

ABSTRAK

Enzim CYP3A5 merupakan salah satu katalis metabolisme fase I senyawa xenobiotik. Polimorfisme gen SNP *CYP3A5*3* (rs776746) dapat berakibat menurunnya fungsi CYP3A5. Penelitian ini bertujuan mengetahui kondisi optimal kadar primer dan suhu *annealing* metode d-PCR untuk mengidentifikasi SNP *CYP3A5*3* yang merupakan gen *mutant* dan *CYP3A5*1* sebagai gen normal. Sampel isolat DNA berasal dari pasien yang mengonsumsi obat antihipertensi amlodipine dan menunjukkan gejala edema. Desain primer berjumlah 4 untuk mengamplifikasi *CYP3A5*1* dan *CYP3A5*3* secara simultan dan disusun menurut metode T-ARMS menggunakan perangkat lunak *Geneious Prime*. Panjang desain produk PCR untuk *CYP3A5*3* adalah 318bp, *CYP3A5*1* 208bp, dan outer:outer 490bp. Suhu *annealing* dibuat gradien pada *Thermo Cycler* yaitu 47,8°C; 50,7°C; 54,2°C; 56,9°C; dan 58,8°C sedangkan kadar primer menggunakan kombinasi outer:inner 10pmol/μL:10pmol/μL; 10pmol/μL:20pmol/μL; 10pmol/μL:40pmol/μL; dan 10pmol/μL:60pmol/μL. Visualisasi dilakukan menggunakan elektroforesis gel dan transiluminator UV. Pita elektroforegram paling jelas dan tunggal terlihat pada suhu *annealing* 56,9°C dengan kadar primer 10pmol/μL:60pmol/μL sehingga dianggap sebagai kondisi optimal. Validasi dilakukan dengan uji spesifisitas dan uji reproduibilitas. Hasil uji spesifisitas konstruksi primer dengan *Nucleotide-BLAST* NCBI menunjukkan kesamaan 100% untuk *CYP3A5*1* dan 99% untuk *CYP3A5*3* terhadap *CYP3A5* milik spesies *Homo sapiens*. Uji reproduibilitas pada 7 sampel acak menunjukkan 3 sampel mengandung *CYP3A5* heterozigot (*1/*3) dan 4 sampel merupakan homozigot *mutant* (*3/*3).

Kata kunci: SNP *CYP3A5*3*, *duplex*-PCR, T-ARMS, optimasi, validasi

ABSTRACT

CYP3A5 enzyme is one of the catalysts of phase I metabolism of xenobiotic compounds. SNP *CYP3A5*3* gene polymorphism (rs776746) can result in decreased CYP3A5 function. This study aims to determine the optimal conditions for primer concentration and annealing temperature using the d-PCR method to identify SNP *CYP3A5*3* which is a mutant gene and *CYP3A5*1* as a normal gene. The DNA isolate sample came from a patient taking the antihypertensive drug amlodipine and showing symptoms of edema. Four primer designs were used to simultaneously amplify *CYP3A5*1* and *CYP3A5*3* and were prepared according to the T-ARMS method using *Geneious Prime* software. The PCR product design length for *CYP3A5*3* is 318bp, *CYP3A5*1* is 208bp, and outer:outer is 490bp. The annealing temperature was made gradient on the *Thermo Cycler*, namely 47.8°C; 50.7°C; 54.2°C; 56.9°C; and 58.8°C while the primer concentration uses a combination outer:inner 10pmol/μL:10pmol/μL; 10pmol/μL:20pmol/μL; 10pmol/μL:40pmol/μL; and 10pmol/μL:60pmol/μL. Visualization was performed using gel electrophoresis and a UV transilluminator. The clearest and single electrophoretic band was seen at annealing temperature of 56.9°C with a primer content of 10pmol/μL:60pmol/μL so it was considered as optimal condition. Validation was carried out by specificity test and reproducibility test. The results of the primer construction specificity test with Nucleotide-BLAST NCBI showed 100% similarity for *CYP3A5*1* and 99% for *CYP3A5*3* to *CYP3A5* belonging to the species *Homo sapiens*. The reproducibility test on 7 random samples showed that 3 samples contained heterozygous *CYP3A5* (*1/*3) and 4 samples were homozygous mutants (*3/*3).

Keywords: SNP *CYP3A5*3*, duplex-PCR, T-ARMS, optimization, validation