelombang 260 dan
280 nm

Hasil dan Pembahasan



Gambar 1. Perlakuan sampel A-E: tanpa sentrifugasi, sentrifugasi 500 rpm, sentrifugasi 1500 rpm, sentrifugasi 3000 rpm, sentrifugasi 4500 rpm

sampel A : Control negatif,

sampel B : Terlihat plasma dan darah belum sepenuhnya terpisah,

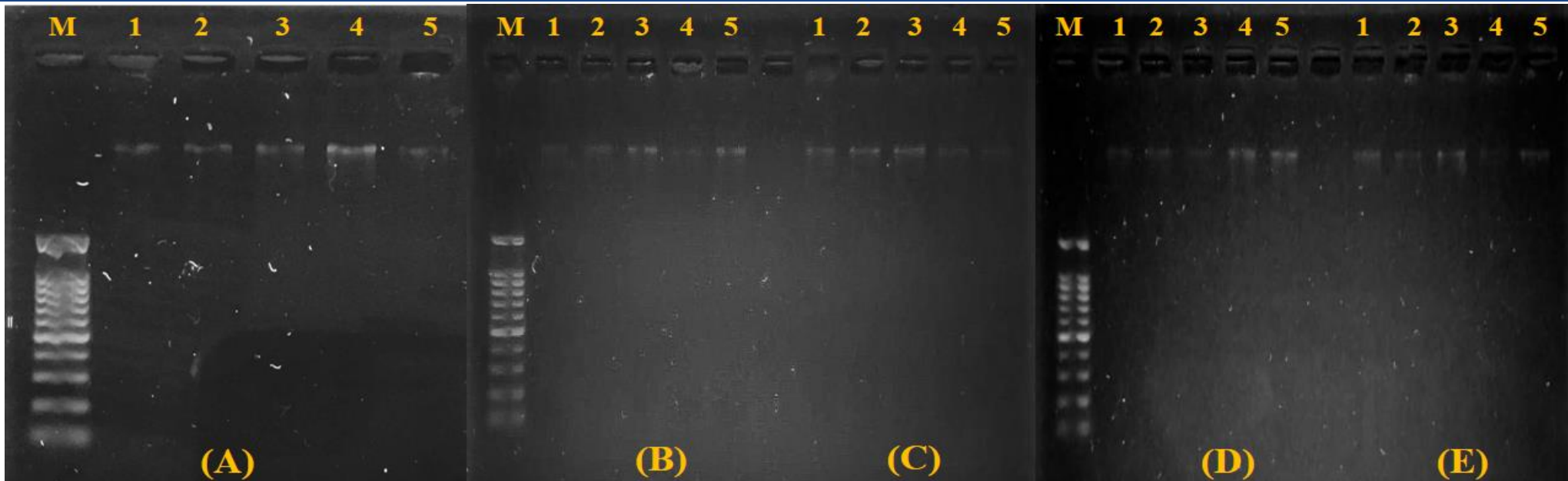
sampel C : Eritrosit mulai mengendap, mulai terbentuknya lapisan *buffy coat* plasma belum tampak sepenuhnya jernih,

sampel D : menunjukkan lapisan darah, *buffy coat*, dan plasma dapat dibedakan tetapi sangat tipis,

sampel E : menunjukkan lapisan darah, *buffy coat*, dan plasma dapat dibedakan tetapi sangat tipis, plasma jernih



Uji Kualitatif DNA



Gambar 2. Hasil visualisasi elektroforesis sampel A, B,C,D,E. Keterangan: M : Marker, kode 1-5 : tanpa sentrifugasi, sentrifugasi 500 rpm, sentrifugasi 1500 rpm, sentrifugasi 3000 rpm, sentrifugasi 4500 rpm.

sampel A : Kecepatan 3000 rpm,
sampel B : Kecepatan 1500 rpm dan 4500 rpm,
sampel C : Kecepatan 1500 rpm,
sampel D : Kecepatan 3000 rpm dan 4500 rpm,
sampel E : Kecepatan 1500 rpm dan 4500 rpm



Uji Kuantitatif DNA

Keterangan	Tanpa sentrifugasi	Sentrifugasi 500 rpm	Sentrifugasi 1500 rpm	Sentrifugasi 3000 rpm	Sentrifugasi 4500 rpm
Kemurnian	1,28	1,15	1,21	1,50	1,26
Konsentrasi (ng/ μ L)	17,9	17,1	16,7	15,0	13,7

Hasil kemurnian dan konsentrasi DNA kemudian diuji secara statistik *one way* Anova dengan taraf signifikansi sebesar $\alpha=0,05$, Kemurnian $P= 0,558$ dan Konsentrasi = 0,654 yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap perlakuan yang dilakukan.



Pembahasan

Hasil Elektroforesis

- Pita yang tipis pada gel agarosa : rendahnya konsentrasi DNA.
- Hasil visualisasi fragmen DNA yang bagus : pita yang tebal, tegas dan tidak ada smear (DNA yang tergradasi atau DNA tidak utuh)

Hasil Spektrofotometer

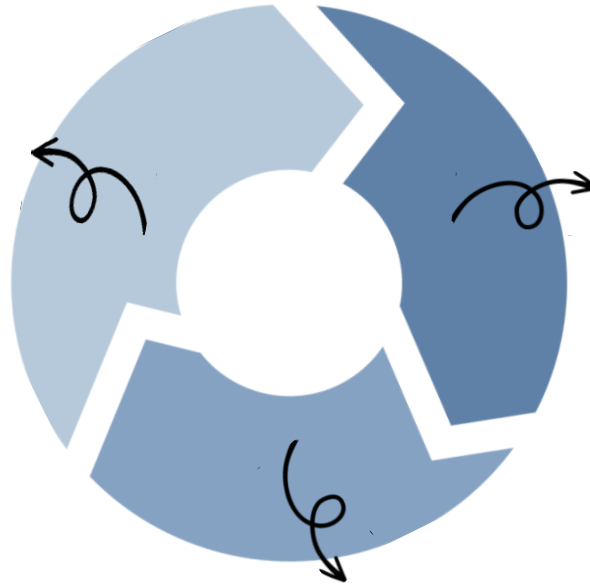
- Kemurnian : 1,8-2,0
< 1,8 = kontaminasi fenol, protein
> 2,0 = kontaminasi RNA
- Konsentrasi : >50 (ng/ μ L)



Faktor penyebab

Spektrofotometer

- Kit Reagen (Tiangen)
- Bahan Kuvet (Kuvet kaca lebih baik digunakan pada spektrofotometer UV-Vis karena dinilai dapat menyerap sinar ultraviolet)



Elektroforesis

- Konsentrasi DNA yang rendah
- Suhu yang tinggi : mengubah konformasi DNA menjadi tidak stabil
- Pemipetan sampel ke sumuran yang tidak merata

Perolehan sampel *buffy coat* juga memerlukan volume darah yang lebih banyak agar terbentuk lapisan *buffy coat* yang tebal

Kesimpulan

“Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat pengaruh yang signifikan kecepatan sentrifugasi sampel darah dengan variasi kecepatan 500 rpm, 1500 rpm, 3000 rpm, dan 4500 rpm selama 5 menit pada pemeriksaan T2D berbasis molekuler”

Referensi

- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. "Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus". *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6275. 2020. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>.
- Salasa, R. A., Rahman, H., & Andiani, A. "Faktor Risiko Diabetes Mellitus Tipe 2 Pada Populasi Asia: A Systematic Review". *Jurnal Biosainstek* 1(1), 95–107. 2019. Doi: <https://doi.org/52046/biosainstek.v1i01.306>
- Dinkes Jatim. "Profil Kesehatan 2021". 2021 Diakses dari :<https://dinkes.jatimprov.go.id/userfile/dokumen/PROFIL%20KESEHATAN%202021%20JATIM>.
- Willmer, T., Johnson, R., Louw, J., & Pheiffer, C. "Blood-Based DNA Methylation Biomarkers for Type 2 Diabetes: Potential for Clinical Applications. *Frontiers in endocrinology*". 9, 744. 2018. Doi: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00744>
- Samadi Shams, S., Zununi Vahed, S., Soltanzad, F., Kafil, V., Barzegari, A., Atashpaz, S., & Barar, J. "Highly Effective DNA Extraction Method From Fresh, Frozen, Dried and Clotted Blood Samples". *BiolImpacts : BI*, 1(3), 183–187. 2011. Doi: <https://doi.org/10.5681/bi.2011.025>
- Guha, P., Das, A., Dutta, S., & Chaudhuri, T. K. "A Rapid And Efficient DNA Extraction Protocol From Fresh and Frozen Human Blood Samples". *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(1), e22181. 2017. Doi: <https://doi.org/10.1002/jcla.22181>

