

# ANALISIS POLIMORFISME NUKLEOTIDA TUNGGAL (SNP) DAERAH 3'UTR GEN *LDLR* PENDUDUK PAPUA

Asri Saffanah Pratiwi<sup>1\*</sup>, Achmad Taher<sup>1</sup>

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

Jl. Gunung Salju Amban, Manokwari, 98314, Papua Barat

E-mail: pasri\_saffanah@yahoo.co.id

## ABSTRAK

Keragaman suku di Papua yang tinggi berpotensi menghasilkan keragaman genetik, salah satunya pada gen *LDLR*. Gen *LDLR* adalah gen penyandi protein reseptor LDL yang berfungsi mengatur kadar kolesterol dalam darah. Gen *LDLR* tersusun dari 18 ekson serta mengandung daerah 3'UTR. Daerah 3'UTR berperan penting dalam pengaturan ekspresi gen. Penelitian ini bertujuan melihat potensi keragaman genetik penduduk Papua yang berasal dari suku-suku yang berbeda berdasarkan daerah 3'UTR gen *LDLR*. Penelitian dilakukan dengan metode reaksi berantai polimerase untuk melipatgandakan jumlah DNA target, kemudian disekuensing untuk mengetahui urutan basa nukleotida. Hasil penelitian ini menunjukkan dari 6 mahasiswa Universitas Papua (UNIPA) asal Papua yang dijadikan sampel, ditemukan 2 SNP pada posisi \*52 dan \*504 dengan keragaman nukleotida ( $\pi$ ) sebesar 0,00149. Polimorfisme ini membentuk 3 jenis haplotipe, yaitu GG, GA dan AA dengan nilai keragaman haplotipe  $0,600 \pm 0,215$ .

**Kata kunci :** 3'UTR, gen *LDLR*, penduduk Papua, SNP

## ABSTRACT

*Single nucleotide polymorphism (SNP) is a single nucleotide difference in the arrangement of DNA base strands that can show genetic variation. The LDLR gene is a low density lipoprotein (LDL-R) receptor gene that functions to regulate cholesterol levels in the blood. The LDLR gene is composed of 18 exons and contains a 3'untranslated region (3'UTR) which plays an important role in regulating gene expression. This study aims to analyze the SNP in an area of 3'UTR LDLR genes from 6 University of Papua students from Papua. The research was carried out by polymerase chain reaction method to multiply the number of target DNA, then sequenced to find out the sequence of nucleotide bases. The results of this study were from 6 individuals, found 2 SNPs at position \*52 and \*504 with nucleotide diversity ( $\pi$ ) of 0.00149. These polymorphisms forms 3 types of haplotypes, namely GG, GA and AA with a haplotype diversity of  $0.600 \pm 0.215$ .*

*Keyword :* 3'UTR, *LDLR* gene, Papuan, SNP

## PENDAHULUAN

Papua memiliki banyak suku dengan ciri khasnya masing-masing. Keragaman suku yang tinggi ini berpotensi

menghasilkan keragaman genetik salah satunya pada gen reseptor lipoprotein densitas rendah (*Low-Density Lipoprotein Receptor, LDLR*). Gen *LDLR* adalah

gen pengkode protein reseptor lipoprotein densitas rendah (LDL-R) yang memediasi endositosis partikel LDL sehingga memainkan peranan penting dalam mengontrol kadar kolesterol dalam plasma manusia dan hewan (Francke *et al.*, 1984). Gen *LDLR* terletak pada kromosom 19 pada pita 19p13.2. Gen ini memiliki panjang lebih dari 45 kilobasa (kb) dan terdiri dari 18 ekson, 17 intron, serta mengandung daerah 3' *untranslated region* (UTR) dan 5'UTR (Südhof *et al.*, 1985).

Daerah 3'UTR terletak di hilir dari urutan pengkodean protein. Daerah ini berperan dalam berbagai proses pengaturan termasuk pembelahan transkrip, stabilitas dan poliadenilasi, terjemahan dan lokalisasi mRNA. Daerah ini sangat penting dalam menentukan nasib mRNA. Daerah 3'UTR merupakan daerah yang paling panjang dari suatu rantai mRNA (Barrett *et al.*, 2013). Daerah 3'UTR gen *LDLR* memiliki panjang sekitar 2,5 kb (Südhof *et al.*, 1985).

Daerah 3'UTR telah banyak dipelajari variasi genetiknya melalui analisis keberadaan polimorfisme nukleotida tunggal (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP). Fagundes *et al.* (2005) meneliti 111 orang yang berasal dari Afrika, Asia, Kaukasia dan Amerika menemukan 21 SNP pada daerah 3'UTR gen *LDLR*. Chen *et al.* (2008)

menganalisis 197 orang Cina menemukan adanya 6 SNP. Werutsky (2006) meneliti karakterisasi molekul gen *LDLR* pada 40 pasien FH di Rio Grande do Sul, Brasil, menemukan adanya 3 SNP pada daerah 3'UTR. Khusus untuk penduduk Papua, keberadaan SNP pada daerah 3'UTR telah dilaporkan oleh Munir (2018). Hasil penelitian tersebut, yang mengambil sampel 9 orang mahasiswa Universitas Papua (UNIPA) asal Papua, menemukan adanya 2 SNP pada daerah 3'UTR.

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian Munir (2018), yaitu dengan menambah jumlah sampel mahasiswa yang dianalisis SNP-nya pada daerah 3'UTR gen *LDLR*. Sampel yang ditambahkan berasal dari kabupaten yang sama maupun dari kabupaten yang berbeda dari sampel yang diteliti oleh Munir (2018). Tujuannya untuk melihat potensi keragaman genetik penduduk Papua yang berasal dari suku suku yang berbeda.

## METODE PENELITIAN

### Sampel Darah

Sampel darah diperoleh dari 6 mahasiswa aktif UNIPA yang berasal dari suku berbeda menggunakan metode *selective purposing*, yaitu 1 orang Aruisai, 2 orang Nduga, 1 orang Onate dan 2 orang Byak. Mahasiswa yang darahnya dijadikan sebagai sampel terlebih dahulu diberi penjelasan mengenai tujuan pengambilan

darahnya dan diminta kesediaannya secara sukarela untuk berpartisipasi dalam

### **Pengambilan Darah**

Sampel darah diambil dari vena tangan sebanyak 1 mL menggunakan alat suntik. Sampel darah kemudian dimasukkan dalam tabung vakum yang berisi antikoagulan EDTA.

### **Ekstraksi dan Amplifikasi DNA**

DNA genomik diekstraksi menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Tissue)* mengikuti prosedur yang diberikan oleh perusahaan Geneaid, Taiwan. Amplifikasi daerah 3'UTR gen *LDLR* dilakukan menggunakan metode PCR. Pasangan primer yang digunakan merujuk pada penelitian sebelumnya (Taher *et al.*, 2016). Primer *forward* yang digunakan adalah F: 5'-GAGGGATCAGGATGTGGGAG-3' sedangkan primer *reverse* yang digunakan adalah R: 5'-ACCACGGATTCAGCCAGATC-3' dengan ukuran hasil amplifikasi 713 pb. Komponen campuran *master mix* untuk PCR sebanyak 25 µL terdiri dari 1 µL primer UTR *forward* 10 pmol, 1 µL primer UTR *reverse* 10 pmol, 12,5 µL *Gotaq Green*, 5,5 µL *Nuclease Free Water* dan 5 µL cetakan DNA.

PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit lalu tahapan 40 siklus. Setiap siklus dilakukan

penelitian ini.

dengan tahapan reaksi sebagai berikut: sampel didenaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, dilanjutkan *annealing* pada suhu 50°C selama 30 detik, dan *extension* pada suhu 72°C selama 3 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan *post extension* pada suhu 72°C selama 5 menit, dan diakhiri pada suhu 25°C selama 2 menit.

### **Elektroforesis Gel Agarosa**

Produk PCR dideteksi menggunakan elektroforesis gel agarosa 1,8 % dan sebagai penanda digunakan *1kb DNA Ladder*. Hasil elektroforesis diamati menggunakan alat *GelDoc* dan dibaca hasilnya di komputer dengan aplikasi *Quantity One*. Keberadaan produk PCR ditunjukkan dengan adanya pita (*band*) dalam gel hasil elektroforesis.

### **Sekuensing Amplikon**

Produk hasil purifikasi selanjutnya dikirim ke *First Base Laboratory Sdh Bhd* (Malaysia) untuk dianalisis sekuennya menggunakan *dideoxy sequencing in ABI 3730XL automated DNA sequencer*.

### **Analisis Data**

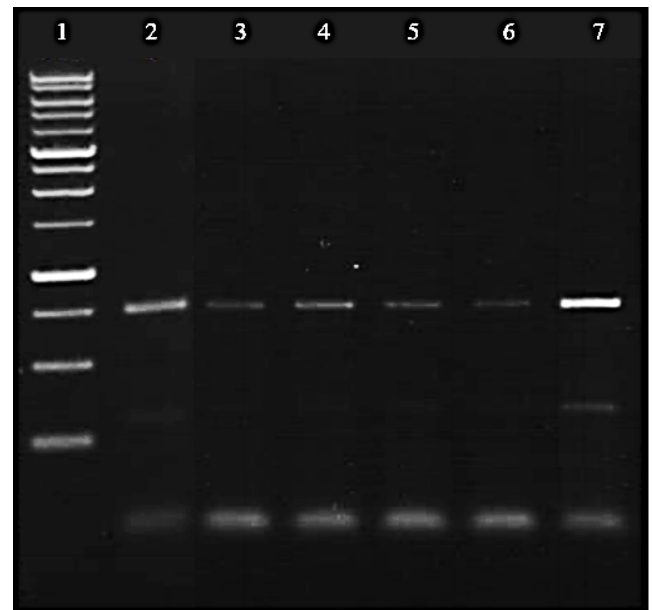
Sekuen *forward* dan *reverse* yang diperoleh dianalisis menggunakan program *Mega 7.0* untuk mendapatkan sekuen konsensus. Sekuen konsensus selanjutnya

disejajarkan dengan sekuen rujukan di *GenBank* (nomor akses FJ525879.1) dengan *Basic Local Search Alignment Tools (BLAST)*. Pensejajaran sekuen, analisis perbedaan nukleotida, keragaman nukleotida ( $\pi$ ), jarak genetik dan pohon filogenetik dilakukan menggunakan program *Mega 7.0* (Kumar *et al.*, 2016). Pensejajaran menggunakan *Clustal W*, jumlah perbedaan nukleotida menggunakan opsi *number of differences*, perhitungan jarak genetik berdasarkan *Kimura 2-parameter* dan pohon filogenetik dibentuk berdasarkan *neighbor-joining* dengan melakukan *bootstraps* sebanyak 1000 pengulangan. Analisis haplotipe dilakukan menggunakan program *DnaSP 6.11* (Rozas *et al.*, 2017). Analisis *median-joining network* dilakukan menggunakan program *Network 5.0* (Bandelt *et al.*, 1999).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

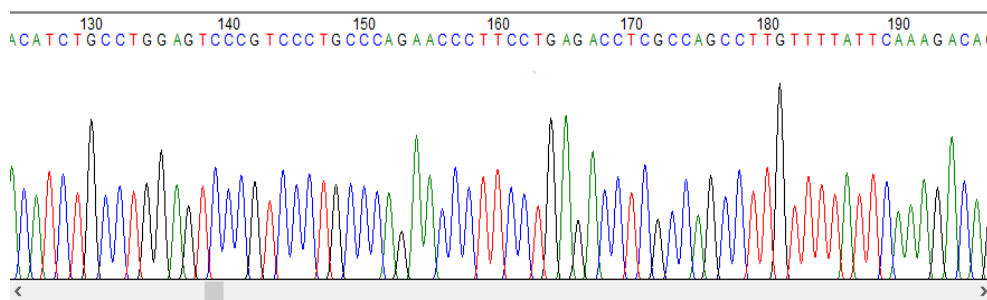
### Amplifikasi dan Sekuensing Daerah 3'UTR

Daerah 3'UTR gen *LDLR* dari 6 sampel berhasil diamplifikasi menggunakan primer *forward* dan *reverse*. Produk amplifikasi yang diperoleh sebesar 713 pb. Pita DNA hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pita DNA produk PCR. Keterangan (1) *1kb DNA Ladder*, (2) Aruisai, (3) Nduga-1, (4) Onate, (5) Nduga-2, (6) Byak-1, (7) Byak-2

Produk amplifikasi kemudian disekuensing dan diperoleh hasilnya dalam bentuk elektroforegram berupa puncak dari urutan basa nukleotida (Gambar 2). Setiap basa nukleotida memberikan warna puncak yang berbeda, yaitu Adenin berwarna hijau, Guanin berwarna hitam, Timin berwarna merah dan Sitosin berwarna biru. Hasil pensejajaran sekuen konsensus dengan sekuen rujukan di *GenBank* (kode akses FJ525879.1) menunjukkan sekuen terdiri atas 94 pb yang merupakan bagian 17 intron, 36 pb merupakan bagian ekson 18, dan 583 pb merupakan bagian 3'UTR.



Gambar 2. Fragmen elektroferogram sampel Byak-2

**Variasi Nukleotida antar Sekuen 3’UTR**

**Gen *LDLR***

Analisis variasi nukleotida dari sekuen 3’UTR berdasarkan perbedaan komposisi nukleotida diperoleh jumlah perbedaan antar pasangan sekuen. Jumlah perbedaan nukleotida berkisar antara 0 sampai 2 nukleotida dengan rata-rata sebesar 0,867 nukleotida dan keragaman nukleotida ( $\pi$ ) sebesar 0,00149. Jumlah perbedaan paling jauh ditunjukkan oleh sekuen asal Byak-2 dengan Nduga-1, Onate, Nduga-2 dan Byak-1. Sekuen dengan jumlah perbedaan 1 nukleotida ditunjukkan oleh individu asal Aruisai dengan kelima individu lainnya. Sedangkan perbedaan nukleotida 0 menunjukkan bahwa setiap sekuen individu yang diperoleh memiliki kesamaan atau identik. Matriks perbedaan nukleotida antar pasangan sekuen dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan perbedaan nukleotida dapat diketahui jarak genetik antar pasangan sekuen. Jarak genetik yang diperoleh berkisar antara 0,000 (0,0 %) hingga 0,003 (0,3 %) Individu asal Nduga-1, Onate, Nduga-2 dan Byak-1 memiliki jarak genetik yang dekat, yaitu sebesar 0,000 (0,0 %). Individu asal Aruisai menunjukkan jarak genetik 0,002 (0,2 %). Sedangkan jarak genetik terbesar, yaitu 0,003 (0,3 %) ditunjukkan oleh individu asal Byak-2 dengan individu asal Nduga-1, Onate, Nduga-2 dan Byak-1. Tingginya nilai jarak genetik menunjukkan semakin jauh hubungan kekerabatannya. Sebaliknya, nilai jarak genetik yang rendah menunjukkan hubungan kekerabatan yang semakin dekat. Jarak genetik antar pasangan sekuen ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 1. Matriks perbedaan nukleotida antar pasangan sekuen

No.	ID Sampel	1	2	3	4	5	6
1.	Aruisai						
2.	Nduga-1	1					
3.	Onate	1	0				
4.	Nduga-2	1	0	0			

5.	Byak-1	1	0	0	0	
6.	Byak-2	1	2	2	2	2

Tabel 2. Jarak genetik antar pasangan sekuen

No.	ID Sampel	1	2	3	4	5	6
1.	Aruisai						
2.	Nduga-1	0,002					
3.	Oonate	0,002	0,000				
4.	Nduga-2	0,002	0,000	0,000			
5.	Byak-1	0,002	0,000	0,000	0,000		
6.	Byak-2	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003	

Nilai rata-rata untuk seluruh populasi, keragaman nukleotida, jarak genetik dan pola substitusi secara keseluruhan menunjukkan variasi genetik yang rendah. Keragaman nukleotida ( $\pi$ ) merupakan salah satu parameter yang dapat menunjukkan variasi genetik.

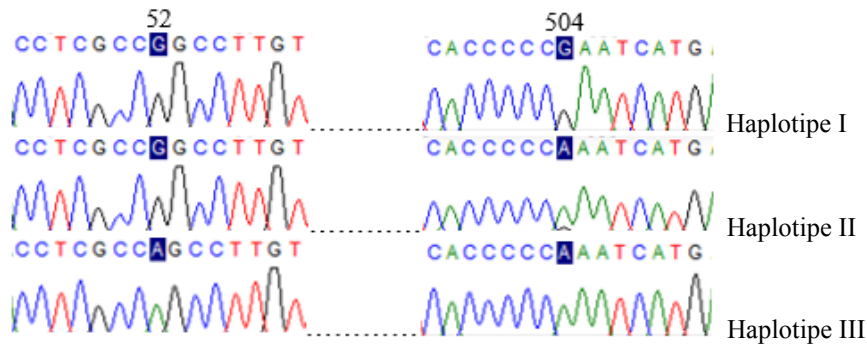
**SNP dan Haplotipe**

Hasil analisis sekuen 3'UTR dari 6 sampel menunjukkan adanya 2 SNP pada posisi \*52 dan \*504. Dua SNP yang diperoleh menghasilkan adanya 3 haplotipe. SNP ini terdiri dari satu situs variabel singleton dan satu situs parsimoni informatif. Situs variabel singleton berada

pada posisi \*52. Sedangkan situs parsimoni informatif berada pada posisi \*504. Setiap individu mengelompok berdasarkan jenis haplotipenya masing-masing. Haplotipe yang identik dengan haplotipe referensi *GenBank* adalah Haplotipe I. Haplotipe I memiliki jumlah individu paling banyak, yaitu 4 individu yang terdiri dari individu asal Nduga-1, Onate, Nduga-2 dan Byak-1. Sedangkan haplotipe II dan III masing-masing memiliki jumlah satu individu. Haplotipe II merupakan individu asal Aruisai. Haplotipe III merupakan individu asal Byak-2. Posisi polimorfisme dan jenis haplotipe dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Polimorfisme sekuen 3'UTR

Haplotipe	Posisi nukleotida pada 3'UTR		Jumlah individu	ID Sampel
	*52	*504		
Ref	G	G	-	FJ525879.1
I	G	G	4	Nduga-1, Onate, Nduga-2, Byak-1
II	G	A	1	Aruisai
III	A	A	1	Byak-2

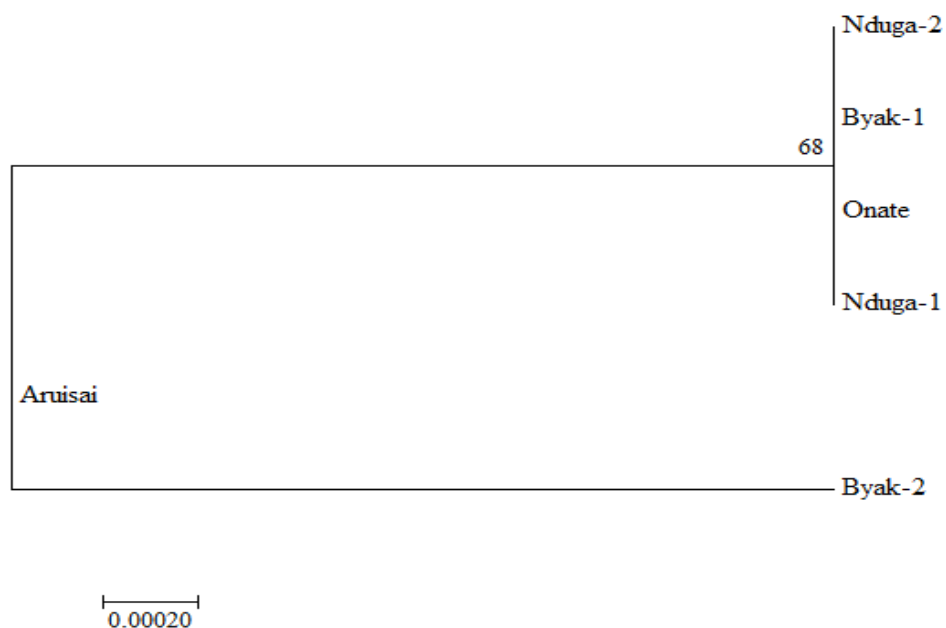


Gambar 3. Elektroferogram untuk tiga pola haplotipe

Haplotipe yang dihasilkan dapat digolongkan menjadi haplotipe umum dan haplotipe khusus. Haplotipe I (GG) dan haplotipe II (GA) tergolong haplotipe umum karena dimiliki oleh lebih dari satu individu. Haplotipe III (AA) tergolong haplotipe khusus karena hanya dimiliki oleh satu individu. Nilai keragaman haplotipe yang diperoleh sebesar  $0,600 \pm 0,215$ . Keragaman haplotipe dapat menunjukkan tingkat keragaman genetik. Haplotipe yang semakin beragam

menandakan tingkat keragaman genetik semakin tinggi.

Berdasarkan keragaman haplotipe tersebut, dapat dibuat pohon filogenetik. Keenam sampel pada pohon filogenetik mengelompok berdasarkan haplotipenya. Nduga-2, Byak-1, Onate dan Nduga-1 mengelompok dan berada pada posisi paling jauh dari Byak-2. Sedangkan Aruisai berada di antara kedua haplotipe. Pohon filogenetik untuk keenam sampel ditampilkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Pohon filogenetik berdasarkan sekuen 3'UTR

Haplotipe I merupakan haplotipe umum untuk seluruh haplotipe yang teridentifikasi. Haplotipe I dan haplotipe II berbeda 1 nukleotida pada posisi \*504. Haplotipe II dan haplotipe III menunjukkan perbedaan 1 nukleotida pada posisi \*52. Sedangkan haplotipe I dan haplotipe III memiliki perbedaan 2 nukleotida pada posisi \*52 dan \*504. Hasil analisis *median-joining network* dari polimorfisme sekuen 3'UTR dapat dilihat pada Gambar 5.

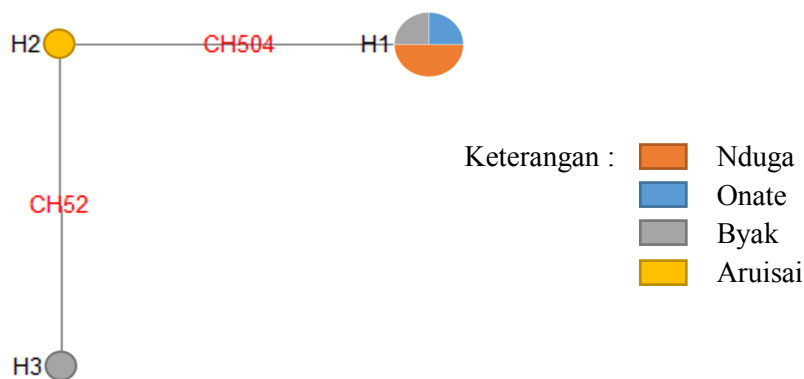
Sekuen asal Byak merupakan sekuen yang paling beragam. Hal ini dikarenakan sekuen tersebut terbagi dalam dua haplotipe, yaitu haplotipe I dan haplotipe III. Walaupun individu Byak-1 dan Byak-2 berasal dari suku yang sama, dapat dilihat bahwa mereka dapat menghasilkan polimorfisme.

**Perbandingan dengan Penelitian Sebelumnya**

Penelitian sebelumnya untuk melihat keragaman genetik daerah 3'UTR gen

*LDLR* dari 9 mahasiswa UNIPA telah dilakukan oleh Munir (2018). Pada dasarnya, hasil yang diperoleh pada penelitian ini hampir sama dengan hasil dari penelitian sebelumnya.

Jumlah SNP yang diperoleh pada penelitian ini sama banyak dengan penelitian sebelumnya yaitu 2 SNP. Namun terdapat perbedaan pada posisi SNP. Titik SNP yang diperoleh oleh penelitian sebelumnya adalah pada posisi \*315 dan \*504. Penelitian ini juga menemukan titik SNP pada posisi \*504, serta mendapatkan titik SNP yang baru, yaitu pada posisi \*52. Perubahan nukleotida pada posisi \*315 yang ditemukan sebelumnya adalah C>G. Pada posisi \*504, kedua penelitian sama-sama menemukan perubahan nukleotida G>A. Perubahan nukleotida pada posisi \*52 yang ditemukan pada penelitian ini adalah G>A. Penemuan titik SNP yang baru ini dapat menambahkan polimorfisme pada daerah 3'UTR gen *LDLR* mahasiswa UNIPA.



Gambar 5. *Median-joining network* polimorfisme sekuen 3'UTR

Posisi SNP yang berbeda menyebabkan haplotipe yang diperoleh juga berbeda. Haplotipe pada penelitian Munir adalah CG, GG dan CA. Sedangkan pada penelitian ini diperoleh haplotipe GG, GA dan AA. Nilai keragaman haplotipe dari kedua penelitian tidak berbeda jauh. Pada penelitian Munir (2018), diperoleh keragaman haplotipe  $0,556 \pm 0,165$ . Pada penelitian ini diperoleh keragaman haplotipe  $0,600 \pm 0,215$ .

## KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya 2 SNP pada posisi \*52 dan \*504 dengan keragaman nukleotida ( $\pi$ ) sebesar 0,00149. Kedua SNP yang diperoleh membentuk 3 jenis haplotipe, yaitu GG, GA dan AA dengan nilai keragaman haplotipe  $0,600 \pm 0,215$ .

## DAFTAR PUSTAKA

- Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A. 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48
- Barrett, L. W., Fletcher, S., Wilton S. D. 2013. *Untranslated Gene Regions and Other Non-coding Elements: Regulation of Eukaryotic Gene Expression*. Springer Science & Business Media. Australia
- Chen, W., Wang, S., Ma, Y., Zhou, Y., Liu, H., Strnad, P., Kraemer, F. B., Krauss, R. M., Liu, J. 2008. Analysis of Polymorphisms in The 3'Untranslated Region of The LDL Receptor Gene and Their Effect on Plasma Cholesterol Levels and Drug Response. *International Journal of Molecular Medicine*, 21(3), 345-353
- Fagundes, N. J. R., Salzano, F. M., Batzer, M. A., Deininger, P. L., Bonatto, S. L. 2005. Worldwide Genetic Variation at the 3'UTR Region of the LDLR Gene: Possible Influence of Natural Selection. *Annals of Human Genetic*, 69(4), 389-400
- Francke, U., Brown, M. S., Goldstein, J. L. 1984. Assignment of The Human Gene for The Low Density Lipoprotein Receptor to Chromosome 19: Synteny of A Receptor, A Ligand, and A Genetic Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(9), 2826-2830
- Munir, M., Taher, A. 2018. Keragaman Genetik Penduduk Papua: Polimorfisme pada Daerah 3'UTR Gen Reseptor Lipoprotein Densitas Rendah (LDLR). *Prosiding Seminar Nasional MIPA UNIPA*, 3(1), 47-55
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Libradi, P., Ramos-Onsins, S. E., Sánchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302
- Südhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Russell, D. W. 1985. The LDL Receptor Gene: A Mosaic of Exon Shared with Different Proteins. *Science*, 228(4701), 815-822

Taher, A., Solihin, D. D., Sulistiyani, Sajuthi, D., Astuti, D. A. 2016. Genetic Diversity within the 3'UTR *Basic and Applied Research*, 26(1), 237-248

Werutsky, C. A. 2006. As Bases Moleculares das Hipercolesterolemias Familiares no Brasil o Rio Grande do Sul. *Tesis*. Universidade de São Paulo

of the *Cynomolgus Macaque (Macaca Fascicularis) LDLR Gene. International Journal of Science:*