

## IDENTIFIKASI KERAGAMAN GENETIK DAERAH 3'UTR GEN *LDLR* PENDUDUK ASLI PAPUA

*Identification of Genetic Diversity of LDLR Gen within the 3'UTR of the Native Papuans*

Windasari<sup>1</sup>, Muhammad Fajar Islam<sup>1</sup>, Achmad Taher<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia FMIPA Universitas Papua, Manokwari, Papua Barat

\*Corresponding author : a.taher@unipa.ac.id

**ABSTRACT:** Papua is one of the big islands in Indonesia that has many tribes live within different ecological zones. Different ecological zones may potentially result in genetic diversity of their population. Researches in genetic diversity of the Native Papuans are very rare, mainly in terms of the diversity of the *LDLR* gen within the 3'UTR. The research aimed to identify the genetic diversity of the *LDLR* gen of the indigenous people of Papua within the 3'UTR. Four steps were performed in the research, namely DNA extraction, amplification, electrophoresis, and sequencing. Two SNPs within the 3'UTR's were identified with a nucleotide diversity ( $\pi$ ) of 0.00177. The identified SNPs are at \*52, that is G>A and at \*504, that is G>A. The observed haplotypes are GG and AA with a diversity of  $0.533 \pm 0.172$ .

**Keywords:** 3'UTR; genetic diversity; *LDLR* gen; native papuans

### PENDAHULUAN

Penduduk Papua terdiri atas banyak suku yang tersebar di berbagai zona-zona ekologis dengan karakteristik sosial budaya yang berbeda satu sama lainnya (Rumansara 2015). Banyaknya suku berpotensi menghasilkan keragaman genetik pada individu-individu penduduknya. Salah satunya adalah keragaman genetik pada gen *LDLR* (*Low-Density Lipoprotein Receptor*). Gen *LDLR* mengkode protein reseptor LDL (LDL-R). Protein LDL-R berperan dalam proses endositosis partikel LDL sehingga sangat penting dalam mempertahankan homeostasis kolesterol pada manusia dan hewan (Francke *et al.*, 1984). Pada manusia, gen *LDLR* memiliki ukuran lebih dari 45 kilobasa (kb) dan terletak pada kromosom 19, yaitu dalam pita 19p13.2. Gen ini mengandung 18 ekson, 17 intron, 5' *untranslated Region* (daerah 5'UTR) dan 3' *untranslated Region* (daerah 3'UTR) (Südhof *et al.*, 1985).

Daerah 3'UTR meliputi sekuens dengan ukuran terbesar pada suatu rantai mRNA. Sekuens 3'UTR adalah sekuens yang tidak ditranslasikan. Daerah ini merupakan salah satu dari daerah pengatur yang berperan pada berbagai proses, mulai dari pembelahan transkrip, stabilitas dan poliadenilasi hingga

proses translasi serta lokalisasi mRNA. Selain itu daerah ini juga sangat berperan dalam menentukan nasib mRNA. (Barrett *et al.*, 2013). Pada gen *LDLR* sekuens 3'UTR-nya berukuran sekitar 2,5 kb, hampir setengah dari keseluruhan mRNA nya (Südhof *et al.*, 1985).

Daerah 3'UTR gen *LDLR* memiliki tingkat keragaman genetik yang tinggi yang dipertahankan selama proses evolusi melalui seleksi alam. Variasi genetik pada daerah 3'UTR gen *LDLR* manusia, berupa keberadaan polimorfisme nukleotida tunggal (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) telah banyak dilaporkan. Fagundes *et al.* (2005) meneliti variasi genetik pada 3'UTR gen *LDLR* dari 111 individu asal Afrika, Asia, Kaukasia dan Amerika dan menemukan adanya 21 SNP. Chen *et al.* (2008) yang menganalisis 197 individu asal Cina menemukan 6 SNP pada 3'UTR gen *LDLR*. Werutsky (2006) yang mengkarakterisasi gen *LDLR* dari 40 pasien penderita *familial hipercholesterolemia*, *FH* di Rio Grande do Sul, Brazil, mengidentifikasi adanya 3 SNP pada 3'UTR. Tingginya keragaman genetik pada daerah 3'UTR menurut Fagundes *et al.* (2005) kemungkinan dipengaruhi oleh seleksi alam selama proses evolusi.

Keragaman genetik daerah 3'UTR gen *LDLR* pada penduduk asli Papua telah dilaporkan oleh Munir dan Taher (2018) dan

Pratiwi dan Taher (2019). Pada kedua penelitian tersebut diidentifikasi 2 SNP. Penelitian ini mengambil sampel yang berbeda baik yang berasal dari suku yang sama maupun berbeda dari sampel yang telah diteliti sebelumnya. Penambahan jumlah sampel dimaksudkan untuk mendapatkan variasi genetik umum penduduk Papua pada daerah 3'UTR gen *LDLR*. Tujuan penelitian adalah untuk mengidentifikasi keragaman genetik daerah 3'UTR gen *LDLR* penduduk Papua.

## METODE PENELITIAN

### Sampel darah

Darah diambil dari 6 orang asli Papua dengan asal suku berbeda menggunakan metode *selective purposing*, yaitu 2 orang Biak, 2 orang Asmat dan 2 Meybrat. Orang yang darahnya diambil darahnya diminta kesediaannya terlebih dahulu dan diberi penjelasan mengenai tujuan darahnya diambil.

### Ekstraksi DNA

Proses ekstraksi DNA genomik menggunakan kit DNA (*Genomic DNA Mini Kit Geneaid*). Proses ekstraksi dilakukan dengan cara sebagai berikut: (1) Sebanyak 200  $\mu$ L sampel darah dan 20  $\mu$ L proteinase K dimasukkan pada tabung eppendorf yang berkapasitas 1,5 mL lalu divorteks selama 15 detik dan diinkubasi menggunakan suhu 60°C selama 5 menit. Setelah itu disentrifugasi sebentar guna menurunkan sisa-sisa capuran yang masih berada pada tutup eppendorf. (2) setelah itu ditambahkan 200  $\mu$ L GSB Buffer lalu dikocok dengan kuat selama 5 detik dan disentrifugasi. Selanjutnya diinkubasi pada 60°C selama 5 menit. (3) Sebanyak 200  $\mu$ L etanol pa ditambahkan pada campuran lalu dikocok dengan kuat selama 15 detik dan selanjutnya disentrifugasi. (4) Campuran selanjutnya dimasukkan ke dalam GS *column* dalam *Collection tube* berkapasitas 2 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 14-16000 rpm selama 1 menit. GS *column* hasil sentrifugasi diambil dan dimasukkan ke dalam *collection tube* berkapasitas 2 mL yang baru. (5) Setelah itu W1 *buffer* sebanyak 400  $\mu$ L ditambahkan pada GS *column* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14-16000 rpm selama 30 detik. (6) Filtrat hasil sentrifugasi dibuang, lalu GS *column* kembali diletakan pada *collection tube* 2 mL. (7) *Wash Buffer* Sebanyak 600

$\mu$ L dimasukkan pada GS *column*, dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 14-16000 rpm selama 30 detik. (8) Filtrat yang diperoleh dibuang dan GS *Column* kembali diletakan ke dalam *collection tube* 2 mL dan disentrifugasi selama 3 menit agar matriks kolom menjadi kering. GS *Column* yang telah disentrifugasi selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung microsentrifuge 1,5 mL dan *Elution Buffer* sebanyak 100  $\mu$ L ditambahkan dan dibiarkan selama kurang lebih 3 menit lalu GS *Column* disentrifugasi pada 14-16000 rpm selama 30 detik untuk melulusi DNA yang dimurnikan.

### Amplifikasi

Gen target diamplifikasi menggunakan metode PCR. Pasangan primer yang digunakan untuk mengamplifikasi daerah 3'UTR gen *LDLR* merujuk pada penelitian sebelumnya (Munir dan Taher, 2018), yaitu F: 5'-GAGGATCAGGATGTGGGAG-3' dan R: 5'-ACCACGGATTCAGCCAGATC-3'.

Amplifikasi dilakukan dengan mesin *SimpliAmp Thermal Cycler*. Volume total campuran yang digunakan dalam proses amplifikasi adalah 25  $\mu$ L. Campuran terdiri dari 5  $\mu$ L sampel DNA, 12,5  $\mu$ L *Gotaq green*, 1  $\mu$ L primer *forward*, 1  $\mu$ L primer *reverse* dan 5,5  $\mu$ L *nuclease free water*. Proses amplifikasi meliputi tahapan denaturasi pertama selama 5 menit menggunakan suhu 94°C dan tahapan siklus sebanyak 40x. Tahapan dalam setiap siklus meliputi denaturasi kedua selama 30 detik menggunakan suhu 94°C, penempelan primer selama 30 detik menggunakan suhu 56°C, dan *extension* selama 30 detik menggunakan suhu 72°C. Tahapan selanjutnya adalah *post extension* selama 7 menit pada suhu 72°C lalu dan 2 menit pada suhu 25°C.

### Elektroforesis Gel Agarosa

Produk amplifikasi dideteksi dengan metode elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,8%. Pembuatan gel dilakukan dengan melarutkan 1,8 gram agarosa dalam 100 mL larutan buffer *Tris-Acetate-EDTA* 1X (TAE 1X), kemudian dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk dalam microwave. Setelah mendidih larutan ditambahkan 5  $\mu$ L etidium bromida dan dituang pada cetakan lalu dibiarkan hingga terbentuk gel. Gel selanjutnya dimasukkan ke dalam *chamber* elektroforesis yang berisi larutan buffer TAE IX. Setelah itu sebanyak 5  $\mu$ L produk hasil amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur sampel lalu

dielektroforesis. Sebagai marker digunakan DNA ladder 1 kb. Proses elektroforesis dilakukan dengan tegangan sebesar 100 Volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis diamati menggunakan alat *UV-Vis transluminator*. Adanya pita (*band*) terang dalam gel yang telah dielektroforesis menunjukkan adanya produk hasil amplifikasi.

#### Sekuensing Amplikon dan Analisis Data

Produk amplifikasi yang diperoleh dikirim ke Malaysia untuk disekuensing. Hasil sekuensing berupa sekuens *forward* dan *reverse* untuk masing-masing amplikon diedit menggunakan program BioEdit dan Mega versi 11.0 sehingga diperoleh sekuens konsensus untuk masing-masing amplikon. Sekuens konsensus yang diperoleh kemudian disejajarkan dengan sekuens DNA pada basis data di *GenBank* dengan *Basic Local Search Alignment Tools (BLAST)* untuk memastikan bahwa sekuens konsensus yang diperoleh adalah sekuens gen *LDLR* manusia

Pensejajaran sekuens konsensus dan analisis perbedaan jumlah nukleotida, jarak genetik dan rekonstruksi pohon filogenetik juga dilakukan menggunakan program Mega 11.0. Jarak genetik Clustal W dipilih untuk melakukan pensejajaran, jumlah perbedaan nukleotida menggunakan opsi *number of differences*, perhitungan jarak genetik didasarkan pada kimura 2-parameter dan pembentukan pohon

filogenetik berdasarkan *Neighbor-joining* dengan nilai *bootstraps* 1000x.

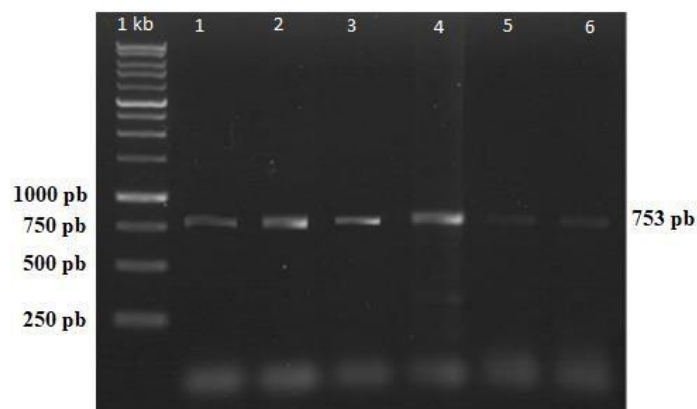
Program *DNA Sequence Polymorphysme (DnaSP) 6.12* (Rozas *et al.*, 2017) digunakan untuk menganalisis *single nucleotide polymorphisms (SNP)*, nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ), jenis haplotipe dan nilai keragaman haplotipe.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Amplifikasi dan Sekuensing 3'UTR

Penelitian ini berhasil mengamplifikasi 3'UTR gen *LDLR* dari 6 individu asli Papua yang dijadikan sebagai sampel. Produk hasil amplifikasi yang diperoleh berukuran 753 pb. Keberhasilan proses amplifikasi ditunjukkan oleh adanya pita-pita terang DNA pada gel agarosa hasil elektroforesis. Pita-pita dari DNA hasil amplifikasi dapat dilihat pada Gambar 1.

Pensejajaran sekuens konsensus amplikon dengan basis data di *GenBank* diperoleh tingkat kesamaan 98-100% dengan gen *LDLR* manusia (nomor akses FJ525879.1) dan merupakan bagian dari daerah intron 17 sebanyak 114 pb, ekson 18 sebanyak 36 pb dan 3'UTR sebanyak 603 pb. Sekuens 3'UTR sepanjang 603 pb (terletak pada posisi 1\* hingga 603\*) selanjutnya digunakan untuk analisis variasi nukleotida dan SNP.



Gambar 1. Pita DNA produk PCR. Keterangan (1kb) DNA ladder, (1) Biak-1, (2) Asmat-1, (3) Meybrat-1, (4) Meybrat-2, (5) Asmat-2, (6) Biak-2.

Asmat-2.

**Variasi Nukleotida antar Sekuens 3’UTR**

Berdasarkan analisis perbedaan nukleotida diperoleh hasil bahwa perbedaan nukleotida antar sekuens berkisar 0 hingga 2 dengan nilai rata-rata 1,067 dan nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ) 0,00177. Perbedaan terjauh dimiliki oleh 2 sekuens, yaitu sekuens asal Meybrat-2 dan sekuens asal Biak-2. Kedua sekuens ini berbeda dua nukleotida dengan sekuens asal Biak-1, Asmat-1, Meybrat-1 dan Tabel 1. Matriks perbedaan nukleotida antar pasangan sekuens.

Sekuens Meybrat-2 dan Biak-2 memiliki perbedaan nukleotida 0, sama halnya dengan sekuens biak-1, Asmat-1, Meybrat-1 dan Asmat-2 di mana antar mereka perbedaan nukleotidanya juga 0. Perbedaan nukleotida nol menunjukkan bahwa kedua sekuens yang dibandingkan adalah sama atau identik. Matriks perbedaan nukleotida antar pasangan sekuens dapat dilihat pada Tabel 1.

No.	ID Sampel	1	2	3	4	5	6
1.	Biak-1						
2.	Asmat-1	0					
3.	Meybrat-1	0	0				
4.	Meybrat-2	2	2	2			
5.	Asmat-2	0	0	0	2		
6.	Biak-2	2	2	2	0	2	

Dari hasil perbedaan nukleotida dapat diketahui jarak genetik antar pasangan sekuens. Jarak genetik yang diperoleh berkisar 0,000-0,003 dengan rata-rata 0,002. Individu asal Biak-1, Asmat-1, Meybrat-1 dan Asmat-2 memiliki jarak genetik 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa keempatnya adalah identik secara genetik. Jarak genetik antar pasangan sekuens sebesar 0,003 ditunjukkan oleh individu asal Meybrat-2 dan

Biak-2 dengan individu Biak-1, Asmat-1, Meybrat-1 dan Asmat-2. Jarak genetik antar pasangan sekuens ditunjukkan pada Tabel 2. Hal ini menunjukkan bahwa individu-individu ini memiliki perbedaan secara genetik walaupun jaraknya kecil. Rendahnya jarak genetik menunjukkan dekatnya hubungan kekerabatan antar pasangan sekuens. Sebaliknya, tingginya jarak genetik menunjukkan jauhnya hubungan kekerabatan.

Tabel 2. Jarak genetik antar pasangan sekuens.

No.	ID Sampel	1	2	3	4	5	6
1.	Biak-1						
2.	Asmat-1	0,000					
3.	Meybrat-1	0,000	0,000				
4.	Meybrat-2	0,003	0,003	0,003			
5.	Asmat-2	0,000	0,000	0,000	0,003		
6.	Biak-2	0,003	0,003	0,003	0,000	0,003	

**SNP dan Haplotipe**

Hasil analisis keseluruhan sekuens 3’UTR dari 6 sampel menunjukkan adanya 2 SNP yang terletak pada posisi \*52 dan \*504. Kedua situs SNP yang diperoleh merupakan situs parsimoni informatif dan menghasilkan 2 haplotipe, yaitu haplotipe I (GG) dan haplotipe II (AA). Haplotipe I terdiri atas 4 individu, yaitu individu asal

Biak-1, Asmat-1, Meybrat-1 dan Asmat-2. Haplotipe II dimiliki oleh 2 individu, yaitu individu asal Meybrat-2 dan Biak-2. Kedua haplotipe digolongkan sebagai haplotipe umum karena terdapat lebih dari satu individu yang memiliki haplotipe tersebut. Nilai keragaman haplotipe yang diperoleh sebesar  $0,533 \pm 0,172$ . Posisi polimorfisme yang diidentifikasi dan jenis haplotipenya dapat ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Polimorfisme sekuens daerah 3’UTR.

Haplotipe	Posisi nukleotida pada 3’UTR		Jumlah individu	ID sampel
	*52	*504		
Ref	G	G	-	FJ525879.1
I	G	G	4	Biak-1, Asmat-1, Meybrat-1, Asmat-2
II	A	A	2	Meybrat-2, Biak-2

Keragaman haplotipe yang diperoleh dalam penelitian ini adalah rendah. Hal ini ditunjukkan oleh nilai Tajima’s D, yaitu sebesar -1,1003. Nilai negatif menunjukkan tidak signifikan dan mengindikasikan bahwa keragaman genetik pada sampel yang digunakan rendah. Keragaman genetik yang rendah menandakan kecilnya tingkat evolusi pada individu yang diteliti.

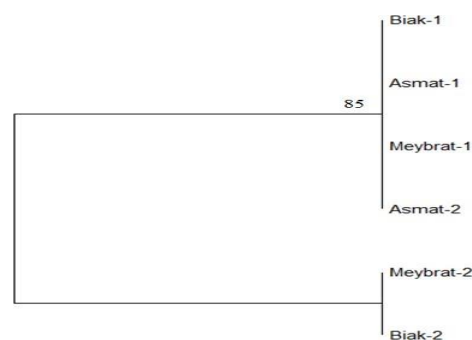
Rendahnya keragaman genetik dari individu orang asli Papua yang dijadikan sampel dalam penelitian ini sama dengan penelitian sebelumnya (Munir dan Taher, 2018; Pratiwi dan Taher, 2019). Keragaman nukleotida ( $\pi$ ) pada penelitian Munir sebesar 0,00105 dan pada penelitian Pratiwi sebesar 0,00149. Sedangkan keragaman nukleotida ( $\pi$ ) pada penelitian ini adalah sebesar 0,00177 nukleotida.

Jumlah dan posisi polimorfisme pada penelitian Pratiwi dengan penelitian ini sama, yaitu 2 SNP dan terletak pada posisi \*52 dan \*504. Pada penelitian Munir juga diperoleh 2 SNP, namun posisinya berbeda. SNP yang diperoleh Munir terletak pada posisi \*315 dan \*504. Penelitian ini tidak menemukan SNP pada posisi \*315. Perubahan nukleotida pada posisi \*315 yang ditemukan oleh Munir adalah C>G. Jumlah haplotipe yang ditemukan pada penelitian Munir dan Pratiwi adalah 3 haplotipe sedangkan pada penelitian ini hanya ditemukan 2 haplotipe. Jenis haplotipe yang dilaporkan Munir yaitu CG, GG dan CA, sedangkan jenis haplotipe yang dilaporkan Pratiwi adalah GG, GA dan AA. Pada penelitian ini walaupun posisi SNP nya sama dengan yang dilaporkan Asri, namun hanya dihasilkan 2 jenis haplotipe, yaitu GG dan AA. Haplotipe GA tidak teridentifikasi pada sampel yang digunakan.

Untuk keragaman haplotipe, nilai yang diperoleh penelitian ini lebih rendah dibandingkan penelitian sebelumnya. Munir mendapatkan nilai keragaman haplotipe

0,556 ± 0,165, sementara pada penelitian Pratiwi nilai yang didapatkan adalah 0,600 ± 0,215. Nilai keragaman haplotipe yang diperoleh pada penelitian ini sebesar 0,533 ± 0,172. Dengan demikian hasil penelitian ini menguatkan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa keragaman genetik daerah 3’UTR pada gen *LDLR* penduduk Papua adalah rendah.

Dari keragaman haplotipe selanjutnya dibuat direkonstruksi pohon filogenetik. Hasil rekonstruksi pohon filogenetik menunjukkan bahwa keenam sampel mengelompok sesuai dengan jenis haplotipenya. Haplotipe I terdiri dari 4 individu yang membentuk kelompok tersendiri dengan *bootstrap* 85 yang terpisah dari haplotipe II terdiri dari 2 individu. Rekonstruksi pohon filogenetik untuk keenam sampel ditampilkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Rekonstruksi pohon filogenetik berdasarkan sekuens 3’UTR

Pemisahan haplotipe II dari haplotipe I menunjukkan bahwa walaupun sama- sama orang asli Papua, namun individu asal Meybrat-2 dan Biak-2 adalah berbeda secara genetik. Perbedaan ini kemungkinan karena adanya pencampuran genetik yang terjadi melalui interaksi perkawinan dengan penduduk lain di luar Papua yang terjadi pada leluhur mereka sebelumnya.

**KESIMPULAN**

Penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan nukleotida antar sekuens yang dianalisis. Perbedaan berkisar 0 hingga 2 nukleotida dengan nilai rata-rata 1,066 dan nilai keragaman nukleotida ( $\pi$ ) 0,00177. SNP yang diidentifikasi terletak pada posisi \*52 dan \*504 dan menghasikan haplotipe GG dan AA dengan sebesar  $0,533 \pm 0,172$ . Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa daerah 3'UTR gen *LDLR* dari sampel yang dianalisis memiliki keragaman genetik yang rendah.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Barrett, L. W., Fletcher, S., Wilton, S. D. 2013. Regulations of eukariot gene expression by the Untranslated Gene Regions and Other Non-coding Elements. *Cell Mol Life Sci*, 69(21), 3613-3634.
- 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. 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.
- Pratiwi, S. A., & Taher, A. 2019. Analisis Polimorfisme Nukleotida Tunggal (SNP) Daerah 3'UTR Gen *LDLR* Penduduk Papua. *Jurnal Natural*, 15(1):11-20.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., SánchezDelBarrio, 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.
- Rumansara EH. 2015. Memahami Kebudayaan Lokal Papua: suatu Pendekatan Pembangunan yang manusiawi di tanah Papua. *Jurnal Ekologi Birokrasi*, 1(1), 47-58
- Südhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, L. S., Russell, D. W. 1985. The LDL Receptor Gene: A Mosaic of Exon Shared with Different Proteins. *Science*, 228(4701):815- 822.
- Werutsky, C. A. 2006. As Bases Moleculares das Hipercolesterolemias Familiares no Brasil o Rio Grande do Sul. *Tesis*. Universidade de Sao Paul