

Overview of MYH9 Gene Polymorphism SNP RS3752462 in Chronic Kidney Disease (CKD) Patients with Diabetic Nephropathy

Ahmad Akmal Maulana¹ & Muhammad Taufiq Qurrohman^{1*}

¹Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Sukoharjo, Jawa Tengah, Indonesia;

Article History

Received : March 05th, 2026

Revised : April 15th, 2026

Accepted : May 02th, 2026

*Corresponding Author: **Muhammad Taufiq Qurrohman**, Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Sukoharjo, Jawa Tengah, Indonesia;
Email: m.taufiqqurrohman@stikesnas.ac.id

Abstract: Diabetic nephropathy is a major cause of chronic kidney disease and is influenced by both environmental and genetic factors. One of the genes implicated in the pathogenesis of diabetic nephropathy is MYH9, particularly the Single Nucleotide Polymorphism (SNP) rs3752462. This study aimed to describe the polymorphism of the MYH9 gene SNP rs3752462 in patients with chronic kidney disease associated with diabetic nephropathy. A descriptive study design was applied, involving five patients who met the inclusion criteria. Blood samples were analyzed using the Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) method with the RsaI restriction enzyme. The Results showed that the DNA band patterns observed in all samples did not form consistent combinations and did not correspond to the expected genotype classification standards. In addition, extra bands outside the target fragment sizes and variations in band intensity among samples were observed. Based on these findings, the resulting band patterns could not be reliably used to accurately determine genotypes, and therefore did not adequately represent the polymorphism of the MYH9 gene SNP rs3752462 in the studied samples. Accordingly, further optimization of the PCR-RFLP method is required, along with validation using more accurate approaches, such as DNA sequencing, and a larger sample size to obtain more reliable results.

Keywords: Chronic kidney disease; Diabetic nephropathy; MYH9; PCR-RFLP; SNP rs3752462.

Pendahuluan

Penyakit tidak menular, khususnya Diabetes Melitus (DM), merupakan tantangan utama dalam kesehatan global karena prevalensinya yang terus meningkat dan komplikasi kronis yang ditimbulkannya, salah satu komplikasi paling serius adalah nefropati diabetik (ND). Nefropati diabetik (ND) merupakan salah satu komplikasi kronis paling serius dari diabetes melitus yang menjadi penyebab utama penyakit ginjal kronis (PGK) dan gagal ginjal tahap akhir (Syurma *et al.*, 2021). Di berbagai negara. Secara global, ND berkontribusi signifikan terhadap peningkatan angka morbiditas dan mortalitas, serta beban

ekonomi kesehatan (Alicic *et al.*, 2020; Thomas *et al.*, 2021). Di Indonesia, proporsi pasien penyakit ginjal kronis (PGK) akibat nefropati diabetik (ND) tergolong tinggi, sejalan dengan tingginya prevalensi ND di berbagai negara. Di kawasan Asia, hampir 60% individu dengan diabetes dan hipertensi menunjukkan keterlibatan ginjal, termasuk di Indonesia yang mencapai sekitar 30–40% kasus PGK. Kondisi ini menunjukkan bahwa ND tidak hanya merupakan masalah klinis, tetapi juga menjadi masalah kesehatan masyarakat yang penting dan memerlukan pendekatan ilmiah yang komprehensif dalam penelitian biomedis dan klinis (Suherman *et al.*, 2023).

Secara patofisiologis, nefropati diabetik

ditandai oleh perubahan struktural dan fungsional ginjal akibat hiperglikemia kronis, seperti penebalan membran basal glomerulus, ekspansi mesangial, dan kerusakan podosit. Kondisi ini menyebabkan proteinuria, hipertensi, serta penurunan *Glomerular Filtration Rate* (GFR) secara progresif (Li *et al.*, 2021). Selain faktor lingkungan dan metabolik, faktor genetik juga berperan penting dalam kerentanan individu terhadap ND. Variasi genetik, khususnya dalam bentuk *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), diketahui dapat memengaruhi ekspresi gen dan fungsi protein yang terlibat dalam homeostasis ginjal (Iyengar *et al.*, 2015). Perkembangan ilmu genomik melalui pendekatan Genome Wide Association Study (GWAS) telah mengidentifikasi berbagai variasi genetik, khususnya *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), diketahui dapat memengaruhi ekspresi gen dan fungsi protein yang terlibat dalam homeostasis ginjal (Gaal *et al.*, 2009).

Salah satu gen yang sering diteliti adalah MYH 9, dalam mengkode protein *non-muscle myosin heavy chain IIA* dan berperan menjaga integritas sitoskeleton podosit. Disfungsi podosit akibat variasi genetik pada MYH9 dapat memicu kerusakan filtrasi glomerulus dan berkontribusi terhadap perkembangan penyakit ginjal kronis (Freedman *et al.*, 2009). Berbagai penelitian telah melaporkan hubungan antara polimorfisme gen MYH9 dan penyakit ginjal pada berbagai populasi dunia, namun penelitian pada populasi Asia Tenggara, khususnya Indonesia, masih menunjukkan kesenjangan pengetahuan yang signifikan. Variasi genetik yang bersifat spesifik populasi menyebabkan hasil penelitian dari negara lain belum tentu dapat diaplikasikan secara langsung pada populasi lokal. Selain itu, keterbatasan data mengenai distribusi genotipe serta hubungan polimorfisme MYH9 *rs3752462* dengan kejadian nefropati diabetik pada pasien diabetes di Indonesia menunjukkan masih rendahnya pemahaman terhadap kontribusi faktor genetik pada populasi tersebut. Kondisi ini menghambat pengembangan strategi deteksi dini dan penatalaksanaan berbasis risiko genetik yang lebih tepat sasaran.

Perbedaan latar belakang genetik dan lingkungan di kawasan Asia Tenggara juga berpotensi memengaruhi distribusi genotipe serta risiko penyakit, namun belum banyak dikaji secara komprehensif. Polimorfisme gen MYH9,

termasuk *rs3752462*, telah dikaitkan dengan peningkatan risiko penyakit ginjal kronis dan *end-stage renal disease* (ESRD) pada berbagai populasi (Cooke *et al.*, 2012; Tuttle *et al.*, 2022), tetapi sebagian besar penelitian masih terfokus pada populasi Afrika-Amerika, Kaukasia, dan sebagian Asia lainnya (Colares *et al.*, 2014). Oleh karena itu, kurangnya representasi data genetik lokal menjadi permasalahan penting yang memengaruhi akurasi interpretasi risiko penyakit serta menghambat pengembangan pendekatan diagnosis dan terapi berbasis genetik pada populasi Indonesia.

Seiring berkembangnya teknologi analisis genetik, sejumlah varian intronik MYH9 telah diidentifikasi sebagai faktor risiko penyakit ginjal. Studi RENASTUR di Spanyol melaporkan bahwa SNP *rs3752462* berhubungan dengan peningkatan kerentanan terhadap penderita ginjal kronis (Tavira *et al.*, 2013). Metode identifikasi polimorfisme yang spesifik dan akurat diperlukan untuk menganalisis variasi genetik secara komprehensif. Salah satu teknik yang umum digunakan adalah *Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP), yaitu teknik yang menggabungkan proses amplifikasi DNA melalui PCR dengan pemotongan fragmen DNA menggunakan enzim restriksi tertentu. Teknik ini memungkinkan identifikasi variasi genotipe melalui perbedaan pola fragmen DNA serta dikenal sebagai metode yang relatif sederhana, spesifik, dan efisien dalam analisis SNP (Sinha *et al.*, 2020).

Banyak penelitian menunjukkan polimorfisme *rs3752462* terhadap gen MYH9 berpotensi menjadi biomarker genetik untuk memprediksi risiko penyakit ginjal kronis, termasuk pada pasien diabetes tipe 2 (Cooke *et al.*, 2012; Owiredo *et al.*, 2020). Meskipun demikian penelitian terhadap populasi Indonesia masih sangat terbatas. Kondisi ini menunjukkan perlunya penelitian yang dapat memberikan data genetik yang lebih spesifik pada populasi lokal. Oleh karena itu, sebagai upaya mengisi kesenjangan tersebut, penelitian ini bertujuan mengetahui gambaran distribusi dan pola polimorfisme gen MYH9 SNP *rs3752462* pada pasien gagal ginjal kronis dengan nefropati diabetik melalui pendekatan *Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Penelitian ini

penting untuk mendukung pengembangan skrining genetik, deteksi dini, sehingga diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap pemahaman peran faktor genetik dalam perkembangan nefropati diabetik, sekaligus menambah informasi ilmiah mengenai peran faktor genetik dalam nefropati diabetik pada populasi Indonesia.

Bahan dan Metode

Metode Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan etik dari institusi Universitas Sebelas Maret dengan nomor registrasi 075/UN27.46/TA.04.19/KEP/EC/2025.

Penelitian dirancang menggunakan metode deskriptif yang bertujuan untuk menggambarkan polimorfisme gen MYH9 *SNP rs3752462* pada pasien gagal ginjal kronis dengan nefropati diabetik. Teknik pengambilan sampel dilakukan menggunakan *quota sampling* sesuai kriteria inklusi yang telah ditentukan. Data penelitian berupa hasil pemeriksaan molekuler yang diperoleh dari sampel darah pasien yang dianalisis menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Pengambilan sampel darah dilakukan di Rumah Sakit Universitas Sebelas Maret (UNS), sedangkan proses uji kualitas dan kuantitas DNA, amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR), proses digesti menggunakan enzim restriksi, hingga visualisasi hasil melalui elektroforesis gel, dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional Surakarta

Alat dan bahan penelitian

Alat penelitian ini meliputi Mikropipet, *centrifuge*, cup sampel, *yellow tip*, *blue tip*, *spin down*, *vortex*, *eppendorf*, rak tabung, *water bath*, kuvet, spektrofotometer UV Vis, tabung falcon, chamber elektroforesis, *gel doc*, kertas timbang, tabung erlenmeyer, oven, monitor, CPU, cetakan agarose, *thermal cycler*, *PCR tube*, PCR-RFLP, dan *Bio-Rad Gel Doc EZ Imuger Manual*. Bahan penelitian terdiri atas sampel darah pasien gagal ginjal kronis dengan nefropati diabetik, TBE buffer, NEB buffer, aquabidest, agarose, *loading dye*, *gel red*, *PCR mix*, *master mix*, *primer reverse*, *primer forward*, kit reagen, Genomic

DNA Mini Kit, enzim *nuclease*, dan air suling ganda (ddH₂O).

Cara kerja

Uji Kualitatif DNA

Isolasi DNA dari sampel darah dilakukan menggunakan kit Geneaid™ melalui lima tahapan utama, yaitu *sample preparation*, *cell lysis*, DNA binding, *wash*, dan DNA elution. Selanjutnya, DNA hasil isolasi dianalisis secara kualitatif menggunakan metode elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi 1%. Sampel DNA dicampur dengan *loading dye*, dan *gel red* kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel agarose yang disiapkan dalam buffer TBE. Elektroforesis dilakukan hingga terbentuk pemisahan fragmen DNA dengan tegangan 60volt, 400mA selama 120menit. kemudian pita DNA divisualisasikan menggunakan *Bio-Rad Gel Doc EZ Imuger Manual* untuk menilai keberadaan DNA gen.

Uji Kuantitatif DNA

Uji kuantitatif dilakukan dilakukan menggunakan metode spektrofotometri dengan pengenceran 20µl isolat DNA dilarutkan dalam 2980 aquabidest. Isolat DNA yang sudah diencerkan dibaca pada alat spektrofotometer UV-Vis dengan mengukur nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Nilai absorbansi yang didapatkan digunakan untuk menghitung kemurnian dan konsentrasi suatu DNA dengan rumus :

$$\text{Kemurnian DNA} = \frac{A_{260}}{A_{280}}$$

$$\text{Konsentrasi DNA} = \frac{A_{260}}{50} \times \text{faktor pengenceran}$$

Optimasi Suhu Annealing

Optimasi suhu annealing dilakukan dengan menetapkan rentang suhu yang diperoleh dari perhitungan rata-rata nilai *Temperature Melting* (TM) primer. Nilai TM yang didapatkan kemudian dilakukan pengujian dengan 8 suhu 59°C-65°C untuk menentukan suhu yang menghasilkan amplifikasi DNA paling baik.

Polymerase Chain Reaction

Amplifikasi DNA dilakukan pada alat *thermal cycler* dengan primer spesifik, yaitu *primer forward* 5'CCAGGAGCATCCGGGCTCTA-3 dan *primer reverse*

5'CACCTCCACAACCAACACAGAGCT-3'.

Reaksi PCR terdiri atas 4 µl DNA genom, masing-masing 1 µl primer, 12 µl master mix, dan 7 µl NFW. Reaksi PCR meliputi pre-denaturasi (94°C, 3 menit), diikuti tahap denaturasi (94°C, 35 detik), annealing (55°C, 45 detik), dan ekstensi (72°C, 55 detik), serta final extension (72°C selama 5 menit). Produk PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis gel agarose 1% pada 60 Volt dan 400 mA selama 120.

Digestion

Analisis polimorfisme gen MYH9 *SNP rs3752462* dilakukan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Produk PCR selanjutnya dicerna menggunakan enzim restriksi *RsaI*, dengan komposisi reaksi berupa 10 µl produk PCR dan 0,5 µl enzim restriksi, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Hasil digesti dianalisis menggunakan elektroforesis gel agarose 1% untuk mengamati pola pita DNA yang terbentuk, yang selanjutnya digunakan dalam penentuan adanya polimorfisme SNP pada pasien gagal ginjal kronis dengan nefropati diabetik.

Hasil dan Pembahasan

Uji Kuantitatif DNA

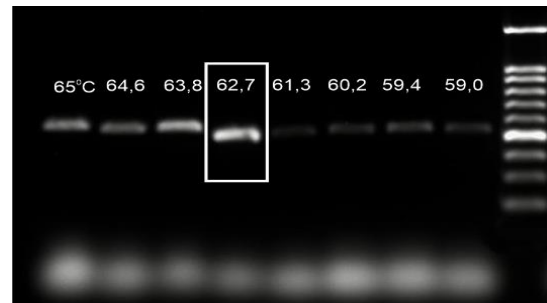
Uji kuantitatif dilakukan untuk untuk menentukan tingkat kemurnian serta konsentrasi DNA. Nilai kemurnian dan konsentrasi DNA didapatkan dari hasil rata-rata pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Berdasarkan tabel 1, nilai kemurnian DNA pada seluruh sampel tercatat berada pada rentang 0,22–0,41.

Tabel 1. Hasil uji kuantitatif isolat DNA

Sampel	A ₂₆₀	A ₂₈₀	Kemurnian DNA	Konsentrasi DNA ng/µl
D1	0,0076	0,0183	0,41	57
D2	0,0040	0,0179	0,22	30
D3	0,0054	0,0179	0,3	40,5
D4	0,0045	0,0175	0,25	33,75
D5	0,0079	0,0197	0,4	59,25

Optimasi Suhu Annealing

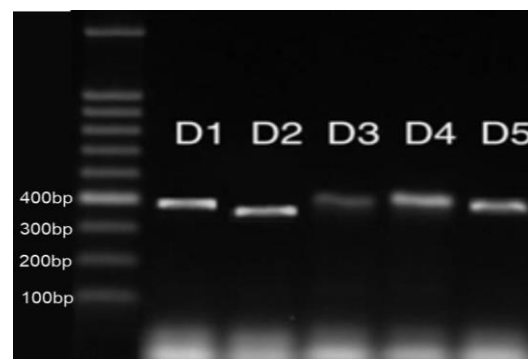
Optimasi suhu annealing dilakukan untuk memperoleh kondisi PCR yang optimal dalam mendeteksi fragmen DNA. Optimasi dilakukan pada suhu 59°C-65°C. Berdasarkan hasil (Gambar 2), Pada suhu annealing 62,7°C, pita DNA teramati jelas dan terdefinisi, dibandingkan dengan suhu annealing lainnya, sehingga suhu ini digunakan pada tahap PCR selanjutnya.



Gambar 1. Hasil optimasi suhu annealing

Polymerase Chain Reaction

Amplifikasi gen MYH9 dilakukan menggunakan pasangan primer spesifik, yaitu *primer forward* 5'-CCAGGAGCATCCGGGCTCTA-3' dan *primer reverse* 5'-CACCTCCACAACCAACACAGAGCT-3', dengan produk target berukuran 421 bp dan suhu annealing 62,7°C. Produk PCR divisualisasikan menggunakan elektroforesis gel agarose 1% yang dijalankan pada tegangan 60 Volt dan arus 400 mA selama 120 menit, dengan DNA ladder 100 bp sebagai penanda ukuran fragmen amplifikasi. Hasil elektroforesis PCR (Gambar 3), pita DNA hasil amplifikasi teramati pada posisi yang sejajar dengan penanda ukuran sekitar 421 bp pada masing-masing sampel.

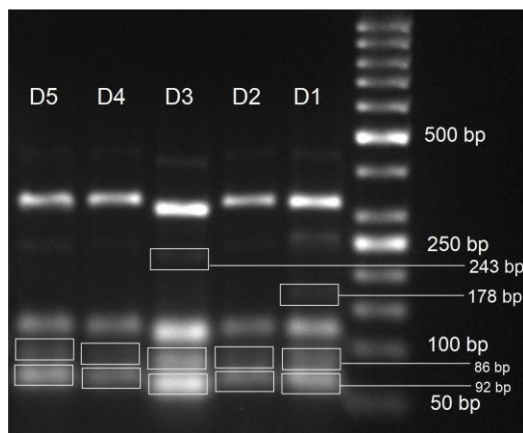


Gambar 2. Hasil elektroforesis PCR

Digestion

Proses digest dilakukan untuk mengetahui

adanya polimorfisme pada *SNP rs3752462* dari Gen MYH9. Produk hasil amplifikasi PCR direaksikan dengan enzim restriksi RsaI yang memiliki situs pengenalan spesifik pada sekuens. Dengan demikian, keberadaan atau ketiadaan situs restriksi RsaI akan menghasilkan pola pemotongan DNA yang berbeda, sehingga memungkinkan identifikasi genotip.



Gambar 3. Hasil elektroforesis Digest

Berdasarkan hasil elektroforesis digest (Gambar 4), dari lima sampel yang dianalisis menunjukkan terdapat perpotongan pita DNA pada ukuran sekitar 243 bp, 178 bp, 92 bp, dan 86 bp, tetapi pola pita tersebut tidak membentuk kombinasi yang konsisten sesuai dengan klasifikasi genotipe yang diharapkan. Selain itu, teramati pula beberapa perpotongan pita tambahan di luar ukuran fragmen yang ditentukan.

Pembahasan

Hasil uji kuantitatif DNA menunjukkan bahwa nilai rasio absorbansi $\lambda 260/\lambda 280$ pada seluruh sampel berada di bawah kisaran ideal kemurnian DNA (1,8–2,0). Nilai rasio yang rendah tersebut menunjukkan adanya kontaminasi, baik oleh protein maupun protein sisa reagen isolasi seperti etanol atau buffer lisis, yang belum tereliminasi secara optimal selama proses pemurnian DNA. Kondisi ini berpotensi memengaruhi efisiensi reaksi *Polymerase Chain Reaction* (PCR), terutama melalui penghambatan aktivitas DNA polimerase atau penurunan spesifisitas penempelan primer, yang pada akhirnya dapat menghasilkan amplifikasi yang lemah atau tidak konsisten. (Green & Sambrook,

2021).

Beberapa penelitian melaporkan bahwa DNA dengan rasio $\lambda 260/\lambda 280$ di bawah nilai normal masih dapat digunakan untuk analisis PCR, selama integritas DNA genom tetap terjaga dan konsentrasi inhibitor PCR tidak mencapai tingkat yang menghambat reaksi enzimatik (Lucena-aguilar *et al.*, 2016). Temuan ini sejalan dengan laporan Farhanah *et al.* (2021) menjelaskan bahwa rendahnya kemurnian DNA pada sampel darah sering dijumpai dan tidak selalu berujung pada kegagalan amplifikasi. Oleh karena itu, meskipun nilai kemurnian DNA yang diperoleh rendah, proses PCR tetap dapat berlangsung, namun tetap berpotensi meningkatkan variasi efisiensi amplifikasi antar sampel dan menjadi salah satu faktor pembatas yang perlu dipertimbangkan dalam interpretasi hasil genotipe.

Tahap optimasi PCR melalui uji gradien suhu annealing merupakan tahap penting untuk memperoleh spesifisitas dan efisiensi amplifikasi gen MYH9. Hasil uji gradien menunjukkan bahwa suhu annealing $62,7^{\circ}\text{C}$ menghasilkan pita DNA paling jelas, tajam, dan konsisten pada ukuran target 421 bp. Suhu ini mencerminkan kondisi optimal bagi ikatan primer dengan sekuens target, sehingga mampu meminimalkan amplifikasi non-spesifik dan meningkatkan efisiensi reaksi PCR. Suhu annealing yang terlalu rendah dapat meningkatkan kemungkinan primer berikatan dengan sekuens nonspesifik, sedangkan suhu yang terlalu tinggi berpotensi menghambat proses annealing sehingga menurunkan efisiensi amplifikasi (Khaira *et al.*, 2023).

Hasil elektroforesis produk PCR memperlihatkan pita tunggal berukuran sekitar 421 bp sesuai dengan ukuran target yang diharapkan. Tidak ditemukannya pita non-spesifik atau smear menunjukkan bahwa desain primer yang digunakan memiliki spesifisitas tinggi terhadap sekuens target MYH9 *SNP rs3752462* dan kondisi PCR telah optimal. Temuan ini konsisten dengan laporan Wittmeier & Hummel (2022) yang menyatakan bahwa pita tunggal yang jelas mencerminkan spesifisitas primer dan efisiensi amplifikasi yang baik.

Tahap digesti menggunakan enzim restriksi RsaI selanjutnya dimanfaatkan untuk mengidentifikasi variasi genotipe gen MYH9 pada *SNP rs3752462* melalui metode PCR-

RFLP. Enzim *RsaI* merupakan endonuklease restriksi tipe II yang secara spesifik mengenali urutan basa GTAC dan memotong pada situs tersebut, sehingga menghasilkan fragmen DNA dengan ujung tumpul (*blunt end*) (Roberts *et al.*, 2021). Dalam konteks analisis SNP, perubahan satu basa nukleotida pada *rs3752462* dapat menyebabkan terbentuknya atau hilangnya situs pengenalan enzim ini, sehingga memengaruhi pola fragmentasi DNA yang dihasilkan. Oleh karena itu, perbedaan genotipe akan menghasilkan pola pita yang berbeda setelah proses elektroforesis, dan keberhasilan identifikasi genotipe sangat bergantung pada spesifisitas pemotongan enzim terhadap situs target tersebut (Kratochwil *et al.*, 2022).

Hasil elektroforesis PCR-RFLP menunjukkan bahwa pola pita DNA gen MYH9 *SNP rs3752462* tidak sepenuhnya sesuai dengan pola fragmentasi yang dilaporkan dalam jurnal acuan. Secara teoritis, metode PCR-RFLP menghasilkan pola pita spesifik yang dapat digunakan untuk membedakan genotipe berdasarkan keberadaan atau ketiadaan situs restriksi akibat variasi *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), yaitu dua pita untuk homozigot CC, tiga pita untuk homozigot TT, dan empat pita untuk heterozigot CT (Tarach, 2021).

Pola band fragment hasil digesti menggunakan enzim restriksi *RsaI* pada *SNP rs3752462* dalam penelitian oleh Alqaysi *et al.* (2020). menunjukkan klasifikasi genotipe yang jelas, yaitu perpotongan 243 bp + 178 bp untuk genotipe CC, perpotongan 243 bp + 92 bp + 86 bp untuk genotipe TT, serta kombinasi empat pita 243 bp + 178 bp + 92 bp + 86 bp untuk genotipe heterozigot CT. Namun demikian, hasil penelitian ini tidak menunjukkan pola band fragment yang sejalan dengan temuan tersebut. Meskipun terdapat pita pada ukuran 243 bp, 178 bp, 92 bp, dan 86 bp tetap teramati tidak membentuk kombinasi yang konsisten dan tidak dapat diklasifikasikan ke dalam genotipe CC, CT, atau TT secara jelas. Selain itu, munculnya pita tambahan di luar ukuran yang diharapkan mengindikasikan adanya kemungkinan produk non-spesifik atau ketidaksempurnaan proses pemotongan DNA menyebabkan ketidaksesuaian antara hasil penelitian ini dengan pola standar yang dilaporkan dalam literatur.

Munculnya pita tambahan di luar ukuran

fragmen yang diharapkan pada hasil elektroforesis dapat disebabkan oleh faktor genetik maupun teknis. Secara biologis, kemungkinan adanya variasi nukleotida lain di sekitar daerah amplikon selain *SNP rs3752462* perlu dipertimbangkan. Dalam metode PCR-RFLP, enzim restriksi seperti *RsaI* mengenali urutan spesifik GTAC, sehingga perubahan satu basa nukleotida dapat menyebabkan hilangnya situs restriksi atau justru membentuk situs restriksi baru. Kondisi ini berpotensi menghasilkan pola fragmentasi yang berbeda dari pola teoritis, termasuk munculnya fragmen tambahan akibat pemotongan pada lokasi yang tidak terduga. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa keberadaan SNP tambahan atau variasi sekuens lain di sekitar daerah target dapat memengaruhi jumlah dan posisi situs restriksi dalam satu fragmen DNA, sehingga menghasilkan pola digest yang lebih kompleks (Kautt *et al.*, 2022). Namun demikian, munculnya pita tambahan tidak selalu mencerminkan adanya mutasi biologis. Faktor teknis seperti *partial digestion*, amplifikasi non-spesifik, serta kondisi reaksi enzim yang tidak optimal juga dapat menyebabkan terbentuknya fragmen tambahan. Aktivitas enzim restriksi yang tidak optimal bahkan dapat memicu fenomena *star activity*, yaitu pemotongan pada situs yang mirip tetapi tidak identik dengan urutan target (Pingoud *et al.*, 2020).

Faktor teknis yang menjadi salah satu penyebab utama adalah terjadinya *partial digestion*, yaitu kondisi ketika enzim restriksi tidak memotong seluruh produk PCR secara sempurna. Hal ini menyebabkan fragmen DNA yang seharusnya terpotong tetap muncul sebagai pita utuh, sehingga muncul pita tambahan atau ukuran fragmen yang menyimpang menghasilkan pola pita yang tumpang tindih dan sulit diinterpretasikan (Gonzalez *et al.*, 2021). Karakteristik *blunt end* pada enzim restriksi *RsaI* ini menyebabkan efisiensi pemotongan sangat bergantung pada kondisi reaksi. Ketidakesuaian suhu inkubasi, waktu reaksi, konsentrasi enzim, maupun buffer dapat menyebabkan aktivitas enzim tidak optimal, sehingga meningkatkan kemungkinan terjadinya *partial digestion* (Green & Sambrook, 2020; Wilson & Walker, 2010).

Kualitas enzim restriksi juga berperan dalam memengaruhi kesesuaian pola fragmen hasil digest. Enzim restriksi merupakan protein

yang sangat sensitif terhadap kondisi penyimpanan, frekuensi pembekuan, pencairan (*freeze-thaw*), serta masa simpan. Apabila enzim digunakan dalam kondisi aktivitasnya telah menurun, misalnya karena mendekati masa kedaluwarsa atau mengalami degradasi parsial, maka proses pemotongan DNA dapat berlangsung tidak sempurna (*partial digestion*). Kondisi ini dapat menghasilkan pita tambahan. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa stabilitas dan aktivitas enzim restriksi merupakan faktor penting yang menentukan konsistensi hasil metode PCR-RFLP (Kratochwil *et al.*, 2022).

Selain itu, variasi nukleotida di sekitar situs pengenalan enzim restriksi juga dapat memengaruhi efisiensi pemotongan DNA, Variasi basa di luar SNP target berpotensi mengubah kemampuan enzim dalam mengenali situs restriksi, sehingga menghasilkan pola pemotongan yang berbeda, khususnya pada populasi dengan latar belakang genetik yang beragam. Kondisi merupakan salah satu keterbatasan inheren dari metode PCR-RFLP, terutama pada populasi dengan keragaman genetik tinggi (Gonzalez *et al.*, 2021).

Rendahnya kemurnian DNA pada penelitian ini juga dapat memengaruhi efisiensi proses digest. Tingkat kemurnian yang lebih rendah dari kisaran ideal 1,8–2,0 mengindikasikan kemungkinan adanya kontaminasi, baik oleh protein maupun atau sisa reagen isolasi. Kontaminan tersebut dapat menghambat kerja enzim restriksi sehingga pemotongan DNA tidak terjadi secara optimal, meskipun urutan target sebenarnya tersedia. DNA dengan tingkat kemurnian yang rendah diketahui dapat menurunkan efektivitas reaksi enzimatik lanjutan, termasuk reaksi restriksi (Green & Sambrook, 2021).

Berdasarkan perbandingan dengan jurnal acuan dan analisis terhadap hasil yang diperoleh, hasil ini belum dapat digunakan untuk mengidentifikasi polimorfisme *SNP rs3752462* gen MYH9 secara akurat dan perlu ditafsirkan dengan mempertimbangkan keterbatasan penelitian. Mengingat jumlah sampel yang sangat terbatas dapat memengaruhi kekuatan analisis serta representativitas hasil terhadap populasi yang lebih luas. Kondisi ini menyebabkan temuan yang diperoleh dalam penelitian ini lebih bersifat deskriptif eksploratif, sehingga belum dapat digunakan untuk menarik

kesimpulan yang kuat mengenai hubungan antara polimorfisme gen MYH9 *SNP rs3752462* dengan kejadian gagal ginjal kronis akibat nefropati diabetik. Selain itu, ketidaksesuaian pola pita yang diperoleh juga semakin membatasi kemampuan interpretasi genotipe secara akurat.

Oleh karena itu, penelitian selanjutnya perlu mempertimbangkan penggunaan jumlah sampel yang lebih besar agar meningkatkan validitas. Di samping itu, diperlukan optimasi lebih lanjut pada tahapan PCR-RFLP, khususnya pada kondisi digest enzim restriksi, untuk meminimalkan kemungkinan kesalahan teknis seperti *partial digestion* atau amplifikasi non-spesifik. Untuk memastikan keakuratan identifikasi variasi genetik, validasi hasil juga perlu dilakukan menggunakan metode yang lebih sensitif dan spesifik, seperti sekuensing DNA, yang mampu mendeteksi perubahan nukleotida secara langsung tanpa bergantung pada pola fragmentasi. Dengan pendekatan tersebut, diharapkan hasil penelitian selanjutnya dapat memberikan gambaran yang lebih akurat mengenai peran polimorfisme gen MYH9 dalam patogenesis gagal ginjal kronis dengan nefropati diabetik.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, analisis PCR-RFLP gen MYH9 *SNP rs3752462* menunjukkan pola pita DNA yang tidak konsisten, sehingga tidak dapat digunakan untuk menentukan genotipe secara akurat. Meskipun fragmen target terdeteksi, ketidaksesuaian pola tersebut kemungkinan besar disebabkan oleh faktor teknis, seperti *partial digestion*, kondisi enzim yang tidak optimal, dan amplifikasi non-spesifik. Oleh karena itu, penelitian ini memberikan kontribusi ilmiah berupa gambaran awal mengenai penerapan PCR-RFLP pada analisis gen MYH9 pada penderita gagal ginjal kronik dengan nefropati diabetik di populasi lokal. Dengan demikian, diperlukannya penggunaan metode yang lebih akurat, seperti sekuensing DNA, untuk memastikan validitas hasil analisis polimorfisme genetik.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional atas

fasilitas Laboratorium Biologi Molekuler yang diberikan, dan Kepala Instalasi Hemodialisa beserta tenaga kesehatan rumah sakit Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta atas izin dan bantuan selama proses pengambilan sampel berlangsung.

Referensi

- Alicic, R. Z., Rooney, M. T., & Tuttle, K. R. (2020). Diabetic kidney disease: Challenges, progress, and possibilities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 15(1), 121–132. <https://doi.org/10.2215/CJN.11491119>
- Alqaysi, S. A., Juda, T. M., Mohammed, S. B., Ali, Z. A., & Behayaa, H. R. (2020). Genetics risk factors and progression of renal failure. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, 14(2), 1949–1955. <https://doi.org/10.37506/ijfmt.v14i2.3223>
- Colares, V. S., Titan, S. M. O., Pereira, A. C., Malafrente, P., Cardena, M. M., Santos, S., ... Woronik, V. (2014). MYH9 and APOL1 gene polymorphisms and the risk of CKD in patients with lupus nephritis from an admixture population. *PLoS ONE*, 9(3), e87716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087716>
- Cooke, J. N., Bostrom, M. A., Hicks, P. J., Ng, M. C. Y., Hellwege, J. N., Comeau, M. E., Divers, J., Langefeld, C. D., Freedman, B. I., & Bowden, D. W. (2012). Polymorphisms in MYH9 are associated with diabetic nephropathy in European Americans. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(4), 1505–1511. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr522>
- Farhanah, A., Ashar, J. R., Hamzah, P., & Aggun, I. (2021). Optimization of The DNA Isolation and Purification Using CTAB Buffer (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) In Passion Fruit Plants (*Passiflora* sp.) On Lowland of Jenepono District. 17, 31–39. *Jurnal Agroteknologi*, 17(1), 31–39. <https://doi.org/10.52625/j-agr.v17i1.191>
- Freedman, B. I., Kopp, J. B., Winkler, C. A., Nelson, G. W., Rao, D. C., Eckfeldt, J. H., Leppert, M. F., Hicks, P. J., Divers, J., Langefeld, C. D., & Hunt, S. C. (2009). Polymorphisms in the nonmuscle myosin heavy chain 9 gene (MYH9) are associated with albuminuria in hypertensive African Americans: The HyperGEN study. *American Journal of Nephrology*, 29(6), 626–632. <https://doi.org/10.1159/000194791>
- Gaal, S. van, Scholte, H. S., Lamme, V. A. F., Fahrenfort, J. J., & Ridderinkhof, K. R. (2009). Pre-supplementary motor area involvement in inhibitory control: A transcranial magnetic stimulation study. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 21(5), 1020–1031. <https://doi.org/10.1162/jocn.2009.21070>
- Gonzalez, R. M., Vallera, A. C., Calzetta, M., Pichler, V., Love, R. R., Guelbeogo, M. W., ... Besansky, N. J. (2021). A PCR-RFLP method for genotyping of inversion 2Rc in *Anopheles coluzzii*. *Parasites & Vectors*, 14, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04657-x>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2021). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2020). Restriction endonucleases. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(9), <https://doi.org/10.1101/pdb.top100545>
- Iyengar, S. K., Sedor, J. R., Freedman, B. I., Kao, W. H. L., Kretzler, M., Keller, B. J., ... Langefeld, C. D. (2015). Genome-wide association and trans-ethnic meta-analysis for advanced diabetic kidney disease. *PLOS Genetics*, 11(8), e1005352. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005352>
- Kaatt, A. F., Machado-Schiaffino, G., Meyer, A., & Torres-Dowdall, J. (2022). Applications of PCR-RFLP genotyping in SNP detection and molecular ecology studies. *Molecular Ecology Resources*, 22(3), 1023–1035. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13545>
- Khaira, A., Achyar, A., Atifah, Y., & Putri, D. H. (2023). Primer design and optimization of annealing temperature for analysis of glutathione reductase gene expression in rice (*Oryza sativa* L.). *Bioscience*

- Research*, 5(1), 142–148.
<https://doi.org/10.5614/3bio.2023.5.1.3>
- Kratochwil, C. F., Kautt, A. F., Rometsch, S. J., & Meyer, A. (2022). Benefits and limitations of a new genome-based PCR-RFLP genotyping assay. *Ecology and Evolution*, 12(3), e8751.
<https://doi.org/10.1002/ece3.8751>
- Li, Q., Wen, F., Wang, Y., Li, S., Lin, S., Qi, C., ... Wang, W. (2021). Diabetic kidney disease benefits from intensive low-protein diet: Updated systematic review and meta-analysis. *Diabetes Therapy*, 12(1), 21–36.
<https://doi.org/10.1007/s13300-020-00952-5>
- Lucena-Aguilar, G., Marí, A., Barberá, C., Carrillo-Ávila, J. A., & López-Guerrero, J. A. (2016). DNA source selection for downstream applications based on DNA quality indicators analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270.
<https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>
- Owiredu, W. K. B. A., Appiah, M., Obirikorang, C., Adu, E. A., Boima, V., Amos-Abanyie, E. K., ... Acheampong, E. (2020). Association of MYH9 rs3752462 polymorphism with chronic kidney disease. *Clinical Hypertension*, 26(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s40885-020-00148-w>
- Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2020). Type II restriction endonucleases—A historical perspective and more. *Nucleic Acids Research*, 48(14), 7577–7598.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa476>
- Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., & Macelis, D. (2021). REBASE: A database for DNA restriction and modification—Enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D344–D349.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1046>
- Sinha, R., et al. (2020). PCR-RFLP: A tool for molecular genetic analysis. *Molecular Biology Reports*, 47(2), 1–10.
<https://doi.org/10.1007/s11033-019-05169-0>
- Suherman, Sopiah, P., & Ridwan, H. (2023). Literature review: Hubungan diabetes melitus dengan kejadian gagal ginjal kronik. *Jurnal Ilmiah Keperawatan*, 9(5), 639–644.
<https://doi.org/10.33023/jikep.v9i5.1634>
- Syurma, A., Ismail, S., & Bukhari, A. (2021). Terapi nutrisi pada nefropati diabetik. *Indonesian Journal of Clinical Nutrition Physician*, 4(1), 45–50.
<https://doi.org/10.54773/ijcnp.v4i1.55>
- Tarach, P. (2021). Application of polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR) in the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Acta Universitatis Lodzianae. Folia Biologica et Oecologica*, 17, 48–53. <https://doi.org/10.18778/1730-2366.16.14>
- Tavira, B., Coto, E., Gómez, J., Tranche, S., Miguélez, K., & Ortega, F. (2013). Association between a MYH9 polymorphism and renal function. *Gene*, 520(1), 73–76.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.02.024>
- Thomas, M. C., Brownlee, M., Susztak, K., et al. (2021). Diabetic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 7, 1–22.
<https://doi.org/10.1038/s41572-021-00259-0>
- Tuttle, K. R., et al. (2022). Diabetic kidney disease: A report from the ADA consensus conference. *Diabetes Care*, 45(12), 3075–3090. <https://doi.org/10.2337/dci22-0022>
- Wittmeier, P., & Hummel, S. (2022). Benchmark agarose gel electrophoresis to assess PCR product yield. *BioTechniques*, 72(4), 8–11.
<https://doi.org/10.2144/btn-2021-0094>
- Wilson, K., & Walker, J. (2010). *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (7th ed.). Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/CBO9780511841477>