

Karakterisasi Daerah Intron 1 Gen C-C Ligan 7 (CCL7) pada Penderita Asma di Kabupaten Manokwari

Characterization of Intron Region 1 Gene C-C Ligand 7 (CCL7)
in Asthma Patients in Manokwari Regency

Dewi Oktaviani Rahmawati^{1*}, Achmad Taher¹, Muhammad Fajar Islam¹

¹Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Papua

E-mail: dewioktaviarii@gmail.com, taher_kimia73@yahoo.co.id, m.fajar@unipa.ac.id

ABSTRACT

Asthma is a chronic respiratory disease that fluctuates and is one of the most important health problems in the world. Asthma causes obstruction of air flow in the respiratory tract which can make it difficult for sufferers to breathe. Asthma is caused by environmental factors and genetic factors. One of the genetic studies related to asthma explains that there is a gene that plays a role in asthma, namely the C-C Ligand 7 (CCL7) gene. In a previous study, it was found that the intron 1 region of the CCL7 gene was the area with the most polymorphisms. A total of four asthmatics and two non-asthmatics from Manokwari Regency were analyzed for the intron 1 area of the CCL7 gene. The results of this study showed that the intron region 1 of the CCL7 gene consisted of 506 bp. Of the 6 samples studied, 4 samples of asthmatics and 2 samples of non-asthma in Manokwari Regency, 2 SNP polymorphisms were obtained at positions *6 and *214 with nucleotide diversity (π) of 0.00106. This polymorphism forms 3 types of haplotypes, namely AC, AT and TC with a haplotype diversity value of 0.600 ± 0.215 . The results of this study can be concluded that the intron region 1 of the CCL7 gene has low genetic diversity with a small number of samples.

Key words: asthma; CCL7 gene; intron region 1; genetic diversity

ABSTRAK

Asma merupakan penyakit saluran pernafasan kronik yang bersifat fluktuatif dan menjadi salah satu masalah kesehatan penting di dunia. Asma menyebabkan terhambatnya aliran udara dalam saluran pernafasan yang dapat membuat pengidapnya mengalami kesulitan pada saat bernafas. Penyakit asma disebabkan oleh faktor lingkungan dan faktor genetik. Salah satu penelitian genetik terkait penyakit asma menjelaskan bahwa terdapat gen yang berperan pada asma, yaitu gen C-C Ligan 7 (CCL7). Pada penelitian sebelumnya, menemukan bahwa daerah intron 1 gen CCL7 merupakan daerah dengan polimorfisme terbanyak. Sebanyak empat orang penderita asma dan dua orang non-asma yang berasal dari Kabupaten Manokwari dianalisis daerah intron 1 gen CCL7-nya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa daerah intron 1 gen CCL7 terdiri dari 506 pb. Dari 6 sampel yang diteliti, 4 sampel penderita asma dan 2 sampel non-asma di Kabupaten Manokwari diperoleh polimorfisme sebanyak 2 SNP pada posisi *6 dan *214 dengan keragaman nukleotida (π) sebesar 0,00106. Polimorfisme ini membentuk 3 jenis haplotipe, yaitu AC, AT dan TC dengan nilai keragaman haplotipe sebesar $0,600 \pm 0,215$. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa daerah intron 1 gen CCL7 memiliki keragaman genetik yang rendah dengan jumlah sampel yang sedikit.

Kata kunci: asma; Gen CCL7; daerah intron 1; keragaman genetik

PENDAHULUAN

Asma merupakan penyakit saluran pernafasan kronik yang bersifat fluktuatif dan menjadi salah satu masalah kesehatan penting di dunia. Asma menyebabkan terhambatnya aliran udara dalam saluran pernafasan yang dapat membuat pengidapnya mengalami kesulitan pada saat bernafas (Lambrecht dan Hammad, 2015). Menurut WHO (2018), asma menjadi penyakit pernafasan paling umum yang terdapat di kawasan negara berkembang dan negara maju. Asma menyerang semua kalangan umur, baik anak-anak maupun orang dewasa. Prevalensi asma pada anak-anak sebesar 8-10% dan pada orang dewasa sebesar 3-5%.

Asma merupakan masalah kesehatan dengan angka kesakitan dan kematian yang tinggi. Saat ini diperkirakan sebanyak 235 juta orang menderita asma di dunia. Berdasarkan laporan WHO, tercatat pada tahun 2015 sebanyak 383.000 orang meninggal karena asma (WHO, 2018). Hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) Departemen Kesehatan RI menyatakan bahwa asma merupakan penyebab kematian keempat di Indonesia dengan besar angka yaitu 5,6%. Dilaporkan prevalensi asma di seluruh Indonesia sebesar 13 per 1.000 penduduk. Kejadian asma terbanyak di Provinsi Sulawesi Tengah yaitu 7,8% dan di Nusa Tenggara Timur yaitu 7,3% (Kemenkes, 2017), sedangkan untuk prevalensi asma di Kabupaten Manokwari adalah 2,9% (Kemenkes, 2019).

Menurut Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 1023/MENKES/SK/XI/2008 Tentang Pedoman Pengendalian Penyakit Asma, penyakit asma disebabkan oleh faktor lingkungan dan faktor genetik. Faktor lingkungan meliputi alergen, makanan, obat-obatan tertentu, bahan yang mengiritasi, ekspresi emosi yang

berlebihan, asap rokok, polusi, kegiatan-kegiatan tertentu yang dapat memicu kambuhnya asma, dan juga perubahan cuaca. Sementara itu, aspek genetik berperan dalam patofisiologi alergi dan asma yang meliputi hipereaktivitas, alergi bronkus, jenis kelamin, etnik, dan faktor yang memodifikasi penyakit genetik.

Genetik penyakit asma sangat penting untuk diidentifikasi agar dapat memahami patogenesis penyakit asma, menentukan diagnosis hingga proses terapinya. Meskipun perkembangan penelitian genetika penyakit asma sangat pesat, tidak semua gen teridentifikasi dan diketahui mekanismenya secara pasti (Setyawati, 2014). Berbagai kejadian terjadi pada tingkat gen, seperti perubahan atau mutasi pada gen yang disebut polimorfisme nukleotida tunggal (*single nucleotide polymorphisms, SNP*) (Pei-Yu dan Kelvin, 2010).

Polimorfisme tidak menimbulkan perubahan struktur protein, melainkan hanya mengakibatkan variasi pada fungsi protein. Polimorfisme tidak bermanifestasi klinis, tetapi bisa menentukan kerentanan terhadap penyakit. Akibatnya, terjadi perubahan kerentanan suatu populasi terhadap penyakit. Polimorfisme yang terjadi akan terus diturunkan sehingga frekuensi polimorfisme pada setiap etnis dapat berbeda-beda (Pei-Yu dan Kelvin, 2010).

Beberapa penelitian terkait gen yang berhubungan dengan asma telah dilakukan. Penelitian yang dilakukan oleh Wei *et al.* (2012) mengenai polimorfisme berbagai variasi genetik terkait obesitas seperti gen $\beta 2$ -adrenergik receptor (ADRB2), $\beta 3$ -adrenergik receptor (ADRB3), dan *proliferator peroksisom activator gamma* (PPAR γ) menunjukkan bahwa polimorfisme pada gen tersebut meningkatkan resiko terjadinya penyakit asma. Polimorfisme gen ADRB2 rs10427135 kromosom 5q31-q32 genotip A/G,

polimorfisme gen ADRB3 rs4994 kromosom 8p21 genotip C/T, dan polimorfisme gen PPAR γ rs1801282 pada kromosom 3p25 genotip C/G memiliki resiko terkena penyakit asma. Namun yang paling signifikan adalah resiko penyakit asma pada polimorfisme gen ADRB2.

Salah satu penelitian genetik terkait penyakit asma pada manusia yang telah berhasil diidentifikasi menjelaskan bahwa terdapat gen yang berperan pada asma, yaitu gen C-C Ligan 7 (CCL7). Gen C-C Ligan 7 (CCL7) menyandi protein C-C Ligan 7 (CCL7). C-C Ligan 7 (CCL7) atau yang sebelumnya dikenal sebagai *Monocyte Chemotactic Protein-3* (MCP-3) merupakan protein yang disekresikan dalam proses inflamasi. Fungsi dari protein CCL7 adalah sebagai pembawa informasi melalui perekrutan sel limfosit. Gen CCL7 (MCP-3) terletak pada daerah kromosom 17q11.2-q.12 dengan total gen ~3000 pb yang terdiri dari 3 daerah ekson dan 2 daerah intron (Park *et al.*, 2005).

Pada penelitian sebelumnya, Park *et al.* (2005) telah melakukan penelitian mengenai polimorfisme gen CCL7 pada 24 individu penderita asma. Kemudian berhasil menemukan bahwa terdapat polimorfisme di beberapa daerah gen CCL7. Daerah-daerah tersebut yaitu pada daerah promotor terdapat satu polimorfisme, daerah intron 1 terdapat dua polimorfisme, dan daerah intron 2 terdapat satu polimorfisme. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa daerah intron 1 merupakan daerah dengan polimorfisme terbanyak. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk melihat variasi genetik penderita asma dari gen CCL7 pada daerah intron 1.

METODE PENELITIAN

Sampel Darah

Sampel darah diambil dari empat orang penderita asma dan dua orang non-asma yang berasal dari Kabupaten Manokwari dengan menggunakan metode

selective purposing. Pengidap asma dan non-asma yang darahnya dijadikan sebagai sampel terlebih dahulu diberi penjelasan mengenai tujuan pengambilan darahnya dan diminta kesediaannya secara sukarela untuk berpartisipasi dalam penelitian ini.

Isolasi DNA dan PCR Amplifikasi

DNA genomik diekstraksi menggunakan *Geneaid DNA Isolation Kit (Tissue)* sesuai dengan prosedur tertulis dari perusahaan. Amplifikasi daerah 3'UTR gen *LDLR* menggunakan metode PCR. Pasangan primer yang digunakan merujuk pada penelitian sebelumnya (Febriani, 2018). Primer *forward* yang digunakan adalah F:
AGCAGAGTTTGGGATCGGGTGA
sedangkan primer *reverse* adalah R:
ACACATTACAGCTTCCGGGGA.

PCR terdiri dari predenaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit lalu dilanjutkan dengan tahapan 40 siklus. Setiap siklus dilakukan dengan tahapan reaksi sebagai berikut: sampel didenaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, dilanjutkan penempelan primer (*annealing*) pada suhu 58°C selama 30 detik, dan perpanjangan utas DNA (*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 2 menit. Hasil produk PCR divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1%, SB buffer 1x, etidium bromida dan 1 kb DNA marker. Produk selanjutnya dikirim ke *First Base Laboratory Sdh Bhd* (Malaysia) untuk dilakukan sekuensing.

Analisis Data

Sekuens *forward* dan *reverse* yang diperoleh dari setiap amplicon dianalisis menggunakan program Mega-X untuk mendapatkan sekuens konsensus.

Sekuens konsensus selanjutnya disejajarkan dengan sekuens rujukan di *GenBank* (kode akses sekuens nukleotida X72309.1) dengan *Basic Local Search Alignment Tools (BLAST)* untuk menganalisis karakteristik gen amplicon dan menemukan polimorfisme nukleotida tunggal (*single nucleotide polymorphisms, SNP*).

Data hasil pensejajaran berdasarkan data rujukan selanjutnya dianalisis lebih lanjut untuk mengetahui komposisi nukleotida, perbedaan nukleotida, keragaman nukleotida (π), jarak genetik dan pohon filogenetik menggunakan program yang sama, yaitu *Mega-X* (Kumar *et al.*, 2016). Pensejajaran menggunakan *Clustal W*, 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 yang meliputi jumlah haplotipe, situs polimorfisme dan keragaman haplotipe dilakukan menggunakan program *DNA Sequence Polymorphism (DnaSP)* versi 6.11 (Rozas *et al.*, 2017).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi DNA Genomik

Ekstraksi DNA genomik berasal dari sel darah putih (leukosit) karena di dalamnya terdapat inti sel (nukleus). Sedangkan untuk sel darah merah (eritrosit) dan keping darah (trombosit)

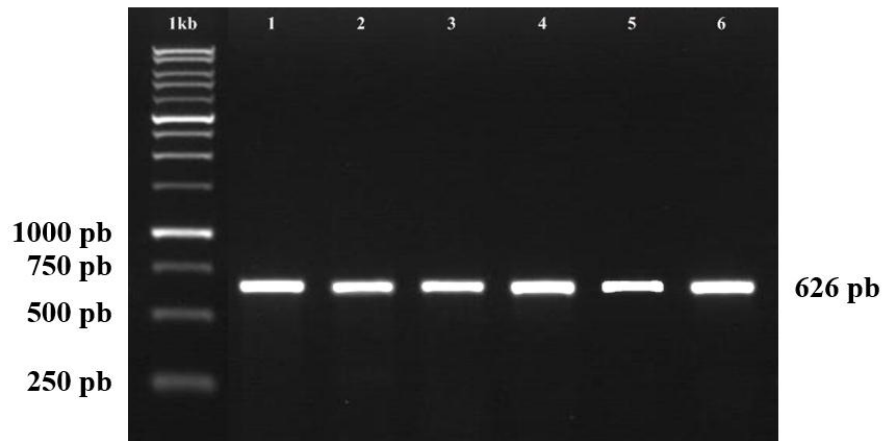
tidak mempunyai inti sel (nukleus). Prinsip ekstraksi yang digunakan yaitu preparasi sampel, penghancuran sampel, pengikatan DNA, pencucian dan elusi. Hasil ekstraksi yang didapatkan berupa larutan tidak berwarna dan tidak memiliki endapan. Hasil ekstraksi DNA genomik ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1 Hasil ekstraksi DNA genomik

Amplifikasi dan Sekuensing Daerah Intron 1 Gen *CCL7*

Amplifikasi daerah Intron 1 gen *CCL7* dari 6 sampel dengan menggunakan primer *forward* dan *reverse* berhasil dilakukan. Keenam sampel tersebut terdiri dari 4 sampel penderita asma dan 2 sampel non-asma. Keberhasilan dari suatu amplifikasi yaitu apabila *primer* yang menempel sesuai dengan gen target yang diinginkan, juga dengan munculnya pita DNA yang dibuktikan melalui proses elektroforesis. Hasil amplifikasi daerah Intron 1 gen *CCL7* ditampilkan pada Gambar 2.



Gambar 2 Hasil elektroforesis produk PCR. Keterangan (1kb) DNA marker 1 kb, (1) Asma-1, (2) Asma-2, (3) Asma-3, (4) Asma-4, (5) Non asma-1, (6) Non asma-2

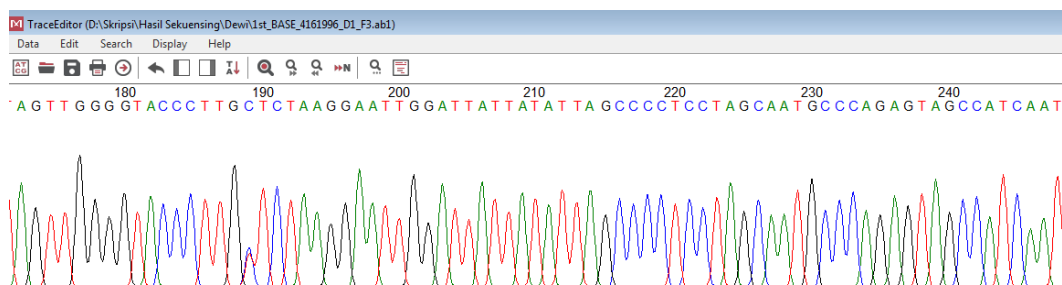
Produk amplifikasi yang telah berhasil didapatkan kemudian disekuensing dan diperoleh hasilnya dalam bentuk elektroforegram, yaitu berupa puncak dari urutan nukleotida DNA. Warna dari masing-masing puncak tersebut menunjukkan kandungan basa nitrogen, yaitu warna hijau melambangkan Adenin (A), warna hitam melambangkan Guanin (G), warna merah melambangkan Timin (T) dan warna biru melambangkan Sitosin (S). Fragmen elektroforegram ditampilkan pada Gambar 3.

Hasil pensejajaran sekuens konsensus kemudian disejajarkan dengan sekuens rujukan di *GenBank* menggunakan kode akses sekuens nukleotida X72309.1. Hasil yang didapat

menunjukkan sekuens terdiri dari 506 pb yang merupakan bagian dari daerah Intron 1, 118 pb merupakan bagian dari daerah Ekson 2, dan 2 pb merupakan bagian dari daerah Intron 2. Sementara itu, ada 273 pb dari daerah Intron 1 yang tidak teramplifikasi.

Variasi Nukleotida antar Sekuens Intron 1 Gen *CCL7*

Hasil analisis komposisi nukleotida dari setiap sampel ditampilkan pada Tabel 1. Komposisi nukleotida timin (T/U) pada sampel Asma-1 dan Asma-3 menunjukkan nilai persentase paling tinggi, yaitu 26,8%. Komposisi nukleotida sitosin (C) pada sampel Asma-1 menunjukkan nilai persentase paling rendah, yaitu 23,3%. Komposisi nukleotida adenin (A) pada sampel Asma-3 menunjukkan nilai persentase paling rendah, yaitu 25,9%. Sedangkan komposisi nukleotida guanin (G) pada seluruh sampel menunjukkan nilai persentase yang sama, yaitu 23,8%.



Gambar 3 Fragmen elektroforegram sampel Asma-1

Tabel 1 Komposisi nukleotida Intron 1 Gen *CCL7*

No.	ID Sampel	Jumlah Nukleotida (pb)	Komposisi Nukleotida (%)			
			T(U)	C	A	G
1.	Asma-1	626	26,8	23,3	26,0	23,8
2.	Asma-2	626	26,7	23,5	26,0	23,8
3.	Asma-3	626	26,8	23,5	25,9	23,8
4.	Asma-4	626	26,7	23,5	26,0	23,8
5.	Non asma-1	626	26,7	23,5	26,0	23,8
6.	Non asma-2	626	26,7	23,5	26,0	23,8
		Rata-rata	26,7	23,5	26,0	23,8

Analisis variasi nukleotida dari sekuens Intron 1 Gen *CCL7* berdasarkan perbedaan komposisi nukleotida diperoleh jumlah perbedaan antar pasangan sekuens. Jumlah perbedaan nukleotida berkisar antara 0 hingga 2 nukleotida dengan rata-rata sebesar 0,667 nukleotida dan keragaman nukleotida (π) sebesar 0,00106. Matriks perbedaan nukleotida antar pasangan sekuens ditampilkan pada Tabel 2.

Kemiripan paling rendah ditunjukkan oleh sekuens sampel Asma-3 dengan sekuens sampel Asma-1 yang berbeda 2 nukleotida. Sekuens dengan jumlah perbedaan 1 nukleotida ditunjukkan oleh sekuens sampel Asma-2 dengan sekuens sampel Asma-1, sekuens sampel Asma-3 dengan sekuens sampel Asma-2, sekuens sampel Asma-4 dengan sekuens sampel Asma-1 dan sekuens sampel Asma-3, sekuens sampel Non asma-1 dengan sekuens sampel Asma-1 dan sekuens sampel Asma-3, sekuens sampel Non asma-2 dengan sekuens sampel Asma-1 dan sekuens sampel Asma-3. Sedangkan pada pasangan sekuens yang memiliki perbedaan nukleotida 0 menunjukkan bahwa kedua sekuens tersebut memiliki kesamaan atau identik.

Berdasarkan perbedaan nukleotida yang telah diperoleh, maka jarak genetik yang menunjukkan kemiripan antar pasangan sekuens dapat diketahui. Semakin tinggi nilai jarak genetik, maka semakin kecil kemiripannya. Sedangkan semakin rendah nilai jarak genetik, maka semakin besar kemiripannya. Jarak genetik antar pasangan sekuens ditampilkan pada Tabel 3.

Sampel Asma-4 dengan sampel Asma-2, sampel Non asma-1 dengan sampel Asma-2 dan sampel Asma-4, sampel Non asma-2 dengan sampel Asma-2, sampel Asma-4 dan sampel Non asma-1 memiliki jarak genetik paling dekat, yaitu 0,000 (0,0%). Jarak genetik antar pasangan sekuens sebesar 0,002 (0,2%) ditunjukkan oleh sampel Asma-2 dengan sampel Asma-1, sampel Asma-3 dengan sampel Asma-2, sampel Asma-4 dengan sampel Asma-1 dan sampel Asma-3, sampel Non asma-1 dengan sampel Asma-1 dan sampel Asma-3, sampel Non asma-2 dengan sampel Asma-1 dan sampel Asma-3. Sedangkan jarak genetik paling jauh ditunjukkan oleh sampel Asma-3 dengan sampel Asma-1, yaitu sebesar 0,003 (0,3%).

Tabel 2 Matriks perbedaan nukleotida antar pasangan sekuens

No.	ID Sampel	1	2	3	4	5	6
1.	Asma-1						
2.	Asma-2	1					
3.	Asma-3	2	1				
4.	Asma-4	1	0	1			
5.	Non asma-1	1	0	1	0		
6.	Non asma-2	1	0	1	0	0	

Tabel 3 Jarak genetik antar pasangan sekuens

No.	ID Sampel	1	2	3	4	5	6
1.	Asma-1						
2.	Asma-2	0,002					
3.	Asma-3	0,003	0,002				
4.	Asma-4	0,002	0,000	0,002			
5.	Non asma-1	0,002	0,000	0,002	0,000		
6.	Non asma-2	0,002	0,000	0,002	0,000	0,000	

Berdasarkan nilai rata-rata untuk seluruh populasi, keragaman nukleotida, jarak genetik dan pola substitusi secara keseluruhan, menunjukkan variasi genetik yang rendah. Keragaman nukleotida (π) merupakan salah satu parameter yang dapat digunakan untuk menentukan adanya variasi genetik.

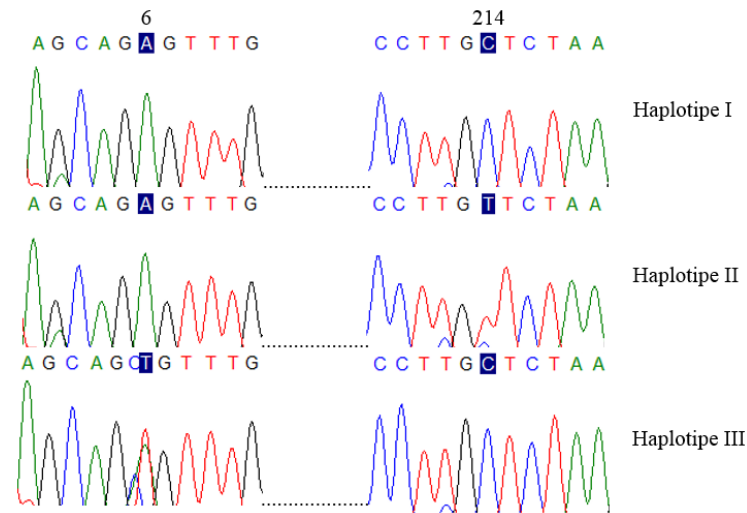
Polimorfisme Nukleotida Tunggal dan Haplotipe

Hasil analisis pada sekuens Intron 1 Gen *CCL7* dari 6 sampel menunjukkan adanya 2 SNP pada posisi *6 dan *214. Berdasarkan 2 SNP yang diperoleh tersebut, menghasilkan adanya 3 haplotipe. Posisi polimorfisme dan jenis

haplotipe ditunjukkan pada Tabel 4. SNP ini terdiri dari satu situs variabel singleton dan satu situs parsimoni informatif. Situs variabel singleton berada pada posisi *6. Sedangkan situs parsimoni informatif berada pada posisi *214. Kemudian setiap sampel mengelompok berdasarkan jenis haplotipenya masing-masing. Pada haplotipe I, yaitu AC terdiri atas sampel Asma-2, Asma-4, Non asma-1 dan Non asma-2. Haplotipe II, yaitu AT merupakan sampel Asma-1. Sedangkan haplotipe III, yaitu TC merupakan sampel Asma-3. Gambar elektroferogram untuk ketiga pola haplotipe ditampilkan pada Gambar 4.

Tabel 4 Polimorfisme sekuens Intron 1 Gen *CCL7*

Haplotipe	Posisi Nukleotida pada Intron 1		Jumlah Individu	ID Sampel
	*6	*214		
Ref	A	C	-	X72309.1
I	A	C	4	Asma-2, Asma-4, Non asma-1 dan Non asma-2
II	A	T	1	Asma-1
III	T	C	1	Asma-3



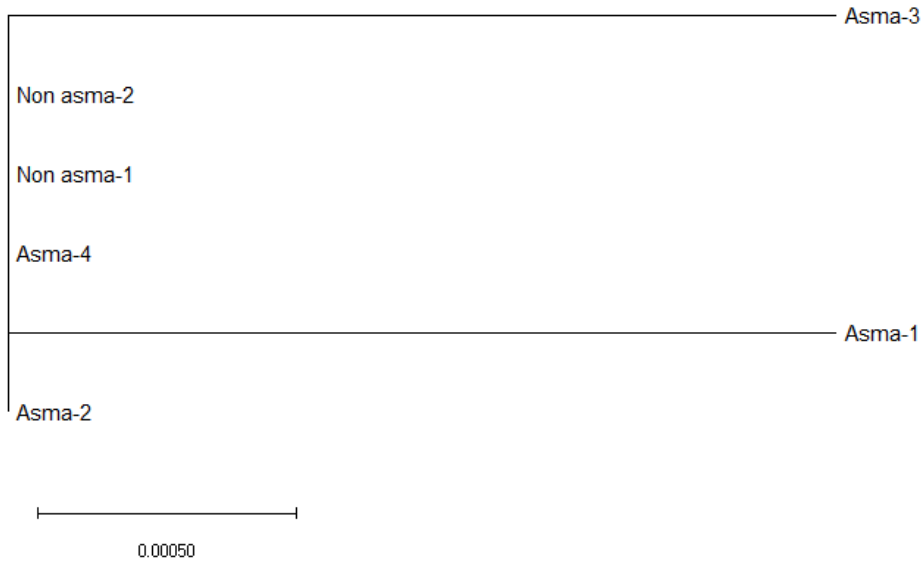
Gambar 4 Elektroferogram untuk tiga pola haplotipe

Haplotipe yang dihasilkan dapat digolongkan menjadi haplotipe umum dan haplotipe khusus. Haplotipe I (AC) merupakan haplotipe umum karena dimiliki oleh lebih dari satu sampel. Sedangkan haplotipe II (AT) dan haplotipe III (TC) tergolong haplotipe khusus dikarenakan hanya dimiliki oleh satu sampel. Nilai keragaman haplotipe yang diperoleh sebesar $0,600 \pm 0,215$. Keragaman haplotipe dapat menunjukkan tingkat variasi genetik. Haplotipe yang semakin beragam menandakan tingkat variasi genetik yang semakin tinggi.

Berdasarkan keragaman haplotipe yang diperoleh, dapat dibuat pohon filogenetik. Keenam sampel pada pohon filogenetik mengelompok berdasarkan haplotipenya. Pohon filogenetik berdasarkan sekuens Intron 1 Gen *CCL7* ditampilkan pada Gambar 5. Haplotipe I

merupakan haplotipe yang identik dengan haplotipe referensi *GenBank* dengan jumlah sampel paling banyak, yaitu 4 sampel. Sedangkan haplotipe II dan haplotipe III merupakan haplotipe dengan jumlah sampel paling sedikit, yaitu masing-masing berjumlah 1 sampel.

Sekuens sampel Asma merupakan sekuens yang paling beragam, khususnya Asma-1 dan Asma-3. Hal tersebut dikarenakan sekuens sampel Asma terbagi dalam semua haplotipe, yaitu haplotipe I, haplotipe II dan haplotipe III. Pada sampel Asma-1 dan Asma-3 menunjukkan adanya polimorfisme. Sedangkan sampel Asma-2 dan Asma-4 tidak menunjukkan adanya polimorfisme, bahkan identik dengan haplotipe referensi *GenBank*, juga sampel Non asma-1 dan Non-asma-2.



Gambar 5 Pohon filogenetik berdasarkan sekuens Intron 1 Gen *CCL7*

Pada penelitian sebelumnya terkait variasi genetik gen *CCL7*, Park *et al.* (2005) mengidentifikasi adanya polimorfisme pada 3 daerah gen *CCL7*. Ketiga daerah tersebut yaitu daerah promotor, daerah intron 1 dan daerah intron 2. Daerah promotor terdapat 1 SNP yang berada pada posisi *420 dengan perubahan nukleotida adalah T>C. Daerah intron 1 terdapat 2 SNP yang berada pada posisi *136 dengan perubahan nukleotida adalah C>G, dan juga pada posisi *563 dengan perubahan nukleotida adalah C>T. Sedangkan daerah intron 2 terdapat 1 SNP yang berada pada posisi *984 dengan perubahan nukleotida adalah G>A.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Batra *et al.* (2011) mengenai variasi genetik gen *CCL7*, mengidentifikasi adanya polimorfisme pada 2 daerah gen *CCL7*. Kedua daerah tersebut yaitu daerah intron 1 dan daerah intron 2. Daerah intron 1 terdapat 1 SNP yang berada pada posisi *163 dengan perubahan nukleotida adalah C>G. Daerah intron 2 terdapat 2 SNP yang berada pada posisi *563 dengan perubahan nukleotida adalah C>T, dan juga pada posisi *984 dengan perubahan nukleotida adalah G>A.

Pada penelitian ini menemukan adanya 2 SNP pada daerah intron 1 gen

CCL7. Polimorfisme yang ditemukan berada pada posisi *6 dengan perubahan nukleotida adalah A>T dan pada posisi *214 dengan perubahan nukleotida adalah C>T.

Dengan demikian, pada penelitian ini berhasil mengidentifikasi 2 SNP pada daerah intron 1 gen *CCL7* yang belum teridentifikasi pada penelitian sebelumnya. Kedua SNP ini terletak pada posisi *6 dan *214, yaitu A>T dan C>T. Akan tetapi, seluruh SNP yang diidentifikasi belum diketahui pengaruhnya terhadap mekanisme patogenesis asma.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa daerah intron 1 gen *CCL7* terdiri dari 506 pb. Dari 6 sampel yang diteliti, 4 sampel penderita asma dan 2 sampel non-asma di Kabupaten Manokwari diperoleh polimorfisme sebanyak 2 SNP pada posisi *6 dan *214 dengan keragaman nukleotida (π) sebesar 0,00106. Polimorfisme ini membentuk 3 jenis haplotipe, yaitu AC, AT dan TC dengan nilai keragaman haplotipe sebesar $0,600 \pm 0,215$. Hasil pembuatan pohon filogenetik menunjukkan sekuens sampel Asma-1 dan Asma-3 memiliki jarak genetik paling jauh.

DAFTAR PUSTAKA

- Barnes, P. J. 2008. Immunology of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Immunology*. (8): 183–191.
- Batra, J., Das, S., Chatterjee, R., Chandra, S., Ghosh, B. 2011. Monocyte Chemotactic Protein (MCP3) Promoter Polymorphism Is Associated With Atopic Asthma In The Indian Population. *J Allergy Clin Immunol*. 128: 239-42.
- Brooker, R. J. 2014. Genetics: Analysis and Principles (4th ed.): McGraw-Hill Education.
- Campbell, A., Jane B. R., Michael L. C., Steven A. W., Peter V. M., dan Robert B. J. 2008. Biologi Edisi Kedelapan. Erlangga. Jakarta.
- Corkill, G., Rapley, R. 2008. The Manipulation of Nucleic Acids: Basic Tools and Techniques in Molecular Biomethods Handbook Second Edition. Ed: Walker, J. M., Rapley, R. Humana Press, NJ, USA.
- Ensembl. 2017. Gene: CCL7. ENSG00000108688.
- Febriani, N. 2018. Karakterisasi Gen C-C Ligan 7 (CCL7) sebagai Penanda Genetik Asma pada Beruk (Macaca nemestrina). Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Franca, L. T. C., Carrilho, E., Kist, T. B. L. 2002. A Review of DNA Sequencing Techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics* 35: 169–200.
- George, R. B. 2005. Chest Medicine: Essentials Of Pulmonary And Critical Care Medicine. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. Hal. 62. ISBN 978-0-7817-5273-2.
- Glick, B. R., Pasternak, J. J., Patten, C. L. 2010. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. (4 ed.). Washington, DC: ASM Press. Hlm. 117– 118.
- Hartwell, L. H., Hood, L., Goldberg, M. L., Reynolds, A. E., Silver, L. M. 2010. Genetics: From Genes to Genomes (4 ed.): McGraw-Hill Higher Education.
- Holme, D. J., Hazel, P. 1998. E-book: Analytical Biochemistry Third Edition. Pearson Education. England.
- Ishmael, F. T., Stellato, C. 2008. Principles And Applications Of Polymerase Chain Reaction: Basic Science For The Practicing Physician. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 101(4), 437-443.
- Joshi, M., Deshpande, J. 2010. Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles And Application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81-97.
- Karp, G. 2008. Cell and Molecular Biology, Concepts and Experiment. New Jersey: John Wiley and Son, Inc.
- Kemenkes. 2008. Pedoman Pengendalian Penyakit Asma. Indonesia: Kemenkes RI.
- Kemenkes. 2017. Hasil Penelitian Riset Kesehatan Dasar. Indonesia: Kemenkes RI.
- Kemenkes. 2019. Laporan Provinsi Papua Barat Riset Kesehatan Dasar 2018. Indonesia: Kemenkes RI.
- Khosravinia, H., Murthy, H. N. N., Parasad, D. T., Pirany, N. 2007. Optimizing Factors Influencing DNA Extraction from Fresh Whole Avian Blood. *African Journal of Biotechnology*. 6 (4): 481-486.

- Lambrecht, B. N., Hammad, H. 2014. The Immunology of Asthma. *Nat Immunol.* 16: 45-56.
- Lambrecht, B. N., Hammad, H. 2015. The Immunology of Asthma. *Immunology of The Lung.* (16): 45–50.
- Liu, Y., Cai, Y., Liu, L., Wu, Y., Xiong, X. 2018. Crucial Biological Functions Of CCL7 In Cancer. Hal. 6.s
- Mariya, S. S. 2018. Isolasi, Karakterisasi dan Ekspresi Kemokin sebagai Penanda Genetik Penyakit Asma pada Hewan Model Macaca fascicularis. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Mariya, S. S., Dewi, F. N., Villiandra, Paramastri, Y. A., Iskandriati, D., Saepuloh, U., Hayes. E., Pamungkas, J., Sajuthi, D. 2019. Isolation and Characterization of C-C Chemokine Ligand 7 (CCL7) in *Cynomolgus* Macaques. *Journal of Biosciences.* Vol. 26(3), 129-132. ISSN: 1978-3019.
- Martinez, F. D. 2007. Genes, Environments, Development And Asthma: A Reappraisal. *Eur Respir J.* Hal. 29 (1): 179–84.
- Menten, P., Wuyts, A., Van, D. J. 2001. Monocyte chemotactic protein-3. *European Cytokine Network.* 12 (4): 554–60.
- Metzker, M. L., Caskey, C. T. 2009. Polymerase Chain Reaction (PCR). eLS.
- Murakami, K., Nomiya, H., Miura, R., Follens, A., Fiten, P., Van, C. E., Van, D. J., Opendakker, G. 1997. Structural and Functional Analysis of The Promoter Region of The Human MCP-3 Gene: Transactivation of Expression by Novel Recognition Sequences Adjacent to The Transcription Initiation Site. *DNA and Cell Biology.* Vol. 16(2), 173–183.
- Murray, J. F., Nadel, J. A., Broaddus, V. C. 2016. Asthma: Pathogenesis and Phenotypes. Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine sixth edition. (2): 713–725.
- NCBI. 2018. Crucial Biological Functions of CCL7 in Cancer.
- Olsvik, O., Whalberg, J., Petterson, B., Uhlen, M., Popovic, T., Wachmuth, I. K., Fields, P. I. 1993. Use of Automated Sequencing of Polymerase Chain Reaction-Generated Amplicons to Indentify Three Types of Cholera Toxin Subunit B In *Vibrio Cholerae* O1 Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 22–25.
- Palmer, S., Wiegand, A. P., Maldarelli, F., Bazmi, H., Mican, J. M., Polis, M., Dewar, R. L., Planta, A., Liu, S., Metcalf, J. A. 2003. New Real-Time Reverse Transcriptase-Initiated PCR Assay With Single-Copy Sensitivity For Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA In Plasma. *Journal of clinical microbiology,* 41(10), 4531-4536.
- Park, B. L., Kim, L. H., Choi, Y. H., Cheong, H. S., Park, H. S., Hong, S. J., Choi, B. W., Lee, J. H., Uh, S. T., Park, C. S., Shin, H. D. 2005. Association Analysis of Monocyte Chemotactic Protein-3 (MCP3) Polymorphisms with Asthmatic Phenotypes. *J Biochem Mol Biol* 38:77-81.
- Pei-Yu, L., Kelvin, H. L. 2010. From SNPs to Functional Polymorphism-The Insight Into Biotechnology Application. Elsevier. *Biochemical Engineering Journal* 49: 149–158.
- Pratama, A. B. 2013. Therapy Herbal-Back to Nature. Surabaya: Pustaka Media. Hal. 21. ISBN 978-602-8214-56-8.

- Queljoe, D. D., Wahjudi, M., Erdiansyah, M., Suryadinata, R. V., Lorensia, A. 2015. Studi Pendahuluan Polimerfisme Genetik Gen CYP1A2*1F pada Pasien Asma dan Nonasma di Indonesia. *Jurnal Farmasi Klinik Indonesia*. Vol. 4(1), 8-16. ISSN: 2252-6218.
- Rollins, B. J. 1997. Chemokines. *Blood*. 90 (3): 909–28.
- Romagnani, S. 2002. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Molecular Immunology*. 38 (12–13): 881–5.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Libradi, P., Ramos-Onsins, S. E., Sanchez-Gracia, A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1997. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467.
- Setyawati, T. 2014. Polimorfisme Gen pada Penderita Asma Bronkial. *Jurnal Ilmiah Kedokteran*. Vol. 1(2).
- Song, A., Nikolcheva, T., Krensky, A. M. 2000. Transcriptional regulation of RANTES expression in T lymphocytes. *Immunological Reviews*. 177:236–45.
- Tsou, C. L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A. M., Weisberg, S. P. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of Clinical Investigation*. 117 (4): 902–9.
- Van, C. E., Van, D. J., Opendakker, G. 1999. The MCP/Eotaxin Subfamily Of CC Chemokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. Vol. 10(1): 61–86.
- Varshney, R.K., S.N. Nayak, G.D. May, and J.A. Jackson. 2009. Next-Generation Sequencing Technologies and Their Implications for Crop Genetics and Breeding. *Trends in Biotechnol.* 9: 522–530.
- Venter, J. C., Levy, S., Stockwell, T., Remington, K., Halpern, A. 2003. Massive Parallelism, Randomness and Genomic Advances. *Nat. Genet.* 33: 219–227.
- Weber, K. S., Von, H. P., Lewis, C. I., Weber, P. C., Weber, C. 1999. Differential Immobilization And Hierarchical Involvement Of Chemokines In Monocyte Arrest And Transmigration On Inflamed Endothelium In Shear Flow. *European Journal of Immunology*. 29 (2): 700–12.
- Wei, S. M. 2012. Gene-Gene and Gene Environmental Interaction of Childhood Asthma: A Multifactor Dimension Reduction Approach. *PlosOne*. Vol. 7(2):1-9.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., Rasmussen, R. P. 2013. Continuous Fluorescence Monitoring Of Rapid Cycle DNA Amplification. *Biotechniques*, 54(6), 314-320. doi:10.2144/000114043.
- World Health Organization. 2018. Global Asthma Network The Global Asthma Report. Geneva.
- Yudhawati, R., Krisdanti, D. P. A. 2017. Imunopatogenesis Asma. *Jurnal Respirasi*. Vol. 3(1).
- Yuwono, T. 2005. *Biologi Molekuler*. Erlangga. Jakarta.