

**PATIENT CENTER CARE DALAM PENANGANAN DIABETES MELITUS
OBESE GERIATRI SECARA KOMPREHENSIF**

**The Minor Allele Frequency of Metformin
Transporter Gene: *SLC22A1* rs628031 A>G among
the Indonesian Healthy Subjects**

**Frekuensi Alel Minor Gen Transporter Metformin:
SLC22A1 rs628031A>G pada Subyek Sehat Indonesia**



Endang Susilowati¹

¹Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang

email korespondensi: etha_susil@yahoo.co.id

Abstract: The OCT1 transporter coding gene, *SLC22A1* shows a high polymorphism in the Asian population. The gene polymorphism is considered to contribute to the inter-individual variability of the pharmacokinetics of metformin with the consequences of changing the therapeutic response. In Indonesia, the *SLC22A1* gene polymorphism identification has been carried out in cancer and type 2 diabetes mellitus patients, but in healthy subjects no data is available yet. This study aims to determine the minor allele frequency of the *SLC22A1* rs628031 (A> G) among the Indonesian healthy subjects. The study used an observational descriptive approach involving Indonesian Javanese healthy subjects. The SNP identification used the PCR-RFLP method. Finding shows that the *SLC22A1*rs628031 G allele frequency is 62,5% In conclusion, in Indonesia, the *SLC22A1* rs628031 minor allele frequency in healthy subject is almost the same as other Asian populations.

Keywords: Polimorfism, metformin, *SLC22A1*, rs628031, Indonesian Javanese healthy subjects

Abstrak: Gen pengkode transporter OCT1, *SLC22A1*, menunjukkan polimorfisme yang tinggi di populasi Bangsa Asia. Polimorfisme gen tersebut diduga berkontribusi pada variabilitas inter-individual farmakokinetik metformin dengan konsekuensi pada perubahan respon terapi. Di Indonesia, identifikasi polimorfisme gen *SLC22A1* sudah pernah dilakukan pada pasien kanker dan diabetes melitus tipe 2, namun pada subyek sehat hingga saat ini belum tersedia data. Penelitian ini bertujuan menentukan distribusi frekuensi alel *SLC22A1* rs628031 (A>G) pada subyek sehat Indonesia. Penelitian menggunakan pendekatan deskriptif observasional yang melibatkan subyek sehat Indonesia suku Jawa. Identifikasi SNP menggunakan metode PCR-RFLP. Penelitian menunjukkan bahwa frekuensi alel G gen *SLC22A1* rs628031 ditemukan sebesar 62,5%. Kesimpulan, frekuensi alel minor *SLC22A1* rs628031 pada subyek sehat Indonesia suku Jawa termasuk tinggi (65,2%), hampir sama dengan frekuensi alel minor pada populasi Bangsa Asia lainnya.

Kata kunci: polimorfisme, metformin, *SLC22A1*, rs628031, subyek sehat Indonesia

1. Pendahuluan

Prevalensi diabetes mellitus tipe 2 (DMT2) di Indonesia pada tahun 2015 berada pada urutan ke-7 di dunia, dan diprediksi akan terus meningkat dari 10 juta kasus pada tahun 2015 mencapai 14,1 juta pada tahun 2035 (IDF, 2015). DMT2 mendorong risiko

penyakit kardiovaskular dan kematian dini sehingga menjadi tantangan bagi klinisi untuk melakukan optimalisasi pencegahan dan penatalaksanaannya. Di Indonesia, metformin direkomendasikan sebagai lini pertama pengobatan DMT2 (Perkeni, 2015). Sebagai agen hipoglikemik, metformin bekerja melalui hambatan glukoneogenesis, peningkatan ambilan glukosa, dan perbaikan sensitivitas insulin (Bailey, 1992; Stumvoll *et al.*, 1995). Metformin efektif sebagai terapi tunggal (menurunkan HbA1C 1,0 - 2,0%) maupun terapi kombinasi, memperbaiki profil lipid, menurunkan komplikasi mikrovaskuler dan makrovaskuler, jarang menimbulkan hipoglikemi, serta memiliki risiko efek samping relatif kecil (Rena *et al.*, 2012). Namun demikian, metformin menunjukkan variabilitas respon yang signifikan antar individu. Hasil uji BA/BE oleh BPOM menunjukkan variasi konsentrasi maksimal (C_{max}) metformin yang cukup besar, antara 1099,89-3412,65 ng/ml (BPOM RI, 2015). Pada pasien DMT2, variasi kadar tunak C_{ssmin} lebih dari 100 kali dan C_{ssmax} 15 kali (Ningrum, 2017). Sementara di negara lain dilaporkan lebih dari 30% pasien yang mendapat monoterapi metformin tidak mencapai kontrol glukosa darah yang baik (Cook, 2007). Variabilitas respon obat dapat disebabkan oleh polimorfisme genetik dengan kontribusi hingga 30% (Leabman & Giacomini, 2003).

Metformin termasuk senyawa kation organik dan hidrofilik sehingga transportasi antar sel bergantung pada protein transporter. OCT1 adalah transporter penting yang terlibat dalam farmakokinetik metformin. OCT1 banyak terekspresi di membran sinusoidal hepatosit, berperan dalam ambilan metformin ke hepatosit, yang menjadi tempat berlangsungnya aksi metformin dalam menghambat glukoneogenesis (Graham *et al.*, 2011). Dengan demikian, mutasi titik atau *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) gen pengkode OCT1 dapat berpengaruh disposisi serta respon terapi metformin. Gen pengkode OCT1 yaitu *SLC22A1*, terletak di kromosom 6q26, terdiri dari 11 ekson dan 10 intron yang terbentang sepanjang 37 kb (Verhaagh *et al.*, 1999). Di Asia, gen *SLC22A1* menunjukkan polimorfisme yang tinggi, seperti di Korea 74% (Kang *et al.*, 2007), Jepang 81% (Itoda *et al.*, 2004), dan India 80% (Sur, 2014). Di Jogjakarta, frekuensi alel minor *SLC22A1* rs628031 G>A pada pasien DMT2 teridentifikasi mencapai 60,47% (Ningrum dkk, 2017). Sementara data distribusi polimorfisme gen *SLC22A1* rs628031 pada populasi sehat di Indonesia hingga saat ini belum tersedia. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan distribusi frekuensi alel *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) *SLC22A1* rs628031 A>G pada subyek sehat Indonesia. Hasil analisis genotip OCT1 berguna sebagai informasi awal untuk studi selanjutnya tentang studi diagnosa penyakit dan studi korelasi antara mutasi gen dengan keberhasilan terapi obat.

2. Bahan dan Metode

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional dengan sampel subyek sehat Indonesia suku Jawa, sebanyak 96 orang. Metode pengambilan sampel dengan *consecutive nonprobability sampling*, yaitu mengambil subyek yang dibutuhkan sampai jumlah subyek minimal terpenuhi.

2.1 Subyek penelitian

Karakteristik distribusi gen *SLC22A1* rs628031 diperoleh dari partisipan dengan kriteria inklusi, orang sehat Indonesia suku Jawa, usia 18-50 tahun, laki-laki dan perempuan, BMI antara 18-25 kg/m², bersedia dilibatkan sebagai subyek penelitian yang dibuktikan dengan penandatanganan *informed consent*. Kriteria eksklusi, yaitu wanita hamil dan perokok berat. Persetujuan etika penelitian diperoleh dari Komite Etika dan Hukum Rumah Sakit Universitas Airlangga No. 120/KEH/2017.

2.2 Uji Laboratorium Klinik

Informasi kesehatan subyek diperoleh dari pemeriksaan darah lengkap, urine lengkap, SGOT/SGPT dan kreatinin serum.

2.3 Analisis Genotip

Analisis gen *SLC22A1* rs628031 melalui tahapan isolasi DNA, pengukuran kemurnian DNA, desain primer gen *SLC22A1* rs628031, amplifikasi gen dengan teknik PCR, konfirmasi ampikon produk PCR dengan gel agarosa 1,5% dilanjutkan dengan RFLP menggunakan *MscI* sebagai enzim restriksi, diinkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Konfirmasi ampikon yang sudah terdigesti dengan elektroforesis pada media agarosa 2% dan diidentifikasi dengan ethidium bromide. Digesti ampikon menghasilkan fragmen 397 bp untuk varian mutan homozigot (Val/Val), dan fragmen 210 dan 187 bp untuk genotip wildtype (Met/Met). Ampikon produk digesti dengan ukuran 397 bp, 210 bp dan 187 bp menunjukkan mutan heterozigot (Met/Val) (Umamaheswaran *et al.*, 2011).

2.3.1 Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan prosedur dari Kit Isolasi DNA (Wizard Genomic DNA Purification Kit from Promega) : sebanyak 0,3 ml darah dimasukkan ke tube 2 ml yang berisi 1,5 ml Buffer Cell Lysis Solution, kemudian divortex. Diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, disentrifuse 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang pelet ditambahkan 1 ml Nuclei Lysis dan di vortex. Tambahkan 0,3 ml protein precipitation solution, di vortex selama 20 detik, disentrifuse 2000 rpm selama 10 menit. Supernatan dimasukkan ke tube 1,5 ml baru yang berisi 1 ml isopropanol kemudian di vortex dan disentrifuse selama 1 menit. Pelet dilarutkan dengan 1 ml etanol 70% disentrifuse selama 1

menit. Supernatan di buang, pelet dikeringkan dengan vakum untuk memastikan etanol benar-benar hilang. Hasil pelet dilarutkan dalam 75 µl DNA *Rehydration Solution*, diinkubasi pada suhu 65 °C selama 1 jam, selanjutnya disimpan pada suhu -20° C.

2.3.2 Pengukuran Kemurnian DNA

Pengukuran kemurnian isolat DNA menggunakan UV spektrofotometer *Biorad* dengan prosedur: sampel DNA 5 µl ditambah 995 µl Tris-EDTA (TE) *buffer* dan divorteks. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 230 nm, 260 nm, dan 280 nm. kemurnian DNA pada perbandingan $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ memiliki kisaran nilai 1,8-2 (Fatchiyah, dkk. 2011).

A280

2.3.3 Perancangan primer gen SLC22A1

Primer dirancang menggunakan *software* Oligo Analyzer versi 1.0.2., Oligo Explorer 1.1.0. dan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) yang diakses secara *online* pada NCBI. Rancangan primer gen SLC22A1 rs628031: 5'-TTT CTT CAG TCT CTG ACT CAT GCC - 3' (forward) dan 5' - AAA AAA CTT TGT AGA CAA AGG TAG CAC C- 3' (reverse).

2.3.4 Amplifikasi Gen dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) Amplifikasi dilakukan dengan teknik PCR menggunakan mesin *thermocycler*. Komposisi PCR dengan volume total 20 µl/*tube* terdiri atas 6 µl ddH₂O, 10 µl PCR kit *GoTaq[®] Green Master Mix* (10 x *buffer taq polymerase, dNTP, MgCl₂, primer, Taq DNA polymerase, ddH₂O*), primer *forward* 1 µl, primer *reverse* 1 µl dan 2 µl DNA genomik sampel. Secara berurutan proses amplifikasi dikondisikan pada suhu denaturasi 95 °C 30 detik, annealing suhu 61 °C 60 detik, dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 30 detik dibuat 35 siklus.

2.3.5 Konfirmasi Hasil Amplifikasi Gen SLC22A1 rs628031

Hasil PCR dikonfirmasi menggunakan elektroforesis horizontal gel agarosa 1,5%. Sebanyak 2 µl sampel DNA dicampur dengan 1 µl *loading dye* kemudian dimasukkan ke dalam sumuran secara perlahan. Selanjutnya, dilakukan proses elektroforesis (*running*) dengan tegangan 65 Volt selama 1,5 jam. Amplikon dideteksi dengan menggunakan Gel Doc 1000 (*Biorad, USA*) untuk divisualisasi dengan sinar ultra violet pada panjang gelombang 300 nm dan didokumentasikan dengan kamera polaroid.

2.3.6 Analisis RFLP

Amplikon hasil PCR disiapkan sebagai bahan dasar pemotongan DNA dengan enzim restriksi. Untuk tiap 50 µl larutan digesti berisi : berurutan H₂O 30 µl, Digest

buffer 5 μ l, amplicon DNA produk PCR 1-5 μ l dan MscI 0,5-1 μ l. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam. Konfirmasi amplicon yang sudah terdigesti dengan elektroforesis pada media agarosa 2% dan diidentifikasi dengan ethidium bromide.

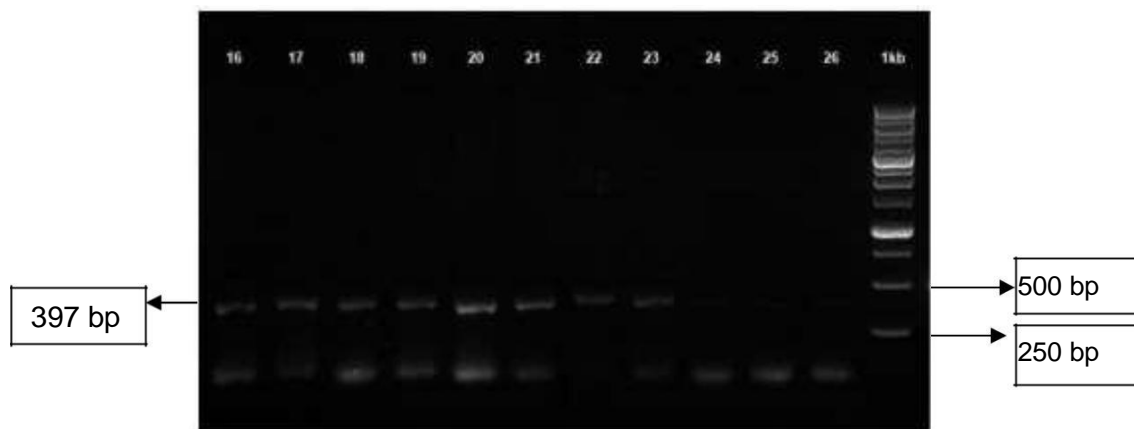
3. Hasil Dan Pembahasan

3.1 Karakteristik Subyek

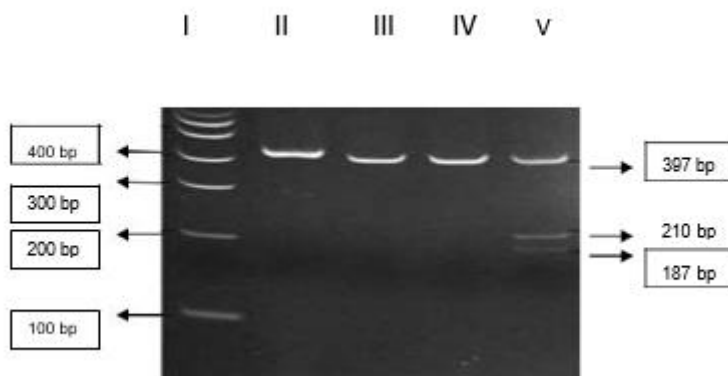
Penelitian ini melibatkan 96 partisipan sehat, usia rata-rata $22 \pm 2,4$ tahun (rata-rata \pm SD). Terdiri dari subyek laki-laki sebanyak 39 orang dengan usia rata-rata $23 \pm 4,7$ tahun dan 57 subyek perempuan dengan usia rata-rata $20 \pm 3,4$ tahun. BMI subyek rata-rata $21,1 \pm 5,0$ kg/m². Hasil pemeriksaan laboratorium menunjukkan kreatinin serum (SCr) subyek berada pada rentang 0,53 – 0,98 mg/dl dengan rata-rata 0,68 mg/dl. Nilai SGPT/SGOT semua subyek tidak melebihi 2 kali lebih tinggi dari nilai normal.

3.2 Hasil elektroforesis gen SLC22A1rs628031

Amplicon hasil PCR – RFLP dielektroforesis dengan gel agarosa 2% dan divisualisasi di bawah sinar UV. Hasil elektroforesis ditampilkan pada gambar berikut.



Gambar 1. Hasil elektroforesis SLC22A1 rs628031 (M408V, 1222A>G) pada gel agrosa 2%. Baris paling kanan adalah marker DNA, baris 16-23 adalah sampel dengan genotip mutan homozigot GG (397 bp).



Gambar 2. Hasil elektroforesis SLC22A1 rs628031 (M408V,1222A>G pada gel agarosa 2%. Baris I adalah marker DNA, baris II adalah kontrol, baris III dan IV adalah sampel dengan genotip mutan homozigot GG (397) dan baris V adalah sampel dengan genotip mutan heterozigot AG (397 bp, 210 bp, 187 bp).

3.3 Profil Genotip Subyek

Subyek diklasifikasikan berdasarkan jenis genotipnya, wildtype (AA), mutan heterozigot (AG) dan mutan homozigot (GG), disajikan dalam tabel berikut.

Tabel 1. Distribusi Genotip dan Frekuensi Alel Gen *SLC22A1* rs628031

| Gen SLC22A1 rs628031 | N=96 | (%) |
|------------------------|------|------|
| Genotipe | | |
| Wildtype (AA) | 4 | 4,2 |
| Mutan Heterozigot (AG) | 64 | 66,6 |
| Mutan Homozigot (GG) | 28 | 29,2 |
| Frekuensi Alel | | |
| A (AA) | | 37,5 |
| G (AG dan GG) | | 62,5 |

Tabel 1 menunjukkan bahwa diantara 96 subyek sehat Indonesia, genotip terbanyak adalah mutan heterozigot sebanyak 64 orang (66,6%), mutan homozigot sebanyak 28(29,2%), dan wildtype 4 orang (4,2%). Frekuensi alel A sebesar 37,5% dan alel minor G 62,5%. Penelitian sebelumnya pada 86 pasien DMT2 di Jogjakarta- Indonesia, ditemukan frekuensi alel minor sebesar 60,47% (Ningrum *et al.*, 201 Hal ini menunjukkan MAF rs628031 antara subyek sehat dan pasien DMT2 di Indonesia tidak berbeda. Sementara bila dibandingkan dengan bangsa Asia lainnya relatif lebih rendah. Studi pada Bangsa Tamilian India, MAF rs628031 (80,3%) (Umamaheswaran *et al.*, 2011), Bangsa Korea (74%) (Kang *et al.*,2007), dan Jepang (81%) (Itoda *et al.*, 2004). Secara umum diketahui frekuensi alel G rs628031 di Bangsa Asia diidentifikasi sebesar 76,2-81%, lebih tinggi dibanding Bangsa Afrika Amerika (73,5%) dan Bangsa Eropa ((57,4-60%). Berdasarkan penelitian meta analisis, telah ditemukan 34 polimorfisme gen OCT1 yang teridentifikasi dalam 10 kelompok etnis (Mato *et al.*, 2018). Met408Val (rs628031) merupakan SNP *non synonymous* yang paling banyak dieksplorasi dan seringkali dikaitkan dengan respon farmakokinetik dan farmakodinamik metformin,. Mengingat pada SNP rs628031 (M408V) terjadi perubahan asam amino Methionin menjadi Valine maka sangat mungkin dapat menyebabkan penurunan fungsi OCT1 sebagai transporter obat kation organik termasuk metformin. Oleh karena OCT1 utamanya terletak di membran sinusoidal hepar, maka perubahan fungsi transport akan mempengaruhi ambilan metformin ke dalam hepatosit yang berakibat pada penurunan efek hipoglikemik. Hasil

penelitian ini diharapkan dapat menjadi data awal profil polimorfisme gen pengkode OCT1, *SLC22A1* rs628031 di populasi Indonesia yang dapat dikembangkan pada studi farmakogenetik metformin maupun obat lain yang menjadi substrat gen pengkode OCT1.

3.4 Distribusi Genotip dan Frekuensi Alel gen *SLC22A1* rs628031 (A>G) berdasarkan Jenis Kelamin

Tabel 2. Distribusi Genotip dan Frekuensi Alel

| Keterangan | Laki-Laki | Perempuan | p-value |
|-----------------------|-------------|-------------|---------|
| Jenis Genotip | | | |
| AA | 1 (2,6%) | 3 (5,3%) | 0,174 |
| AG | 27 (69,2%) | 35 (61,4%) | |
| GG | 11 (28,2%) | 19 ((33,3%) | |
| Frekuensi Alel | | | |
| A (AA) | 29 (37,18%) | 41 (35,96%) | 0,231 |
| G(AG dan GG) | 49 (62,82%) | 73 (64,04%) | |

Tabel 2 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan frekuensi alel minor G antara subyek laki-laki dan perempuan ($P > 0,05$). Hal ini didukung penelitian sebelumnya, meskipun masih terbatas pada tikus, diketahui tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen OCT1 di ginjal berdasarkan jenis kelamin (Schlatter *et al.*, 2014).

4. Kesimpulan

Frekuensi alel minor gen pengkode OCT1, *SLC22A1* rs628031 (A>G) pada subyek sehat Indonesia Suku Jawa menunjukkan presentase tinggi (65,2%), hampir sama dengan bangsa-bangsa di Asia lainnya. Oleh sebab itu sangatlah penting dilakukan studi lanjutan tentang pengaruh polimorfisme gen *SLC22A1* rs628031 terhadap respon metformin pada aspek farmakokinetik maupun respon klinik. Studi berikutnya juga dapat mengeksplorasi pengaruh polimorfisme gen tersebut terhadap efektivitas obat lainnya yang menjadi substrat OCT1.

Ucapan Terimakasih

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi (Kemenristekdikti) yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Disertasi Doktor.

Daftar Pustaka

International Diabetes Federation (IDF), Indonesia vs World Prevalence of Diabetes, 2015.

Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (Perkeni)., Konsensus Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia, 2015.

Bailey, C.J., 1992. Biguanides and NIDDM. *Diabetes Care*. 15 (6), pp.755-772.

Stumvoll, M., Nurjhan, N., Perriello, G., Dailey, G., Gerich, J.E., 1995. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 333 (9), pp.550-554.

Rena, G., Pearson, E.R., dan Sakamoto, K., 2012. Molecular action and pharmacogenetics of metformin: current understanding of an old drug. *Diabetes Management*, 2 (5), pp.439-452.

Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2015. *Pedoman Bioekivalensi Spesifik Zat Aktif*.

Ningrum, dkk., 2017. Hubungan Antara Variasi Genetik pada OCT1 dan MATE1 dengan Farmakokinetik Kadar Tunak dan Farmakodinamika Metformin, Disertasi.

Cook, M.N., Girman, C.J., Stein, P.P., Alexander, C.M., 2007. Initial monotherapy with either metformin or sulphonylureas often fails to achieve or maintain current glycaemic goals in patients with Type 2 diabetes in UK primary care. *Diabetic Medicine*, 24, pp.350-358.

Leabman, M.K., Giacomini, K.M., 2003. Estimating the contribution of genes and environment to variation in renal drug clearance. *Pharmacogenetics*. 2003;13:581– 584.

Graham, G.G., Punt, J., Arora, M., Day, R.O., Doogue, M.P., Du Peter Timminong, J.K., Furlong, T.J., Greenfield, J.R., Greenup, L.C., Kirkpatrick, C.M., Ray, J.E., and Williams, K.M., 2011. Clinical pharmacokinetics of metformin, *Clinical Pharmacokinetics*, 50 (2), pp.81-98.

Verhaagh S., Schweifer N., Barlow D.P. and Zwart R.: (1999), Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (slc22a3/SLC22A3) indentifies a conservative cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics*, **55**: 209-218.

Kang, H.J., Song, I.S., Shin, H.J., Kim, W.Y., Lee, C.H., Shim, J.C., Zhou, H.H., Lee, S.S., Shin, J.G., 2007. Identification and functional characterization of genetic variants of human organic cation transporters in a Korean population. *Drug Metabolism Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35(4), pp.667-675.

Itoda M, Saito Y, Maekawa K, Hichiya H, Komamura K, Kamakura S, *et al*. Seven novel single nucleotide polymorphisms in the human SLC22A1 gene encoding organic cation transporter 1 (OCT1). *Drug Metab Pharmacokinet*. 2004;19:308–12.

Sur, D. 2014. A Tale Of Genetic Variation In The Human Slc22a1 Gene Encoding OCT1 Among Type 2 Diabetes Mellitus Population Groups Of West Bengal, India.

International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences Vol. 2, Issue 5, 97-106

Ningrum dkk., 2017. Allele Frequencies of Two Main Metformin Transporter Genes: *SLC22A1*rs628031 A>G and *SLC47A1*rs2289669 G>A among the

Javanese Population in Indonesia. *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*, Volume X.

Umamaheswaran, R. G. Praveen, A. S. Arunkumar, A. K. Das, D. G. Shewade, and C. Adithan, 'Genetic analysis of OCT1 gene polymorphisms in an Indian population', *Indian J. Hum. Genet.*, vol. 17, no. 3, pp. 164–168, 2011.

Fatchiyah, dkk. 2011. *Biologi Molekular, Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga, hal 33-37.

Mato, M, *et al.*, 2018. Genetic polymorphisms of organic cation transporter 1 (OCT1) and responses to metformin therapy in individuals with type 2 diabetes: A systematic review. *Medicine*, Vol 97 Issue 27, p e 11349

Schlatter *et al.*, 2014. Mouse organic cation transporter 1 determines properties and regulation of basolateral organic cation transport in renal proximal tubules, *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.*, vol. 466, no. 8, pp. 1581–1589, Aug. 2014.