

ABSTRAK

LPL terlibat dalam metabolisme lipid dan merupakan *rate limiting enzyme* yang didegradasi menjadi gliserol dan asam lemak bebas. Mutasi yang terjadi pada LPL dapat menyebabkan penurunan aktivitas enzim LPL sehingga degradasi kilomikron dan VLDL plasma akan semakin lama, akibatnya terjadi peningkatan trigliserida plasma dan VLDL. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dari suhu *annealing* dan konsentrasi primer pada tahap optimasi dalam identifikasi SNP Alel D9N (rs1801177) menggunakan T-ARMS PCR. Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni dengan rancangan deskriptif analitik. Desain primer yang digunakan meliputi empat primer yaitu *forward outer* (FO) dan *reverse inner* (RI) untuk *wild type* serta *forward inner* (FI) dan *reverse outer* (RO) untuk *mutant type*. Keempat primer tersebut diuji spesifitas untuk memastikan desain primer yang dibuat spesifik terhadap gen LPL pada manusia. Proses PCR dilakukan dengan tahapan pre denaturasi pada 94°C (45 detik), denaturasi 94°C (10 detik), *annealing* pada rentang suhu yang mencakup seluruh T_m primer (15 detik), dan ekstensi pada 72°C (60 detik). Siklus dilakukan pengulangan sebanyak 35 siklus, dan kemudian tahap final ekstensi pada suhu 72°C (5 menit). Optimasi konsentrasi primer dilakukan dengan membuat perbandingan *wild type* : *mutant type* yaitu 20 pmol/μL : 20 pmol/μL, 30 pmol/μL : 30 pmol/μL, 40 pmol/μL : 40 pmol/μL; dan 50 pmol/μL : 50 pmol/μL. Produk hasil PCR kemudian diidentifikasi menggunakan elektroforesis gel, kemudian validasi dilakukan untuk memastikan bahwa suhu *annealing* dan konsentrasi primer yang optimal dapat menghasilkan produk yang reproduksibel. Diperoleh hasil penelitian yang menunjukkan suhu *annealing* optimal adalah 58,5°C dan konsentrasi primer optimal adalah 20 pmol/μL : 20 pmol/μL. Optimasi metode menghasilkan suhu *annealing* optimal pada 58,5°C dan konsentrasi primer optimal pada 20 pmol/μL untuk kedua pasang primer. Kondisi ini penting untuk mencegah terjadinya *mispriming* dan *off-target*, serta menghasilkan intensitas pita DNA yang optimal. Pada kondisi tersebut, identifikasi alel D9N pada gen LPL berhasil menghasilkan produk PCR yang reproduksibel.

Kata kunci: LPL, SNP D9N, *tetra primer ARMS PCR*, suhu *annealing*, konsentrasi primer.

ABSTRACT

LPL is involved in lipid metabolism and is a rate limiting enzyme that is degraded into glycerol and free fatty acids. Mutations that occur in LPL can cause a decrease in LPL enzyme activity so that the degradation of chylomicrons and plasma VLDL will be longer, resulting in an increase in plasma triglycerides and VLDL. The purpose of this study was to determine the effect of annealing temperature and primer concentration at the optimization stage in the identification of SNP Allele D9N (rs1801177) using T-ARMS *PCR*. This type of research is pure experimental with analytical descriptive design. The primer design used included four primers, namely forward outer (FO) and reverse inner (RI) for wild type and forward inner (FI) and reverse outer (RO) for mutant type. The four primers were tested for specificity to ensure the primer design was specific to the LPL gene in humans. The *PCR* process was carried out with pre denaturation at 94°C (45 seconds), denaturation at 94°C (10 seconds), annealing at a temperature range that covers the entire primer T_m (15 seconds), and extension at 72°C (60 seconds). The cycle was repeated for 35 cycles, and then the final stage was extension at 72°C (5 min). Primer concentration optimization was carried out by making a wild type: mutant type ratio of 20 pmol/μL: 20 pmol/μL, 30 pmol/μL : 30 pmol/μL, 40 pmol/μL : 40 pmol/μL; and 50 pmol/μL : 50 pmol/μL. *PCR* products were then identified using gel electrophoresis, then validation was carried out to ensure that the optimal annealing temperature and primer concentration could produce reproducible products. Method optimization resulted in an optimal annealing temperature of 58.5°C and an optimal primer concentration of 20 pmol/μL for both primer pairs. These conditions are important to prevent mispriming and off-target, and produce optimal DNA band intensity. Under these conditions, identification of the D9N allele in the LPL gene successfully produced reproducible *PCR* products.

Keywords: LPL, SNP D9N, tetra primer ARMS *PCR*, annealing temperature, primer concentration.