

**DETEKSI GEN GLUKOKINASE PADA REMAJA DI PESISIR KOTA
KENDARI SULAWESI TENGGARA**

**MOLECULAR DETECTION OF GLUCOKINASE GENES IN ADOLESCENTS
ON THE COAST OF KENDARI IN SOUTHEAST SULAWESI**

Tiara Mayang Pratiwi Lio¹, Sugireng¹

¹Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, STIKES Mandala Waluya Kendari
e-mail: tiaramayangpratiwilio@yahoo.com

Abstrak

Gen glukokinase (GCK) mengkode enzim glukokinase yang berfungsi dalam metabolisme glukosa. Di pankreas, enzim ini berperan dalam sekresi insulin yang distimulasi glukosa dan di hati, enzim ini penting dalam pengambilan glukosa dan konversi menjadi glikogen. Mutasi pada gen ini dapat menyebabkan perubahan aktivitas enzim yang telah dikaitkan dengan beberapa tipe diabetes. Penelitian deteksi gen GCK pada remaja di pesisir Kota Kendari Sulawesi Tenggara merupakan penelitian deskriptif analitik untuk melihat apakah gen GCK exon 7 dapat dideteksi pada remaja di Kota Kendari dengan metode PCR. Penelitian ini menggunakan metode observasional analitik dengan pendekatan *cross-sectional*. Sampel penelitian ini merupakan 10 orang siswa SMAN 8 Kendari berusia 15-18 tahun. Analisis genetik dilakukan dengan mengisolasi DNA dari darah sampel menggunakan prosedur rutin. Daerah pengkodean serta batas intron-ekson diamplifikasi oleh PCR menggunakan prosedur standar. Berdasarkan hasil penelitian 8 dari 10 sampel menunjukkan pita DNA pada panjang 300bp, sehingga dapat disimpulkan metode PCR dapat digunakan mendeteksi gen GCK exon 7 pada remaja di Kota Kendari.

Kata kunci: *Gen Glukokinase, Diabetes, Remaja, Kendari*

Abstract

The glucokinase gene (GCK) encodes the glucokinase enzyme that functions in glucose metabolism. In the pancreas, this enzyme plays a role in the secretion of insulin-stimulated glucose and the liver, this enzyme is important in glucose uptake and conversion to glycogen. Mutations in this gene can cause changes in enzyme activity that have been linked to several types of diabetes. The GCK gene detection study in adolescents on the coast of the Kendari City of Southeast Sulawesi is a descriptive-analytic study to see whether the exon 7 GCK gene can be detected in adolescents in the Kendari City by using the PCR method. This research uses an analytic observational method with a cross-sectional approach. The sample of this research was 10 students of SMAN 8 Kendari aged 15-18 years. Genetic analysis carried out by isolating DNA from the blood's sampel using routine procedures. The coding area and the intron-exon boundary are amplified by PCR using standard procedures. Based on the results of study 8 of 10 samples showed DNA bands at 300bp in length, so it can be concluded that the PCR method can be used to detect the exon 7 GCK gene in adolescents in Kendari City.

Keywords: *Glukokinase Gene, Diabetes, Remaja, Kendari*

Pendahuluan

Glucokinase (GCK) adalah enzim kunci dalam regulasi pelepasan insulin di sel β pankreas. Ini dikodekan oleh gen glucokinase yang terletak di kromosom 7p15.3 – p15.1, yang terdiri dari 10 ekson dan mencakup 45,168 bp. Kelainan dalam GCK akibat mutasi gen akan mengganggu homeostasis glukosa yang menyebabkan hiperglikemia dan hipoglikemia. Mutasi inaktivasi menyebabkan GCK-MODYsementaramutasi homozigot atau senyawa heterozigot menghasilkan fenotip yang lebih parah dari DM neonatal permanen. Sebaliknya, mutasi aktivasi heterozigot menyebabkan hipoglikemia hiperinsulinemik yang persisten padabayi (Gloyn *et al.*, 2003; Osbak *et al.*, 2009; DeFronzo *et al.*, 2015)

Ada 620 mutasi berbeda yang ditemukan pada 1441 keluarga dalam 10 ekson (ekson 1–10) dari gen GCK yang diekspresikan dalam sel β pankreas. Meskipun mutasi patogen GCK heterozigot beragam, mereka semua mengarah ke fenotip yang sama yakni hiperglikemia puasa ringan (Osbak *et al.*, 2009; IDF, 2017).

Penelitian sebelumnya mengidentifikasi mutasi nonsense di ekson 7 sebagai kemungkinan penyebab intoleransi glukosa dalam gangguan dominan yang diwariskan. Isolasi dan urutan parsial dari gen glukokinase pada manusia menunjukkan mutasi missense di ekson 7, codon 228 [ACG^{Thr}--ATG^{Met}], codon 251 [ATG^{Met}--ACG^{Thr}] dan codon 261 [GGG^{Gly}--AGG^{Arg}], yang berhubungan dengan onset awal *diabetes mellitus non-insulin-dependent*. Mutasi Thr-228 mempengaruhi afinitas untuk ATP dan mutasi Gly-261 dapat mengubah ikatan glukosa. Sehingga mutasi pada gen GCK, sebuah protein yang memainkan peran penting dalam metabolisme glukosa hati dan sel β pancreas, menunjukkan bahwa onset awal *diabetes mellitus non-insulin-dependent* mungkin merupakan awal dari gangguan metabolisme karbohidrat (Stoffel *et al.*, 1992 ; Kanthimathi *et al.*, 2014).

Metode Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei-Agustus 2019 di SMAN 8 Kendari, Sulawesi Tenggara dan Laboratorium Molekuler Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis STIKES Mandala Waluya Kendari dengan menggunakan metode observasional analitik. Penelitian terdiri atas pemeriksaan GDS dan analisis genetic. Penelitian ini menggunakan darah yang diambil dari ujung jari untuk pemeriksaan GDS dengan alat glucometer dan dari vena yang terdapat di lengan untuk analisis genetic.

Pemeriksaan GDS dilakukan dengan menggunakan alat glucometer dan dilanjutkan dengan analisis DNA. Isolasi DNA dari sampel *Whole blood* menggunakan kit isolasi dan purifikasi DNA (*The DNA Extraction*) dari Geneaid. Penentuan genotip GCK yaitu dengan cara fragmen DNA di amplifikasi dengan forward primer 5'-AGTGCAGCTCTCGCTGACAG-3' dan 5'-CATCTGCCGCTGCACCAGAG-3' sebagai primer reverse dengan ukuran panjang produk 285 pb (Stoffel *et al.*, 1992 ; Kanthimathi *et al.*, 2014).

Campuran reaksi PCR (volume akhir 25 μ L) yang terdiri dari: 2 μ L primer mix (1 μ L *primer forward* dan 1 μ L *primer reverse*) ke dalam microtube PCR 0,2 ml ditambahkan 15 μ L PCR *master mix* (1x buffer PCR, 150 nM dNTP, dan 0,5 U *Taq* DNA polymerase), kemudian ditambahkan 3 μ L *Nuclease Free Water* dan 5 μ L DNA *template*. Kondisi temperatur reaksi PCR gen GCK adalah sebagai berikut: Denaturasi awal dilakukan pada suhu 94°C selama 5 menit yang diikuti oleh 35 siklus. Initial denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 60°C selama 1 menit, *extension* pada suhu 72°C selama 2 menit, dan *final extension* pada suhu 72°C selama 10 menit (Stoffel *et al.*, 1992 ;

Kanthimathi *et al.*, 2014). Produk PCR yang diperoleh dari proses PCR dengan kondisi PCR yang telah disesuaikan kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Penelitian

Data hasil pemeriksaan GDS pada siswa/siswi SMAN 8 Kendari yang diukur dengan menggunakan glukometer ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan GDS

No.	Jenis Kelamin (P/L)	Umur (Tahun)	GDS (mg/dl)
1.	P	15	116
2.	P	15	115
3.	P	15	99
4.	p	16	99
5.	P	16	95
6.	P	15	91
7.	P	16	92
8.	L	15	107
9.	P	15	108
10.	L	16	128

Data hasil pemeriksaan konsentrasi DNA hasil isolasi pada darah siswa/siswi SMAN 8 Kendari yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 260 nmditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel2. Hasil Pembacaan Konsentrasi DNA

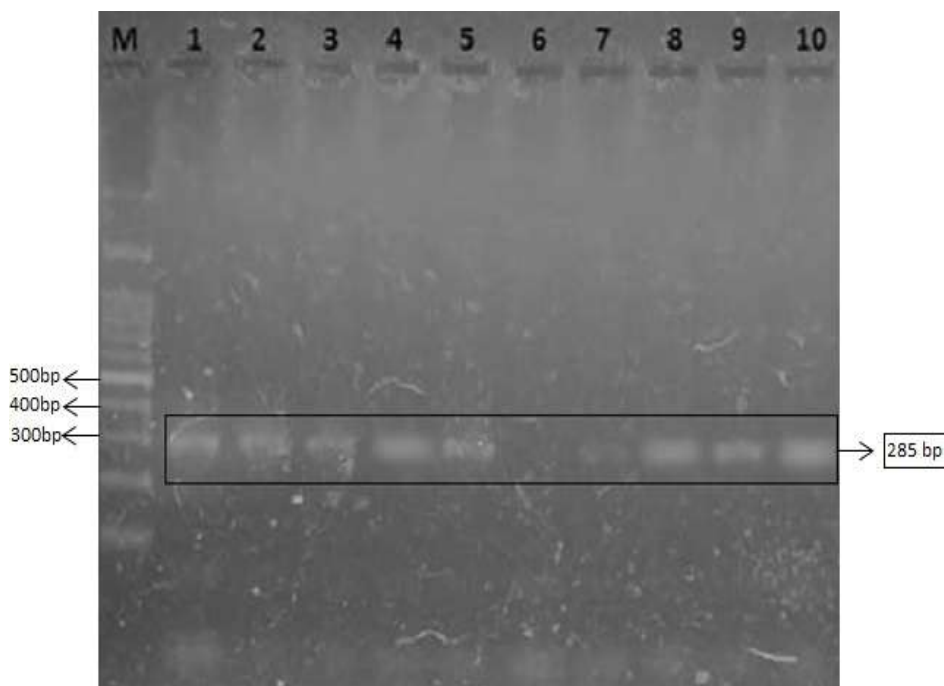
Sampel	Rasio serapan Absorbance ratio (nm)
1	0.71
2	0.71
3	0.72
4	0.70
5	0.70
6	0.67
7	0.60
8	0.71
9	0.72
10	0.71

Letak primer forward dan primer reverse digunakan dalam penelitian ini dan DNA target yaitu gen glukokinase exon 7.

Tabel3.Fasta RefSeqGene dari Gen Glukokinase pada urutan basa 55338..55521

55261	ACTCCTGTGG	GCAGGAACCA	GGCCCTACTC	CGGGGCAGTG	CAGCTCTCGC	TGACAGTCCC
55321	CCCGACCTCC	ACCCAGGCA	CGGGCTGCAA	TGCTGTCTAC	ATGGAGGAGA	TGCAGAATGT
55381	GGAGCTGGTG	GAGGGGGACC	AGGGCCGCAT	GTGCGTCAAT	ACCGAGTGGG	GCGCCTTCGG
55441	GGACTCCGGC	GAGCTGGACG	AGTTCCTGCT	GGAGTATGAC	CGCCTGGTGG	ACGAGAGCTC
55501	TGCAAACCCC	GGTCAGCAGC	TGTAAGGATG	CCCCCTCCC	CCACAACCCA	GGCCCTGGGC
55561	CGCTCTGGTG	CAGCGGCAGA	TGGGAGCCGG	GCCATTGCAG	ATAATGGGCT	TGTTTTTAAA

Note :xx Merupakan primer forward ; xx Merupakan primer reverse ; xx Posisi exon 7 gen glukokinase



Gambar 1. Hasil Elektroforesis GenGCK pada Remaja di kota Kendari

Pembahasan

Metabolisme glukosa dimulai dengan fosforilasi glukosa menjadi glukosa 6-fosfat melalui pemindahan sebuah fosfat dari ATP. Fosforilasi menyebabkan glukosa ikut dalam metabolisme di dalam sel karena glukosa 6-fosfat tidak dapat dikeluarkan dari dalam sel dalam keadaan fisiologis. Heksokinase dan glukokinase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi ini dan merupakan kelompok enzim yang tergabung dalam family isoenzim. Heksokinase dan glukokinase mengkatalisis transfer gugus fosfat dari ATP ke glukosa dalam proses fosforilasi glukosa oleh ATP menjadi glukosa-6-fosfat. Heksokinase merupakan enzim yang bekerja di jaringan otot sedangkan glukokinase merupakan enzim yang bekerja di pancreas dan hati. Kerja heksokinase diinhibisi oleh produk reaksi ini yaitu glukosa-6-fosfat. Ketika konsentrasi glukosa-6-fosfat mencapai nilai yang tinggi, produk ini akan bertindak sebagai efektor negatif bagi heksokinase sehingga keaktifan heksokinase berkurang bahkan hilang. Berbeda halnya dengan enzim glukokinase. Enzim ini tidak dihambat oleh produk glukosa-6-fosfat tetapi tetap aktif sementara glukosa berlimpah. Di pankreas, enzim ini berperan dalam sekresi insulin yang distimulasi glukosa, sementara di hati, enzim ini penting dalam

pengambilan glukosa dan konversi menjadi glikogen. Mutasi pada gen ini yang mengubah aktivitas enzim yang telah dikaitkan dengan beberapa tipe diabetes dan hipoglikemia hiperinsulinemia (Pearson *et al.*, 2003; Aniket *et al.*, 2015)

Hasil penelitian GDS yang ditunjukkan **Tabel 1.** menunjukkan bahwa dari 10 responden yang merupakan anak dari orang tua yang memiliki riwayat DM memiliki kadar glukosa sewaktu bervariasi dari 91-128 mg/dl. Jika dilihat dari kadar GDS maka tidak terdapat responden yang terindikasi menderita DM (ADA, 2014). Hal ini dapat dikarenakan pada usia remaja (18-20 tahun) tubuh masih memiliki kemampuan respon tubuh yang baik dalam memproduksi insulin sesuai kebutuhan dengan sensitivitas yang baik pula. Kadar GDS yang rendah dapat umumnya disebabkan pada usia remaja aktifitas yang dimiliki sangat tinggi karena merupakan usia produktif akan tetapi memiliki pola hidup yang belum teratur terutama dalam hal mengkonsumsi makanan yang sesuai kebutuhan gizi dan teratur.

Analisis genetik untuk mendeteksi gen GCK exon 7 dilakukan dengan metode PCR. Pada tahap awal terlebih dahulu dilakukan ekstraksi DNA pada darah perifer dengan menggunakan kit ekstraksi. Komponen kit ekstraksi DNA berupa *buffer GST*, *Proteinase K*, *buffer GSB*, etanol absolut, *buffer W1*, *wash buffer*, dan *elution buffer*. Pada prinsipnya isolasi DNA meliputi 5 tahapan, yaitu isolasi atau pemanenan sel, penghancuran sel (lisis sel), penghilangan protein dan RNA (ekstraksi), pemurnian (purifikasi) DNA serta pengendapan (presipitasi).

Tahap pemanenan sel dilakukan dengan sentrifugasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada didasar (pellet), sedangkan substansi yang lebih ringan akan berada di atas (supernatant). Pellet yang dihasilkan merupakan sel jaringan yang telah mengendap sedangkan supernatannya adalah sisa komponen protein/lipopolisakarida dari dinding sel bakteri. DNA yang dihasilkan dalam proses ini biasa disebut sebagai DNA templat.

Hasil isolasi DNA ditentukan konsentrasinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm. Penentuan kadar DNA dilakukan untuk mengetahui apakah DNA hasil isolasi cukup memadai untuk diamplifikasi dengan metode PCR. Rasio serapan 1.80 merupakan rasio standar kemurnian DNA. Rasio serapan $A_{260}/A_{280} \geq 1.80$ menunjukkan bahwa DNA terkontaminasi dengan RNA sedangkan $ratio \leq 1.80$ menunjukkan bahwa DNA terkontaminasi dengan protein (Putranto dkk., 2006). Pada penelitian ini, seperti yang ditunjukkan oleh **Tabel 2.**, DNA dari ekstraksi DNA memiliki rasio A_{260}/A_{280} dibawah 1.80, menunjukkan bahwa DNA hasil ekstraksi masih terkontaminasi oleh zat pengotor yang berupa protein (Ratnayani *et al.*, 2009). Meskipun begitu, DNA hasil isolasi tersebut masih dapat dijadikan sebagai *template* pada proses amplifikasi PCR.

Setelah melalui tahapan isolasi DNA tahap berikutnya adalah PCR (*Polymerase Chain Reaction*). PCR merupakan suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) potongan DNA secara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Primer yang digunakan sebagai pembatas daerah yang diperbanyak adalah DNA untai tunggal yang urutannya komplemen dengan DNA templatnya. PCR memungkinkan adanya perbanyakan DNA antara dua primer, hanya di dalam tabung reaksi, tanpa perlu memasukkannya ke dalam sel (*in vivo*). Pada proses PCR dibutuhkan DNA untai ganda yang berfungsi sebagai cetakan (templat) yang mengandung DNA-target (yang akan diamplifikasi) untuk pembentukan molekul DNA baru, enzim DNA polimerase, deoksinukleosida trifosfat (dNTP), dan sepasang primer oligonukleotida. Berdasarkan **Table 3.** posisi primer forward terletak pada basa 55297-55316 dan reverse terletak pada basa 55563-55581 dan posisi exon 7 dalam gen glukokinase adalah 55338-55521 sehingga diharapkan kedua primer akan mengenali dan berikatan dengan untai DNA komplemennya yang terletak pada awal dan akhir fragmen DNA target yaitu exon 7. Setelah kedua primer menempel pada DNA templat,

DNA polimerase mengkatalisis proses pemanjangan kedua primer dengan menambahkan nukleotida yang komplemen dengan urutan nukleotida templat.

Setelah DNA melalui tahapan PCR maka dapat dilihat dengan visual melalui proses elektroforesis. Elektroforesis adalah suatu cara analisis kimiawi yang didasarkan pada pergerakan molekul-molekul protein bermuatan di dalam medan listrik (titik isoelektrik). Berdasarkan gambar 1. Terlihat pita DNA dari S1, S2, S3, S4, dan S5 yang sejajar dengan marker berukuran 300 bp. Hal ini bermakna bahwa dari ke-5 sampel telah berhasil di isolasi DNA dari gen glukokinase pada exon 7 yang memiliki ukuran 285 bp. Pergerakan molekul saat proses elektroforesis terjadi dalam medan listrik yang dipengaruhi oleh bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia dari molekul. Pemisahan dilakukan berdasarkan perbedaan ukuran berat molekul dan muatan listrik yang dikandung oleh makro-molekul tersebut. Bila arus listrik dialirkan pada suatu medium penyangga yang telah berisi protein plasma maka komponen-komponen protein tersebut akan mulai bermigrasi. Sehingga berdasarkan hasil tersebut maka seluruh sampel memiliki bentuk, ukuran, besar muatan dan sifat kimia yang sama terlihat dari hasil pita elektroforesis yang muncul pada posisi yang sama.

Setelah memastikan bahwa gen glukokinase exon 7 berhasil diisolasi dan diperbanyak berdasarkan hasil elektroforesis maka DNA hasil PCR dapat dilanjutkan ke tahap sequence untuk melihat variant dan urutan asam basa yang terdapat dalam DNA sehingga dapat dilihat apakah ada perbedaan antara gen glukokinase exon 7 pada remaja kota Kendari dengan variant lain yang telah dilaporkan sebelumnya baik variant normal maupun mutasi.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa dengan metode PCR maka dapat dilakukan pendeteksian gen glukokinase exon 7 pada posisi marker 300 bp.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jendral Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi yang telah memberikan dana hibah Penelitian Dosen Pemula ini serta kepada LPPM STIKES Mandala Waluya Kendari dan Prodi D-IV Teknologi Laboratorium Medis STIKES Mandala Waluya Kendari yang telah memfasilitasi pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- American Diabetic Association (ADA), 2014. Diagnostic and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37:82-90.
- Anik, A., Catli, Gonul., Abacı, Ayhan., and Bober, Ece., 2015. Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY): an update. *Journal Pediatric Endocrinology Metabolic*. Volume 28(3-4):251-63. doi: 10.1515/jpem-2014-0384.
- DeFronzo RA, Ferrannini E, Zimmet P, et al., 2015. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, 2 Volume Set, 4th Edition. Wiley-Blackwell
- Gloyn AL., 2003. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: Maturity onset diabetes of the young (MODY), permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. *Human Mutation*; 22:353-62.
- International Diabetes Federation, 2017. *IDF DIABETES ATLAS* Eighth edition. ISBN: 978-2-930229-87-4
- Kanthimathi S, Jahnavi S, Balamurugan K, Ranjani H, Sonya J, Goswami S, Chowdhury S, Mohan V, Radha V., 2014. Glucokinase gene mutations (MODY 2) in Asian Indians. *Diabetes Technology and Therapeutics* ;16:180-5.

- Osbak KK, Colclough K, Saint-Martin C, Beer NL, Bellanné-Chantelot C, Ellard S, Gloyn AL., 2009. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Human Mutation*; 30:1512–26
- Pearson ER, Starkey BJ, Powell RJ, Gribble FM, Clark PM, *et al.*, 2003. Genetic cause of hyperglycaemia and response to treatment in diabetes. *Lancet* 362(9392): 1275-1281.
- Putranto, R. A., Budiani Asmini, Hayati M., Niyyah F., dan Djoko S., 2009. *Rapid cloning for gene encoding fungal β -1,6 glucanase by means of RT-PCR using specific primers*, Jurnal Menara Perkebunan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Ratnayani K., Chandra S.Y., dan Syane L.S., 2009. Amplifikasi fragmen 0,4 kb daerah D-loop DNA Mitokondria Lima Individu Suku Bali tanpa hubungan kekerabatan dengan Metode *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. *Jurnal Kimia* 3(1):14-20.
- Stoffel, M., P. Froguel, J. Takeda, H. Zouali, N. Vionnet, S. Nishi, *et al.*, 1992. Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Journal*. Volume 89:7698–7702.