

POLIMORFISME GEN NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN-1 (NRAMP-1) DENGAN PCR-RFLP DARI EKSTRAK SALIVA MENGGUNAKAN ENZIM RESTRIKSI AVA II

Rr. Dyah Roro Ariwulan^{*}, Rosana Agus^a, Moch. Hatta^b, Sjafaraenan^c

^{*}Alamat korespondensi e-mail: rr.dyahroroariwulan@yahoo.com

^{a,c}Jurusan Biologi FMIPA Universitas Hasanuddin, b

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai *Polimorfisme Gen Natural Resistance-Associated Macrophage Protein-1 (NRAMP-1) Dengan PCR-RFLP Dari Ekstrak Saliva Menggunakan Enzim Restriksi Ava II*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan imunologi Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme pada gen Natural resistance-associated macrophage protein-1 (Nramp-1) khususnya pada lokus D543N dari hasil ekstraksi DNA saliva dengan enzim restriksi *Ava II*. Sampel saliva diekstraksi dengan metode Boom sehingga diperoleh DNA genom, selanjutnya diamplifikasi dengan menggunakan enzim *Ava II*. Hasil Elektroforesis gel yang dilakukan menunjukkan tidak terdapat perbedaan pola pemotongan pita DNA. Sampel saliva dari 10 responden (100%) tidak terjadi pemotongan. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan polimorfisme dari saliva responden.

Kata kunci : Saliva, NRAMP-1, D543N, Polimorfisme.

GENE POLYMORPHISMS NATURAL RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN-1 (NRAMP-1) PCR-RFLP WITH EXTRACTS FROM SALIVA USING RESTRICTION ENZYMES AVA II

ABSTRACT

This research has conducted on gene polymorphisms Natural Resistance-Associated Macrophage Protein-1 (NRAMP-1) PCR-RFLP With Extracts From Saliva Using Restriction Enzymes *Ava II*. This research was conducted in the Laboratory of Molecular Biology and Immunology Section of Microbiology, Faculty of Medicine, Hasanuddin University, Makassar. This study aims to determine polymorphism in the gene Natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp-1), especially in the D543N locus DNA extracted from saliva using the restriction enzyme *Ava II*. Salivary samples were extracted with Boom method to obtain genomic DNA, further amplified by using an enzyme *Ava II*. Gel electrophoresis results do indicate that there is no difference in the pattern of DNA ribbon cutting. Saliva samples of 10 respondents (100%) did not happen cuts. This result describe that polymorphism didn't have different from responden's saliva.

Keywords : Saliva, NRAMP-1, D543N, Polymorphism.

PENDAHULUAN

Darah telah digunakan selama bertahun-tahun sebagai sampel untuk tes DNA. Sel darah putih (leukosit)

merupakan sumber DNA dalam jumlah besar dengan genom berkualitas tinggi yang diperlukan untuk pengujian. Namun,

ada banyak kelemahan pada sampel tersebut, yaitu pemakaian jarum suntik akan melukai pasien saat pengambilan sampel dan membutuhkan waktu yang cukup lama untuk mengekstraksi sel darah putih dari darah dan sampel darah tidak dapat disimpan untuk jangka waktu panjang karena lebih sensitif terhadap kerusakan (Smith, 2010).

Saat ini telah ada alternatif yang di gunakan untuk menggantikan darah sebagai sampel, yaitu air liur atau saliva. Saliva sendiri layak digunakan sebagai pengganti sampel darah, karena saliva berasal dari sel-sel darah putih, yang juga merupakan sumber DNA dari darah dan dalam penggunaannya sebagai sampel, saliva terbilang mudah dan efisien untuk digunakan (Chatburn, 2012).

Saliva dapat digunakan dalam pengujian genetik yang berguna untuk mendeteksi penyakit yang berhubungan dengan mutasi gen. Hal ini disebabkan karena di dalam air liur mengandung DNA, dimana 74% sumber DNA pada saliva berasal dari sel-sel darah putih (Smith, 2010). Analisis saliva memiliki metode pengambilan sampel yang sederhana dan tidak invasif. Pengambilan sampel cairan mulut aman bagi peneliti, dokter dan pasien, serta memiliki penyimpanan yang mudah dan murah. Karakteristik ini memungkinkan untuk memantau beberapa biomarker pada bayi, anak-anak, dan lansia, serta dalam situasi (Chiappin, *et al.*, 2007).

Faktor genetik sangat menentukan tubuh manusia untuk menahan infeksi, yang disebabkan oleh berbagai agen penyebab. Deteksi faktor penyebab penyakit serta memahami mekanisme pembentukan kerentanan dan ketahanan terhadap agen infeksius tampaknya berperan penting bagi pengembangan metode baru dalam upaya pencegahan dan pengobatan penyakit menular. Pada tikus inbrida perlawanan alami terhadap infeksi, yang disebabkan oleh *Mycobacterium*

bovis, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Leishmania donovani* dan *Salmonella typhimurium* dikendalikan oleh gen Nramp 1 (Puzyrev, 2002).

Dalam darah terdapat banyak sel darah putih seperti sel monosit, makrofag dan Neutrofil polimorfonuklear yang didalamnya mengandung gen khusus yaitu Gen Natural resistance-associated macrophage protein-1 (Nramp-1). Gen Natural resistance-associated macrophage protein-1 (Nramp-1) ini berfungsi untuk ketahanan alami pada protein makrofag yang ditemukan untuk mengkodekan sebuah rangkai polipeptida makrofag khusus dengan fitur mampu memprediksi karakteristik dari protein membran. Untuk meneliti keberadaan gen ini, umumnya menggunakan sampel darah. Selain dalam darah, Gen Nramp-1 ini juga terdapat pada seluruh sel dalam tubuh termasuk dalam sel epitel bukal yang terdapat pada saliva (Puzyrev, 2002).

Polimorfisme DNA ditandai dengan adanya perbedaan urutan nukleotida antara individu. Polimorfisme pada susunan DNA, disebabkan oleh karena ada atau tidaknya sisi pengenalan terhadap enzim restriksi, yang disebut "Restriction Fragment Length Polymorfism" (RFLP). Polimorfisme gen Nramp-1 umumnya berkaitan dengan adanya penyakit dalam tubuh. Beberapa bukti menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara polimorfisme Nramp-1, salah satunya ialah polimorfisme gen Nramp-1 dengan tipe penyakit pada penderita kusta (Perpetuo, *et al.* 2007).

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui polimorfisme pada gen Natural resistance associated macrophage protein-1 (Nramp-1) pada hasil ekstraksi DNA saliva melalui Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP) dengan menggunakan enzim restriksi Ava II.

METODE PENELITIAN

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Sentrifuse, Enkas, Vortex, Mikropipet (1000 μ l, 100 μ l, 20 μ l, 200 μ l), Inkubator, Plastik sampel, Tabung eppendorf bersekrup steril 1,5 ml (Sarstedt), Tabung 0,5 ml steril, Water bath shaker, Tip Aerosol steril 30 μ l (Gilson), Tip Aerosol steril 20 μ l (Art), Tip steril 250 μ l (Matrix), Tip steril 1000 μ l, Freezer, Kulkas, Pot saliva, Rak tabung eppendorf, Tabung Falcon 50 ml, Tabung vial PCR, Thermo Cycler PCR (Hybaid Omni-E), UV gel dock, Tangki larutan penyangga elektroda (Mupid + α), Microwave (Sanyo), Timbangan digital, Erlenmeyer 250 ml, Sisir gel, Cetakan gel, dan Tabung ukur 100 ml.

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah L6 (*lysis buffer*), L2 (*Washing buffer*), HCl 32 %, SiO₂ (*Silica dioxide*), Etanol 70%, Aseton, TE-*elution buffer*, Enzim restriksi *AvaII*, Gel agarosa 2 %, Etidium bromida, Buffer elektroforesis Tris acetic acid-Buffer-EDTA, Larutan *Loading dye*, Larutan NaOH, Larutan *RNase away*, Primer D543N Forward, Primer D543N Reverse, dNTP's Mix, Taq Polimerase, NE-Buffer, aquabidest, Aluminium foil, Marker DNA 100 bp ladder, Mineral oil dan Kertas film.

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober – November 2013 di Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi, Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin. Pengambilan sampel saliva, dilakukan pada bulan Oktober 2013, di Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Prosedur Penelitian

Pengambilan Sampel Saliva

Sampel klinis yang dipakai dalam penelitian ini adalah 10 sampel saliva yang diperoleh secara acak dari Mahasiswa-mahasiswi Jurusan Biologi Fakultas MIPA UNHAS yang dilengkapi data dukung meliputi umur responden dengan rentang umur 15 – 25 tahun serta bukan seorang perokok.

Sampel saliva diperoleh dengan cara metode non-invasif, saliva disimpan di dalam pot saliva, yang sebelumnya telah diberi label.

Purifikasi Sampel Saliva

Masing-masing sampel saliva kemudian dipindahkan ke tabung eppendorf sebanyak 1 mL, lalu disentrifus 13.000 rpm selama 5 menit. Setelah sentrifugasi, supernatan dari masing-masing tabung eppendorf dibuang sebanyak 900 μ L. sampel lalu ditambahkan 900 μ L larutan L6 (*Lysis buffer*), lalu dihomogenkan dengan vortex.

Ekstraksi DNA dengan Metode Boom (Hatta and Smits, 2007)

Sampel sebanyak 100 μ L yang telah ditambahkan 900 μ L larutan L6 (*lysis buffer*) kemudian diinkubasi selama 24 jam untuk mendapatkan DNA, selanjutnya membuat suspensi diatom dengan mencampurkan 1 gr SiO₂ (*Silica Dioxide*) dengan menambahkan 5 mL Aquabidest dan 44,5 μ L HCl 32% ke dalam tabung Falcon 50 mL. Sampel lalu ditambahkan 20 μ L suspensi diatom (vortex dahulu suspensi tersebut setiap kali akan digunakan). Vortex campuran tersebut dan letakkan pada *waterbath shaker* 100 rpm selama 10 menit. Campuran sampel lalu disentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik dan buang supernatannya. Setelah itu dilakukan purifikasi dengan mencuci pelet sebanyak dua kali dengan menambahkan 1 mL larutan L2 (*Washing buffer*), kemudian divortex dan sentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik lalu buang supernatannya. Setelah itu, cuci dua kali dengan 1 mL etanol 70% dan satu kali dengan 1 mL aseton, masing-masing pencucian sampel divortex, dan disentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik lalu buang supernatannya. Setelah membuang supernatan aseton, biarkan tabung terbuka dan inkubasi pada suhu 56 °C dalam inkubator selama 10 menit atau hingga sampel menjadi kering. Tambahkan 60 μ L TE-*elution buffer*, vortex secara naik-turun lalu inkubasi lagi tabung tersebut pada suhu 56°C selama 10 menit. Setelah itu, sentrifus selama 30

detik pada 12.000 rpm. Pindahkan 50 μ L supernatan ke dalam vial yang baru (jangan menyentuh sedimennya) kemudian disimpan pada freezer suhu -4°C hingga siap untuk diproses dengan teknik PCR.

Polymerase Chain Reaction (PCR) DNA (Hatta, et al., 2010)

PCR primer Mix dibuat dengan mencampurkan 2,5 μ L buffer 10x, 1 μ L Taq Polymerase, 1 μ L dNTP's Mix (ACTP, CCTP, GCTP, TCTP), 1 μ L Primer D543N Forward, 1 μ L Primer D543N Reverse dan 13,5 μ L Aquabidest ke dalam tabung vial PCR yang kemudian di tambahkan 2 μ L template DNA yang telah diekstraksi dari sampel saliva menggunakan metode BOOM. Untuk kontrol negatif, tabung vial tidak ditambahkan template DNA. Kemudian tambahkan 20 μ L Mineral oil ke dalam masing-masing tabung PCR.

Untuk polimorfisme gen Nramp-1 lokus D543N, pasangan primer yang digunakan untuk menghasilkan produk Polymerase Chain Reaction (PCR) sebesar 244 bp untuk D543N, F-5'-GCATCTCCCAATTCATGGT-3'.

Parameter untuk thermocycling dari D543N adalah sebagai berikut: inkubasi selama 5 menit pada suhu 95°C , lalu 45 detik pada suhu 94°C , 45 detik pada suhu 57°C , 45 detik pada suhu 72°C pada tiap siklus dan diulangi sebanyak 35 siklus, kemudian langkah ekstensi akhir dari 10 menit pada suhu 72°C . Amplikon divisualisasikan dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% diwarnai dengan etidium bromida. Amplikon digunakan untuk analisis Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).

Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP) (Hatta, et al., 2010)

Amplikon PCR dari D543N kemudian diambil sebanyak 10 μ L kedalam tabung vial PCR yang telah berisi 2 μ L enzim restriksi, *AvaII*, dan 3 μ L NE-Buffer. Sampel lalu diinkubasi pada suhu 37°C Selama 24 jam. Produk

divisualisasikan dengan elektroforesis dalam gel agarosa 2 % diwarnai dengan etidium bromida.

Deteksi Produk PCR / Elektroforesis (Morin, et al., 2004)

Gel agarosa 2% dibuat dengan mencampurkan 0,6 gr serbuk agarosa ke dalam 30 mL Tris-Buffer-EDTA di Erlenmeyer kemudian dipanaskan ke dalam microwave selama 45 detik hingga mendidih, lalu ditambahkan 2 μ L etidium bromida dan kocok hingga homogen. Cairan gel lalu didinginkan pada suhu kamar. Setelah agak dingin, cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dengan menggunakan sisir gel dengan jumlah sisir 17 sumur.

Masing-masing 10 μ L produk amplifikasi dicampur dengan 2 μ L larutan *loading dye*. Setelah tercampur dengan baik, masing-masing dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 2% yang telah terendam dalam tanki yang berisi Tris acetid acid-Buffer-EDTA. Dimasukkan juga 4 μ L marker DNA 100 bp Ladder ke dalam sumur gel agarosa di dekat kontrol positif untuk mengetahui ukuran DNA produk PCR, kemudian elektroforesis dijalankan selama 40 Menit dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah 40 Menit, elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar Ultra Violet (UV). Hasil yang diperoleh berupa pola pita DNA (band DNA) yang menunjukkan jumlah dan pola yang berbeda.

Analisis Data

Hasil deteksi PCR-RFLP dengan elektroforesis dianalisis berdasarkan ada tidaknya polimorfisme pada potongan pita DNA (band DNA) yang terbentuk dan data disajikan secara deskriptif dengan menggunakan tabel dan gambar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dengan metode Boom

Penelitian ini menganalisis gen NRAMP-1 dan polimorfisme gen NRAMP-1 pada lokus D543N dengan enzim *Ava II*, dengan 10 jumlah sampel saliva, yang diperoleh dari mahasiswa

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.

Proses ekstraksi DNA dilakukan untuk memisahkan genom DNA dari molekul lain di dalam suatu sel. Langkah awal dalam analisis DNA adalah memisahkan genom DNA menjadi fragmen-fragmen spesifik yang lebih kecil yaitu dengan cara mengekstraksi genom DNA dari saliva.

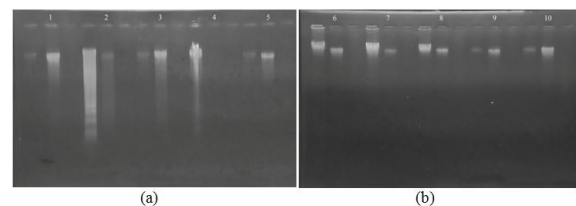
Pada penelitian ini ekstraksi DNA dilakukan secara kimiawi yaitu dengan menggunakan metode Boom, dimana pemecahan sel dilakukan dengan penambahan larutan L6 yang mengandung GuSCN (guanidinium tiosianat), Tris HCL 0,1 M, pH 6,4, EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetat) dan Triton X-100. GuSCN yang terkandung dalam larutan tersebut berfungsi untuk membantu melisiskan sel dengan memanfaatkan sifat korosif yang dimiliki GuSCN. Senyawa Tris berfungsi sebagai pelarut dalam larutan L6. Senyawa EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetat), dimana senyawa ini mampu menghilangkan ion magnesium yang sangat diperlukan untuk mempertahankan integritas keseluruhan selubung sel serta dapat menghambat enzim seluler yang dapat merusak DNA. Triton X-100 yang merupakan jenis detergen yang bersifat basa kuat yang digunakan untuk membantu proses lisis sel dengan cara menghilangkan molekul lipid sehingga menyebabkan kerusakan dinding sel.

Pada saat sel telah mengalami lisis, DNA langsung diikat dengan suspensi diatom dengan memasuki pori-pori dari diatom akibat adanya gaya tarik menarik dari silika dan GuSCN yang membungkus DNA. Tapi DNA yang diperoleh belum murni karena masih terdapat protein dan RNA dalam jumlah yang cukup besar dimana RNA tersebut berasosiasi kuat dengan DNA sehingga perlu dilakukan pembersihan debris sel yang dalam metode ini menggunakan 3 larutan yaitu larutan L2, Etanol 70% dan Aseton. Larutan L2 yang mengandung 120 gr GuSCN

(guanidinium tiosianat) dan 100 mL Tris HCL 0,1 M, pH 6,4 ini berfungsi untuk menghilangkan deterjen dari sampel. Pencucian dengan L2 dilakukan 2 kali untuk meningkatkan efektifitas pencucian sehingga tidak ada deterjen yang tersisa. Larutan etanol 70% berfungsi untuk memekatkan DNA dan menyatukan DNA menjadi satu dan terikat dengan diatom. Pencucian dengan etanol 70% dilakukan 2 kali bermaksud untuk meningkatkan efektifitas dalam menyatukan DNA serta untuk membuang kandungan GuSCN pada sampel. Larutan pencucian terakhir ialah larutan aseton yang berfungsi untuk mengeringkan diatom sehingga memungkinkan etanol dan GuSCN yang tersisa dalam sampel akan menguap.

Setelah sampel mengering dan menjadi serbuk, tahap terakhir dari metode ini ialah dengan menambahkan buffer TE yang mengandung EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetat) dan Tris HCL pH 8.0 dimana TE ini berfungsi untuk rehidrasi DNA yaitu membantu melepaskan dan menarik DNA keluar dari diatom.

Hasil dari ekstraksi dengan metode Boom lalu di visualisasikan sebagai berikut:



Gambar 1. Hasil ekstraksi dengan Metode Boom. a. elektroforesis pertama, b. elektroforesis kedua

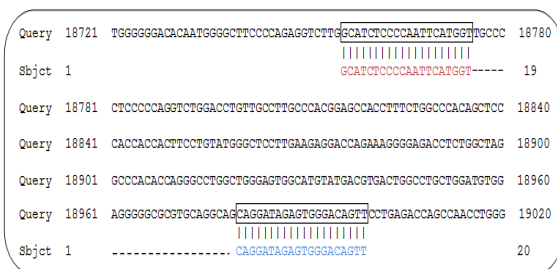
Dari hasil visualisasi dengan elektroforesis pada gambar 6 diatas, terlihat bahwa kualitas DNA dari ekstraksi dengan menggunakan metode Boom bagus. Gambar 6 diatas menunjukkan bagaimana pola pita DNA sebelum dilakukan Polymerase Chain Reaction, dimana pada semua sampel terbentuk pita tunggal. Pita yang terbentuk dapat dilihat dengan jelas pada sampel nomor 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, dan 10. Sedangkan pada sampel

nomor 4, tidak terbentuk pita DNA, dikarenakan pada sampel nomor 4 terdapat DNA yang terekstraksi dalam jumlah yang sedikit. Dengan hasil tersebut, dapat dikatakan bahwa untuk mengekstraksi DNA pada saliva dapat menggunakan metode Boom.

Visualisasi Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara in vitro (Handoyo dan Ari, 2000). PCR mampu menghasilkan sejumlah besar fragmen DNA spesifik dengan panjang dan sekuens yang telah ditentukan dari sejumlah kecil template (Nasir, 2002). Pada proses PCR, digunakan primer yaitu F-5'-GCATCTCCCCAATTCATGGT-3', R- 5'-AACTGTCCCCACCTATCCTG-3'.

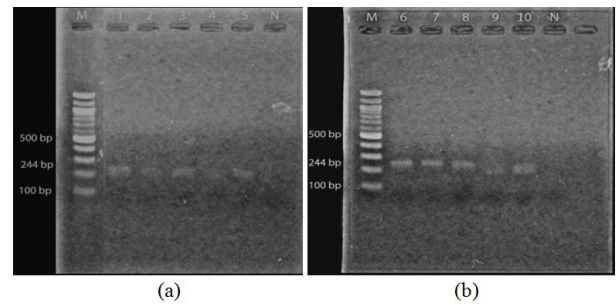
Primer ini khusus digunakan pada gen Nramp-1 khususnya untuk lokus D543N. Dibawah ini dicantumkan urutan basa dari lokus D543N.



Gambar. 2 Hasil BLAST primer NRAMP-1 dengan panjang basa 244 bp pada lokus D543N.

Keterangan: Urutan basa nukleotida yang berwarna merah, merupakan urutan primer forward. Urutan basa nukleotida yang berwarna biru, merupakan urutan primer reverse.

Hasil PCR pada sampel yang telah diekstraksi dengan metode Boom dengan primer tersebut kemudian dilakukan visualisasi dengan elektroforesis sehingga diketahui panjang dari lokus D543N tersebut ialah 244 bp. Hal ini dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar.3 Hasil Amplifikasi D543N sebelum dipotong dengan enzim *Ava II*. a. elektroforesis pertama, b. elektroforesis kedua

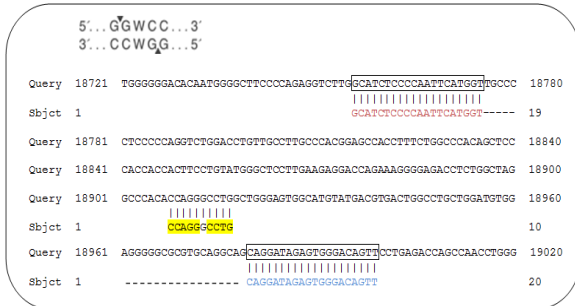
Keterangan = M : marker
1 -10 : urutan sampel
N : Kontrol negatif

Dari hasil visualisasi dengan elektroforesis pada gambar 8 diatas, terlihat bahwa kualitas DNA dari ekstraksi dengan menggunakan metode Boom cukup baik serta primer yang digunakan dapat teramplifikasi dengan baik terhadap gen Nramp-1 khususnya untuk lokus D543N, yaitu 244 bp. Gambar 8 diatas menunjukkan bagaimana pola pita DNA sebelum dilakukan RFLP atau pemotongan dengan menggunakan enzim *Ava II*, dimana pita DNA yang terbentuk pada semua sampel hanya berupa pita tunggal. Pita DNA yang terbentuk dapat dilihat dengan jelas pada sampel nomor 1, 3, 5, 6, 7, 8 dan 10. Pada sampel 2 dan 9, pita yang terbentuk terlihat samar. Sedangkan pada sampel 4, tidak terbentuk pita DNA. Dari hasil visualisasi elektroforesis tersebut, terlihat bahwa dalam saliva atau air liur manusia, terdapat gen NRAMP1.

Visualisasi Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR - RFLP)

Proses pemotongan pita tunggal DNA sampel dengan menggunakan enzim restriksi bertujuan untuk mendapatkan beberapa potongan pada fragmen DNA yang telah teramplifikasi. Potongan-potongan fragmen DNA yang terbentuk akan digunakan untuk menganalisis ada tidaknya keberadaan pola pemotongan pada gen Nramp-1 khususnya pada lokus D543N. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya enzim restriksi

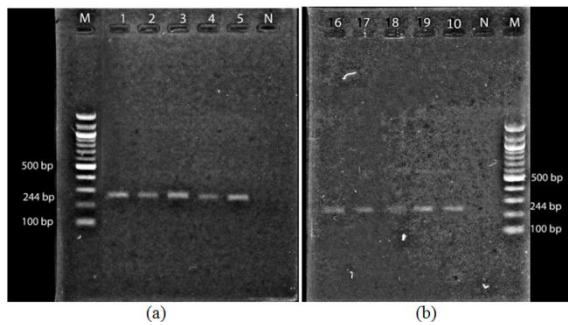
yang dapat memotong gen Nramp-1 khususnya pada lokus D543N ini adalah enzim *Ava II*. Berikut letak dari pemotongan enzim *Ava II* pada gen Nramp-1.



Gambar 4. Lokasi pemotongan enzim restriksi *Ava II* pada lokus D543N.

Keterangan: Terdapat daerah pengenalan pemotongan enzim restriksi, *Ava II*, yang ditandai dengan warna kuning.

Berikut hasil visualisasi dari PCR-RFLP gen Nramp-1 dengan menggunakan enzim *Ava II* dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar.5 Hasil pemotongan gen Nramp-1 dengan enzim *Ava II*. a. elektroforesis pertama, b. elektroforesis kedua

Keterangan = M : marker
1 -10 : urutan sampel
N : Kontrol negatif

Pada gambar 10 menunjukkan pola pita DNA setelah dilakukan pemotongan dengan enzim restriksi, ternyata dari 10 sampel saliva responden yang digunakan diperoleh hasil bahwa semua sampel saliva tidak terjadi pemotongan melainkan yang terbentuk hanyalah pita DNA tunggal dengan panjang 244 bp. Hal ini diakibatkan oleh banyak faktor. Salah

satunya disebabkan karena adanya mutasi pada gen Nramp-1 lokus D543N tersebut, sehingga pada lokus tersebut tidak dapat terpotong oleh enzim *Ava II* (Faiqah, 2010). Hasil restriksi enzim *AvaII* dapat kita lihat lebih jelas pada tabel I berikut ini:

Tabel I. Hasil Pengamatan RFLP

Pemotongan dengan enzim restriksi, <i>Ava II</i>	Total
Positif	0 (0 %)
Negatif	10 (100%)
Jumlah	10

Pada tabel I diatas dapat kita lihat bahwa dari 10 sampel responden yang dipergunakan semuanya (100%) tidak mengalami pemotongan gen. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semua sampel mengalami mutasi, sehingga menyebabkan terjadi perubahan urutan basa pada gen Nramp-1 lokus D543N dan berakibat pada tidak terpotongnya gen tersebut oleh enzim restriksi yang digunakan. Hal ini mungkin berpengaruh terhadap ekspresi dari gen Nramp-1 ini sehingga responden memiliki kerentanan terhadap infeksi dengan patogen intraseluler.

Menurut teori, Pada manusia, Gen Nramp-1 mengandung 15 ekson dan terletak pada kromosom 2q35 (Cellier, *et al.*, 1994). Gen Nramp-1 diungkapkan secara eksklusif di pasangan lisosom ataupun makrofag dan bertindak di awal fase pra-imun bila terjadi infeksi. Apabila terjadi mutasi pada gen Nramp-1 akan mengurangi kemampuan makrofag untuk mengendalikan infeksi dari beberapa patogen (Botteldoorn, *et al.*, 2003). Mutasi di gen Nramp-1 dapat menjadi penyebab kerentanan terhadap infeksi dengan patogen intraseluler. Dalam darah manusia, leukosit polimorfonuklear (PMN) adalah tempat yang paling berlimpah akan mRNA Nramp-1, yang menunjukkan bahwa Nramp-1 memainkan peran penting dalam aktivitas sel (Canonne-Hergaux, *et al.*, 2002).

Kelemahan penelitian ini adalah pada jumlah sampel yang sedikit yaitu 10 sampel, sehingga tidak cukup signifikan

menunjukkan polimorfisme gen NRAMP-1 lokus D543N pada responden.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil visualisasi menggunakan elektroforesis pada produk PCR-RFLP, diperoleh hasil ekstraksi dengan menggunakan metode Boom yang diujikan pada sampel saliva, yang berasal dari 10 mahasiswa Jurusan Biologi, Universitas Hasanuddin, tidak terdapat polimorfisme pada gen Nramp-1 lokus D543N yang dipotong dengan enzim restriksi *Ava II*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 2010, **Elektroforesis Pada Gel Agarose** (Online), (<http://balleck.files.wordpress.com/2009/12/elektroforesis.docx>., diakses pada tanggal 14 September 2013).
- Anonim, 2011, **what is DNA polymorphism and how it helps in genetic mapping?** (Online), (<http://www.nature.com/scitable/popular-discussion/680>, diakses pada tanggal 22 September 2013).
- Anonim, 2012, **Real-Time PCR Handbook**, Life Technologies Corp.
- Anonim, 2013, **Boom Methode** (Online), (http://en.wikipedia.org/wiki/Boom_method, diakses pada tanggal 5 September 2013).
- Awomoyi A. A., 2007, **The Human Solute Carrier Family 11 Member 1 Protein (SLC11A1): Linking Infections, Autoimmunity And Cancer?**. FEMS Immunol. Med.Microbiol., 49(3), 324-329.
- Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., dan Hardin, J., 2000, **The World of The Cell**. Edisi keempat, The Benjamin Publishing Company.
- Bellamy, R., C.Ruwende, et al., 1998, **Variations in the NRAMP 1 Gene and usceptibility to Tuberculosis in West Africans**, N engl J Med 338(10):640-4.
- Boom, R., C. J. A. Sol, M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-Van Dillen, dan J. Van Der Noordaa, 1990, **Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids**, *Journal Of Clinical Microbiology*, Mar. 1990, P. 495-503
- Botteldoorn, N., H. Werbrouck, N. Rijpens, L. Herman, V. Dedain, J. Depuydt, S. De Smet, 2003, **Genetic resistance towards Salmonella infections**, 17th Forum for Applied Biotechnology, Gent, Belgium.
- Canonne-Hergaux, F., Jero, C., Etienne, R., Mathieu, C., Sergio, G., Neils, B. and Philippe, G., 2002, **Expression and subcellular localization of NRAMP1 in human neutrophil granules**, *Blood*, 1 July 2002 Volume 100, Number 1, 2002 100: 268-275.
- Chatburn, K., 2012, **Can saliva replace blood for DNA collection & analysis? (Part 1 of 3)** (Online). (<http://blog.dnagenotek.com/blogdnagenotekcom/bid/88550/Can-saliva-replace-blood-for-DNA-collection-analysis-Part-1-of-3>, diakses pada tanggal, 27 Agustus 2013.)
- Cellier M, Govoni G, Vidal S, *et al.* **Human natural resistance-associated macrophage protein:cDNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue- specific expression.** *J Exp Med* 1994; 5: 1741-52.
- Chiappin, S., Giorgia, A., Rosalba, G., dan Elio, F.D.P., 2007, **Saliva Specimen: A New Laboratory Tool for Diagnostic and Basic Investigation**, *Clinica Chimica cta* 383 (2007) 30 – 40.

- Crevel, R.V., Ida, P., Edhyana, S., Sangkot, M., Tom, H.M.O., Mihai, G.N., Andre, v.d.V., Ronald, H.N., Jos, W.v.d.M., Bacht, A. dan Esther, v.d.V., 2009, **Infection with Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotype Strains Is Associated with Polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian Patients with Tuberculosis**, *The Journal of Infectious Diseases* 2009; 200:1671-4
- Dailami Muhammad, 2011, **Mengoptimalkan PCR** (Online), (<http://kimiaunipa.blogspot.com>, diakses pada tanggal 6 Desember 2013)
- Ekstrom, J., Nina, K., Massimo, C., dan Irene, M., 2012, **Saliva and The Control of Its Secretion, Dysphagia, Medical Radiology. Diagnostic Imaging**, DOI: 10.1007/174_2011_481: 19 – 47.
- Fanani, M.Z., 2011, **Teknologi Analisis Molekular Menggunakan Metode Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP): Aplikasinya Dalam Diagnosis Molekular Spesies Candida** (Online), (<http://mazfanani.wordpress.com/2011/04/25/teknologi-analisis-molekular-menggunakan-metode-restriction-fragment-length-polymorphism-rflp-aplikasinya-dalam-diagnosis-molekular-spesies-candida/>, diakses pada tanggal 5 September 2013).
- Faiqah, 2010, **Analisis Polimorfisme Gen Nramp-1 (Natural Resistance Associated Macrophage Protein-1) Lokus 3'utr Terhadap Susceptibility Individu Pada Penderita Kusta Di Kota Makassar**, Pascasarjana, Universitas Hasanuddin.
- Gadro, S.A., 2009, **Sidik DNA** (Online), (<http://www.vikaasriningrum.com/2009/12/sidik-dna.html>, diakses pada tanggal 22 September 2013).
- Gruenheid S, Pinner E, Desjardins M, Gros P. **Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The Nramp-1 proteins is recruited to the membrane of the phagosome.** *J Exp Med* 1997; 185: 717-30.
- Handoyo, D., dan Ari, R., 2000, **Prinsip Umum Dan Pelaksanaan Polymerase Chain Reaction (PCR)**, *Unitas*, Vol. 9, No. 1, September 2000 - Pebruari 2001, 17-29.
- Hatta, M., Ratnawati, Motoko, T., Jun, I., Toshiro, S., dan Masato, K., 2010, **Nramp1/Slc11a1 Gene Polymorphisms And Host Susceptibility To Mycobacterium Tuberculosis And M. Leprae In South Sulawesi, Indonesia**, *Southeast Asian J Trop Med Public Health* Vol 41 No. 2 March 2010: 386 – 394.
- Hatta, M. and Smits, H.L. 2007. **Detection of Salmonella Typhi by Nested Polymerase Chain Reaction in Blood, Urine, and Stool Samples.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 76(1), p. 139-143.
- Heintze, U., Birkhed, D., dan Björn, H., 1983, **Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex**, *Swed Dent J* 7:227-238.
- Holsinger, F.C., dan Dana, T.B., 2010, **Anatomy, Function, and Evaluation of the Salivary Glands** (Online), (http://www.springer.com/cda/content/document/cda_downloaddocument/9783540470700-c1.pdf, diakses pada tanggal 2 September 2013).
- Jean, F.G., 2010. **Agarose Gel Electrophoresis – Applications in Clinical Chemistry.** *Journal of Medical Biochemistry* 2010; 29 (1).

- Kandou, F.E.F., 2009, **Analisis Molekuler *Escherichia coli* Serotype O157:H7 Pada Air Minum Dalam Kemasan Dan Isi Ulang Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (Pcr) Dengan *Rfbc* Sebagai Gen Target**, *Chem. Prog. Vol. 2*, No. 1. Mei 2009: 8 – 14.
- Lina, M.R., Budiman, B., dan Mukh, S., 2007, **Deteksi Gen Target INH pada DNA Sputum Basil Tahan Asam Positif**, *Maj Kedokt Indon*, Volum: 57, Nomor: 8, Agustus 2007.
- Marquet, S., Pierre, L., Thomas, J.H., James, M.M., dan Erwin, S., 2000, **Complete nucleotide sequence and genomic structure of the human NRAMP1 gene region on Chromosome region 2q35**, *Mammalian Genome* 11, 755–762 (2000).
- McPherson, M.J., dan Simon, G.M., 2006, **PCR: Second Edition**, Taylor nd Francis Group, New York.
- Morin, N.J., Gong, Z. and Xing-Fang, L. 2004. **Reverse Transcription-Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1, and *Salmonella Typhi***. *Clinical Chemistry*, 50:11, 2037-2044.
- Nasir, M., 2002, **Bioteknologi Potensi Dan Keberhasilannya Dalam Bidang Pertanian**, PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Nurrohman, A., Nurfadlina, W., Peri,I.Y.L., dan Sri, I, 2012, **Makalah Genetika PCR (*Polimerase Chain Reaction*)** (Online), (<http://apikdewefppundip2011.wordpress.com/2012/06/29/makalah-genetika-pcr-polimerase-chain-reaction/>), diakses pada tanggal 15 September 2013).
- Phillips, S.M., 2009, **A Comparative Study Of Dna Extraction Methodologies: Variation In Dna Yield And Effects On Downstream Pcr Analysis**, *B.S. Cornell University Repub* 2007.
- Pink, R., Jiri, S., Jana, V., Edgar, F., Petr, M., Jindric, P., dan Karel, I., 2009, **Saliva As A Diagnostic Medium**, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2009, 153(2):103–110.
- Prasetyo, A.A., 2009, **Materi Asistensi Biomedik FK UNS 2009** (Online), (<http://afie.staff.uns.ac.id/files/2009/11/materi-asistensi-biomedik-fk-uns2009.docx>., diakses pada tanggal 14 September 2013).
- Pratiwi, R., 2001, **Mengenal Metode Elektroforesis**, *Oseana, Volume XXVI*, Nomor 1,2001 : 25 – 31
- Puzyrev, 2002. **NRAMP-1 Gene: Structure, Function, And Human Infectious Diseases**. (Online), (<http://www.plosone.org/article/>, Diakses pada tanggal 2, Sepetmber 2013).
- Smith, B., 2010, **Rinse, Swab or Spit -- What's the Real Source of DNA in Saliva?** (online), (<http://blog.dnagenotek.com/blogdnagenotekcom/bid/35944/Rinse-Swab-or-Spit-What-s-the-Real-Source-of-DNA-in-Saliva>, diakses tanggal 28 Agustus 2013).
- Solich, A.A., 2012, **Elektroforesis Gel Agarosa** (Online),(<http://anadianaazam.blogspot.com/2012/06/elektroforesis-gel-agarosa.html>, diakses pada tanggal 14 September 2013).
- Wibawa, B., 2010, **Metode Analisis Dna Finger Printing Metode RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)** (Online), (<http://bhimashraf.blogspot.com/2010/09/bioteknologi.html>, diakses pada tanggal 14 September 2013).
- Wibowo, D.A., 2009, **Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Gen Sitokrom B Dna Mitokondria Dari Delapan**

Spesies Burung, Fakultas
Kedokteran Hewan, Institut
Pertanian Bogor, Bogor.

Winter, P.C., 2005, **Polymerase Chain
Reaction (PCR)**, *Encyclopedia Of
Life Sciences* (2005) doi:
10.1038/Npg.Els.0005339.