

## KARAKTERISASI NUKLEOTIDA DAERAH EKSON 5 DAN 6 GEN *LDLR* PENDUDUK PAPUA

Hamida<sup>1\*</sup>, Achmad Taher<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia FMIPA Universitas Papua

Email: h.ida53@yahoo.com

### ABSTRAK

Keragaman suku di Papua berpotensi menghasilkan keragaman genetik. Gen *LDLR* adalah gen pengkode protein reseptor LDL (LDL-R) yang berperan sangat penting dalam homeostasis kolesterol. Gen *LDLR* terdiri dari 18 ekson dan 17 intron yang membentang sepanjang 45 kilo basa (kb). Daerah ekson 5 dan 6 merupakan bagian struktural yang penting dalam menyandi asam amino penyusun daerah pengikat ligan yang memediasi interaksi antara reseptor dan lipoprotein yang mengandung Apo B-100 atau Apo E. Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi nukleotida pada daerah ekson 5 dan 6 gen *LDLR* penduduk Papua dengan asal yang berbeda. Amplifikasi gen target dilakukan menggunakan metode reaksi berantai polimerase (PCR) lalu disekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotida. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa karakter nukleotida daerah ekson 5 dan 6 gen *LDLR* dari 9 mahasiswa UNIPA asal Papua adalah identik karena memiliki jumlah nukleotida dan susunan nukleotida yang sama. Jumlah nukleotida untuk daerah ekson 5 sebesar 123 pb, terdiri dari T=22,0%, C=24,4%, G=30,9%, A=22,8%, A+T=44,8% dan C+G=55,3%. Untuk daerah ekson 6 dengan jumlah nukleotida sebesar 123 pb, komposisi nukleotidanya yakni T=16,3%, C=26,8%, G=27,6%, A=29,3%, A+T=45,6% dan C+G=54,4%. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua daerah tersebut adalah lestari.

**Kata Kunci** : Ekson 5 dan 6, Gen *LDLR*, penduduk Papua

### ABSTRACT

The diversity shown in tribes in Papua has the potential to produce varying genetic diversity. LDLR gene is a gene coding for LDL receptor proteins (LDL-R) that play a very important role in cholesterol homeostasis. The LDLR gene consists of 18 exons and 17 introns that stretch for 45 kilos of base (kb). The exon 5 and 6 regions are important structural parts in encoding amino acids and are also ligand binding regions that mediate the interaction between receptors and lipoproteins containing Apo B-100 or Apo E. This study aims to characterize the nucleotides of Papuan populations with different origins. The method used is the polymorphism chain reaction method and sequencing method to find out the sequence of nucleotide bases. The results of the exon 5 and 6 regional nucleotide characterization of LDLR genes from 9 UNIPA students from Papua showed identical results because they had the same number of nucleotides and nucleotide arrangements. The number of nucleotides for exon 5 area is 123 pb, consisting of T = 22.0%, C = 24.4%, G = 30.9%, A = 22.8%, A + T = 44.8% and C + G = 55.3%. For exon 6 area with nucleotide amount of 123 pb, the nucleotide composition is T = 16.3%, C = 26.8%, G = 27.6%, A = 29.3%, A + T = 45.6% and C + G = 54.4%. The same results show that the two regions are conserved.

Keywords: Exon 5 and 6, LDLR gene, Papuan population

## PENDAHULUAN

Wilayah Papua adalah salah satu daerah yang memiliki keragaman suku, adat istiadat dan kultur budaya yang sangat unik. Keragaman yang diperlihatkan pada suku di Papua berpotensi menghasilkan keragaman karakter genetik, salah satunya pada gen reseptor lipoprotein densitas rendah (*LDLR*). Gen *LDLR* adalah gen pengkode protein reseptor LDL (*LDL-R*) yang berperan sangat penting dalam homeostasis kolesterol (Brown dan Golstein, 1986). Gen *LDLR* manusia, terletak pada kromosom 19p13.2, terdiri dari 18 ekson dan 17 intron yang membentang sepanjang 45 kilo basa (Sudhof *et al.*, 1985).

Ekson 5 dan 6 merupakan bagian struktural yang penting dalam menyandi asam amino penyusun daerah pengikat ligan yang memediasi interaksi antara reseptor dan lipoprotein.. Fungsi ini terlokalisasi pada daerah ujung amino reseptor, meliputi 40 residu yang berulang sebanyak tujuh kali. Setiap pengulangan mengandung 6 residu sistein, yang memediasi pelipatan domain ke dalam struktur yang kaku dengan gugus bermuatan negatif di permukaannya (dengan tripeptida Ser-Asp-Glu). Diperkirakan Gugus ini berpartisipasi dalam pengikatan

lipoprotein melalui gugus bermuatan positif pada apoB 100 atau apoE

Karakter gen adalah sifat, ciri atau kekhasan yang dimiliki oleh suatu gen. Karakterisasi gen adalah proses untuk memperoleh sifat, ciri atau kekhasan dari gen tersebut. Karakterisasinya meliputi (1) komposisi nukleotida di mana basa nukleotida (nukleobasa) merupakan bagian pada DNA dan RNA yang dapat terlibat dalam pemasangan basa, utamanya adalah sitosin, guanin, adenin, timin (DNA) dan urasil (RNA) secara berurutan disingkat C, G, A, T, dan U yang dalam genetika basa nukleotida tersebut biasanya hanya disebut sebagai basa N (memiliki gugus amina yang beratom nitrogen) yang komposisinya sesuai dengan hasil sekuensing yang dilakukan. (2) Jarak genetik adalah selisih genetik antara spesies atau antara populasi dalam satu spesies tertentu yang diukur dengan berbagai parameter di mana jarak genetik yang kecil menunjukkan hubungan genetik yang dekat dan sebaliknya, jarak genetik yang besar menunjukkan hubungan genetik yang jauh. Jarak genetik dapat digunakan untuk membandingkan persamaan genetik antara spesies yang berbeda. (3) Keragaman genetika suatu populasi dapat diperkirakan dengan menggunakan pengukuran yang

sederhana yaitu: keragaman gen adalah proporsi lokus polimorfik diseluruh genom.

*Polymorphism, SNP*) merupakan perbedaan susunan basa nukleotida tunggal pada genom suatu individu yang menyebabkan adanya variasi genetik dalam sebuah populasi (Twyman, 2005).

Beberapa penelitian terkait karakter DNA mitokondria penduduk Papua telah dilaporkan (Ngili *et al.* 2008; Palit *et al.* 2010; Ngili *et al.* 2012). Khusus untuk karakter gen *LDLR* telah dilakukan oleh Munir (2018) yang mengkarakterisasi daerah 3'UTR. Hasil yang diperoleh menunjukkan menunjukkan adanya 2 SNP pada posisi \*315 dan \*540. Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian Munir (2018), di mana daerah yang menjadi target adalah ekson 5 dan 6. Tujuannya adalah untuk mengkarakterisasi daerah lain pada gen *LDLR*, yaitu daerah ekson 5 dan 6.

## **METODE PENELITIAN**

### **Sampel Darah**

Sampel darah diambil dari mahasiswa suku Papua dan masih aktif kuliah di UNIPA Manokwari dengan menggunakan metode *selective purposing* yaitu pengambilan sampel secara sengaja sesuai dengan persyaratan sampel yang

(4) Polimorfisme nukleotida tunggal (*Single Nucleotide*

diperlukan. Mahasiswa yang darahnya dijadikan sebagai sampel terlebih dahulu diberi penjelasan mengenai tujuan pengambilan darahnya dan diminta kesediaanya secara sukarela untuk berpartisipasi dalam penelitian ini. Jumlah mahasiswa yang darahnya dijadikan sebagai sampel adalah 9 orang yang berasal: 2 dari Biak, 2 dari Serui, 1 dari Wamena, 1 dari Pegunungan Bintang, 1 dari Nabire, 1 dari Yahukimo dan 1 dari Jayapura.

### **Pengambilan Darah**

Darah diambil dari vena tangan sebanyak 1,5 mL dengan menggunakan alat suntik dan dimasukkan ke dalam tabung vakum yang berisi antikoagulan EDTA. Pengambilan darah dilakukan oleh tenaga medis di Puskesmas Amban Manokwari.

### **Ekstraksi dan amplifikasi DNA**

DNA genomik diekstraksi menggunakan *QIAamp DNA Mini Kit*. Amplifikasi fragmen gen *LDLR* menggunakan metode PCR. Daerah yang diamplifikasi dalam gen *LDLR* adalah ekson 5 dan ekson 6. Pasangan primer yang digunakan merujuk pada penelitian sebelumnya (Taher *et al.*, 2016). Primer untuk ekson 5 yaitu

F:5'-AAAATCAACACACTCTGTCC-3'  
dan R:5'-GGATGGAAAACCAGATGGC-  
3' sedangkan untuk ekson 6 Yaitu F: 5'-  
CCTTCCTCCTTCCTCTCTCT-3' dan R:  
5'-ACTCTGCAAGCCGCCTGCAC-3'.

PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94°C selama 5 menit lalu tahapan 40 siklus. Setiap siklus dilakukan dengan tahapan reaksi sebagai berikut: sampel didenaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, dilanjutkan *annealing* pada suhu 56°C selama 30 detik, dan *extension* pada suhu 72°C selama 30 detik. Setelah itu proses PCR dilanjutkan dengan *post extension* pada suhu 72°C selama 7 menit, dan diakhiri pada suhu 25°C selama 4 menit.

### Elektroforesis Gel Agarosa

Deteksi produk PCR dilakukan menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,8%. dan sebagai penanda digunakan *DNA marker* 1 kb. Hasil elektroforesis diamati di bawah sinar *UV GelDoc* dengan program *Quantity One* (Biorad). Adanya produk PCR ditunjukkan dengan adanya pita (band) dalam gel hasil elektroforesis.

### Sekuensing AmplikonP

Produk hasil purifikasi selanjutnya dikirim ke *First Base Laboratory Sdh Bhd*

(Malaysia) untuk dianalisis sekuensnya menggunakan *dideoxy sequencing in ABI 3730 XL automated DNA sequencer*.

### Analisis Data

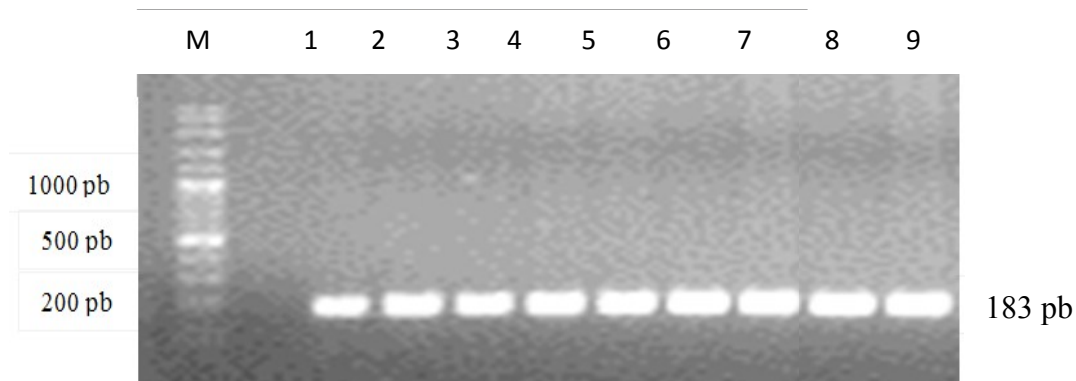
Sekuens *forward* dan *reverse* yang diperoleh dari setiap amplicon dianalisis menggunakan program BioEdit dan Mega versi 6.0 untuk mendapatkan sekuens konsensus. Selanjutnya hasil sekuens konsensus disejajarkan dengan sekuens rujukan di *GenBank* (nomor akses FJ525879.1) untuk menganalisis karakteristik gen amplicon dan menemukan titik mutasi atau *single nucleotide polymorphisms*. Pensejajaran sekuens dan analisis komposisi nukleotida, perbedaan nukleotida, keragaman nukleotida ( $\pi$ ), jarak genetik dan pohon filogenetik dilakukan menggunakan program yang sama, yaitu Mega 6.0. Pensejajaran menggunakan Clustal W 1.8, jumlah perbedaan nukleotida menggunakan opsi *number of differences*, penghitungan jarak genetik berdasarkan Kimura 2-parameter dan pohon filogenetik dibentuk berdasarkan *Neighbourjoining* dengan melakukan *bootstraps* sebanyak 1000 pengulangan. Analisis haplotipe dilakukan menggunakan program DnaSP.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

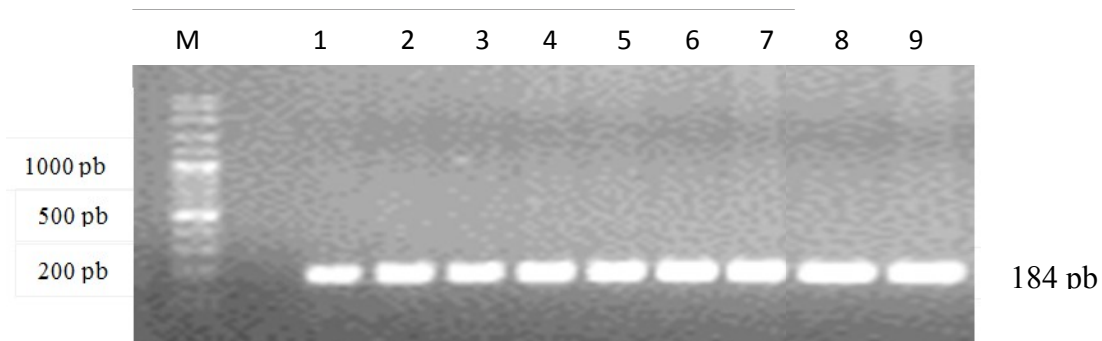
**Amplifikasi dan Elektroforesis**

Produk amplifikasi yang dihasilkan berupa pita (band) DNA berukuran 183 pb untuk daerah ekson 5. Sedangkan untuk daerah ekson 6, pita (band) DNA yang dihasilkan berukuran 184 pb dengan menggunakan marker DNA yang

mempunyai ukuran yang sama yaitu 100 pb. Hasil yang diperoleh sudah sesuai dengan yang diharapkan. Pita DNA hasil elektroforesis dari amplifikasi PCR untuk daerah ekson 5 ditunjukkan pada Gambar 1. Sedangkan pita DNA hasil elektroforesis dari amplifikasi PCR untuk daerah ekson 6 ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 1 . Pita (*Band*) DNA hasil elektroforesis produk PCR untuk daerah Ekson 5



Gambar 2. Pita (*Band*) DNA hasil elektroforesis produk PCR untuk daerah Ekson 6

**Sekuensing Amplikon**

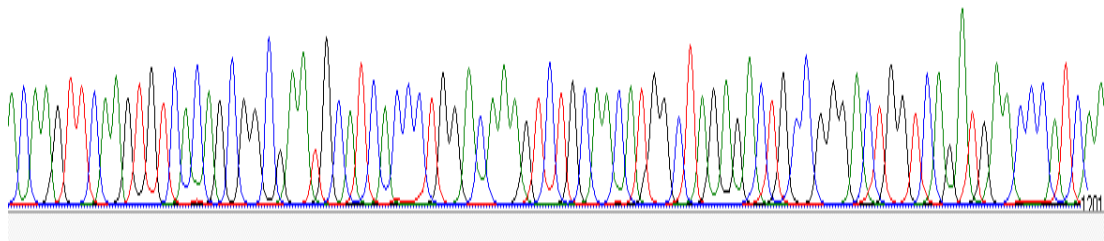
Hasil sekuensing dari produk amplifikasi (amplikon) pada daerah ekson 5 dan 6 ditunjukkan dalam bentuk elektroforegram yang berupa puncak dari

urutan basa-basa nukleotida DNA. Masing-masing puncak mempunyai warna yang berbeda di mana warna tersebut memperlihatkan kandungan basa nitrogen

yang dihasilkan, yaitu Adenin (A, merah), Guanin (G, hitam) dan Sitosin (C, biru). Fragmen elektroforegram daerah ekson 5 ditunjukkan pada Gambar 3 dan daerah ekson 6 ditunjukkan pada Gambar 4.

Hasil pensejajaran sekuens konsensus untuk daerah ekson 5 dengan referensi dari *Genbank* (no akses

...ACAAGTTCAAAGTGTTCACAGCGGCGAATGCATCACCCCTGGACAAAAGTCTGCACCATGGCTAGAGACTGCCGGGACTGGTTCAGATGAACCCATCAA



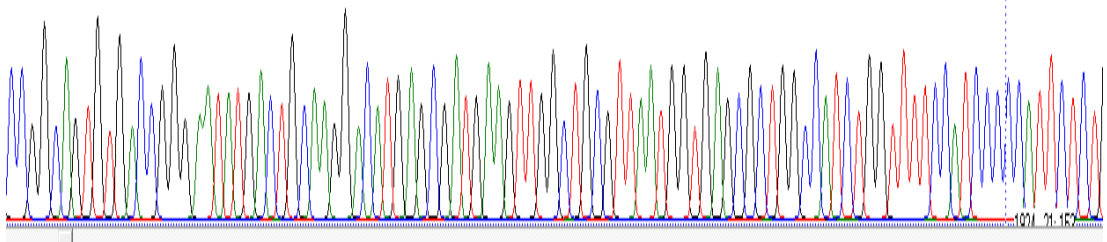
Gambar 3. Fragmen elektroforegram daerah ekson 5

Hasil pensejajaran sekuens untuk daerah ekson 6 dengan referensi *Genbank* (no akses FJ525879.1) menunjukkan bahwa produk amplifikasi tidak hanya mengandung

hijau), Timin (T, FJ525879.1) menunjukkan bahwa produk amplifikasi tidak hanya mengandung basa nukleotida ekson 5 yang terdiri atas 123 pb, tetapi juga mengandung beberapa basa nukleotida dari intron pengapit ekson yaitu 30 pb pada intron 4 dan 30 pb pada intron 5.

basa nukleotida ekson 6 yang terdiri dari 123 pb, tetapi juga beberapa basa nukleotida dari intron pengapit ekson yaitu 31 pb pada intron 5 dan 30 pb pada intron 6.

CCGGCAGTGTACCGGGAATATGACTGCAAGGACATGAGCGATGAAGTTGGCTGCGTAAATGGTAGCGCTGGCCATCTGGTTTTCCATCCCCAATCTCTC



Gambar 4. Fragmen elektroforegram daerah ekson 6

Berdasarkan hasil sekuensing dapat ditentukan komposisi nukleotida dari setiap sampel. Hasil analisis menunjukkan bahwa

untuk ekson 5 komposisi nukleotida timin (T/U) pada seluruh individu menunjukkan

persentase yang sama sebesar 22,0%. pada semua individu juga menunjukkan persentase yang sama, yakni sebesar 24,4%. Komposisi nukleotida guanin (G) juga menunjukkan jumlah persentase yang sama pada setiap individunya, yaitu sebesar 30,9%. Untuk komposisi nukleotida adenin (A) juga memberikan nilai persentase yang sama pada semua individu, yakni 22,8%.

Komposisi nukleotida sitosin (C) Rata-rata komposisi nukleotida A+T secara keseluruhan diperoleh sebesar 44,8% lebih rendah dibandingkan dengan jumlah nukleotida C+G secara keseluruhan yakni sebesar 55,3%. Komposisi nukleotida pada daerah ekson 5 gen *LDLR* diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi nukleotida daerah ekson 5 gen *LDLR*

No	ID Sampel	Jumlah nukleotida (pb)	Komposisi nukleotida (%)					
			T(U)	C	A	G	A+T	C+G
1	Biak-1	123,0	22,0	24,4	22,8	30,9	44,8	55,3
2	Biak-2	123,0	22,0	24,4	22,8	30,9	44,8	55,3
3	Serui-1	123,0	22,0	24,4	22,8	30,9	44,8	55,3
4	Serui-2	123,0	22,0	24,4	22,8	30,9	44,8	55,3
5	Wamena	123,0	22,0	24,4	22,8	30,9	44,8	55,3
6	Nabire	123,0	22,0	24,4	22,8	30,9	44,8	55,3
7	Peg. Bintang	123,0	22,0	24,4	22,8	30,9	44,8	55,3
8	Yahukimo	123,0	22,0	24,4	22,8	30,9	44,8	55,3
9	Jayapura	123,0	22,0	24,4	22,8	30,9	44,8	55,3
		Rata-rata	22,0	24,4	22,8	30,9	44,8	55,3

Untuk daerah ekson 6 komposisi nukleotida timin (T/U) pada seluruh individu menunjukkan persentase yang sama sebesar 16,3%. Komposisi nukleotida sitosin (C) pada semua individu juga menunjukkan persentase yang sama, yakni sebesar 26,8%. Komposisi nukleotida guanin (G) juga menunjukkan jumlah persentase yang sama pada setiap individu, yaitu sebesar 27,6%. Untuk komposisi nukleotida adenin (A) juga

memberikan nilai persentase yang sama pada semua individu, yakni 29,3%. Rata-rata komposisi nukleotida A+T secara keseluruhan diperoleh sebesar 45,6% lebih rendah dibandingkan dengan jumlah nukleotida C+G secara keseluruhan yakni sebesar 54,4%. Komposisi nukleotida pada daerah ekson 6 gen *LDLR* diperlihatkan pada Tabel 2.



Tabel 4. Jarak genetik antara sampel pada penelitian ini dengan individu pada *Genbank* daerah ekson 6.

No	ID Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Biak-1											
2	Biak-2	0,000										
3	Serui-1	0,000	0,000									
4	Serui-2	0,000	0,000	0,000								
5	Wamena	0,000	0,000	0,000	0,000							
6	Nabire	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000						
	Pegunungan											
7	Bintang	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					
8	Yahukimo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000				
9	Jayapura	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
10	Washington	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
11	California	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
12	Belgium	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Kesamaan urutan nukleotida pada daerah ekson 5 dan 6 dari sampel pada penelitian ini dan individu pada *Genbank* menunjukkan bahwa kedua daerah pada gen *LDLR* ini bersifat *conserved* atau lestari. Sifat lestari menunjukkan bahwa sekuens pada kedua daerah ini tidak mengalami perubahan, baik susunan, jumlah maupun urutan nukleotidanya selama berlangsungnya evolusi. Daerah yang lestari biasanya mempunyai peranan yang sangat penting terhadap fungsi sel. Oleh karena itu apabila terjadi perubahan pada susunan dan urutan nukleotida pada daerah tersebut, maka dapat menyebabkan gangguan fungsi sel (Kolondam, 2012).

## SIMPULAN

Karakter nukleotida daerah ekson 5 dan 6 gen *LDLR* mahasiswa UNIPA asal Papua adalah identik karena memiliki jumlah nukleotida dan susunan nukleotida yang sama. Jumlah nukleotida untuk daerah ekson 5 sebesar 123 pb, terdiri dari T=22,0%, C=24,4%, G=30,9%, A=22,8%, A+T=44,8% dan C+G=55,3%. Untuk daerah ekson 6 dengan jumlah nukleotida sebesar 123 pb, komposisi nukleotidanya yakni T=16,3%, C=26,8%, G=27,6%, A=29,3%, A+T=45,6% dan C+G=54,4%. Hasil yang sama menunjukkan daerah ekson 5 dan 6 dalam gen *LDLR* bersifat lestari (*conserved*).

**DAFTAR PUSTAKA**

- Brown, T. A. 1986. Sequencing (MPSS) on microbead arrays". Nature Biotechnology Nature MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 232:34-47
- Kolondam BJ .2012. Barcode DNA rbcL dan matK aglaonema (*Aglaonemasp.*), anthurium gelombang cinta (*Anthurium plowmanii*) dan anggrek payus Limondok (*Phaiustan carvilleae*). Tesis Program Pascasarjana UNSRAT. Manado
- Ngili, Y., Bolly, H. M. B., Ubyaan, R., Jukwati, Palit, E. I. Y. 2012. Studies on Specific Nucleotide Mutations in the Coding Region of the ATP6 Gene of Human Mitochondrial Genome in Populations of Papua Province-Indonesia. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(6), 111-118
- Ngili, Y., Palit, E. I., Suaka, I., Noer, A. S. 2008. Mitochondrial DNA diversity in indigenous populations of Northern Papua and its implications on native Papuan haplogroup. *Proceeding of The International Seminar on Chemistry*. 621- 627
- Palit EIY, Bolly HMB, Ngili Y, 2010. Polymorphisms of Human Mitochondrial DNA Analysis in Papua Populations. *Proceedings of the Third International Conference on Mathematics and Natural Sciences (ICMNS 2010)*.
- Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. 1985. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science*. 228: 815-22
- Taher A, Solihin DD, Sulistiyani, Sajuthi D, Astuti DA. 2016. Single nucleotide polymorphism within the *LDLR* gene and responsiveness of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) to atherogenic diet. *Biodiversitas*. 17(2):430-434
- Twyman RM. 2005. Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Genotyping Techniques-An Overview. *Encyclopedia of Diagnostic Genomic*
- Vance, J. E., Vance, D. E. 2008. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*: Elsevier
- Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, Heath SC, Timpson NJ, Najjar SS, Stringham HM, Strait J, Duren WL. 2008. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet*. 40:161-169