

2017

Identifikasi Polimorfisme Gen Reduced Folate Carrier 1 (RFC) A80G pada Pasien Sumbing Bibir dengan Atau Tanpa Celah Langitan Non Sindrom di Sumatera Utara

Febrianto, Budi Yulhasfi

Universitas Sumatera Utara

<http://repositori.usu.ac.id/handle/123456789/19594>

Downloaded from Repositori Institusi USU, Universitas Sumatera Utara

**IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN *REDUCED FOLATE CARRIER1 (RFC1) A80G* PADA PASIEN SUMBING CELAHAN NON SINDROM
DI SUMATERA UTARA**

TESIS

Oleh

BUDI YULHASFI FEBRIANTO

XXXXXX



**PROGRAM MAGISTER KEDOKTERAN ILMU BEDAH
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SUMATERA UTARA
MEDAN
2017**

**IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN *REDUCED FOLATE CARRIER1* (RFC1) A80G PADA PASIEN SUMBING CELAHAN NON SINDROM
DI SUMATERA UTARA**

TESIS

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Magister Kedokteran Ilmu Bedah dalam Program Magister Kedokteran Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara

Oleh

BUDI YULHASFI FEBRIANTO

XXXXXX

**PROGRAM MAGISTER KEDOKTERAN ILMU BEDAH
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS SUMATERA UTARA
MEDAN
2017**

Judul Tesis : IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN REDUCED FOLATE CARRIER 1 (RFC) A80G PADA PASIEN SUMBING BIBIR DENGAN ATAU TANPA CELAH LANGITAN NON SINDROM DI SUMATERA UTARA

Nama Peneliti : Budi Yulhasfi Febrianto
NIM : 117041046
Program Studi : Magister Kedokteran Klinik
Kategori : Bedah Plastik

**Menyetujui,
Komisi Pembimbing**

(dr. Frank Bietra Buchari, SpBP-RE(K)) (dr. Utama AbdiTarigan, SpBP RE(K))
Ketua Anggota

Ketua Program Studi

Dekan

Dr. dr. Rodiah R. Lubis, MKed(Oph), SpM(K)
NIP. 19760417 200501 2 002

Dr. dr. Aldy Safruddin Rambe, Sp.S(K)
NIP. 19660524 199203 1 002

Tanggal Lulus: September 2017

Telah diuji pada
Tanggal: September 2017

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : dr. Frank Bietra Buchari, Sp.BP-RE(K)
Anggota : 1. dr. Utama Abdi Tarigan, SpBP-RE(K)
2. dr. Liberty Sirait, SpB -KBD
3. dr. Adi Muradi, Sp.B-KBD
4. dr. Pimpin Utama Pohan, Sp.B (K)Onk

PERNYATAAN

Judul Tesis

“IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN REDUCED FOLATE CARRIER 1 (RFC) A80 PADA PASIEN SUMBING BIBIR DENGAN ATAU TANPA CELAH LANGITAN NONSINDROM DI SUMATERA UTARA”

Dengan ini penulis menyatakan bahwa tesis ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh gelar Magister Kedokteran Ilmu Bedah pada Program Studi Magister Kedokteran Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara adalah benar merupakan hasil karya penulis sendiri.

Adapun pengutipan-pengutipan yang penulis lakukan pada bagian-bagian tertentu dari hasil karya orang lain dalam penulisan tesis ini, telah penulis cantumkan sumbernya secara jelas sesuai dengan norma, kaidah, dan etika penulisan ilmiah.

Apabila di kemudian hari ternyata ditemukan seluruh atau sebagian disertasi ini bukan hasil karya penulis sendiri atau adanya plagiat dalam bagian-bagian tertentu, penulis bersedia menerima sanksi pencabutan gelar akademik yang penulis sandang dan sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundangan yang berlaku.

Medan, Oktober 2017

Penulis,

Budi Yulhasfi Febrianto

“IDENTIFIKASI POLIMORFISME GEN *REDUCED FOLATE CARRIER 1 (RFC) A80* PADA PASIEN SUMBING BIBIR DENGAN ATAU TANPA CELAH LANGITAN NONSINDROM DI SUMATERA UTARA”

ABSTRAK

Bibir sumbing merupakan kelainan kongenital paling sering kedua di Indonesia setelah Sindrom Down dengan prevalensi pada anak usia 24-59 bulan. Etiologi bibir sumbing non sindromik dengan atau tanpa celah langit-langit belum didefinisikan. Beberapa penelitian telah menyelidiki keterlibatan faktor genetik dan lingkungan. Beberapa gen yang terlibat dalam metabolisme folat baru-baru ini diperiksa untuk menemukan faktor genetik pada etiologi bibir sumbing. Protein Reduced Folate Carrier 1 (RFC1) tidak terlibat langsung dalam metabolisme asam folat namun berperan penting dalam transport intraselular metabolit aktif 5-methyltetrahydrofolate (MTHF) dan mempertahankan konsentrasi folat intraselular. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi polimorfisme pada Reduced Folate Carrier 1 (RFC1) pada pasien bibir sumbing non sindromik dengan atau tanpa celah langit-langit di Sumatera Utara. Sebanyak 46 pasien bibir sumbing tanpa sumbing langit-langit berpartisipasi dalam penelitian deskriptif ini. DNA subjek diambil dari leukosit perifer pasien yang diikuti dengan prosedur genotip pada gen RFC1 A80G dengan menggunakan Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Distribusi genotipe kelompok subjek mengikuti Hardy-Weinberg Equilibrium. Frekuensi genotipe mutan (AG + GG) dari kelompok subjek adalah 63% (29/46). Penelitian ini menegaskan hipotesis bahwa varian mutan RFC1 A80G memiliki proporsi yang lebih besar pada pasien bibir sumbing non sindromik dengan atau tanpa celah langit-langit di Sumatera Utara.

Kata kunci: NSCLP, RFC1, polimorfisme, asam folat

***THE IDENTIFICATION OF REDUCE FOLAT CARIER 1 GENE
POLYMORPHISM A80G ON NON SYNDROMIC CLEFT LIP
WITH OR WITHOUT PALATE IN SUMATERA UTARA,
INDONESIA***

ABSTRACT

Cleft lip is the second most frequent congenital anomalies in Indonesia after Down Syndrome with the prevalence among children aged 24-59 months. The etiology of non syndromic cleft lip with or without cleft palate has not yet been defined. Some studies have investigated the involvement of genetic and environmental factors. Some genes involved in the folate metabolism have been recently examined in order to discover the genetic factors in the cleft lip etiology. Reduced Folate Carrier 1 (RFC1) protein is not directly involved in the folic acid metabolism but plays a significant role in the intracellular transport of metabolically active 5-methyltetrahydrofolate (MTHF) and maintains the intracellular concentrations of folate. This research intends to identify polymorphism in the Reduced Folate Carrier 1 (RFC1) in the patients of non syndromic cleft lip with or without cleft palate in Sumatera Utara. A number of 46 patients of cleft lip without cleft palate participated in this descriptive study. Subjects' DNAs were extracted from the patients' peripheral leukocytes followed by genotyping procedure on RFC1 A80G gene using Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Genotype distributions of the subject groups followed Hardy-Weinberg Equilibrium. The mutant genotype frequency (AG+GG) of the subject groups was 63% (29/46). This research confirms the hypothesis that RFC1 A80G mutant variant holds a greater proportion in the patients of non syndromic cleft lip with or without cleft palate in Sumatera Utara

Keywords: NSCLP, RFC1, polymorphism, folic acid

KATA PENGANTAR

Penulis mengucapkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan berkah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.

Selama melakukan penelitian dan penulisan tesis ini, Penulis banyak memperoleh bantuan moril dan materil dari berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang tulus kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Runtung, S.H., M.Hum selaku Rektor Universitas Sumatera Utara.
2. Bapak Dr. dr. Aldy Safruddin Rambe, Sp.S(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
3. Ibu Dr. dr. Rodiah R. Lubis, M.Ked(Oph), SpM(K) selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Kedokteran Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
4. Bapak dr. Frank Bietra Buchari, Sp.BP-RE(K) selaku Ketua Komisi Pembimbing yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam penulisan tesis ini.
5. Bapak dr. Utama Abdi Tarigan, SpBP-RE(K) selaku Anggota Komisi Pembimbing yang telah membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan penulisan tesis ini.
6. Bapak dr. Liberty Sirait, SpB -KBD , Bapak dr. Adi Muradi, Sp.B-KBD dan Bapak dr. Pimpin Utama Pohan, Sp.B (K)Onk selaku Komisi Pembimbing atas saran dan kritik yang diberikan.
7. Bapak Prof. dr. Aznan Lelo, PhD, SpFK, yang telah membimbing, membantu dan meluangkan waktu dalam mengajarkan statistika dari tulisan tugas akhir ini.
8. Bapak dr. Hidayat, M.Biomed yang telah banyak memberikan masukan dan bimbingan terutama dalam bidang Biomolekuler penulisan tesis ini.
9. Kedua orang tua, terima kasih yang sebesar-besarnya yang telah membesarkan dan mendidik saya sejak kecil hingga sekarang dan selalu mengiringi dengan doa dan dukungan selama menjalani pendidikan selama ini. Terima kasih juga kepada istri tercinta dr. Dita Hasni, M.Biomed beserta putri kecil saya Hikari Yumna yang senantiasa mendukung dan membantu dalam menyukseskan pendidikan di program studi ilmu bedah FK USU.

10. Rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada seluruh guru bedah yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, di lingkungan RSUP H. Adam Malik, RSUD Pirngadi Medan dan semua tempat yang mengajarkan ketrampilan bedah pada diri saya. Semua telah tanpa pamrih memberikan bimbingan, koreksi dan saran kepada penulis selama mengikuti program pendidikan ini.
11. Rasa terima kasih juga saya sampaikan kepada perawat dan staff RS Accuplast Medan beserta staff Laboratorium Penelitian Terpadu FK USU yang telah banyak membantu saya dalam pengerjaan penelitian ini.
12. Para senior,sejawatpeserta program studi Ilmu Bedah serta junior; khususnya dr. M. Ishaq Porkas,yang bersama-sama menjalani suka duka selama pendidikan serta membantu dalam pengerjaan tugas ini.
13. Para pegawai di lingkungan Departemen Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara dan tenaga kesehatan yang berbaaur berbagi pekerjaan memberikan pelayanan.

Penulis menyadari tesis ini masih banyak memiliki kekurangan dan jauh dari sempurna.Namun harapan penulis semoga tesis ini bermanfaat kepada seluruh pembaca.Semoga kiranya Tuhan Yang Maha Esa memberkati kita semua.Amin.

Medan, Oktober 2017
Penulis,

Budi Yulhasfi Febrianto.

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI	i
DAFTAR TABEL	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR LAMPIRAN	v
DAFTAR SINGKATAN	vi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan umum	4
1.3.2 Tujuan khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Etiologi Sumbing Bibirdengan atau Tanpa Celah Langitan.....	5
2.2 Fungsi dan Metabolisme Asam Folat	6
2.3 Polimorfisme RFC1 A80G(rs1051266)	11
2.4 Kerangka Teori.....	13
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	15
3.1 Jenis Penelitian	15
3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	15
3.2.1 Lokasi	15
3.2.2 Waktu	15
3.3 Populasi Penelitian	15
3.3.1 Populasi Target.....	15
3.3.2 Populasi Terjangkau	15
3.4 Kriteria Subyek Penelitian.....	15
3.4.1 Kriteria Inklusi	15
3.4.2 Kriteria Eksklusi.....	16
3.5 Besar sampel.....	16
3.6 Cara Pengambilan Sampel.....	16
3.7 Defenisi Operasional	17
3.8 Pelaksanaan Penelitian	17
3.9 Prosedur Penyimpanan dan Pengiriman Sampel.....	17
3.10 Prosedur Pemeriksaan	18
3.10.1 Prosedur Isolasi DNA	18
3.10.2 Proses <i>Genotyping</i> RFC1 A80G	20
3.11 Kerangka Operasional.....	23
3.12 Penyajian Data.....	24
3.13 Keluaran Statistik	24
3.14 Jadwal Penelitian	24

BAB IV HASIL PENELITIAN.....	25
4.1 Hasil	25
4.1.1 Karakteristik Subjek Penelitian.....	25
4.1.2 Polimorfisme RFC -1	28
BAB V PEMBAHASAN	31
BAB VI SIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Simpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN.....	39
Lampiran 5.....	44
Anggaran Dana	44

DAFTAR TABEL

No	Judul	Halaman
3.1	Defenisi Operasional Pada Penelitian Identifikasi Polimorfisme RFC1 A80G Pada Pasien Sumbing Bibir dengan atau tanpa celah langit non sindrom di Sumatera Utara.....	17
3.2	<i>Dummy Table</i> frekuensi Varian Genotip dan Alel RFC1.....	24
4.1	Distribusi Subjek Berdasarkan klasifikasi sumbing bibir.....	25
4.2	Distribusi Jenis Kelamin Pada Subjek Penelitian.....	26
4.3	Perbandingan Proporsi diagnosis pasien sumbing bibir antar Jenis Kelamin	26
4.4	Distribusi Subjek Penelitian berdasarkan suku	27
4.5	Distribusi Subjek Berdasarkan Diagnosis	27
4.6	Distribusi Variant Genotype RFC1 A80G pada subjek penelitian.....	29
4.7	Distribusi Klasifikasi Polimorfisme RFC1 pada subjek penelitian	29
4.8	Frekuensi Alel RFC1 A80G pada pasien bibir sumbing	29

DAFTAR GAMBAR

No	Judul	Halaman
2.1	Jalur Metabolisme Folat dan Homosistein.....	11
2.2	Keterangan Kerangka Teori Identifikasi Polimorfisme RFC1 pada Pasien Sumbing Bibir dengan atau tanpa CelahLangitan non sindrom.....	14
4.1	Hasil Elektroforesis Produk PCR-RFLP Analisa SNP RFC-1 yang direstriksi oleh enzim HaeII dari masing-masing subjek.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

No	Judul	Halaman
1	Penjelasan Tentang Penelitian Kepada Awam.....	39
2	Surat Persetujuan Ikut Penelitian	41
3	Lembar Isian Data Penelitian.	42

DAFTAR SINGKATAN

5,10-MTHF	=N5,N10-ethylenetetrahydrofolate (
BHMT	= Enzim Betain-Homosistein Methyltransferase
CBS	= Cystathionine sintase
CSE	= Cystathionine glyase
DHF	= D
DHFR	= D reductase
dTMP	= D
dUMP	=
FOLT	= Folat Transporter
GSH	= Glutathione
H27R	= Perubahan asam amino pada kodon 27 dari histidine menjadi arginine
Hcy	= Homosistein
MAT	= Methionine Adenosyltransferase
Met	= Methionin
MTHF	= M
MTRR	= M
RFC 1 G80A	= Substitusi nukleotida guanine menjadi adenin pada urutan nukleotida 80 gene reduce folate carier 1
RFC1	= 1
RFC1(A/A)	= Variant genotype tipe Adenine adenine
RFC1 (A/G)	= Variant genotype tipe Adenine Guanine
RFC1 (G/G)	= Variant genotype tipe Guanin-guanin
RFC1 A80G	= Substitusi nukleotida guanine menjadi adenin pada urutan nukleotida 80 gene reduce folate carier 1
SAH	= A
SAM	= S-Adenosylmethionine
SHMT	=
SLC19A1	= GeneHuman Solute Carrier family 19, member 1
THF	= T
TYMS	= T

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sumbing bibir merupakan kelainan kongenital yang paling sering terjadi dengan prevalensi 1,7 per 1000 kelahiran anak hidup (Little *et al.*, 2008) dan di Indonesia termasuk kelainan kongenital ke-2 tersering setelah sindrom Down dengan prevalensi sumbing bibir pada anak umur 24-59 bulan adalah 0,8 per 1000 anak (Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, 2013)

Sumbing bibir terbagi menjadi 2 kelompok besar yaitu sumbing bibir dengan atau tanpa celah palatum dan celah palatum saja. Selanjutnya dapat dibagi menjadi kelompok sumbing bibir celah langit non sindrom (tidak ada hubungan dengan malformasi lainnya), sumbing bibir celah langit dengan sindrom (merupakan bagian dari sindrom yang telah dikenal) dan sumbing bibir celah langit dengan *multiple defect* yang tidak termasuk sebagai sindrom yang dikenal. Pierre Robin Sequence (PRS) secara klinis mengelompokkan celah palatum dengan kombinasi mikrognathia, celah palatum bentuk U posterior dan glossoptosis. (Chango, Emery-Fillon, *et al.*, 2000) Celah palatum pada PRS merupakan hasil perkembangan abnormal struktur rahang bawah dengan celah palatum terjadi sebagai efek sekunder hambatan fisik dari penyatuan palatal dari lidah embrionik diretroposisi. Semua individu dengan bibir sumbing tipe apapun membutuhkan penatalaksanaan multidisiplin dari lahir sampai dewasa. Penderita dan keluarganya bisa mengalami efek psikologis. Oleh karena itu menjadi

penting untuk mengetahui etiologinya agar dapat dilakukan pencegahan primer.(Mills *et al.*, 2008)

Etiologi sumbing bibir celah langit non sindrom masih belum bisa didefinisikan, beberapa penelitian telah menyelidiki adanya keterlibatan factor genetic dan lingkungan.(Blanton *et al.*, 2011; Wehby & Murray, 2011) Penelitian sebelumnya menemukan adanya hubungan antara pemberian suplementasi asam folat selama awal kehamilan ($\geq 0.4\text{mg/hari}$) dengan penurunan risiko kejadian sumbing bibir (odds ratio 0.61, dan Indeks Kepercayaan 95% 0.39 - 0.96). (Wilcox *et al.*, 2007) Pada penelitian lainnya dilakukan *double blinded Randomized clinical trial* pemberian asam folat 0,4 mg dan 4 mg pada perempuan sebelum hamil sampai trimester pertama dan ditemukan penurunan kejadian sumbing bibir. (Wehby *et al.*, 2013) Hasil yang berbeda ditemukan di *United Kingdom* bahwa tidak ada hubungan antara konsumsi dan suplementasi asam folat dengan insidensi sumbing bibir.(Little *et al.*, 2008)

Perbedaan hasil temuan tersebut bisa dipengaruhi proses metabolisme folat yang meliputi absorpsi, transportasi, modifikasi dan interkonversi folat. Beberapa gen yang terlibat pada metabolisme folat telah diteliti untuk mencari keterlibatan gen pada etiologi sumbing bibir. Protein *Reduced Folate Carrier*(RFC) tidak terlibat secara langsung pada metabolisme folat tetapi berperan penting pada transport intraseluler metabolit aktif 5-methyltetrahydrofolate dan menjaga konsentrasi folat intraseluler. Protein ini dikenal juga sebagai *Folate Transporter* (FOLT) dan dikodekan oleh gen *human solute carrier family 19, member 1* (SLC19A1) atau RFC1 yang dipetakan pada akhir lengan panjang kromosom 21 (21q22.2–q22.3).(Sook Wah Yee *et al.*, 2010)

Polimorfisme pada gen RFC1 (SLC19A1) telah diidentifikasi, yaitu terjadi substitusi adenin menjadi guanin pada nukleotida 80 (A80G) sehingga terjadi perubahan asam amino pada kodon 27 dari histidin menjadi arginin (H27R; rs1051266). (Coppedè *et al.*, 2013) Pada beberapa penelitian ditemukan RFC1 Alel G mengatur transportasi folat dalam sel darah merah secara negative, sehingga menimbulkan kadar folat plasma yang lebih rendah dan tingkahomocysteine yang tinggi. Kondisi ini ditemukan pada individu dengan dua salinan dari 80G alel 80G G. (Chango, Emery-Fillon, *et al.*, 2000; Stanisławska-Sachadyn *et al.*, 2009) Beberapa penelitian telah menemukan bahwa polimorfisme A80G RFC1 terkait dengan kerentanan kelainan kongenital seperti spina bifida, sumbing bibir dan cacat jantung bawaan. (Biselli *et al.*, 2008; Pei *et al.*, 2006; Vieira *et al.*, 2008)

sumbing bibirlgangguan, yang salah satunya berupa konseling genetik. Saat ini belum ada data penelitian di Indonesia dan khususnya Sumatera Utara yang membahas identifikasi gen RFC1 pada kejadian sumbing bibir, sehingga diperlukan penelitian awal tentang ini.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah diatas maka dapat dirumuskan masalah penelitian ini sebagai berikut : Bagaimana gambaran polimorfisme gen *ReducedFolate Carrier1* (RFC1) A80G pada pasien sumbing bibir celah langit non sindrom di Sumatera Utara?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi polimorfisme gen *ReducedFolate Carrier1* (RFC1) A80G pada pasien sumbing bibir celah langitan non sindrom di Sumatera Utara .

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengetahui karakteristik klinis dan demografis pasien sumbing bibir dengan atau tanpa celah langitan non sindrom di Medan, Sumatera Utara.
2. Mengetahui proporsi varian genotip RFC1(A/A) pada subjek penelitian.
3. Mengetahui proporsi varian genotip RFC1 (A/G) pada subjek penelitian.
4. Mengetahui proporsi varian genotip RFC1 (G/G) pada subjek penelitian.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dapat diperoleh dari penelitian ini adalah:

1. Memberi informasi mengenai karakteristik pasien sumbing bibir celah langitan non sindrom di Sumatera Utara.
2. Memberi informasi ilmiah mengenai gambaran polimorfisme RFC1 A80G pada pasien sumbing bibir celah langitan non sindrom di Sumatera Utara.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Etiologi Bibir Sumbing Celahan

Bibir sumbing bibirtcelah merupakan kelainan kongenital urutan ke-2 yang sering terjadi setelah sindrom Down menurut data Riset Kesehatan Dasar 2013. Hal ini dapat disebabkan oleh kompleks genetic dan *environmental*. Bibir sumbing bibirtcelah terbagi dua yaitu Bibir sumbing sumbing bibirtcelah non sindrom dan Bibir sumbing sumbing bibirtcelah dengan sindrom bibir sumbing., dengan perbandingan 70:30. (Hopper *et al.*, 2007)

Prevalensi sumbing bibir berbeda di setiap wilayah dunia, tergantung etnis, negara, dan status sosial ekonomi. Secara umum kasus sumbing bibir yang sering ditemukan adalah Bibir sumbing sumbing bibir tanpa celah langit dapat dialami 1 dalam 500 kelahiran pada populasi Asia dan Indian-Amerika Utara, intermediate pada populasi Kaukasia (1=1000) dan terendah pada populasi Afrika (1=2500). (Bhaskar *et al.*, 2011; Wehby & Murray, 2011) Prevalensi sumbing bibir di Indonesia menurut data Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) 2013 adalah 0,08 % dengan Sumatera Utara memiliki prevalensi 0,07%. (Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, 2013) Data dari salah satu rumah sakit swasta di Medan didapatkan sebanyak 102 pasien sumbing bibir selama tahun 2016. (Rekam Medis RS Accuplast, 2017)

Bibir sumbing bibirtcelah merupakan hasil akhir yang kompleks dari factor genetic dan environment. Pada manusia, terdapat tahapan ekspresi gen, migrasi sel, transformasi sel, dan apoptosis antara hari ke-14

sampai 60 pasca konsepsi yang membentuk jaringan lunak keras dan wajah dari membran *oropharyngeal*. Pada hari ke-48 bibir atas bersambung dan pada hari ke-60 terjadi penyatuan palatum melengkapi proses embryogenesis wajah. (Wehby & Murray, 2011) Gangguan pada salah satu komponen yang meregulasi proses tersebut baik akibat faktor genetik ataupun lingkungan dapat menjadi predisposisi insidensi bibir sumbing dengan atau tanpa celah langit-langit. (Sook Wah Yee *et al.*, 2010)

Beberapa penelitian epidemiologi menemukan bahwa risiko bibir sumbing dengan celah langit-langit dapat diturunkan dengan konsumsi ≥ 0.4 mg asam folat setiap hari. (Wehby *et al.*, 2013; Wilcox *et al.*, 2007) Namun hasil yang berbeda ditemukan di *United Kingdom* bahwa tidak ada hubungan antara konsumsi dan suplementasi asam folat dengan insidensi bibir sumbing. (Little *et al.*, 2008)

Hal ini mengindikasikan rendahnya kadar asam folat yang merupakan faktor predisposisi insidensi bibir sumbing dengan celah langit-langit tidak hanya dipengaruhi asupan ataupun suplementasi asam folat bisa juga pada proses metabolisme asam folat. (Biselli *et al.*, 2008)

2.2 Metabolisme Fungsi dan Asam Folat

Folat berasal dari bahasa Latin yaitu *folium*, yang berarti daun sayuran dan terdiri dari 3 bagian. Grup pteridin yang berikatan dengan asam para amino benzoat (PABA) yang disebut asam pteroyl, kemudian bergabung dengan asam glutamat membentuk asam pteroyl glutamat atau asam folat, yang bersifat larut air dan terurai dengan cepat saat terkena cahaya. Asam folat diserap dengan cepat di jejunum bagian proksimal. Dalam darah, asam folat diangkut oleh beta globulin, yang kemudian ditangkap oleh sel hati dimana terbentuk koenzim. (Lucock, 2000)

Asam folat tidak disimpan dalam jaringan. Defisiensi asam folat dapat disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya : kehamilan, gangguan penyerapan pada saluran cerna, pemakaian obat-obatan anti konvulsif yang dapat menghambat enzim intestinal, anemia hemolitik, kurangnya asupan asam folat, dan defisiensi vitamin B12. Akibat dari defisiensi asam folat dapat mengakibatkan terganggunya sintesis DNA, anemia makrositik, homosisteinemia, cacat saat lahir dan kanker.(Vasudevan *et al.*, 2013)

Kadar asam folat normal dalam plasma darah adalah 20 nanogram/ ml dan sekitar 200 mikrogram/ml berada intrasel.Sumber asam folat terbanyak berasal dari ragi dan daun sayuran yang berwarna hijau.Kebutuhan folat harian adalah 200 mikrogram dan meningkat pada saat kehamilan menjadi 400 mikrogram dan saat laktasi 300 mikrogram. Dosis yang melebihi 1 mg dapat menyebabkan kerusakan saraf karena akan menyebabkan penggumpalan vitamin B12, serta berisiko terjadi kerusakan ginjal.(Murray *et al.*, 2000; Vasudevan *et al.*, 2013)

Folat merupakan cofactor dan co-substrat yang diperlukan untuk sintesis methionine dan *S-adenosylmethionine* (SAM) untuk reaksi metilasi esensial termasuk metilasi DNA dan menyediakan satu gugus karbon untuk sintesis basa DNA guanin, adenin dan timin dan juga berperan sebagai molekul pengatur(Wehby & Murray, 2011)*Tetrahydrofolate* (THF) dan turunannya merupakan bentuk biologis aktif dari asam folat dan berperan sebagai cosubstrat khusus untuk beberapa enzim yang terlibat pada proses metabolisme.(Vieira *et al.*, 2005)

Sebagian besar turunan folat yang termetilasi *N*¹⁰-*formyltetrahydrofolate* and *N*⁵,*N*¹⁰-*ethylenetetrahydrofolate* (5,10-MTHF) – merupakan kelompok donor karbon untuk sintesa nukleotida. *N*⁵- *methyltetrahydrofolate* (5-MTHF) merupakan turunan asam folat aktif lainnya yang diproduksi oleh 5,10-MTHF oleh *methylenetetrahydrofolate*.(MTHFR).(Mills *et al.*, 2008)5-MTHF bekerja bersama vitamin B12 (*methylcobalamin*) pada proses konversi homosistein (Hcy) menjadi *methionine* (Met) yang menyediakan kelompok metil untuk sejumlah reaksi biokimia di tubuh. Reaksi ini di katalisis oleh *methioninesintase*. Aktifitas *methioninesintase* sangat penting dalam mempertahankan kecukupan kadar *methionine* dan untuk mencegah akumulasi homosistein. Aktifitas *methioninesintase* bergantung pada protein kedua yaitu *methioninesintasereductase*, enzim yang menjaga ikatan kobalamin dengan *methioninesynthase* dalam keadaan aktif. Ketika kobalamin mengalami oksidasi, *methioninesintasereductase* mengkatalisis produk metilasi reduktifnya menggunakan *S-adenosylmethionine* sebagai donor metil untuk regenerasi *methylcobalamin*.

Methionine merupakan asam amino esensial yang dimetabolisme menjadi *S-adenosylmethionine* (SAM) oleh enzim *methionineadenosyltransferase* (MAT). SAM merupakan donor metil biologis utama pada berbagai reaksi transmetilasi, setelah kehilangan kelompok metil, SAM dikonversi menjadi *S-adenosylhomocystein* (SAH).(Sukla & Raman, 2012)

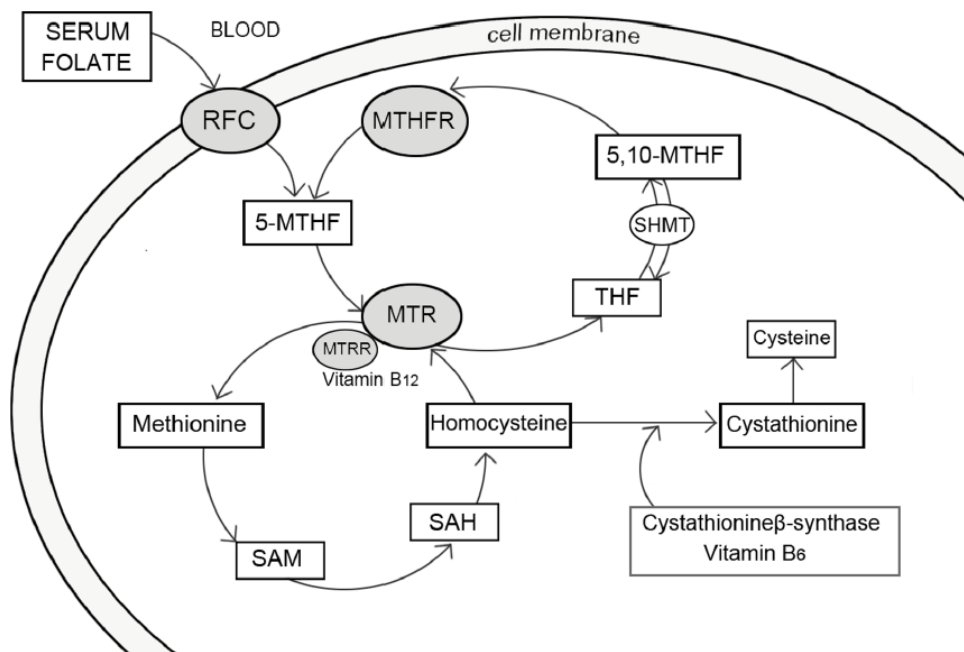
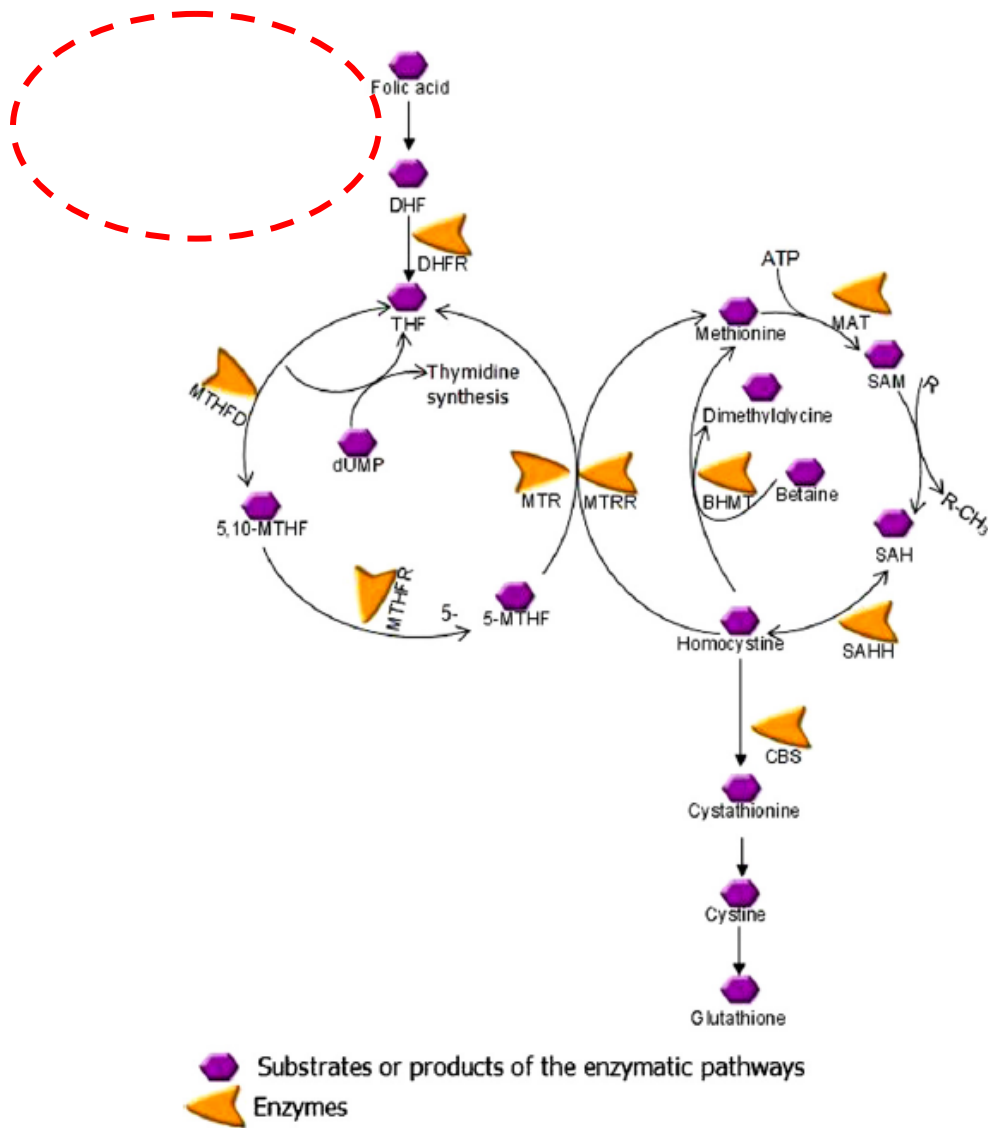
Pada kondisi fisiologis normal, SAH dihidrolisis oleh SAH hidrolase menjadi homosistein (Hcy) dan adenosin. selain itu Hidrolisis SAH bergantung pada efisiensi pembuangan homosistein (Hcy) melalui remetilasi menjadi

methionine atau degradasi menjadi sistein, tetapi konstans equilibrium dari SAH hidrolasememungkinkan sintesis SAH lebih aktif daripada hidrolisis. Pembuangan Homosistein (Hcy) permanen dari siklus *methionine* terjadi melalui jalur satu arah transsulfurasi yang melibatkan dua buah enzim yang bergantung vitamin B6 yaitu *cystathionine sintase* (CBS) dan *cystathionine glyase* (CSE).(Van Rooij *et al.*, 2003)

Enzim *cystathionine sintase* (CBS) menggabungkan homosistein (Hcy) dengan serin menjadi bentuk *cystathionine* dan selanjutnya enzim *cystathionine glyase* (CSE) mengkonversi *cystathionine* menjadi *cysteine* dan *a-ketobutyrate*. *Cystein* (Cys) merupakan prekursor beberapa metabolit penting termasuk biosintesis *glutathione* (GSH).

Defisiensi folat dan abnormalitas pada fungsi enzim yang memetabolisme homosistein akan meningkatkan kadar homosistein didalam sel. Pada kondisi normal kadar homosistein dalam darah berkisar 4,0 sampai 11,7 mmol/L sedangkan pada beberapa kelainan kongenital kadar homosistein darah melebihi 16 mmol/L. Peningkatan kadar homosistein akan menimbulkan produksi betain yang dapat digunakan sebagai donor group metil untuk sintesa *methionine*.

Enzim *betaine-homosisteine methyltransferase* (BHMT) mengkatalisis konversi betain dan homosistein menjadi *dimethylglysine* dan *methionine*. BHMT berperan penting pada regulasi metabolisme *methionine* karena menjaga konsentrasi *methionine* hepatic selama periode pengambilan folat inadkuat dan pembuangan homosistein yang terlalu banyak.(Yee *et al.*, 2010)



, – Gambar 2.1 Jalur Metabolisme Folat dan Homosistein (Zhang *et al.*, 2013)

2.3 Polimorfisme RFC1 A80G(rs1051266)

Folat mengalami metabolisme yang terdiri dari proses absorpsi, modifikasi, transportasi dan interkonversi. Salah satu gangguan pada proses metabolisme tersebut dapat menurunkan kadar folat didalam darah dan memiliki dampak klinis kejadian bibir sumbingcelah langitan. Salah satu protein yang berperan penting dalam proses metabolisme folat adalah protein *Reduced Folate Carrier 1* (RFC1) A80G yang berperan pada transporter 2 arah *5-methyltetrahydrofolate* dan *thiamine monophosphate* kedalam intraseluler dan sel darah merah dan menjaga homeostasis folat pada saat terjadi *down regulation* pada respons defisiensi folat. Protein RFC1 yang dikenal juga sebagai *Folate Transporter* (FOLT) dikode oleh gen *human solute carrier family 19, member 1* (SLC19A1) atau disebut juga gen RFC1 dipetakan yang pada akhir lengan panjang kromosom 21 (21q22.2–q22.3) (Yee *et al.*, 2010)

Gen SLC19A1 bersifat polimorfik pada manusia. Pengaruh polimorfisme gen SLC19A1 telah dipelajari secara luas pada beberapa kondisi klinis yang melibatkan jalur metabolisme, sintesis, dan transport asam folat

1. SLC19A1= Arg27His; 80A>G (rs1051266)
2. SLC19A1= 5'-UTR variant, -43T>C, (rs1131596)
3. SLC19A1= Pro232Pro; 6318C>T (rs12659)
4. SLC19A1= 3'-UTR; 2606G>T (rs1051296)
5. SLC19A1= 3'UTR, 2522C>T (rs1051298)

Salah satu varian yang banyak diteliti adalah Polimorfisme gen SLC19A1 atau gen RFC1 A80G(rs1051266) yang merupakan polimorfisme non

sinonim pada exon 2 yang menimbulkan substitusi histidin menjadi arginin pada kodon 27 di urutan protein. Estimasi frekuensi genotip pada populasi Kaukasia GG=29%,GA= 47,3%, AA= 23,7%. Frekuensi alel A pada Kaukasia 47,3% , 56,4% pada Afrika-Amerika, dan 47,2% pada populasi Hispanik.

Polimorfisme gen ini banyak diteliti karena fungsinya sebagai transporter serapan folat dan hubungannya dengan risiko penyakit. Pada beberapa penelitian hubungan polimorfisme RFC1 A80G dengan kadar asam folat ditemukan individu dengan genotip homozigot AA memiliki kadar folat intrasel yang lebih tinggi dibandingkan individu yang membawa alel G, (Chango, Emery-fillon, *et al.*, 2000) tetapi hubungan ini tidak ditemukan pada penelitian lainnya.(Devlin *et al.*, 2006)Salah satu penelitian mengamati hubungan RFC1 A80G dan kadar folat didalam sel darah merah dan ditemukan hubungannya tampak lebih besar pada wanita dibandingkan pria.(Stanisławska-Sachadyn *et al.*, 2009)

Hubungan antara polimorfisme RFC1 A80G dengan insidensi kelainan kongenital diteliti karena asam folat mempunyai peranan penting dalam menurunkan kejadian kelainan kongenital seperti spina bifida, sumbing bibir, dan kelainan jantung. Salah satu penelitian di Italia menunjukkan bahwa frekuensi alel G dari polimorfisme A80G lebih banyak ditemukan pada anak dengan spina bifida.(De Marco *et al.*, 2001) Penelitian lain menemukan adanya hubungan antara suplementasi folat perikonsepsional pada ibu dan risiko spina bifida pada anaknya berkaitan dengan polimorfisme genotip RFC1 A80G yang dimilikinya. Ditemukan bahwa anak yang memiliki genotip GG memiliki risiko yang lebih tinggi mengalami spina bifida dibandingkan dengan anak genotip AA jika ibunya

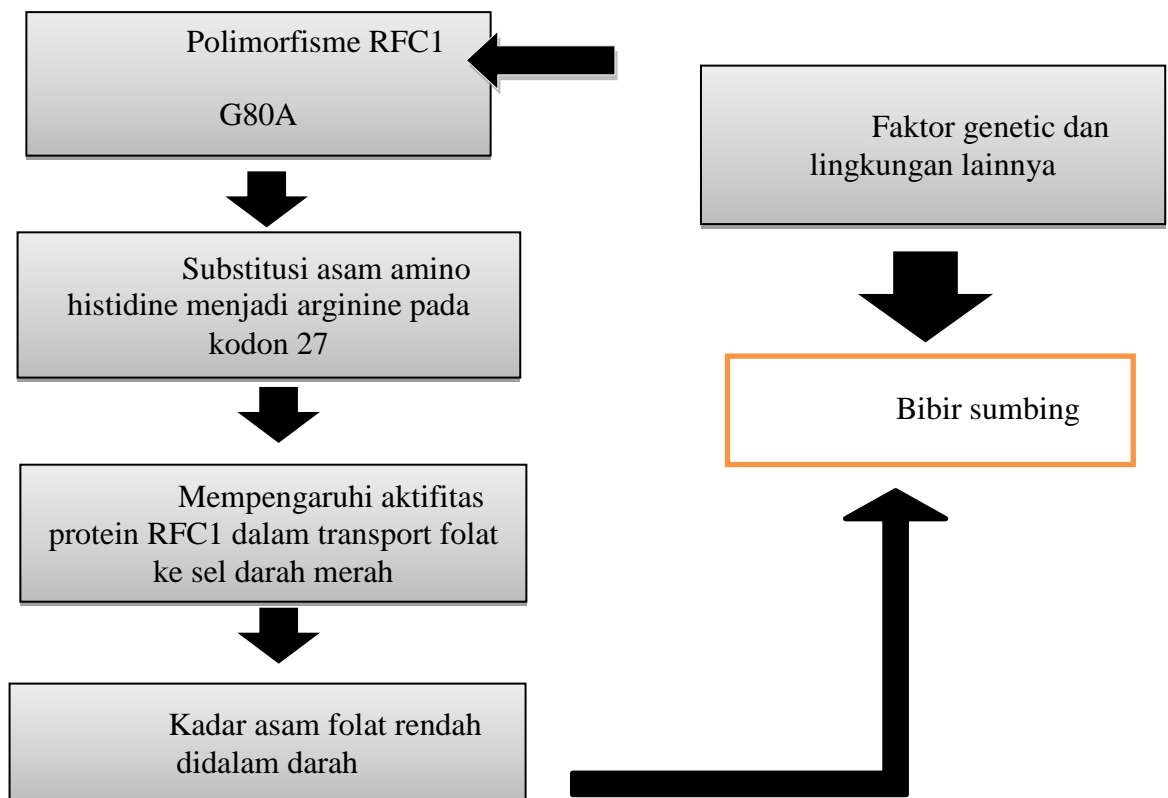
tidak mengkonsumsi folat selama masa perikonsepsi (OR=2.4).(Shaw *et al.*, 2002)

Hubungan polimorfisme RFC1 A80G dengan kelainan kongenital seperti penyakit jantung kongenital juga diteliti. Salah satu penelitian menunjukkan bahwa risiko kelainan jantung kongenital lebih tinggi pada anak dengan genotip GG (OR=4,03) dan GA (OR=4,14) dibandingkan dengan anak genotip AA.(Shaw *et al.*, 2002)

Pada penelitian yang dilakukan di India ditemukan anak dengan alel G berisiko lebih tinggi mengalami bibir sumbing celahlangitan non sindrom dibandingkan dengan anak alel A. (OR=1,4).(Lakkakula *et al.*, 2015)

2.4 Kerangka Teori

Berdasarkan dasar teori yang telah diuraikan, maka dikembangkan suatu kerangka teori yaitu :



Gambar 2.2 Keterangan Kerangka Teori Identifikasi Polimorfisme RFC1 pada Pasien Sumbing Bibir dengan atau tanpa Celah Langitan non sindrom

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat deskriptif, untuk mengidentifikasi polimorfisme gen *Reduced Folate Carrier 1* (RFC1) pada pasien sumbing bibir celah langitan non sindrom di Sumatera Utara

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.2.1 Lokasi

Pengambilan sampel dari subjek penelitian akan dilakukan di Rumah Sakit Umum Pusat H. Adam Malik, dan Rumah Sakit Swasta yang ada di kota Medan.

3.2.2 Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan selama 8 minggu.

3.3 Populasi Penelitian

3.3.1 Populasi Target

Penderita bibir sumbing bibir celah langitan non sindrom di Sumatera Utara.

3.3.2 Populasi Terjangkau

Penderita bibir sumbing celahlangitan yang dioperasi sumbing bibir pada pengabdian masyarakat FK USU, di Rumah Sakit Umum Pusat H. Adam Malik Medan sebagai rumah sakit pendidikan dan di rumah sakit jejaring di kota medan.

3.4 Kriteria Subyek Penelitian

Subyek penelitian diikutsertakan dan diseleksi sesuai kriteria inklusi dan eksklusi

3.4.1 Kriteria Inklusi

- Penderita Bibir Sumbingcelah langitan non sindrom
- Bersedia ikut serta dalam penelitian dan menandatangani *informed consent*

- Tidak ada riwayat keluarga kandung sumbing bibir dengan atau tanpa celah langit

3.4.2 Kriteria Eksklusi

Menderita Kelainan kongenital lainnya, seperti kelainan jantung bawaan, Sindrom Down dan spina bifida.

3.5 Besar sampel

Perhitungan besar sampel minimal dihitung dengan menggunakan rumus perhitungan sampel untuk penelitian deskriptif kategorik.

Dengan Rumus =

$$: n = \frac{Z\alpha^2 \times P \times Q}{d^2}$$

$Z\alpha$ = Deviat baku alfa → Kesalahan tipe I ditetapkan sebesar 5%, hipotesis dua arah, sehingga $Z\alpha = 1,96$.

P = Proporsi = Proporsi alel G pada kelompok sumbing bibir dengan atau tanpa celah langit non sindrom sebesar 0,35 (Lakkakula *et al.*, 2015)

$Q = 1 - P = 1 - 0,35 = 0,65$

d = presisi = kesalahan prediksi yang masih bisa diterima 17%

Dengan memasukkan nilai-nilai diatas pada rumus, diperoleh =

$$n = \frac{1,96^2 \times 0,35 \times 0,65}{0,17^2}$$

$n = 30,24 \approx 31$ sampel

Didapat jumlah sampel minimal yang diteliti adalah 31 orang.

3.6 Cara Pengambilan Sampel

Sampel diambil dengan cara konsekutif sampling sesuai kriteria inklusi dan eksklusi.

3.7 Defenisi Operasional

Tabel 3.1 Defenisi Operasional Pada Penelitian Identifikasi Polimorfisme RFC1 A80G Pada Pasien Sumbing Bibir dengan atau tanpa celahlangitan non sindrom di Sumatera Utara

No	Variabel	Defenisi Operasional	Skala
1	RFC 1 <i>Genotype</i> G/G	Suatu kondisi normal yang menunjukkan tidak adanya polimorfisme pada posisi nukleotida ke 80 gen RFC1 (<i>wild type</i>)	Nominal
2	RFC 1 <i>Genotype</i> A/G dan A/A	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP) pada posisi nukleotida ke 80 (substitusi Adenin menjadi Guanin) menghasilkan perubahan asam amino pada kodon 27 (Histidin→Arginin) pada RFC1	Nominal
3	Bibir Sumbingcelah langitan non sindrom	Pasien yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi kelompok kasus sumbing bibir	Nominal

3.8 Pelaksanaan Penelitian

Kepada semua subjek yang ikut dalam penelitian, sebelumnya dijelaskan tujuan, prosedur, manfaat, resiko sebagai subjek dalam penelitian dan perasaan yang tidak menyenangkan yang mungkin ada kepada keluarga yang bertanggungjawab akibat pelaksanaan prosedur penelitian (Lampiran 1). Semua subjek yang setuju ikut dalam penelitian, diminta menandatangani persetujuan secara tertulis untuk mengikuti penelitian (*Informed Consent*) seperti yang terdapat pada lampiran 2.

3.9 Prosedur Penyimpanan dan Pengiriman Sampel

Sampel darah sebanyak 3 ml (minimal 1 ml) diambil dari subjek penelitian dan disimpan pada tabung yang berisi antikoagulan *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) yang sesuai untuk pemeriksaan DNA.(Shabikhani *et al.*, 2014)Biasanya, mengumpulkan sampel darah diproses sesegera mungkin untuk menghindari penurunan *yield* biomolekul dan untuk meminimalkan potensi degradasi. Telah terbukti bahwa DNA dapat diekstraksi dengan hasil yang dapat diterima dan berkualitas dari sampel darah yang disimpan pada suhu kamar 4 ° C, dan pada -

20 ° C selama maksimal 1 bulan. Penyimpanan yang lama menyebabkan lisis eritrosit dan, dengan hemolisis yang parah, diperkirakan bahwa beberapa leukosit akan lisis juga, yang akan mengakibatkan hilangnya DNA selama tahap panen leukosit pada ekstraksi DNA. Typically, collected blood samples are processed as soon as possible to avoid any drop in biomolecule yield and to minimize potential degradation [16]. It has been shown that DNA can be extracted with acceptable yield and quality from blood samples that are stored at room temperature, 4°C, and at -20°C for a maximum of 1 month [56]. Prolonged storage causes lysis of the erythrocytes and, with severe hemolysis, it is expected that some of the leukocytes will have lysed as well, which will result in loss of DNA during the leukocyte harvesting step in DNA extraction [56]. In this

3.11 Prosedur0 Pemeriksaan

Diambil sampel darah dari semua subjek penelitian, kemudian diperiksa *genotyping* RFC1 A80G dengan prosedur PCR-RFLP. Lembar Isian Data Penelitian (Lampiran 3) digunakan untuk mengumpulkan data klinis dan demografi pasien

3.10.1 Prosedur Isolasi DNA

Bahan dan Alat=

1. Sarung tangan
2. pipet automatic 1000µL, 100µL.
3. tabung ependorf 1,5 ml
4. sentrifus
5. vortex,
6. kit ekstraksi DNA [theWizard® Genomic DNA purification Kit (Promega Corporation, USA)
7. tips steril berbagai ukuran
8. stopwatch
9. kulkas

10. kertas label
11. Pena tahan air.

Cara Kerja=

1. Dilakukan Pengkodean dan pelabelan pada tabung Ependorf tempat sampel darah.
2. Darah EDTA disentrifus 3000 rpm selama 15 menit.
3. Dilakukan pemisahan terhadap plasmanya, lalu diambil leukosit sebanyak 300 μ L dimasukkan ke tabung eppendorf 1,5 ml kemudian ditambah El Buffer 900 μ L, dibolak-balik secara perlahan.
4. Campuran tersebut diinkubasi selama 10 menit didalam kulkas lalu disentrifus pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit.
5. Setelah proses sentrifugasi selesai, supernatant dibuang dengan hati-hati agar endapan tidak ikut terbuang dan tahapan no 2-4 diulangi sampai 3x dan terlihat warna supernatan menjadi jernih dan endapan berwarna putih,
6. Setelah diperoleh endapan yang berwarna putih atau supernatan yang jernih, supernatan dibuang, dan endapan divortex selama 20 detik.
7. Ditambahkan 300 μ L *Nuclei Lysis Solution* dan dicampurkan dengan cara dibolak-balik.
8. Ditambahkan 100 μ L Protein Precipitation, dan divortex selama 20 detik.
9. Campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm pada suhu ruangan.
10. Setelah proses sentrifugasi, supernatan dipindahkan ke dalam tabung ependorf steril yang telah berisi 300 μ L isopropanolol, lalu dibolak-balik sampai terlihat benang-benang DNA.

11. Campuran disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit, dan akan terlihat endapan putih.
12. Supernatant dibuang dan ditambahkan etanol 70%
13. Disentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000 rpm selama 1 menit.
14. Setelah proses sentrifugasi selesai, etanol diaspirasikan menggunakan pipet dan dikeringkan selama 1 jam.
15. Jika sudah kering, ditambahkan 100 μ L DNA *Rehydration Solution* dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 1 malam. Setelah proses ini selesai DNA dapat disimpan di freezer pada suhu (- 20°C) sampai proses *genotyping* dilakukan.

3.10.2 Proses *Genotyping* RFC1 A80G

3.10.2.1 Proses *Polimerase Chain Reaction* (PCR)

Alat dan Bahan

1. Mesin PCR/Thermal cycler
2. Mikropipet
3. Mikrotube (tabung 1,5 ml)
4. Tip steril berbagai ukuran
5. mesin sentrifugasi
6. PCR mix [Go Taq® Green Master Mix (Promega,USA)]
7. DNA sampel
8. primer forward RFC1 = 5 - AGC GGT GGA GAA GCA GGT-3
9. primer reverse RFC1= 5 - GGA GGT AGG GGG TGA TGA AG-3
10. kertas label dan pena.

Cara Kerja

1. Dilakukan pelabelan pada mikrotubes sesuai dengan kode nomor sampel

2. Dibuat campuran untuk reaksi PCR dengan total volume 25 μ L untuk setiap sampel DNA yang terdiri 2 μ L DNA sampel, Master Mix 12,5 μ L, forward dan reverse primer masing-masing 1 μ L, dan Nuclease free water sebanyak 8,5 μ L.
3. Campuran reaksi PCR dimasukkan kedalam mesin PCR (Thermal cycler)
4. Gen RFC1 pada DNA sampel diamplifikasi dengan menggunakan mesin PCR (Thermal Cycler) dengan suhu denaturasi inisial 94°C selama 5 menit, diikuti 35 siklus denaturasi pada 94°C selama 30 detik, annealing pada 61°C selama 30 detik, dan elongasi pada 72°C selama 30 detik, dan tahap akhir pada suhu 72°C selama 5 menit.
5. Dilakukan elektroforesis pada agarose 4 % maka akan terlihat fragmen DNA pada 140 bp(Lakkakula *et al.*, 2015)

3.10.2.2 Proses Elektroforesis

Alat dan Bahan

1. Agarose, LE, Analytical Grade (Promega®) 100g
2. Buffer Tris EDTA 1X
3. Flask Beaker 250 ml
4. Magnetic stir
5. Timbangan digital
6. Ethidium Bromide
7. Alumunium foil
8. Stirer dengan Hot Plate
9. Gel Casting Tray
10. Gel Comb
11. Gel Documentation

Cara Kerja

1. Membuat gel

- Timbang agar 4% dari ukuran Gel *Casting Tray* (135 ml) untuk 30 sampel dimasukkan ke dalam *flask beaker* 250 ml
 - Ditambahkan dengan Buffert Tris EDTA 1x
 - Dimasukkan magnetic stir dan ditutup dengan alumunium
 - Diaduk dan dipanaskan diatas stirer dengan *hot plate* sampai mendidih dan berwarna jernih.
 - Matikan pemanasnya, dan ditambahkan *ethidium bromide*, dan diaduk kembali. Cairan dituang ke *Casting Tray* dan didinginkan sampai membeku
2. Setelah gel selesai dibuat, masukkan 7 μ L DNALadder, produk PCR dan Produk RFLP ke dalam sumur-sumur gel.
 3. Dilakukan pencatatan posisi sampel pada sumur-sumur gel.
 4. Mesin elektroforesis dinyalakan selama 90 menit dengan tegangan 70 Volt. Jika sudah selesai, gel dipindahkan kedalam *gel documentation system* untuk pembacaan dan dokumentasi hasil elektroforesis

3.10.2.3 Proses *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

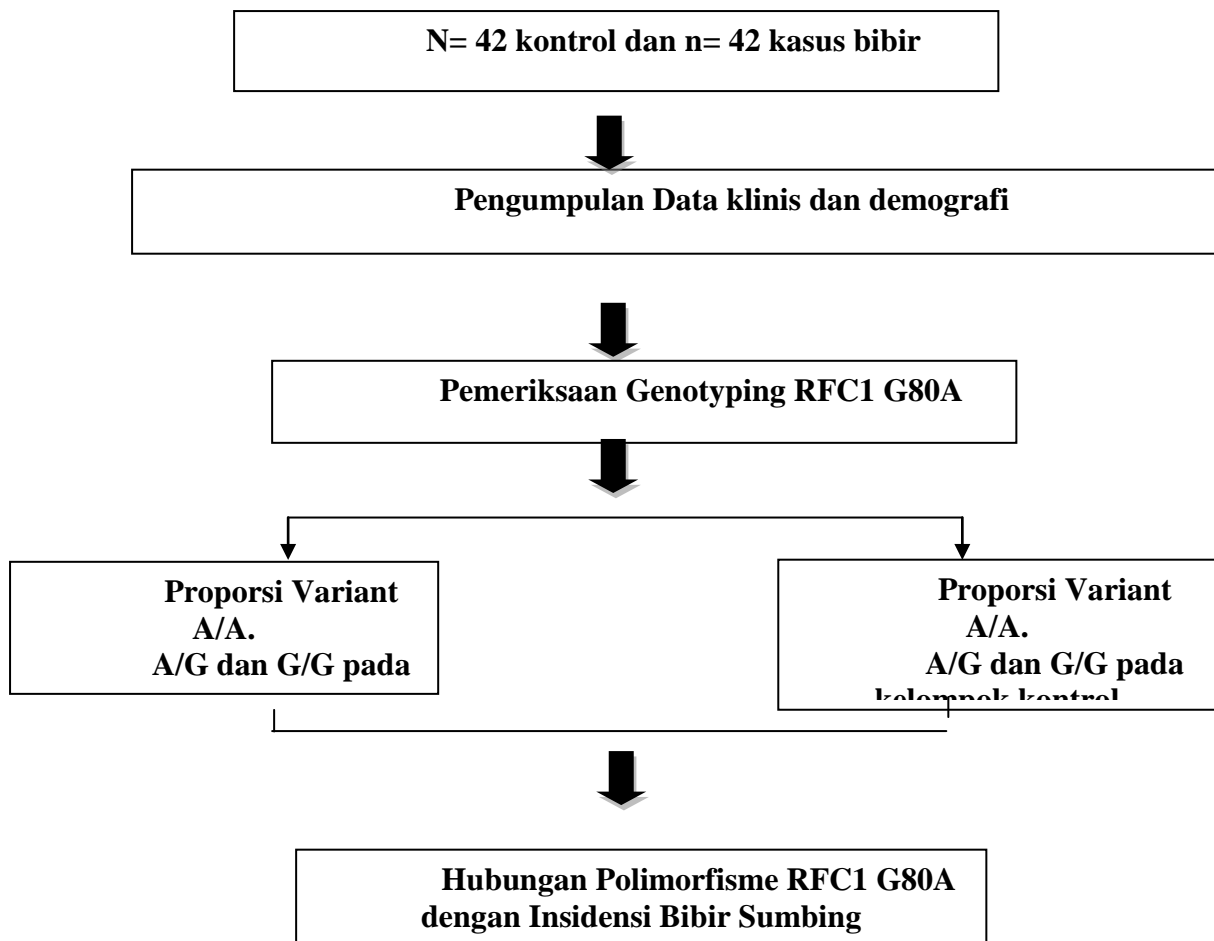
Alat dan Bahan

1. Enzim HaeII(New England,Biolabs® Inc) 1000 unit
2. NEBuffer
3. Nuclease Free Water
4. PCR product
5. Tabung microtubes
6. Mikropipet
7. Inkubator
8. Stop watch
9. Kertas label dan pena tahan air.

Cara Kerja

1. Dilakukan pelabelan pada mikrotubes sesuai kode nomor sampel.
2. Dibuat campuran untuk reaksi RFLP dengan total volume 10 μ L untuk setiap sampelnya yang terdiri dari PCR product sebanyak 5 μ L, Enzim restriksi HaeII sebanyak 4 unit (0,2 μ L), NEBuffer sebanyak 1 μ L dan *Nuclease free water* sebanyak 3,8 μ L.
3. Diinkubasi selama 30 menit pada suhu 55°C didalam inkubator.
4. Dilakukan elektroforesis pada agarose 4% maka akan terlihat alel A pada fragmen 140bp dan alel G pada fragment 76bp dan 64bp

3.11 Kerangka Operasional



3.12 Penyajian Data

Seluruh data yang diperoleh akan dicatat dan ditabulasi.

3.13 Keluaran Statistik

Tabel 3.2*Dummy Table* frekuensi Varian Genotip dan Alel RFC1

	n	%
Genotype A/A		
Genotype A/G		
Genotype G/G		
Total		
Alelle A		
Alelle G		
Total		

3.14 Jadwal Penelitian

Keseluruhan kegiatan penelitian dari persiapan sampai pada penulisan hasil penelitian adalah sekitar 8 minggu.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4.1 Hasil

Telah dilakukan penelitian potong lintang terhadap 46 pasien sumbing bibir dengan atau tanpa celah langit yang mendapat terapi bedah di RS Accuplast Medan, dan dilakukan pemeriksaan *Genotyping* di Laboratorium terpadu FK USU.

Seluruh subjek yang terpilih secara *consecutive sampling* telah memenuhi kriteria inklusi dan eklusi penelitian serta orangtua subjek bersedia memberi izin anaknya mengikuti penelitian secara sukarela dengan menandatangani pernyataan persetujuan (*Informed consent*) setelah dijelaskan tujuan, prosedur dan resiko dari penelitian ini. Penelitian ini juga telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Bidang Kedokteran USU.

4.1.1 Karakteristik Subjek Penelitian

4.1.1.1 Klasifikasi Sumbing Bibir

Dari hasil penelitian ini dapat dibuat karakteristik subjek penelitian berdasarkan klasifikasi sumbing bibir sebagai berikut

Tabel 4.1 Distribusi Subjek Berdasarkan klasifikasi sumbing bibir

	N	%	IK 95%
Sumbing bibir saja	4	8,7	7,55 – 9,85
Sumbing Bibir dengan celah Langitan	40	87	86,48 – 87,52
Celah Langitan saja	2	4,3	3,46 – 5, 15
Total	46	100,0	

Pada penelitian ini, distribusi terbanyak pada kelompok subjek penderita sumbing bibir dengan celah langitan sebanyak 40 orang (87,0%), dan yang paling sedikit pada kelompok subjek penderita celah langitan sejumlah 2 orang (4,3 %)

4.1.1.2 Jenis Kelamin

Dari hasil penelitian ini dapat dibuat karakteristik subjek penelitian berdasarkan jenis kelamin sebagai berikut

Tabel 4.2 Distribusi Jenis Kelamin Pada Subjek Penelitian

	n	%	IK 95%
Laki-laki	29	63,0	61,75-64,25
Perempuan	17	37,0	35,37 -38,63
Total	46	100,00	

Pada penelitian ini, distribusi subjek lebih banyak pada laki-laki yaitu 29 orang (63 %) dibandingkan perempuan 17 orang (37%).

Tabel 4.3 Perbandingan Proporsi diagnosis pasien sumbingbibir antar Jenis Kelamin

		Diagnosis Sumbing Bibir					
		CLO		CLP		CPO	
		N	%	N	%	N	%
Jenis Kelamin	Laki-laki	3	75	25	62,5	1	50
	Perempuan	1	25	15	37,5	1	50
Total		4	8.7	40	87	2	4.3

Dari hasil penelitian ini, diperoleh distribusi laki-laki pada pasien yang terdiagnosis dengan *Cleft Lip Only* (CLO) sebesar 75% dibandingkan perempuan 25%, dan pada pasien yang terdiagnosis *Cleft Lip Palatum*(CLP) diperoleh distribusi laki sebesar 62,5% dibandingkan perempuan 37,5% dan pada pasien yang terdiagnosis *Cleft Palate Only*(CPO), distribusi laki-laki dan perempuannya sama.

4.1.1.3 Suku

Dari hasil penelitian ini dapat dibuat karakteristik subjek penelitian berdasarkan suku sebagai berikut

Tabel 4.4 Distribusi Subjek Penelitian berdasarkan suku

	N	%	IK 95%
Aceh	1	2,2	1,58 – 2,82
Batak	25	54,3	51,30 – 58,50
Jawa	14	30,4	28,77 – 32,04
Melayu	2	4,3	3,46 – 5, 15
Minang	3	6,5	5,48 – 7,52
Nias	1	2,2	1,58 – 2,82
Total	46	100,0	

Pada penelitian ini, kelompok suku terbanyak pada suku Batak sebanyak 25 orang (54,30%), yang paling sedikit pada kelompok suku Nias dan Aceh masing-masing sejumlah 1 orang (2,2%)

4.1.1.4 Diagnosis

Dari hasil penelitian ini dapat dibuat karakteristik subjek penelitian berdasarkan diagnosis sebagai berikut

Tabel 4.5 Distribusi Subjek Berdasarkan Diagnosis

	N	%	IK 95%
Right Complete CLP	10	21,7	20,15 – 23,2
Left Complete CLP	20	43,5	41,91 – 45,09
Bilateral Complete CLP	10	21,7	20,15 – 23,2
Right Complete CL	1	2,2	1,58 – 2,82
Left Complete CL	3	6,6	5,48 – 7,52
Cleft Palate	2	4,3	3,46 – 5, 15
Total	46	100,0	

CLP = *Cleft Lip and Palate*

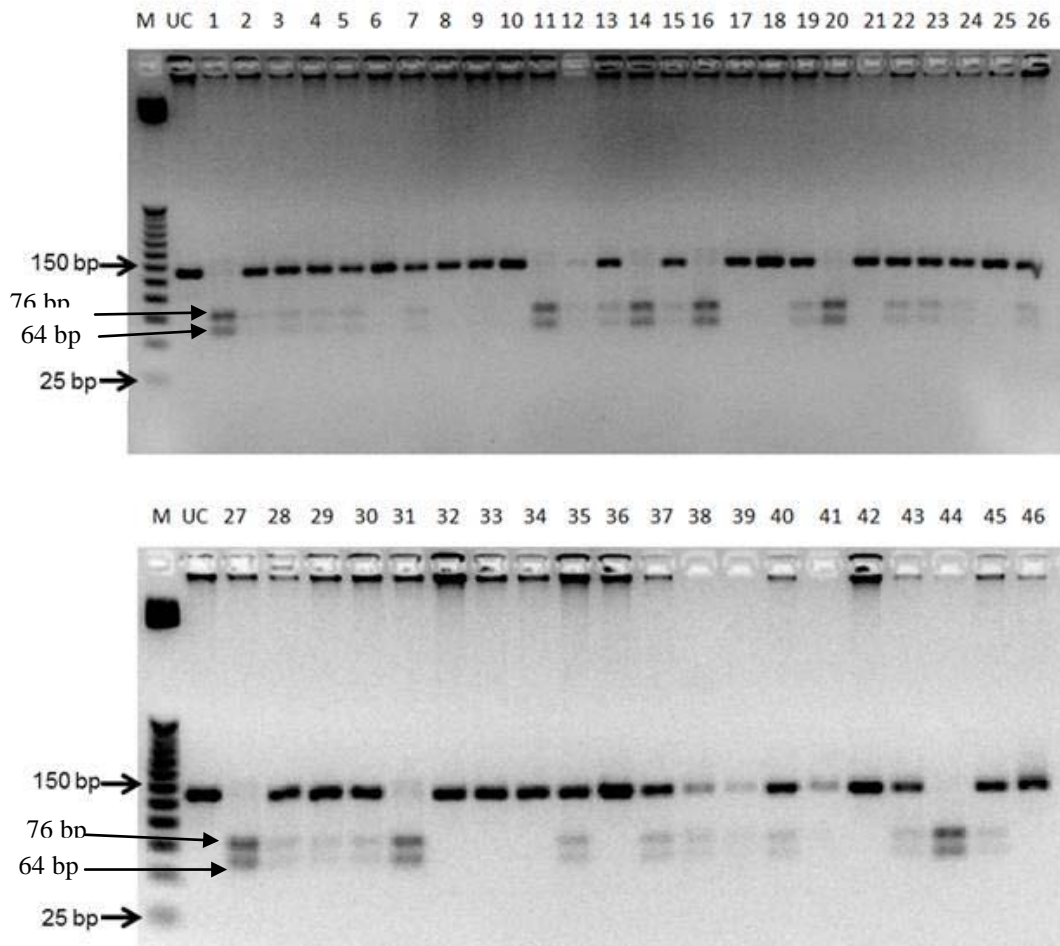
CL = *Cleft Lip*

Pada penelitian ini, distribusi terbanyak pada kelompok subjek yang terdiagnosis *Left Complete Cleft Lip and Palatum* sebanyak 20 orang (43,5 %),

dan yang paling sedikit pada kelompok subjek yang terdiagnosis *Right Complete Cleft Lip* sejumlah 1 orang (2,2 %)

4.1.2 Polimorfisme RFC -1

4.1.2.1 Hasil Elektroforesis PCR-RFLP Polimorfisme RFC 1



Gambar 3.1 Hasil Elektroforesis Produk PCR-RFLP Analisa SNP RFC-1 yang direstriksi oleh enzim HaeII dari masing-masing subjek

Keterangan Gambar =Lane M merupakan DNA Ladder, Lane UC merupakan produk PCR RFC 1 yang tidak dipotong oleh enzim HaeII, Lane 1-46 merupakan sampel dengan no urut 1- 46 .Pada fragmen 140bp terlihat Alel A dan alel G terlihat pada fragment 76bp dan 64bp.

4.1.2.2 Distribusi Variant Genotype RFC1 A80G pada subjek penelitian

Dari hasil penelitian ini diperoleh distribusi variant genotype RFC1 A80G pada subjek penelitian sebagai berikut

Tabel 4.6 Distribusi Variant Genotype RFC1 A80G pada subjek penelitian

	N	%	IK 95%
Genotype A/A	17	37,0	35,37 – 38,63
Genotype A/G	21	45,7	44,14 – 47,26
Genotype G/G	8	17,4	15,93 – 18,87
Total	46	100,0	

Tabel 4.7 Distribusi Klasifikasi Polimorfisme RFC1 pada subjek penelitian

	N	%	IK 95%
Wildtype (AA)	17	37,0	35,37 – 38,63
Mutant (AG+GG)	29	63,0	61,75 – 64,25
Total	46	100,0	

Pada penelitian ini, distribusi subjek penelitian berdasarkan jenis polimorfisme RFC 1 terbanyak pada kelompok variant A/G sejumlah 21 orang (44,7%) dan yang paling sedikit pada kelompok variant G/G sejumlah 8 orang (17,4%). Setelah dilakukan pengelompokan diperoleh subjek yang termasuk dalam Wildtype sejumlah 17 orang (37%) dan mutant sebanyak 29 orang (63 %)

4.1.2.3 Frekuensi Alel RFC1 A80G pada subjek penelitian

Dari hasil penelitian ini diperoleh hasil frekuensi alel RFC1 A80G pada subjek penelitian sebagai berikut

Tabel 4.8 Frekuensi Alel RFC1 A80G pada pasien bibir sumbing

	N	%	IK 95%
Alelle A	55	59,78	59,12 – 60,44
Alelle G	37	40,22	39,41 – 41,03
Total	92	100,0	

Pada penelitian ini, frekuensi lebih banyak terdapat pada kelompok subjek penelitian dengan Alel A RFC 1 sejumlah 55 alel (59,78%) dibanding pada kelompok subjek penelitian dengan Alel G sejumlah 37 alel (40,22%).

BAB V

PEMBAHASAN

Pada populasi sumbing bibir dengan atau tanpa celah langit, diagnosis terbanyak adalah *cleft lip and palate* sebesar 46%, diikuti *cleft palate* sebesar 33% dan *isolated cleft lip* sebesar 21% (Hopper, 2013), Hal ini sedikit berbeda dengan hasil penelitian ini, dengan diagnosis terbanyak adalah *cleft lip and palate* sebesar 87%, *isolated cleft lip* sebesar 8,7 % dan *cleft palate* sebesar 4,3%. Perbedaan proporsi ini terjadi karena pada penelitian ini melakukan pengambilan sampel secara *consecutive sampling* selama 3 bulan (April s.d Juni 2017).

Pada penelitian ini ditemukan *Left Complete CLP* sebesar 43,5%, *Right Complete CLP* sebesar 21,7% dan *Bilateral Complete CLP* sebesar 21,7%. Hal ini tidak jauh berbeda dari pernyataan Hopper et al, 2013; bahwa *unilateral cleft* sembilan kali lebih sering daripada *bilateral cleft* dan terjadi dua kali lebih sering pada sisi kiri dibandingkan dengan sisi kanan.

Berdasarkan distribusi jenis kelamin, menurut Hopper et al, 2013; laki-laki dominan pada populasi sumbing bibir dan langit, dimana *isolated cleft palate* terjadi lebih sering pada perempuan. Pernyataan diatas sesuai dengan hasil penelitian ini yang memperoleh data pasien yang terdiagnosis *Cleft Lip Palate* (CLP) 62,5% subjek adalah laki-laki dan 37,5% perempuan. Dan *isolated cleft palate* hanya ditemukan 2 kasus dari 46 subjek penelitian dengan proporsi laki-laki dan perempuan masing-masing 50%.

Pada penelitian ini diperoleh data kelompok suku terbanyak pada suku Batak sebesar 54,4% diikuti suku Minang sebesar 6,5%, Melayu sebesar 4,3%

,dan yang paling sedikit pada kelompok suku Nias dan Aceh masing-masing sejumlah 2,2%. Distribusi ini tidak jauh berbeda dengan komposisi suku di Sumatera Utara dengan proporsi terbesar suku Batak sejumlah 44,57%, Jawa 33,28%, Nias 7,03%, Melayu 5,95%, Cina 2,62%, Minang 2,57% dan Aceh 1,02%. (Badan Pusat Statistik, 2010; Hopper *et al.*, 2007)

Penelitian ini memperoleh data subjek penelitian yang memiliki varian AA sejumlah 17 orang (37%), AG sejumlah 21 orang (45,7%) dan GG sejumlah 8 orang (17,4%), data ini sedikit berbeda dengan data yang ditemukan di India oleh Lakkakula *et al.*, 2015; yaitu subjek yang memiliki varian AA sejumlah 18 orang (12,7%), AG sejumlah 64 orang (45,1%) dan GG sejumlah 60 orang (42,2%).

Penelitian lainnya mengenai polimorfisme RFC1 pada pasien sumbing bibir non sindromik telah dilakukan di Italia oleh Girardi *et al.*, 2017 memperoleh data Alel A sejumlah 56% dan alel G sejumlah 44%, data di atas mirip dengan data penelitian ini yang menemukan alel A sebesar 59,78% dan alel G 40,22%. Tetapi proporsinya berbeda dengan penelitian Lakkakula *et al.*, 2015; yang memperoleh alel A sebesar 35,2% dan Alel G sebesar 64,8%.

Perbedaan temuan pada penelitian ini dengan data di India dan Italia kemungkinan disebabkan perbedaan lokasi dan suku pada wilayah tersebut, dan bisa juga adanya pengaruh budaya di tempat penelitian Lakkakula *et al.*, 2015; yaitu India Selatan, dimana budaya menikah dengan kerabat dekat atau keluarga masih sering ditemui dan sudah turun-temurun, ditambah adanya aturan perkawinan dengan sesama kasta, sehingga menyebabkan jumlah varian mutan homozigot (GG) lebih besar. (Heitzman & Worden, 1995)

Klasifikasi varian menjadi *wildtype* dan mutan pada penelitian ini diperoleh proporsi subjek dengan mutan lebih banyak dibandingkan subjek *wildtype* dengan rincian *wildtype* sejumlah 17 orang (37%) dan mutan sejumlah 29 orang (63%), Hal ini sejalan dengan data Lijun Pei *et al*,2006; yang menemukan subjek dengan *wildtype* sebesar 18 orang (22%) dan mutan 64 orang (78%), serta sejalan dengan penelitian Lakkakula *et al*,2015;dengan *wildtype* sebesar 18 orang (12,7%) dan mutan 124 (87,4%).

Kesamaan data perihal proporsi varian mutan lebih besar dibandingkan *wildtype* pada subjek penelitian dengan sumbing bibir tentu sejalan dengan teori yang menjelaskan bahwa polimorfisme RFC1 akan menyebabkan variasi pada protein transporter asam folat dan menyebabkan kadar asam folat rendah didalam sitoplasma sehingga meningkatkan risiko terjadinya sumbing bibir.

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

1. Pasien Sumbing bibir yang membawa Varian AA sebesar 37%,AG 45,7% dan GG 17,4%
2. Pasien Sumbing Bibir dengan membawa varian *Wildtype* sebesar 37% dan Mutan sebesar 63%
3. Frekuensi Alel A pada subjek penelitian sebesar 59,78% an Alel G sebesar 48,22%

5.2 Saran

1. Penelitian dapat dilanjutkan dengan membandingkan proporsi polimorfisme RFC 1 pada kelompok kasus sumbing bibir dan kontrol tidak sumbing bibir untuk mencari apakah ada perbedaan proporsi polimorfisme RFC 1 pada pasien sumbing bibir atau tidak secara statistik.
2. Untuk mengidentifikasi apakah ada hubungan polimorfisme RFC1 dengan varian diagnosis sumbing bibir (CPO,CLP dan CPO) maka perlu dilakukan penelitian lainnya dengan melakukan penyesuaian rumus besar sampel.
3. Penelitian ini dapat dilanjutkan dengan mengidentifikasi polimorfisme gen lainnya yang turut berperan serta dalam metabolisme asam folat yang dicurigai berperan dalam kejadian sumbing bibir.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. 2013. Riset Kesehatan Dasar. Jakarta.
- Badan Pusat Statistik. 2010. Hasil Sensus Penduduk 2010. , Sensus Penduduk 2010.
- Bhaskar, L.V.K.S., Murthy, J., & Babu, G.V. 2011. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and orofacial clefts. *Arch. Oral Biol.Elsevier Ltd.* 56(8)=723–737.
- Biselli, J.M., Brumati, D., Frigeri, V.F., Zampieri, B.L., Golono-Bertollo, E.M., & Pavarino-Bertelli, É.C. 2008. A80G polymorphism of reduced folate carrier 1 (RFC1) and C776G polymorphism of transcobalamin 2 (TC2) genes in Down's syndrome etiology. *Sao Paulo Med. J.* 126(6)=329–332.
- Blanton, S.H., Henry, R.R., Yuan, Q., Mulliken, J.B., Stal, S., Finnell, R.H., & Hecht, J.T. 2011. Folate pathway and nonsyndromic cleft lip and palate. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* 91(1)=50–60.
- Chango, A., Emery-Fillon, N., de Courcy, G.P., Lambert, D., Pfister, M., Rosenblatt, D.S., & Nicolas, J.P. 2000. A polymorphism (80G->A) in the reduced folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia. *Mol. Genet. Metab.* 70(4)=310–315.
- Chango, A., Emery-fillon, N., Rosenblatt, D.S., & Nicolas, J. 2000. A Polymorphism (80G- > A) in the Reduced Folate Carrier Gene and Its Associations with Folate Status and Homocysteinemia. 315=310–315.
- Coppedè, F., Lorenzoni, V., & Migliore, L. 2013. The reduced folate carrier (RFC-1) 80A>G polymorphism and maternal risk of having a child with down syndrome= A meta-analysis. *Nutrients.* 5(7)=2551–2563.
- De Marco, P., Calevo, M.G., Moroni, A., Arata, L., Merello, E., Cama, A., Finnell, R.H., Andreussi, L., & Capra, V. 2001. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as risk factors for NTDs. *Eur. J. Pediatr. Surgery, Suppl.* 11(1)=14–17.
- Devlin, A.M., Clarke, R., Birks, J., Evans, J.G., & Halsted, C.H. 2006. Interactions among polymorphisms in folate-metabolizing genes and serum total homocysteine concentrations in a healthy elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.* 83(3)=708–13.

- Girardi, A., Martinelli, M., Cura, F., Palmieri, A., Carinci, F., Sesenna, E., & Scapoli, L. 2017. RFC1 and non-syndromic cleft lip with or without cleft palate = An association based study in Italy. *J. Cranio-Maxillofacial Surg.Elsevier Ltd.* 42(7)=1503–1505.
- Heitzman, J. & Worden, R.L. 1995. India = A Country study [WWW Document]. *Washingt. GPO Libr. Congr.* URL <http://countrystudies.us/india/>.
- Hopper, R.A. 2013. Cleft lip and Palate = Embryology, Principles and Treatment. seventh ed. , in = Thorne, C.H. (Ed.), *Grabb and Smith's plastic surgery.* Lippincott Williams & Wilkins = Philadelphia. . Lippincott Williams & Wilkins = Philadelphia, hal. 173–199.
- Hopper, R.A., Cutting, C., & Grayson, B. 2007. Cleft lip and palate. , in = Grabb and Smith's Plastic Surgery. 6th Edition. Philadelphia = Lippincott Williams and Wilkins. . hal. 179–199.
- Lakkakula, B., Murthy, J., & Gurrakonda, V.B. 2015. Relationship between reduced folate carrier gene polymorphism and non-syndromic cleft lip and palate in Indian population. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* 28(3)=329–32.
- Little, J., Gilmour, M., Mossey, P.A., FitzPatrick, D., Cardy, A., Clayton-Smith, J., & Fryer, A.E. 2008. Folate and clefts of the lip and palate - A U.K.-based case-control study = Part I = Dietary and supplemental folate. *Cleft Palate-Craniofacial J.* 45(4)=420–427.
- Lucock, M. 2000. Folic acid = nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab.Elsevier.* 71(1)=121–138.
- Mills, J.L., Molloy, A.M., Parle-McDermott, A., Troendle, J.F., Brody, L.C., Conley, M.R., Cox, C., Pangilinan, F., Orr, D.J.A., Earley, M., McKiernan, E., Lynn, E.C., Doyle, A., Scott, J.M., & Kirke, P.N. 2008. Folate-related gene polymorphisms as risk factors for cleft lip and cleft palate. *Birth Defects Res. Part A - Clin. Mol. Teratol.* 82(9)=636–643.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., & Rodwell, V.W. 2000. *Harper's Biochemistry*, Appleton and Lange. Stanford, CT.
- Pei, L., Zhu, H., Zhu, J., Ren, A., Finnell, R.H., & Li, Z. 2006. Genetic Variation of Infant Reduced Folate Carrier (A80G) and Risk of Orofacial Defects and Congenital Heart Defects in China. *Ann. Epidemiol.* 16(5)=352–356.
- Rekam Medis RS Accuplast. 2017. Medan.
- Shabikhani, M., Lucey, G.M., Wei, B., Mereninov, S., Lou, J.J., Vinters, H. V, Singer, E.J., Cloughesy, T.F., & Yong, W.H. 2014. The procurement,

storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem.* 47(0)=258–266.

Shaw, G.M., Lammer, E.J., Zhu, H., Baker, M.W., Neri, E., & Finnell, R.H. 2002. Maternal periconceptional vitamin use, genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G), and risk of spina bifida. *Am. J. Med. Genet.* 108(1)=1–6.

Sook Wah Yee, Gong, L., Badagnani, I., Giacomini, K.M., Klein, T.E., & Altman, R.B. 2010. SLC19A1 Pharmacogenomics Summary. *Pharmacogenet genomics.* 20(11)=708–715.

Stanisławska-Sachadyn, A., Mitchell, L.E., Woodside, J. V, Buckley, P.T., Kealey, C., Young, I.S., Scott, J.M., Murray, L., Boreham, C.A., McNulty, H., Strain, J.J., & Whitehead, A.S. 2009. The reduced folate carrier (SLC19A1) c.80G > a polymorphism is associated with red cell folate concentrations among women. *Ann. Hum. Genet.* 73(5)=484–491.

Sukla, K.K. & Raman, R. 2012. Association of MTHFR and RFC1 gene polymorphism with hyperhomocysteinemia and its modulation by vitamin B12 and folic acid in an Indian population. *Eur. J. Clin. Nutr. Nature Publishing Group.* 66(1)=111–118.

Van Rooij, I.A.L.M., Swinkels, D.W., Blom, H.J., Merkus, H.M.W.M., & Steegers-Theunissen, R.P.M. 2003. Vitamin and homocysteine status of mothers and infants and the risk of nonsyndromic orofacial clefts. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 189(4)=1155–1160.

Vasudevan, D.M., Sreekumari, S., & Vaidyanathan, K. 2013. Textbook of Biochemistry for Medical Students. JP Medical Ltd.

Vieira, A.R., Murray, J.C., Trembath, D., Orioli, I.M., Castilla, E.E., Cooper, M.E., Marazita, M.L., Lennon-Graham, F., & Speer, M. 2005. Studies of reduced folate carrier I (RFC1) A80G and 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphisms with neural tube and orofacial cleft defects [2]. *Am. J. Med. Genet.* 135 A(2)=220–223.

Vieira, A.R., Cooper, M.E., Marazita, M.L., Castilla, E.E., & Orioli, I.M. 2008. Reduced folate carrier 1 (RFC1) is associated with cleft of the lip only. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41(8)=689–693.

Wehby, G. & Murray, J.C. 2011. Folic Acid and Orofacial Clefts= A Review of the Evidence. *Oral Dis.* 16(1)=11–19.

Wehby, G.L., Félix, T.M., Goco, N., Richieri-Costa, A., Chakraborty, H., Souza, J., Pereira, R., Padovani, C., Moretti-Ferreira, D., & Murray, J.C. 2013.

High dosage folic acid supplementation, oral cleft recurrence and fetal growth. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 10(2)=590–605.

Wilcox, A.J., Lie, R.T., Solvoll, K., Taylor, J., McConnaughey, D.R., Abyholm, F., Vindenes, H., Vollset, S.E., & Drevon, C.A. 2007. Folic acid supplements and risk of facial clefts= national population based case-control study. *BMJ*. 334(7591)=464.

Yee, S.W., Gong, L., Badagnani, I., Giacomini, K.M., Teri E. Klein, & Altman, R.B. 2010. SLC19A1 Pharmacogenomics Summary. *Pharmacogenet. Genomics*. 20(11)=708–715.

Zhang, T., Lou, J., Zhong, R., Wu, J., Zou, L., Sun, Y., Lu, X., Liu, L., Miao, X., & Xiong, G. 2013. Genetic Variants in the Folate Pathway and the Risk of Neural Tube Defects= A Meta-Analysis of the Published Literature. *PLoS One*. 8(4)=1–10.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Penjelasan Tentang Penelitian Kepada Awam

LEMBAR PENJELASAN KEPADA ORANGTUA CALON SUBJEK PENELITIAN

Selamat pagi/siang Bapak/Ibu/

Nama saya dr. Budi Yulhasfi Febrianto dan akan melakukan penelitian dengan judul=Identifikasi Polimorfisme *Reduce Folate Carrier 1* (RFC1) Pada Pasien sumbing bibir dengan atau tanpa celah langitan di Sumatera Utara. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran variasi genetik protein *Reduce Folate Carrier 1* pada pasien sumbing bibir di masyarakat Sumatera Utara. Dengan diketahuinya hal tersebut maka akan berguna untuk menambah pengetahuan ilmiah di bidang kedokteran mengenai penyebab terjadinya sumbing bibir di masyarakat.

Jika Bapak/Ibu menyetujui anak bapak/ibu mengikuti penelitian ini dan penelitian lainnya yang terkait maka akan dilakukan pengambilan sampel terhadap darah anak Bapak/Ibu untuk diperiksa di laboratorium. Kami sangat mengharapkan keikutsertaan anak Bapak/Ibu dalam penelitian ini, karena selain bermanfaat untuk diri sendiri, juga bermanfaat untuk orang lain.

Selama penelitian ini, Bapak/Ibu tidak dibebankan biaya apapun. Semua data/keterangan dari Bapak/Ibu bersifat rahasia, tidak diketahui orang lain. Apabila keberatan, Bapak/Ibu bebas untuk menolak mengikuti penelitian ini, tanpa khawatir akan mengurangi pelayanan yang kami berikan.

Jika sudah mengerti dan bersedia mengikuti penelitian ini maka Bapak/Ibu dapat mengisi lembar persetujuan (Informed Consent). Pemeriksaan yang akan dilakukan diatas pada lazimnya tidak akan menimbulkan hal yang berbahaya bagi anak Bapak/Ibu/Saudara/i sekalian, namun bila terjadi hal-hal

yang tidak diinginkan yang disebabkan oleh perlakuan penelitian ini, maka Bapak/Ibu/Saudara/i dapat menghubungi saya.

Nama = dr. Budi Yulhasfi Febrianto

Alamat rumah =Jalan Denai Gg. Pena no 57, Medan

No Hp = 085360125045

Demikian penjelasan ini saya sampaikan, kiranya hasildari penelitian ini bermanfaat bagi kita semua.

Medan,.....2017

Peneliti,

(dr. Budi Yulhasfi Febrianto)

Lampiran 2= Surat Persetujuan Ikut Penelitian

**SURAT PERSETUJUAN SETELAH PENJELASAN
(INFORMED CONCERN)**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini =

Nama =

Alamat =.....

Umur =tahun.

No Telp/HP =.....

Orang tua dari =

Nama =

Usia =

Setelah mempelajari dan mendapatkan penjelasan yang jelas dari peneliti mengenai tujuan, prosedur dan manfaat penelitian yang berjudul=Identifikasi Polimorfisme *Reduce Folat Carrier 1* (RFC1) pada Pasien Sumbing bibir dengan atau tanpa Celah langit di Sumatera Utara dan setelah mengetahui dan menyadari sepenuhnya risiko yang mungkin terjadi, dengan ini saya menyatakan bahwa saya bersedia dengan sukarela mengizinkan anak saya menjadi subjek penelitian tersebut. Jika sewaktu-waktu ingin berhenti, saya berhak untuk meminta anak saya tidak melanjutkan mengikuti penelitian ini dan kepada saya tidak dikenakan sanksi apapun. Demikianlah surat persetujuan bersedia ikut dalam penelitian ini saya buat, untuk dapat digunakan seperlunya.

Medan,.....2017

Yang menyatakan

Peneliti

(.....)

(dr.Budi Yulhasfi Febrianto)

Saksi

(.....)

Lampiran 3= Lembar Isian Data Penelitian.

DATA PENELITIAN

I. Anamnesis Pribadi

No	DATA ANAMNESE	
1	Nama	
2	Alamat	
3	Umur	
4	Jenis Kelamin	
5	Suku	
6	Anak ke	
7	Nama Ayah	
8	Nama Ibu	
9	Pekerjaan Ayah/Ibu	
10	Riwayat kontrol kehamilan Ibu	
11	Riwayat suplemen asam folat saat hamil	Ada / Tidak
12	Riwayat Keluarga dengan sumbing bibir	Ada / Tidak
13	Riwayat Keluarga dengan Kelainan kongenital	Ada/ Tidak
14	Diagnosis	

II. Hasil Pemeriksaan Genotype RFC1

Hasil genotyping RFC1	
Varian A/A	
Varian A/G	
Variant G/G	
Alel A	
Alel G	

Lampiran 4

Jadwal Pelaksanaan Penelitian (Minggu1-8)

No	Kegiatan	Minggu							
		1	2	3	4	5	6	7	8
1	Persiapan	√							
2	Pengambilan Sampel		√	√	√	√			
3	Pemeriksaan Sampel		√	√	√	√			
4	Tabulasi Data						√		
5	Penulisan Laporan Hasil						√	√	
6	Seminar Hasil								√

Lampiran 5

Anggaran Dana

a. Alat dan Bahan habis pakai =

• Kit ekstraksi DNA		= Rp. 2.000.000,-
• Primer <i>reverse</i> dan <i>forward</i> RFC1		= Rp.1.000.000,-
• Enzim restriksi HaeII		= Rp. 2.500.000,-
• Kit PCR		= Rp. 1.000.000,-
• Spuit 5 cc		= Rp.100.000,-
• Kapas alkohol		= Rp. 50.000,-
• Wadah penampungan sampel		= Rp.150.000,-
• Termos es		= Rp. 500.000,-
• Sarung Tangan	= 5 pak x Rp.30.000	= Rp. 150.000,-
• Masker	= 2 pak x Rp 25.000	= Rp.50.000,-
• Kertas parafin	= 1 gulung	= Rp. Rp.50.000,-
• Agarose		=Rp.2000.000,-

c. Sewa Laboratorium = Rp. 1.000.000,-

d. Biaya Ethical clearance = Rp.200.000,-

e. Biaya Transportasi = Rp. 500.000,-

f. Biaya ATK dan penjilidan =

• Kertas HVS A4	= 5 rim x Rp.30.000,-	= Rp.150.000,-
• Isi ulang tinta Printer	= 5 botol x Rp.20.000,-	=Rp.100.000,-
• Penjilidan Laporan		= Rp.500.000,-

g. Biaya tak terduga =Rp.2.000.000

Total =Rp.14.000.000

Susunan Peneliti

Peneliti

Nama Lengkap : dr. Budi Yulhasfi Febrianto
NIP : -
Jabatan Fungsional : PPDS Ilmu Bedah
Fakultas : Kedokteran
Perguruan Tinggi : Universitas Sumatera Utara

Pembimbing 1

Nama Lengkap : Dr. Frank Bietra B, SpBP-RE(K)
NIP : 19710517200801 1 008
Jabatan Fungsional : Staf Pengajar Sub Bagian Bedah Plastik FK USU
Fakultas : Kedokteran
Perguruan Tinggi : Universitas Sumatera Utara
Bidang Keahlian : Ilmu Bedah Plastik

Pembimbing 2

Nama Lengkap : Dr. Utama Abdi Tarigan, SpBP-RE(K)
NIP : 19710616200212 1 004
Jabatan Fungsional : Staf Pengajar Sub Bagian Bedah Plastik FK USU
Fakultas : Kedokteran
Perguruan Tinggi : Universitas Sumatera Utara
Bidang Keahlian : Ilmu Bedah Plastik

Daftar Riwayat Hidup

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : dr. Budi Yulhasfi Febrianto
Tempat/Tanggal Lahir : T. Gading /10 Februari 1984
Jenis Kelamin : Laki-Laki
Agama : Islam
Status : Menikah
Alamat : Jl. Denai Gg Pena No 57, Medan
Telp. : 085360125045

Pendidikan

SD : 1990-1996, SD Negeri 1 Tanjung Gading, Batu Bara
SLTP : 1996-1999, SLTP Negeri 1 Tebing Tinggi
SLTA : 1999-2002, SMU Negeri 2 Matauli Pandan, Tapteng
S1 : 2002-2008, Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang
S2 : September 2011 s/d September 2017 Fakultas Kedokteran USU
Medan

Medan, Oktober 2017

Dr. Budi Yulhasfi Febrianto



HEALTH RESEARCH ETHICAL COMMITTEE

Medical Faculty of Universitas Sumatera Utara / H. Adam Malik General Hospital

Jl. Dr. Mansyur No 5 Medan, 20155 - Indonesia

Tel: +62-61-8211045; 8210555 Fax: +62-61-8216264 E-mail:
komisietikfkusu@yahoo.com



**PERSETUJUAN KOMISI ETIK TENTANG
PELAKSANAAN PENELITIAN KESEHATAN
NO: 230 / TGL/KEPK FK USU-RSUP HAM/2017**

Yang bertanda tangan di bawah ini, Ketua Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/RSUP H. Adam Malik Medan, setelah dilaksanakan pembahasan dan penilaian usulan penelitian berdasarkan kaidah Neuremberg Code dan Deklarasi Helsinki, dengan ini memutuskan protokol penelitian yang berjudul :

**“Identifikasi Polimorfisme Reduce Folate Carrier 1 (RFC1) Pada Pasien
Sumbing Bibir Dengan Atau Tanpa Celah Langitan Non Sindrom Di Sumatera Utara”**

Yang menggunakan manusia ~~dan hewan~~ sebagai subjek penelitian dengan ketua Pelaksana/Peneliti Utama: **Budi Yulhasfi Febrianto**
Dari Institusi : **Departemen Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran USU**

Dapat disetujui pelaksanaannya dengan syarat :
Tidak bertentangan dengan nilai-nilai kemanusiaan dan kode etik penelitian biomedik,
Melaporkan jika ada amandemen protokol penelitian
Melaporkan penyimpangan/pelanggaran terhadap protokol penelitian
Melaporkan secara periodik perkembangan penelitian dan laporan akhir
Melaporkan Kejadian yang tidak diinginkan

Persetujuan ini berlaku sejak tanggal ditetapkan sampai dengan batas waktu pelaksanaan penelitian seperti tertera dalam protokol dengan masa berlaku maksimum selama 1 (satu) tahun.

Medan, 20 Mei 2017
Komisi Etik Penelitian Kesehatan
Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara/
RSUP H. Adam Malik Medan



Ketua,

Prof. dr. Sutomo Kasiman, SpPD., SpJP(K)