

## PEMISAHAN PROTEIN DALAM DARAH PENDERITA DIABETES MELITUS TIPE 2 UNTUK PENGEMBANGAN BIOMARKER

Dewi Riskha Nurmalasari<sup>1</sup>, Rosida<sup>2</sup>  
Akademi Farmasi Jember  
\*Email: dewi\_riskha@yahoo.co.id

### ABSTRACT

*Diabetes mellitus (DM) is a disorder of the chronic metabolic system due to insulin function insufficiency. DM is classified into two main categories, type 1 and type 2. The purpose of this study was to separate proteins using the SDS-PAGE method to determine the potential protein profile as an indicator biomarker for early detection in type 2 DM patients. This research is a true experimental research. The samples of this study were the blood of 20 patients with type 2 DM and 5 patients in Sukorejo Bangsalsari Village. Sampling technique in this research are: blood sampling of DM patients and healthy people as negative controls, preparation of blood serum, then protein analysis using the SDS-PAGE method. The data from this research were analyzed descriptively. The results of protein separation using SDS-PAGE showed the presence of protein bands detected in the molecular mass of 28 kDa, 45 kDa, and 235 kDa. Based on these results, it can be concluded that the protein bands detected at a certain size are still not specific, so they cannot refer to potential protein targets.*

**Keywords:** *Diabetes mellitus, Biomarker, SDS-PAGE*

### PENDAHULUAN

Diabetes Melitus (DM) merupakan suatu gangguan pada sistem metabolisme kronis akibat dari insufisiensi fungsi insulin, yang gejalanya ditandai dengan terjadinya kenaikan kadar gula darah dan juga disertai dengan gangguan pada sistem metabolisme karbohidrat, lipid, serta protein (Chandra, 2012). Pada tahun 1980, WHO (World Health Organisation) mengklasifikasikan DM menjadi dua kategori utama yaitu DM tipe 1 dan tipe 2. DM tipe 1 (dikenal dengan *insulin dependent*) ditandai dengan kurangnya produksi insulin, DM tipe 2 (dikenal dengan *non insulin dependent*) adalah penyakit DM yang diakibatkan oleh penggunaan insulin yang kurang efektif oleh tubuh atau bahkan tubuh tidak bisa merespon insulin dengan normal. Keadaan yang seperti ini lebih sering disebut dengan resistensi insulin. Penderita DM tipe 2 lebih banyak jumlahnya dibandingkan dengan DM tipe 1 (WHO, 2006).

Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) yang dilaksanakan pada tahun 2018 melakukan pengumpulan data penderita diabetes melitus pada penduduk berumur >15 tahun. Hasil tersebut menunjukkan bahwa prevalensi DM di Indonesia berdasarkan diagnosis dokter pada umur >15 tahun sebesar 2%. Angka tersebut menunjukkan peningkatan bila dibandingkan prevalensi DM pada penduduk >15 tahun pada hasil Riskesdes 2013 sebesar 1,5%. Namun prevalensi DM menurut hasil pemeriksaan gula darah meningkat dari 6,9% pada 2013 menjadi 8,5% pada tahun 2018. Angka ini menunjukkan bahwa baru sekitar 25% penderita diabetes yang mengetahui bahwa dirinya menderita diabetes (Kemenkes RI, 2020).

Salah satu faktor penyebab tingginya prevalensi DM tipe 2 yaitu interaksi antara faktor-faktor kerentanan genetik dan paparan terhadap lingkungan. Faktor lingkungan yang diperkirakan dapat meningkatkan faktor resiko DM tipe 2 adalah perubahan gaya hidup seseorang. DM tipe 2 dapat dicegah, ditunda atau dihilangkan dengan mengendalikan faktor resiko. Faktor resiko DM tipe 2 yang dapat diubah seperti kebiasaan merokok, aktifitas fisik dan pola makan. Faktor resiko DM tipe 2 yang tidak dapat diubah seperti jenis kelamin, umur, dan faktor genetik (Depkes RI, 2008).

Biomarker adalah semua zat, struktur, atau proses yang bisa diukur dalam tubuh atau produk-produk serta pengaruhnya atau memprediksikan kejadian dampak atau penyakit. Biomarker bisa dikelompokkan sebagai penanda keterpaparan, penanda efek, dan penanda kerentanan. Biomarker digunakan sebagai indikator untuk tahapan patologi pada penyakit dan karakterisasi yang dapat mengestimasi dan mengevaluasi pada keadaan normal, patologikal, dan respon farmakologi setelah terapi. Biomarker juga dapat digunakan untuk identifikasi, karakterisasi, dan ekspresi protein pada sistem biologi. Ada perbedaan tipe pada penanda biologi seperti protein, genetik dan penanda metabolit (Nowak, C. *et al.*, 2016). Ada beberapa variasi pada pola ekspresi protein pada kondisi keadaan normal sehat sebagai kontrol dibandingkan dengan orang yang sakit. Deteksi perbedaan pada level protein sangat penting pada penelitian yang mempelajari proteomik. Biomarker protein sangat diperlukan untuk diagnosis dan prognosis pada keadaan akut dan kronik pada pasien penderita diabetes, berbagai tipe kanker, dan sindrom lainnya (Graves dan Haystead, 2002).

Analisis proteomik pada plasma dan serum digunakan untuk identifikasi dan karakterisasi protein. Salah satu metode yang digunakan yaitu Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Elektroforesis (SDS-PAGE). SDS-PAGE merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui bobot molekul dari suatu protein. Prinsip kerja dari SDS-PAGE adalah ketika protein dipisahkan oleh elektroforesis melalui matriks gel dan arus listrik diberikan, protein dengan molekul yang lebih kecil bermigrasi lebih cepat sedangkan molekul yang lebih besar akan tertahan akibat pergerakan yang lebih lambat. (Pujiastuti D., 2019).

Tujuan penelitian ini adalah untuk memisahkan protein-protein yang ada dalam darah penderita DM tipe 2 di Desa Sukorejo Bangsalsari Kabupaten Jember, dengan menggunakan metode pemisahan protein yaitu SDS-PAGE. Perbedaan profil protein darah pada penderita diabetes melitus tipe 2 dibandingkan dengan profil protein dalam darah orang sehat sebagai kontrol.

## **METODE PENELITIAN**

### **Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi, jarum steril, mikrosentrifus, seperangkat alat elektroforesis SDS-PAGE (Mini – PROTEAN Tetra Cell-BIO-RAD), eppendorf, mikropipet, mikrotip, waterbath, dan *magnetic stirrer*. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi Phenilmetilsulfonilfluoride (PMSF) dalam *Phosphate Buffered Saline* (PBS), buffer sampel 5x (0,6 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8); 5 ml 50% Glycerol;

2 ml 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS); 0,5 ml 2 $\beta$ -mercaptoethanol; 1 ml 1 % Bromo Phenol Blue; 0,9 ml H<sub>2</sub>O), *Staining solution* (1 g Coomassie Blue R-250; 450 ml Methanol; 450 ml H<sub>2</sub>O; 100 ml *Glacial Acetic Acid*); *Destaining solution* (100 ml Methanol; 100 ml *Glacial Acetic Acid*; 800 ml H<sub>2</sub>O), Amonium Persulfate (APS) 10%, Tetramethylethylenediamine (TEMED), *separating gel* 12,5% (Acrylamide/Bis Acrylamide 30%; 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 10% SDS; H<sub>2</sub>O steril; 10% APS; TEMED) dan *stacking gel* 4% ((Acrylamide/Bis Acrylamide 30%; 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; H<sub>2</sub>O steril; 10% APS; TEMED), akril/bis-akrilamid 30% (29,2 g akrilamid; 0,8 g bis akrilamid), *buffer elektroda* 1x (3 g Trisma base; 14,4 g Glycine; 1 g SDS). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah darah penderita DM tipe 2 di Desa Sukorejo Kec. Bangsalsari Kab. Jember sebanyak 20 orang, sedangkan sebagai kontrol negatif yaitu orang sehat (non penderita DM) sebanyak 5 orang.

### **Pengambilan Sampel Darah**

Pengambilan sampel darah dilakukan oleh petugas kesehatan yang ada di Puskesmas . Prosedur pengambilan sampel darah yaitu dengan menggunakan spuit disposable steril 3 ml untuk mengambil darah dari pembuluh vena brachialis di lengan. Darah yang telah diambil kemudian dimasukkan kedalam vacuntainer tanpa anti koagulan EDTA dan disimpan dalam *cooler box* berisi ice gel.

### **Preparasi Serum Darah**

Sampel darah dari vacuntainer dipindahkan pada microtube steril sebanyak 1,5 ml, kemudian diinkubasi pada suhu ruang  $\pm$ 15-30 menit sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan bening yang mengandung serum darah akan tampak di bagian permukaan dan lapisan berwarna merah terdapat di dasar microtube. Lapisan bening yang terbentuk dipindahkan ke dalam microtube steril yang baru lalu disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 27°C. Supernatan yang diperoleh setelah sentrifus dipindahkan ke microtube baru dan disimpan pada suhu -20°C sebagai stok serum darah pustaka acuannya.

### **Analisa Protein Menggunakan Metode SDS-PAGE**

Metode SDS-PAGE dilaksanakan berdasarkan prosedur dari Laemmli (1970). Sampel protein berupa serum darah dalam 10  $\mu$ L larutan PBS-PMSF ditambahkan buffer sampel (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; gliserol; SDS 10%; 2 $\beta$ -mercaptoethanol; bromophenol blue 1%; dH<sub>2</sub>O) dengan perbandingan 1:1 (v/v). Sampel selanjutnya dididihkan selama 3 menit dan dielektroforesis dengan analisis SDS-PAGE menggunakan separating gel 12,5% (Acrylamide/Bis Acrylamide 30%; 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 10% SDS; H<sub>2</sub>O steril; 10% APS; TEMED) dan stacking gel 4% (Acrylamide/Bis Acrylamide 30%; 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; H<sub>2</sub>O steril; 10% APS; TEMED). Sebanyak 10  $\mu$ L sampel protein yang telah dididihkan dimasukkan dalam sumuran gel beserta marker protein pada sumuran yang terpisah. Gel akrilamid kemudian dielektroforesis pada temperatur ruang dalam buffer

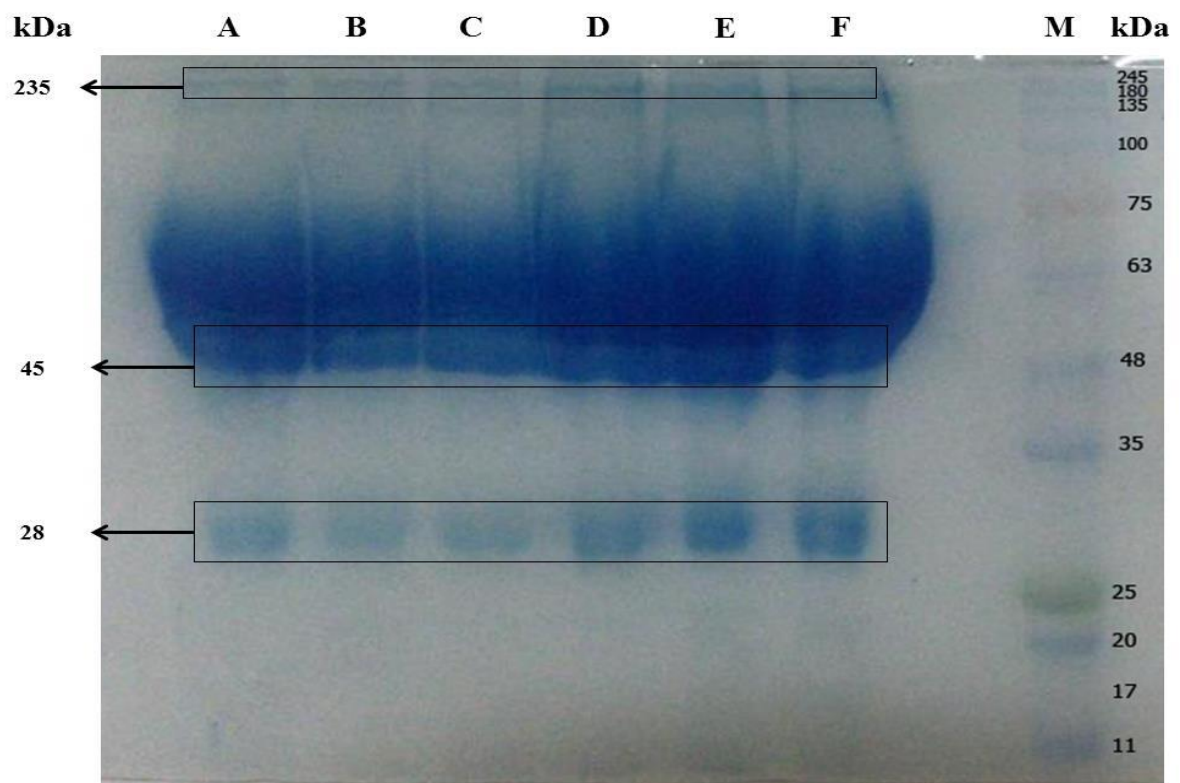
elektroda 1x (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1% SDS) selama 2 jam pada tegangan konstan 120 V. Gel hasil elektroforesis kemudian diwarnai menggunakan larutan staining selama 1 jam dan dilanjutkan proses destaining sebanyak 3 kali selama masing-masing 30 menit hingga tampak pita protein yang jelas dengan latar belakang gel yang jernih (Wilson dan Walker, 2000).

### Analisa Hasil SDS-PAGE

Pengukuran bobot molekul dilakukan berdasarkan metode dari Neville (1971) yaitu dengan memetakan jarak migrasi protein dalam kurva persamaan regresi linier. Regresi ini merupakan alat ukur yang digunakan untuk mengetahui korelasi antar variabel, yaitu antara jarak migrasi protein dalam gel SDS-PAGE dengan bobot molekul protein tersebut.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pengambilan sampel darah penderita DM tipe 2 pada Desa Sukorejo Kecamatan Bangsalsari terlebih dahulu dilakukan isolasi protein yang terdapat serum darah. Hasil isolasi protein selanjutnya dielektroforesis dalam 12,5% gel akrilamid dan *distaining* menggunakan *commassie brilliant blue* untuk visualisasi. Untuk mengidentifikasi dan mengetahui kemurnian dari protein yang telah diisolasi tersebut digunakan metode SDS-PAGE. Hasil visualisasi menggunakan larutan *staining* ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforegram hasil SDS – PAGE protein serum darah. A, B, C, D : serum darah penderita diabetes ; E dan F: Kontrol negatif (orang sehat)

Pemisahan protein pada penelitian ini menjadi awal penelitian kami menggunakan pendekatan proteomik, untuk mengkarakterisasi protein-protein potensial sebagai biomarker yang terdapat pada serum darah penderita DM tipe 2. Profil biomarker protein sangat diperlukan untuk diagnosis dan prognosis pada keadaan akut dan kronik pada pasien penderita diabetes, berbagai tipe kanker, dan sindrom lainnya (Graves dan Haystead, 2002).

Penelitian Samreen Riaz (2015) menunjukkan profil proteomik biomarker protein pada urine penderita DM tipe 2 yang mendapatkan vitamin B1 di Pakistan, hasil penelitian menunjukkan efek vitamin B1 dosis tinggi tidak memberikan pengaruh terhadap perubahan biomarker. Penelitian Saluk dan kawan-kawan (2015) menunjukkan ada perbedaan signifikan biomarker metabolik antara penderita ginjal komplikasi DM dengan penderita ginjal tanpa komplikasi, tetapi tidak ada perbedaan dengan orang normal. Identifikasi biomarker DM tipe 2 di IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute) menunjukkan 90% DM tipe 2 beresiko gangguan kardiovaskular (Mishra, dkk., 2017).

Hasil running SDS-PAGE menunjukkan profil protein yang didasarkan dari ukurannya yaitu bobot molekulnya. Hasil analisis SDS-PAGE protein yang terdapat pada serum darah penderita DM tipe 2 dan serum orang sehat sebagai kontrol negatif, diperoleh tiga pita protein dengan bobot molekul 28 kDa, 45 kDa dan 235 kDa.

## **KESIMPULAN**

Berdasarkan dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa hasil elektroforesis serum darah penderita DM tipe 2 di Desa Sukorejo, Kecamatan Bangsalsari setelah dielektroforesis dalam 12,5% gel akrilamid dan *distaining* menggunakan *commassie brilliant blue R-250* masih kurang bagus. Hasil analisis SDS-PAGE protein yang terdapat pada serum darah penderita DM tipe 2 dan serum orang sehat sebagai kontrol negatif, diperoleh tiga pita protein dengan bobot molekul 28 kDa, 45 kDa dan 235 kDa.

## **SARAN**

Perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut terkait dengan sub-unit protein penyusun protein target potensial sebagai biomarker Diabetes Mellitus tipe 2. Metode yang digunakan untuk karakterisasi protein sebagai target potensial kandidat biomarker penyakit Diabetes mellitus tipe 2 yaitu 2D-Elektroforesis.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Ucapan terima kasih kami tujukan kepada Akademi Farmasi Jember dan berbagai pihak yang terlibat dan banyak membantu hingga terlaksananya penelitian ini.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Advansta corporation, protein analysis electrophoresis, bolting and immunodetection. diakses pada tanggal 15 Desember 2018. [http://advansta.com/PA\\_guide.pdf](http://advansta.com/PA_guide.pdf)
- Chandra, ZF. 2012. Faktor-faktor Risiko Pasien Diabetes Mellitus. *Jurnal*. UGM. ac.id.
- Chee, S. Chin, Chang M.Khai, Loke F.M, Loo, Angela dan Subrayan. 2016. Association of potential salivary biomarkers with diabetic retinopathy and its severity in type - 2 diabetes mellitus: a proteomic analysis by mass spectrometry. *PeerJ*, DOI 10.7717.
- Graves, P.R dan Haystead, T.A. 2002. Molecular Biologist's guide to Proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66(1): 39-63.
- International Diabetes Federation. 2008. World Diabetes Day 14 November. [www.Worlddiabetesday.Org6](http://www.Worlddiabetesday.Org6).
- Kahn, C.R. 1995. *Disorder of Fuel Metabolism, In Becker, K.L. (Ed.), Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism, 2nd Ed., 1148- 54.*
- Laemmli. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the assembly of the head of the Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lawrence, J.C., 1994, *Insulin and Oral Hypoglycemic Agents, In Brody, T.M., Larner, J., Minneman, K.P., and Neu, H.C. (Ed.). Human Pharmacology, 2nd Ed., 523-539.* Mosby. London.
- Mishra, A., Gupta, A., Maheswari, U., & Siddique, L. (2017). Probable Biomarker Identification Using Recursive Feature Extraction And Network Analysis. In Data Mining Workshops (ICDMW), 2017 *IEEE International Conference On* (Pp. 470-477). IEEE.
- Nowak, C., Sundstrom, J., Gustafsson, S., Giedraitis, V., Lind, L., Ingelsson, E. and Fall, T. 2016. Protein Biomarkers for Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Risk in Two Large Community Cohorts. *Diabetes*. 65:276-284
- Pemkab Jember. 2015. RPJMD Kabupaten Jember tahun 2010 – 2015. [www.slideshare.net](http://www.slideshare.net)
- . Review Article Riaz, Samreen. 2015: Study of Protein Biomarkers of Diabetes Mellitus Type 2 and Therapy with Vitamin B1. *Journal of Diabetes Research*.
- Rowland, N.E. dan Bellush, L.L. 1989. Diabetes Mellitus: Stress. Neurochemistry and Behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 13 (4): 199-206.
- Unger, R.H. dan Foster, D.W. 1992. *Diabetes Mellitus, In Wilson, J.D. dan Foster, D.W. Endocrinology. 1255-1317, W.B Sunders Company, A Division of Harcourt Brace and Company. London.*
- Wilson K., dan Walker J. 2000. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry Fifth Edition*. United Kingdom: Cambridge University Press.
- World Health Organisation. 2006. *Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediete Hyperglycemia: report of WHO/IDF consultation*. Geneva. Swiss: 1-35.