



Artikel Penelitian

DETEKSI POLIMORFISME GENE MTHFR C677T MENGGUNAKAN RFLP HINF I***DETECTION OF MTHFR C677T GENE POLYMORPHISM USING HINF I RFLP****Ira Cinta Lestari,^a David Pakaya^b*^a *Departemen Histologi, Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sumatera Utara, Medan, Indonesia*^b *Departemen Histologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Tadulako, Palu, Indonesia***Histori Artikel**Diterima:
08 Januari 2024Revisi:
05 Februari 2024Terbit:
01 Juli 2024**A B S T R A K**

Latar Belakang: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya polimorfisme C677T pada gene yang mengkode enzim *Methylene tetrahydrofolate reductase* (MTHFR) manusia yang berperan penting pada siklus metilasi.

Metode: Digunakan 5 sampel DNA. DNA diisolasi dari darah tepi dengan metode *saturated salt*. Genotyping MTHFR C677C dan C677T ditunjukkan dengan (*Polymerase Chain Reaction*) PCR dan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) gene MTHFR menggunakan enzim restriksi Hinf I.

Hasil: Terdapat 2 sampel dengan genotipe wild type C677C dan 3 sampel dengan genotipe polimorfisme C677T.

Kesimpulan: Polimorfisme C677T terjadi pada sebagian besar populasi dan berkaitan dengan faktor resiko berbagai penyakit.

Kata KunciMTHFR, Hinf I,
Polimorfisme, PCR,
RFLP**A B S T R A C T**

Background: This study aims to determine the existence of the C677T polymorphism in the gene that codes for the human Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) enzyme which plays an important role in the methylation cycle.

Method: 5 DNA samples were used. DNA was isolated from peripheral blood using the saturated salt method. Genotyping of MTHFR C677C and C677T was demonstrated by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of the MTHFR gene using the Hinf I restriction enzyme.

Results: There were 2 samples with the wild type C677C genotype and 3 samples with the C677T polymorphism genotype.

Conclusion: The C677T polymorphism occurs in the majority of the population and is associated with risk factors for various diseases.

Korespondensi

Tel. 08196029417

Email:
iracinta.lestari@fk.uisu
.ac.id

PENDAHULUAN

Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) adalah enzim yang berperan dalam siklus metilasi. MTHFR mengkatalisis reaksi konversi 5,10-methylenetetrahydrofolate menjadi 5-methyltetrahydrofolate, yang merupakan ko-substrat pada remetilasi homosistein menjadi metionin.¹ Variasi genetik dan defisiensi MTHFR akibat mutasi gen yang mengkode MTHFR mempengaruhi berbagai kelainan seperti penyakit *occlusive vascular*, penyakit jantung kongenital, defek *neural tube*, penyakit Alzheimer's, dementia, kanker kolon, leukemia akut dan kanker kolon.² Salah satu akibat defisiensi MTHFR adalah terjadinya hiperhomosisteinemia yang dapat menimbulkan kerusakan pada endotel pembuluh darah, trombosis dan penyakit jantung koroner.³

Gene yang mengkode MTHFR manusia terdapat pada posisi 1p36.3 yaitu pada kromosom 1 lengan pendek posisi 36.3. cDNA gene MTHFR berukuran 2,2 Kbp terdiri atas 11 exon dan enzim yang dihasilkan berukuran 70 KDa.⁴ Untuk mengetahui adanya polimorfisme gene MTHFR dapat dilakukan isolasi DNA, PCR gene MTHFR, RFLP dan elektroforesis. Polimorfisme yang umum terjadi pada gene MTHFR adalah C677T.

Penelitian ini bertujuan mengetahui adanya polimorfisme C677T pada gene MTHFR melalui tahapan isolasi DNA dari darah EDTA dengan metode *saturated salt*, melakukan amplifikasi gene MTHFR dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan deteksi *genotyping* dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) menggunakan enzim restriksi Hinf I dan Elektroforesis.

METODE

Penelitian ini adalah penelitian analitik deskriptif dengan desain *cross sectional*. Penelitian di lakukan di Laboratorium Biologi Molekuler FK-KMK UGM. Sampel yang digunakan adalah sampel DNA manusia dewasa yang ditentukan secara *accidental sampling*. Sampel DNA diisolasi dari darah EDTA dengan metode *saturated salt*, kemudian dilakukan amplifikasi gene MTHFR dengan PCR dan deteksi *genotyping* dengan metode RFLP menggunakan enzim restriksi Hinf I dan Elektroforesis. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Bidang Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sumatera Utara dengan No. 273/KEPK/FK-UISU/VII/2021.

Sampel

Sampel DNA yang digunakan berasal dari 5 subjek penelitian yang terdiri atas 3 orang laki-laki dewasa dan 2 orang perempuan dewasa, berupa darah EDTA sebanyak 5 mL yang dilakukan isolasi DNA terlebih dahulu.

Isolasi DNA

Metode ini dilakukan untuk memisahkan DNA dari komponen sel. Semua prosedur dilakukan di ruang persiapan reagen dan pre PCR. Sebelum bekerja, meja dan pipet dibersihkan dengan etanol 70%. Sampel darah EDTA dituang ke dalam tabung *conical* 50 ml yang sudah dilabel sesuai kode unik sampel kemudian ditambahkan *lysis buffer* 1x hingga 50 ml, dikocok kuat hingga homogen. Dilakukan sentrifus 4000xrpm (rotor 4) selama 20 menit 4°C break 3 kemudian supernatan dibuang. *Pellet* dicuci dengan *lysis buffer* 1x.

Ditambahkan 50 ml *lysis buffer* 1x, dikocok sampai homogen dan dilakukan sentrifus kembali. Ketika *pellet* sudah bersih (putih) ditambahkan 3 ml *lysis buffer* 1x, 200 µl SDS 10%, Proteinase K 10 mg/ml 20 µl, divortex sampai berbusa. Dilakukan inkubasi 56°C selama semalam (*overnight*). Setelah *pellet* larut ditambahkan 1,5 ml Nal 6 M, divortex hingga berbusa kemudian disentrifus, supernatan dipindahkan ke tabung conical 15 ml, ditambahkan ethanol absolut dingin dengan perbandingan 1 volume supernatan ditambah 2 volume ethanol absolut dingin. Tabung *conical* dibolak-balik sampai terlihat benang DNA. Benang DNA dipindahkan ke dalam tabung 1,5 ml yang sudah berisi 1 ml ethanol 70% untuk mencuci DNA dan disentrifus agar DNA mengendap. Ethanol dibuang dan DNA dikeringkan di suhu ruang. Setelah kering, ditambahkan *TE buffer* pada DNA, diinkubasi pada inkubator kering 37°C sampai larut. Setelah larut DNA disimpan di -20°C, diukur OD DNA pada panjang gelombang 260 nm dengan spektrofotometer dan integritas DNA diukur dengan elektroforesis gel 2% 100 volt selama 40 menit.

Elektroforesis Polinukleotida pada Gel Agarose

Metode ini dilakukan untuk mengidentifikasi molekul polinukleotida berdasarkan besarnya. Semua prosedur dilakukan di ruang persiapan reagen dengan pre-PCR. Sebelum bekerja, meja dan pipet dibersihkan dengan etanol 70%. Konsentrasi gel 2% dibuat dari 2 gr agarose dan 100 ml TAE 0,5x, dicampur dan dipanaskan dengan

microwave hingga larut dan dituang pada cetakan gel hingga beku. Campuran sampel DNA ditambahkan *loading buffer* dengan perbandingan 5:2 kemudian dimasukkan ke sumuran. DNA *ladder* dimasukkan sebanyak 5µl. Elektroforesis dijalankan pada 100 volt selama 40 menit. Setelah selesai gel direndam 20 menit pada buffer berisi ethidium bromide dan dilihat dibawah sinar UV (Gel Doc).

PCR Gene MTHFR

Metode ini dilakukan untuk amplifikasi gen MTHFR. Kit PCR menggunakan Kapa 2 G Fast. Suhu denaturasi, ekstensi, final ekstensi, hot start mengikuti suhu dari Kit Kapa 2 G Fast. Suhu *annealing* dihitung manual dengan rumus $Tm=2AT+4GC$ dibuat gradien suhu. Mix PCR 20 µl dibuat dengan komponen dH₂O, Kapa 2x taq ready mix, *Primer MTHFR F*, *Primer MTHFR R* dan 1µl sampel DNA. Sekuens dari primer forward PCR MTHFR adalah 5' AGT CCC TGT GGT CTC TTC ATC 3' dan sekuens dari *primer reverse* nya adalah 5' GGA GAT CTG GGA AGA ACT CAG 3'. PCR dijalankan menggunakan program mesin Bio-rad dengan siklus PCR sebanyak 35 kali. Produk PCR dilakukan elektroforesis gel 2% 100 volt selama 40 menit. Produk PCR gene MTHFR akan terdeteksi pada 387 bp.

Digesti RFLP Gene MTHFR

Metode ini dilakukan untuk memotong gene MTHFR pada RS1801133 menggunakan enzim restriksi Hinf I. Mix digesti 25 µl dibuat dengan komponen dH₂O, 10 x NE *buffer cut smart*, Enzim Hinf I dan 10µl produk PCR. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37°C

selama 1 jam dan elektroforesis menggunakan gel agarose 3% 100 volt selama 42 menit.

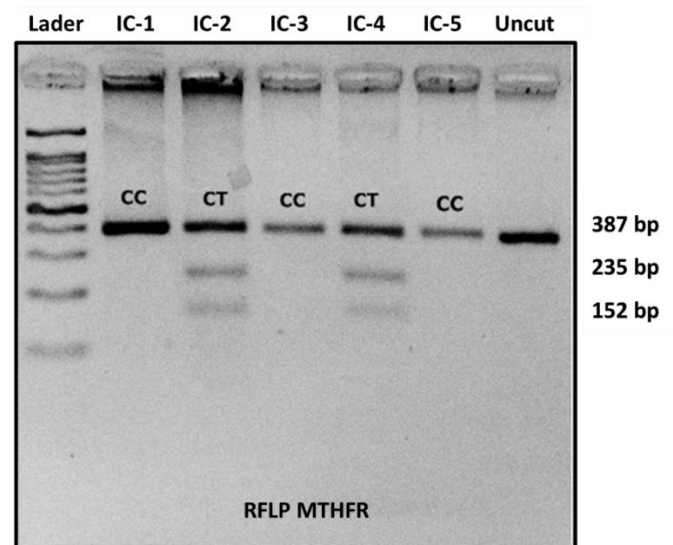
Pada individu *wild type* C677C/ Homozigot CC tidak akan terjadi pemotongan gene MTHFR oleh Hinf I sehingga terdeteksi pada 387 bp. Pada polimorfisme C677T/ Heterozigot CT akan terbentuk fragmen pada 387, 235 dan 152 bp. Sedangkan pada polimorfisme T677T/TT akan terbentuk fragmen pada 235 dan 152 bp.

HASIL

Isolasi DNA dengan metode *saturated salt* berhasil dilakukan dari 5 sampel darah EDTA. Pengukuran integritas seluruh sampel DNA dengan elektroforesis menunjukkan gambaran yang baik. Elektroforesis produk PCR gene MTHFR pada seluruh sampel DNA terdeteksi pada berat molekul 387 bp. Elektroforesis produk digesti RFLP gene MTHFR menggunakan Hinf I terlihat pada gambar 1. Pada 3 sampel tidak terjadi pemotongan gene MTHFR dikatakan sebagai genotipe C677C/ Homozigot CC *wild type*. Pada 2 sampel yaitu terjadi pemotongan gene MTHFR pada 387, 235 dan 152 bp disebut sebagai polimorfisme C677T/ Heterozigot CT. Dengan demikian terdapat 2 dari 5 sampel individu yang mengalami polimorfisme MTHFR C677T. Sedangkan poliformisme T677T/ Homozigot TT tidak dijumpai pada penelitian ini.

Terdapat 5 sampel DNA yang diteliti dan 1 uncut sebagai kontrol. Pada 3 sampel yaitu IC-1, IC-2 dan IC-5 tidak terdapat pemotongan gene MTHFR disebut genotipe homozigot CC *wild type*. Pada sampel IC-2 dan IC-4 terdapat pemotongan gene MTHFR pada 198, 175 dan 23

bp disebut polimorfisme heterozigot CT seperti terlihat pada gambar 1.



Gambar 1. Elektroforesis produk digesti RFLP gene MTHFR menggunakan Hinf I

DISKUSI

Isolasi DNA pertama kali dilakukan oleh Friedrich Miescher pada tahun 1869. Isolasi DNA adalah proses memisahkan DNA dari komponen sel pada jaringan. Untuk mengisolasi DNA yang terdapat didalam sel, perlu dilakukan penghancuran matriks ekstraseluler dan lisis dari membran sel agar DNA dapat dikeluarkan. Penghancuran protein dapat dilakukan dengan pemberian enzim proteinase dan penghancuran lemak pada membran sel dapat dilakukan dengan pemberian deterjen misalnya *sodium dodecyl sulphate* (SDS). DNA yang sudah tidak terikat pada protein dipisahkan dari komponen jaringan lain dengan cara sentrifugasi dan dipisahkan dari larutan dengan cara presipitasi. Metode ini disebut *saturated salt*.^{5,6} Kualitas DNA yang telah diisolasi diamati menggunakan spektrofotometer dan elektroforesis.

Deteksi DNA dapat dilakukan menggunakan elektroforesis gel. Polinukleotida berjalan pada pori-pori yang dibentuk oleh gel agarose dengan dorongan aliran listrik. Gel membentuk matriks dengan kerapatan yang ditentukan oleh konsentrasi agarose. DNA dari 200 bp sampai 50 kbp dapat dipisahkan dengan aliran listrik pada gel agarose berbagai konsentrasi. Kecepatan migrasi ini ditentukan oleh ukuran DNA, konsentrasi agarose dan besaran tegangan yang digunakan. Elektroforesis pada gel agarose biasanya dilakukan dalam konfigurasi horizontal. DNA yang bermuatan negatif akan bergerak dari kutub negatif menuju kutub positif.^{5,6}

Polymerase Chain Reaction (PCR) adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA didasarkan pada amplifikasi enzimatik fragmen DNA dengan menggunakan dua oligonukleotida primer yang komplementer dengan ujung 5' dari kedua untai sekuensi target. Oligonukleotida ini digunakan sebagai primer PCR untuk memungkinkan DNA template dicopy oleh DNA polymerase. PCR melibatkan tiga tahap siklus temperatur yang berurutan yaitu denaturasi template (94 – 95°C), *annealing* (penempelan) pasangan primer pada untai ganda DNA target (50 – 60°C) dan pemanjangan (72°C).^{5,6}

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) adalah metode analisis DNA menggunakan enzim restriksi. Urutan nukleotida akan dipotong oleh enzim restriksi pada posisi tertentu pada lokasi yang tidak saling berhubungan dan akan dihasilkan fragmen yang panjangnya berbeda-beda. Enzim restriksi yang digunakan untuk digesti gene MTHFR adalah Hinf I. Hinf I adalah enzim restriksi yang berasal

dari *Haemophilus influenzae* dan akan memotong urutan nukleotida pada posisi berikut⁷:



Single nucleotide polimorfisme (SNPs) yang terjadi pada gene MTHFR berkaitan dengan resiko terjadinya berbagai penyakit. Pada individu C677T terjadi perubahan Alanin menjadi Valin di exon 4 gene MTHFR. Genotipe tersebut meningkatkan resiko penyakit jantung bawaan, terjadi penurunan aktifitas enzim, peningkatan homosistein puasa dan asam folat plasma yang rendah.^{4,7}

Polimorfisme MTHFR juga meningkatkan resiko terjadinya akut limfoblastik leukemia pada anak-anak.^{3,8} Varian MTHFR C677T memiliki kaitan yang erat dengan gangguan psikiatrik seperti depresi, schizophrenia dan gangguan bipolar serta meningkatkan kemungkinan penggunaan folate sebagai pengobatan dan pencegahan.^{9,10} Selain itu MTHFR C677T juga meningkatkan resiko terjadinya gangguan neurologi seperti penyakit al-zheimer, dementia dan autisme.¹¹⁻¹³

KESIMPULAN

Penelitian ini berhasil mendeteksi adanya polimorfisme MTHFR C677T melalui tahapan isolasi DNA dari darah EDTA, PCR, RFLP Hinf I dan elektroforesis. Terdapat 2 sampel dengan genotipe *wild type* C677C dan 3 sampel dengan genotipe poliformisme C677T. MTHFR memiliki peranan yang penting dalam metabolisme homosistein dan polimorfisme yang terjadi pada gene yang mengkode MTHFR dapat meningkatkan resiko terjadinya penyakit

kardiovaskular, neurologis, psikiatrik serta keganasan.

DAFTAR REFERENSI

1. Li X, Liao Q, Zhang S, Chen M. Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and A1298C polymorphisms with the susceptibility of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL) in Chinese population. *Eur J Med Res*. 2014;19:1–5.
2. Dean L. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. In: *Medical Genetics Summaries. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD)*. ; 2017. <https://europepmc.org/article/nbk/nbk66131>
3. Moll S, Varga EA. Homocysteine and MTHFR mutations. *Circulation*. 2015;132(1):e6–e9.
4. Liew S-C, Gupta E Das. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism: epidemiology, metabolism and the associated diseases. *Eur J Med Genet*. 2015;58(1):1–10.
5. Li Y, Chen S, Liu N, et al. A systematic investigation of key factors of nucleic acid precipitation toward optimized DNA/RNA isolation. *Biotechniques*. 2020;68(4):191–199.
6. Suguna S, Nandal DH, Kamble S, Bharatha A, Kunkulol R. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. *Int J pharm pharm sci*. 2014;6(6):198–199.
7. Shaik MM, Tan HL, Abubakar MB, Gan SH. Development of a multiplex PCR-RFLP method for simultaneous detection of the MTHFR 677C> T and TNF- α -308G> A variants in a Malay population. *Asia Pacific J Mol Biol Biotechnol*. 2018;26(3):11–19.
8. Umerez M, Gutierrez-Camino A, Munoz-Maldonado C, Martin-Guerrero I, Garcia-Orad A. MTHFR polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia: influence on methotrexate therapy. *Pharmgenomics Pers Med*. Published online 2017:69–78.
9. Hu C-Y, Qian Z-Z, Gong F-F, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism susceptibility to schizophrenia and bipolar disorder: an updated meta-analysis. *J Neural Transm*. 2015;122:307–320.
10. Zhang Y-X, Yang L-P, Gai C, et al. Association between variants of MTHFR genes and psychiatric disorders: A meta-analysis. *Front Psychiatry*. 2022;13:976428.
11. Cajavilca CE, Gadhia RR, Román GC. MTHFR gene mutations correlate with white matter disease burden and predict cerebrovascular disease and dementia. *Brain Sci*. 2019;9(9):211.
12. Meguid N, Khalil R, Gebril O, El-Fishawy P. Evaluation of MTHFR genetic polymorphism as a risk factor in Egyptian autistic children and mothers. *J Psychiatry*. 2015;18(1).
13. Miyan J, Buttercase C, Beswick E, Miyan S, Moshkdanian G, Naz N. Folate Related Pathway Gene Analysis Reveals a Novel Metabolic Variant Associated with Alzheimer's Disease with a Change in Metabolic Profile. *Metabolites*. 2022;12(6):475.