

Fitrian Desi
Prameswari_201335300038_AR
TIKEL.pdf
by 5 Perpustakaan UMSIDA

Submission date: 02-Jul-2024 11:01AM (UTC+0700)

Submission ID: 2411497217

File name: Fitrian Desi Prameswari_201335300038_ARTIKEL.pdf (289.86K)

Word count: 2216

Character count: 13918

Optimizing Centrifugation Speed of Blood Samples for Molecular Based Examination of Type 2 Diabetes Melitus (T2D) [Optimasi Kecepatan Sentrifugasi Sampel Darah Untuk Pemeriksaan Diabetes Melitus Tipe 2 (T2D) Berbasis Molekuler]

Fitrian Desi Prameswari¹⁾, Miftahul Mushlih^{*,1)}

¹⁾Program Studi Teknologi Laboratorium Medis, Universitas Muhammadiyah Sidoarjo, Indonesia

*Email Penulis Korespondensi: mif.mushlih@umsida.ac.id

Abstract. Type 2 Diabetes Mellitus (T2D) is a metabolic disorder caused by dysfunction of insulin secretion by pancreatic beta cells and the inability of insulin tissue to respond appropriately to insulin. Molecular-based examination can make it easier to determine precise diagnostic biomarkers and biologically this disease appears long before clinical symptoms develop. Blood isolation samples from the buffy coat contained higher levels of DNA than whole blood samples. The aim of this study was to determine the effect of centrifugation speed on blood samples for molecular-based examination of Type 2 Diabetes Mellitus (T2D). The research was carried out quantitatively using descriptive experimental research using purposive sampling techniques. The samples used were 5 blood samples from T2D patients which were divided into 5 treatment groups (no centrifugation, centrifugation speed 500 rpm, 1500 rpm, 3000 rpm and 4500 rpm for 5 minutes). Test examinations are carried out qualitatively (electrophoresis) and quantitatively (Uv-Vis Spectrophotometer). Research data was analyzed using the one way Anova test. From the test results, the concentration value was obtained ($p=0.558$) and the purity value ($p=0.353$) which showed that there was no significant difference in the treatment..

Keywords - ; Type 2 Diabetes Mellitus (T2D); Centrifugation; Qualitative Test; Quantitative Test

Abstrak. Diabetes Melitus Tipe 2 (T2D) merupakan penyakit gangguan metabolisme yang disebabkan disfungsi sekresi insulin oleh sel beta pankreas dan ketidakmampuan jaringan insulin untuk merespons insulin secara tepat. Pemeriksaan berbasis molekuler dapat memudahkan dalam menentukan biomarker diagnostik yang tepat dan secara biologis penyakit ini muncul jauh sebelum gejala klinis berkembang. Sampel isolasi darah pada bagian buffy coat, terkandung DNA yang lebih tinggi daripada sampel whole blood. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh kecepatan sentrifugasi sampel darah untuk pemeriksaan Diabetes Melitus Tipe 2 (T2D) berbasis molekuler. Penelitian dilakukan secara kuantitatif dengan jenis penelitian deskriptif eksperimental dengan teknik purposive sampling. Sampel yang digunakan berjumlah 5 sampel darah pasien T2D yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan (tanpa sentrifugasi, sentrifugasi kecepatan 500 rpm, 1500 rpm, 3000 rpm, dan 4500 rpm selama 5 menit). Pemeriksaan uji dilakukan secara kualitatif (elektroforesis) dan kuantitatif (Spektrofotometer Uv-Vis). Data penelitian dianalisis menggunakan uji one way Anova. Dari hasil uji tersebut didapatkan hasil nilai konsentrasi ($p=0,558$) dan hasil nilai kemurnian ($p=0,353$) yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan secara signifikan terhadap perlakuan .

Kata Kunci - ; Diabetes Melitus Tipe 2(T2D); Sentrifugasi; Uji Kualitatif; Uji Kuantitatif

I. PENDAHULUAN

Diabetes Melitus Tipe 2 (T2D) merupakan penyakit gangguan metabolisme yang disebabkan disfungsi sekresi insulin oleh sel beta pankreas dan ketidakmampuan jaringan insulin untuk merespons insulin secara tepat[1]. Penyakit ini juga disebut dengan penyakit multifaktorial karena dapat disebabkan karena faktor genetik, lingkungan, dan gen-lingkungan[2].

Menurut Profil Kesehatan Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur (2021), salah satu penyakit tidak menular yang menjadi prioritas adalah penyakit Diabetes Melitus (DM) jumlah penderita DM di Jawa Timur dalam 3 tahun (2019-2021) terakhir mengalami peningkatan di tahun 2021. Pelayanan kesehatan penderita DM di Fasilitas Kesehatan Tingkat Pertama (FKTP) pada 38 kabupaten/kota se Jawa Timur tahun 20 mencapai 807.712 kasus, tahun 2020 sebanyak 785.983 kasus, dan pada tahun 2021 sebanyak 862.57 kasus atau 93,3% dari estimasi penderita DM yang ada dengan jumlah 929.810 kasus. Jumlah estimasi tersebut sebesar 2,6 dari penduduk usia 15 tahun ke atas[3].

Gen yang terlibat dalam penyakit T2D cukup banyak seperti gen TCF7L2, ABCG1, KCNQ1, TXNIP, SREBF1, dan FTO Sehingga pemeriksaan berbasis molekuler dapat memudahkan dalam menentukan biomarker diagnostik yang tepat dan secara biologis penyakit ini muncul jauh sebelum gejala klinis berkembang [4].

Darah merupakan jaringan yang paling sering digunakan dalam melakukan isolasi DNA untuk mendapatkan DNA genom dalam jumlah besar dan berkualitas tinggi[5]. Ketepatan dalam ekstraksi DNA dari sampel darah merupakan syarat terpenting dalam menganalisis kelainan genetik. [6]. Prinsip-prinsip yang harus diperhatikan dalam melakukan isolasi DNA ada 2 yaitu dalam melakukan sentrifugasi dan presipitasi [7].

Kekuatan dari proses sentrifugasi memiliki pengaruh terhadap kadar DNA, karena lisis dari sel darah putih dalam sampel darah mengalami peningkatan. Namun sampel darah yang kurang dimurnikan mengandung lebih banyak sisa seluler seperti protein dan asam nukleat yang dapat menyebabkan isolasi DNA kurang maksimal [8].

Hasil penelitian Wardana (2021) menunjukkan sampel darah yang disentrifugasi dengan kecepatan tinggi dengan sampel buffy coat memiliki kemurnian dan konsentrasi yang lebih tinggi, dibandingkan dengan sampel darah tanpa perlakuan sentrifugasi. Kemudian penelitian yang dilakukan Siswanto (2017) menunjukkan rata-rata konsentrasi DNA dari sampel yang telah disentrifugasi dan diambil *buffy coat* lebih tinggi daripada sampel *whole blood* dan bucal swab, namun hasil dari kemurnian DNA tertinggi terdapat pada sampel *whole blood* daripada sampel *buffy coat* dan bucal swab[9].

Penelitian yang dilakukan oleh Ginkel menunjukkan terdapat penurunan konsentrasi cfDNA plasma sebesar 2,5-3,0 kali lipat setelah sentrifugasi dua langkah dibandingkan dengan sentrifugasi lambat satu langkah, namun tidak ada perbedaan signifikan terhadap sentrifugasi dua langkah dengan kecepatan dan waktu yang dimodifikasi [8].Selanjutnya hasil penelitian Sherwood menunjukkan sentrifugasi dua langkah tidak menurunkan hasil DNA dibandingkan dengan darah yang diproses 2 jam pasca pengumpulan, namun langkah kedua secara signifikan dapat mengurangi hasil DNA dalam darah yang diproses 72 jam pasca pengumpulan hal ini dapat terjadi karena kontaminasi DNA inti yang terjadi selama 72 jam karena adanya lisis sel darah putih yang tidak dipelet secara efisien [11].

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ginkel dan Sherwood, dengan sampel penelitian yang digunakan yaitu sampel darah penderita kanker, namun untuk penderita Diabetes Melitus masih kurangnya informasi dari penggunaan kecepatan sentrifugasi untuk isolasi DNA, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui optimasi kecepatan sentrifugasi sampel darah untuk pemeriksaan penyakit T2D berbasis molekuler..

II. METODE

Penelitian ini telah melakukan uji kelaikan etik (*ethical clearence*) di Komisi Kelaikan Etik Penelitian dan Kesehatan (KKEPK) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya dengan nomor 0597/HRECC.FODM/VI/2024. Penelitian dilakukan secara kuantitatif dengan jenis penelitian deskriptif eksperimental. Populasi dalam penelitian ini yaitu pasien penderita TD2M di Rumah Sakit Bhayangkara Pusdik Sabhara Porong. Pengambilan sampel dilakukan dengan cara *purposive sampling*. Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus Federer didapatkan jumlah sampel sebanyak 5 sampel darah, dari 5 sampel darah tersebut kemudian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei-Juni 2024. Adapun tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler D-IV Teknologi Laboratorium Medis Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Sidoarjo.

Preparasi sampel dimulai dengan melakukan makrosampling darah EDTA sebanyak 5cc kemudian dibagi kedalam tube 1,5 ml dengan masing-masing 1 ml darah. Selanjutnya sampel dilakukan perlakuan yang terdiri dari perlakuan 1: sampel darah tanpa sentrifugasi sebagai kontrol negatif, perlakuan 2: sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm 5 menit, perlakuan 3: sampel darah disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm 5 menit, perlakuan 4: sampel darah disentrifugasi pada kecepatan rpm 5 menit, perlakuan 5: sampel darah disentrifugasi pada kecepatan 4500 rpm 5 menit.

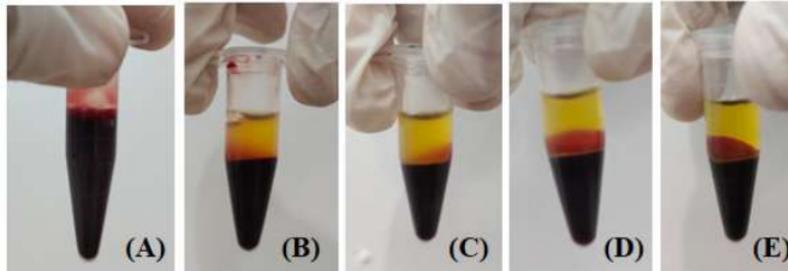
Darah yang disentrifugasi diambil pada bagian *buffy coat* nya. Masing-masing sampel diambil sebanyak 200 μ L dan dilakukan isolasi DNA column dengan kit merk (Tiangen), kemudian dilanjutkan uji secara kualitatif dengan elektroforesis gel agarose dan uji kuantitatif dengan Spektrofotometer Uv-Vis Thermo Scientific *double beam* tipe *evolution* 201 untuk mengetahui kemurnian dan konsentrasi DNA.

Data-data yang diperoleh dari uji kuantitatif kemudian diuji secara statistik menggunakan SPSS 2023 menggunakan uji *one way* Anova dengan taraf signifikansi sebesar $\alpha=0,05$.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

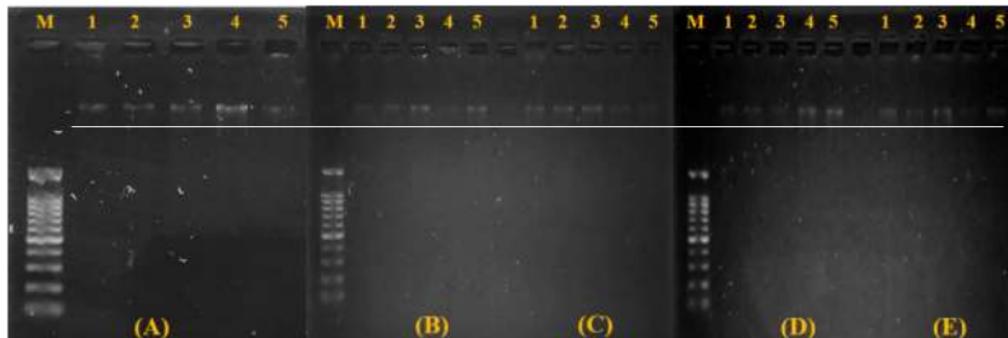
A. Data Hasil Penelitian

Darah yang disentrifugasi akan terpisah menjadi 3 bagian, bagian bawah yang berupa komponen padat tersusun atas sel darah merah atau eritrosit, dan bagian tengah berupa *buffy coat* yang tersusun atas sel darah putih atau leukosit dan trombosit, kemudian pada bagian atas merupakan komponen cair yang mengandung plasma [12]. Pada bagian *buffy coat*, terkandung DNA yang lebih tinggi karena banyak sel berinti yang terkonsentrasi di dalamnya daripada sampel *whole blood* yang tercampur dengan komponen lainnya yang tidak mengandung DNA genom [10].



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

Pada perlakuan sampel A sebagai control negatif, sampel B terlihat plasma dan darah belum sepenuhnya terpisah, sampel C sel eritrosit mulai mengendap dan mulai terbentuknya lapisan *buffy coat* plasma belum tampak sepenuhnya jernih, sampel D dan E menunjukkan lapisan darah, *buffy coat*, dan plasma dapat dibedakan tetapi sangat tipis.



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.

Keberhasilan dalam melakukan isolasi DNA dapat dilihat dari uji kualitatif dan kuantitatif nya. Berdasarkan hasil uji kualitatif dengan proses elektroforesis dengan konsentrasi agarose 1% didapatkan hasil pada kode sampel A, B, C, D, E menunjukkan terbentuknya pita pada semua perlakuan tetapi dengan ketebalan yang berbeda-beda. Pita yang terlihat sangat jelas pada kode sampel A terletak pada kecepatan 3000 rpm, kode sampel B terletak pada kecepatan 1500 rpm dan 4500 rpm, kode sampel C terletak pada kecepatan 1500 rpm dan 4500 rpm, kode sampel D terletak pada kecepatan 3000 rpm dan 4500, dan kode sampel E terletak pada kecepatan 1500 rpm dan 4500 rpm. Dari hasil tersebut menunjukkan pita yang terlihat jelas pada kecepatan sentrifugasi kisaran 1500 rpm sampai 4500 rpm.

Pita yang tipis pada gel agarosa dapat disebabkan karena rendahnya konsentrasi DNA. Hasil visualisasi fragmen DNA yang bagus pada gel agarosa yaitu menunjukkan pita yang tebal, tegas dan tidak ada smear (DNA yang tergradasi atau DNA tidak utuh) [13].

Adapun hal-hal yang dapat mempengaruhi hasil elektroforesis yaitu konsentrasi gel agarose, semakin tinggi konsentrasi agarose maka pori yang terbentuk juga semakin kecil, kemudian jenis sampel meskipun menggunakan jenis sampel yang sama dapat juga menunjukkan hasil yang berbeda, suhu yang tinggi juga dapat mengubah konformasi DNA menjadi tidak stabil [14].

Tabel 1. Rata-Rata Nilai Kemurnian dan Konsentrasi DNA pada Setiap Perlakuan

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	17,9	17,1	16,7	15,0	13,7

Uji kuantitatif isolasi DNA menggunakan Spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur kemurnian DNA dapat memanfaatkan rasio dari panjang gelombang 260/280 nm. Hasil isolasi DNA bisa disebut murni, apabila memiliki nilai berkisar antara 1,8-2,0. DNA dapat dikatakan terkontaminasi RNA apabila nilainya lebih dari 2,0 sedangkan DNA dikatakan terkontaminasi protein atau phenol, apabila memiliki nilai dibawah 1,8 [14]. Berdasarkan hasil perhitungan menunjukkan rata-rata nilai kemurnian sampel darah yang diisolasi menunjukkan nilai di bawah nilai 1,8 yang mengindikasikan adanya kontaminasi protein, phenol, dan substansi lainnya dan hasil nilai konsentrasi juga menunjukkan nilai <100 (ng/ μ L).

Hasil kemurnian dan konsentrasi DNA kemudian diuji secara statistik *one way* Anova dengan taraf signifikansi sebesar $\alpha=0,05$, yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan terhadap perlakuan yang dilakukan. Hasil tersebut sejalan dengan penelitian Siswanto (2017), bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan tingkat kemurnian sampel *whole blood* dengan *buffy coat*. Hal ini dapat dikarenakan dalam memperoleh sampel *buffy coat* juga memerlukan volume darah yang lebih banyak agar terbentuk lapisan *buffy coat* yang tebal [10], sedangkan dalam penelitian ini volume darah yang digunakan sebanyak 1 mL. Namun, hal ini tidak sejalan dengan penelitian Wardana (2021), yang menunjukkan adanya perbedaan hasil antara sampel *whole blood* dengan sampel *buffy coat*. Sampel yang disentrifugasi memiliki kemurnian dan konsentrasi yang tinggi dibandingkan dengan sampel darah tanpa sentrifugasi[9].

Penyebab dari rendahnya konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dipengaruhi oleh keterampilan dalam pemisahan supernatan dengan endapannya dalam penghilangan protein atau senyawa lainnya yang memungkinkan DNA yang berbobot tidak ikut terambil sehingga menyebabkan konsentrasi DNA yang terambil juga sedikit, sedangkan pada pengeringan pada tahap akhir isolasi DNA juga sangat memengaruhi hasil, jika pengeringan yang dilakukan kurang sempurna, maka larutan untuk memurnikan DNA seperti alkohol dan etanol dapat menurunkan nilai kemurnian DNA yang terkandung. Hal ini sejalan dengan penelitian Triani (2020), yang menunjukkan sebagian besar sampel hasil isolasi DNA memiliki nilai kemurnian dibawah 1,8 atau lebih kecil yang mengindikasikan adanya kontaminasi fenol dan pelarut yang digunakan[15].

Selain itu dapat juga dipengaruhi oleh bahan kuvet. Umumnya bahan kuvet terbuat dari plastik dan kaca yang mampu tembus sinar. Kuvet yang terbuat dari bahan kaca silikat lebih baik digunakan pada spektrofotometer UV-Vis karena dinilai dapat menyerap sinar ultraviolet. Sedangkan kuvet yang digunakan dalam penelitian ini terbuat dari plastik sehingga dapat mempengaruhi pendaran dari cahaya yang masuk dan menembus sampel di dalamnya, hal ini sejalan dengan penelitian Dewanata, yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan perbedaan dari uji kemurnian DNA menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dengan bahan kuvet plastik dengan Spektrofotometer Nanodrop, didapatkan hasil nilai kemurnian DNA yang diuji dengan Spektrofotometer UV-Vis dibawah nilai normal daripada sampel yang diuji menggunakan Spektrofotometer Nanodrop [16].

Aspek yang dapat mempengaruhi juga dapat berasal dari aspek teknis seperti keterampilan peneliti dalam melakukan isolasi DNA, dimana pada tahap isolasi DNA metode column memiliki prosedur yang panjang sehingga peneliti harus meminimalisir kontaminan, seperti halnya dalam pengambilan sampel *buffy coat* yang sangat tipis, ketepatan dalam pipetkan reagen.

IV SIMPULAN

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

V UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penelitian ini dapat terlaksana. Terima kasih kepada Bapak Miftahul Mushlih selaku dosen pembimbing dan teman-teman yang membantu dalam penelitian ini dari awal hingga akhir.

ORIGINALITY REPORT

8%

SIMILARITY INDEX

7%

INTERNET SOURCES

4%

PUBLICATIONS

1%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

ijins.umsida.ac.id

Internet Source

2%

2

repository.ukwms.ac.id

Internet Source

1%

3

ejournal.uniramalang.ac.id

Internet Source

1%

4

KHartina Burhan, Dahliah Dahliah, Nevi Sulvita Karsa. "Hubungan Anemia Pada Ibu Hamil Terhadap Kejadian BBLR di RSIA Sitti Khadijah 1 Makassar", Wal'afiat Hospital Journal, 2021

Publication

1%

5

Ragil Saptaningtyas, Regitha Wahyuhendra, Joko Teguh Isworo. "CORRELATION BETWEEN FASTING BLOOD SUGAR AND LDL CHOLESTEROL OF TYPE 2 DM PATIENTS ON WILLIAM BOOTH HOSPITAL SEMARANG", Jambura Journal of Health Sciences and Research, 2022

Publication

1%

6

Submitted to Herzing University

Student Paper

1 %

7

jurnal.untan.ac.id

Internet Source

1 %

8

123dok.com

Internet Source

1 %

Exclude quotes On

Exclude matches < 1%

Exclude bibliography On