

Keragaman Genetik Penduduk Papua: Polimorfisme pada Daerah 3'UTR Gen Reseptor Lipoprotein Densitas Rendah (*LDLR*)

Genetic Diversity of Papuan Population: Polymorphic in 3'UTR Areas of Low Density
Lipoprotein Receptor Gene (*LDLR*)

Misbahul Munir^{1*}, Achmad Taher¹

¹Jurusan Kimia, FMIPA, UNIPA, Manokwari, 98314, Indonesia
E-mail: misbahulmunir192@gmail.com, taheer_kimia73@yahoo.co.id

ABSTRACT

Low-density lipoprotein receptors (LDL-R) play a role in transporting plasma cholesterol into cells. This protein is encoded by the *LDLR* gene that contains the 3'untranslated region (3'UTR). 3'UTR is known as an important regulatory element to the precision of expression in many genes. The genetic variation of the 3'UTR region in some tribal populations indicates that this area has a high diversity. So it can be used to study the evolution of genetic diversity. A total of 9 individuals from Papua from different districts were analyzed for their 3'UTR area. The results of this study indicate that the variation of nucleotides obtained ranges from 0 to 3 nucleotides with an average of 0.0611 nucleotides and nucleotide diversity () of 0.00105 nucleotides. In addition, two SNPs were identified in positions *315 and *540 consisting of two general haplotypes (CG and GG) and one special haplotype (CA) with a haplotype diversity of 0.556 ± 0.165 . The results of this study can be concluded that the 3'UTR area has a low genetic diversity with a small number of samples.

Key words: *LDLR* gene; 3' untranslated region; genetic diversity

ABSTRAK

Reseptor lipoprotein densitas rendah (LDL-R) berperan dalam transpor kolesterol plasma ke dalam sel. Protein ini dikode oleh gen *LDLR* yang mengandung daerah 3'untranslated region (3'UTR). 3'UTR dikenal sebagai elemen pengatur penting terhadap ketepatan ekspresi pada banyak gen. Variasi genetik daerah 3'UTR pada beberapa populasi suku bangsa menunjukkan bahwa daerah ini memiliki keragaman yang tinggi. Sehingga dapat digunakan untuk mempelajari evolusi keragaman genetik. Sebanyak 9 individu asal Papua dari Kabupaten yang berbeda dianalisis daerah 3'UTR-nya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa variasi nukleotida yang diperoleh berkisar 0 sampai 3 nukleotida dengan rata-rata sebesar 0,0611 nukleotida dan keragaman nukleotida () sebesar 0,00105 nukleotida. Selain itu, teridentifikasi dua SNP pada posisi *315 dan *540 yang terdiri atas dua haplotipe umum (CG dan GG) dan satu haplotipe khusus (CA) dengan keragaman haplotipe sebesar $0,556 \pm 0,165$. Hasil

penelitian ini dapat disimpulkan bahwa daerah 3'UTR memiliki keragaman genetik yang rendah dengan jumlah sampel yang sedikit.

Kata kunci: Gen *LDLR*; 3'untranslated region; keragaman genetic

PENDAHULUAN

Reseptor lipoprotein densitas rendah (*low density lipoprotein receptor*, LDL-R) merupakan protein transmembran pada permukaan sel yang berperan dalam transpor kolesterol plasma ke dalam sel (Hobbs *et al.*, 1992). LDL-R berfungsi mengikat partikel LDL, yaitu suatu lipoprotein yang kaya akan kolesterol. LDL-R memasukkan LDL ke dalam sel melalui proses yang disebut endositosis. Endositosis adalah mekanisme pengambilan molekul-molekul dari luar sel untuk memenuhi kebutuhan sel dan mengatur interaksi antara sel dengan lingkungannya (Doherty dan McMahon, 2009). Endositosis yang diperantarai oleh reseptor memiliki peran penting dalam pertumbuhan, perkembangan dan diferensiasi sel hewan (Goldstein *et al.*, 1979).

Protein LDL-R mengandung 843 asam amino yang terbagi dalam lima domain utama dan dikode oleh gen *LDLR* (Gunder dan Martin, 2011). Gen *LDLR* manusia terletak pada kromosom 19p13.2 dan terdiri atas 18 ekson dan 17 intron yang membentang sepanjang 45 kilobasa (kb) dan mengandung daerah 3'untranslated region (3'UTR) sepanjang 2,5 kb (Südhof *et al.*, 1985). Kerusakan pada gen *LDLR* menyebabkan hiperkolesterolemia turunan (*familial hypercholesterolemia*, FH), suatu penyakit yang ditandai oleh peningkatan kadar kolesterol-LDL (LDL-C) plasma dan penyakit jantung koroner (PJK) dini (Goldstein *et al.*, 1995; Goldstein *et al.*, 2001).

Daerah 3'UTR telah dikenal sebagai daerah pengatur penting terhadap ketepatan ekspresi pada banyak gen (Chen *et al.*, 2006; Conne *et al.*, 2000). Daerah ini mengandung elemen-*cis* yang mempengaruhi stabilitas ekspresi, dan/atau mempengaruhi translasi melalui interaksi dengan sekuens 5' transkrip. 3'UTR gen *LDLR* manusia terbagi dalam tiga segmen yang masing-masing mengandung ARE. Selain itu 3'UTR gen *LDLR* juga mengandung sekuens kaya *Alu* yang berfungsi meningkatkan waktu hidup mRNA (Wilson *et al.*, 1998). Dengan demikian keberadaan variasi genetik dalam atau dekat elemen-*cis* dapat mempengaruhi pengikatan protein pada ARE atau elemen kontrol lain sehingga mengubah ekspresi gen.

Analisis variasi genetik daerah 3'UTR gen *LDLR* pada beberapa populasi suku bangsa menunjukkan bahwa daerah ini memiliki keragaman yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk mempelajari evolusi keragaman genetik (Fagundes *et al.*, 2005). Selain itu variasi genetik umum pada daerah ini juga memiliki keterkaitan nyata dengan profil lipoprotein plasma pada populasi tertentu karena gen *LDLR* memainkan peranan penting dalam homeostasis kolesterol (Ahn *et al.*, 1994; Muallem *et al.*, 2007).

Papua merupakan salah satu daerah di Indonesia dengan keragaman suku yang tinggi dan berpotensi menghasilkan keragaman genetik yang tinggi pula. Sekitar 269 suku di Papua telah diidentifikasi dan tersebar dari daerah pesisir hingga pegunungan

(Mansoben, 2007). Meskipun demikian hingga saat ini penelitian terkait dengan variasi genetik terhadap penduduk Papua masih sangat sedikit. Beberapa penelitian terkait keragaman DNA mitokondria penduduk Papua telah dilaporkan (Ngili *et al.*, 2008; Palit *et al.*, 2012), tetapi penelitian mengenai daerah 3'UTR gen *LDLR* belum banyak dilakukan. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan menganalisis variasi genetik pada daerah 3'UTR gen *LDLR* penduduk Papua.

METODE PENELITIAN

Sampel Darah

Sampel darah diambil dari mahasiswa UNIPA asli Papua yang masih aktif kuliah menggunakan metode *selective purposing*. 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 diambil darahnya sebanyak 9 orang, dengan rincian 2 dari Serui, 1 orang dari Pegunungan Bintang, 2 dari Biak, 1 dari Wamena, 1 dari Nabire, 1 dari Yahukimo dan 1 dari Jayapura.

Isolasi DNA dan PCR Amplifikasi

DNA genomik diekstraksi menggunakan *Genomic DNA Mini Kit (Tissue)* (GENEAID, NEW TAIPEI CITY, Taiwan) sesuai dengan prosedur tertulis dari perusahaan. Amplifikasi daerah 3'UTR gen *LDLR* 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* adalah R: 5'-ACCACGGATTCAGCCAGATC-3' dengan ukuran hasil amplifikasi 713 pb.

PCR terdiri dari denaturasi awal pada suhu 80°C selama 10 detik, 94°C selama 3 menit lalu tahapan 35 siklus. Setiap siklus dilakukan 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 1 menit. Setelah itu proses PCR dilanjutkan dengan *post extension* pada suhu 72°C selama 5 menit, dan diakhiri pada suhu 25°C selama 1 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

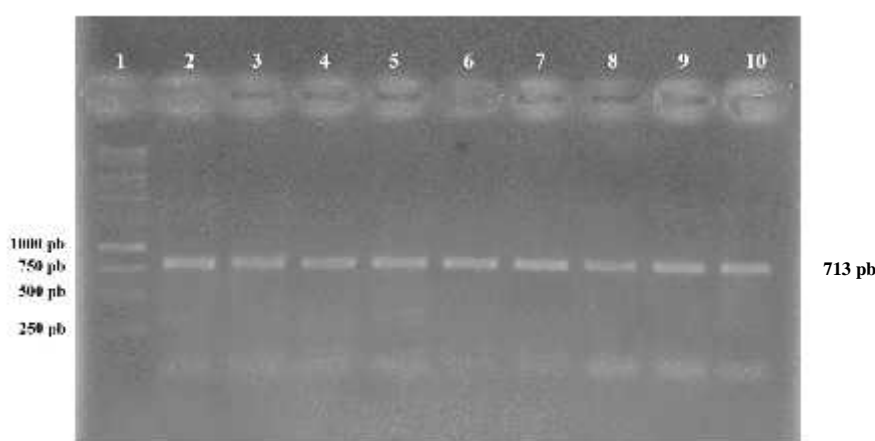
Sekuens *forward* dan *reverse* yang diperoleh lalu dianalisis menggunakan program Mega versi 7.0 untuk mendapatkan sekuens konsensus. Sekuens konsensus

selanjutnya disejajarkan dengan sekuens rujukan di *GenBank* (nomor akses FJ525879.1) dengan *Basic Local Search Alignment Tools (BLAST)*. Pensejajaran sekuens dan analisis perbedaan nukleotida, keragaman nukleotida (), jarak genetik dan pohon filogenetik dilakukan menggunakan program yang sama, yaitu *Mega 7.0* (Kumar *et al.*, 2016). Pensejajaran menggunakan *Clustal W*, jumlah perbedaan dan keragaman 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* (Rozas *et al.*, 2017). Sedangkan analisis *median-joining network* dilakukan dengan menggunakan program *Network* versi 5.0 (Bandelt *et al.*, 1999).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi dan Sekuensing Daerah 3'UTR

Amplifikasi daerah 3'UTR gen *LDLR* dari kesembilan individu yang berpartisipasi dalam penelitian berhasil dilakukan menggunakan primer *forward* dan *reverse*. Produk amplifikasi sesuai dengan yang diharapkan, yaitu 713 pb. Pita DNA hasil amplifikasi ditunjukkan pada Gambar 1. Pensejajaran sekuens konsensus terhadap rujukan di *GenBank* (kode akses FJ525879.1) menunjukkan bahwa produk amplifikasi terdiri atas 94 pb yang merupakan bagian dari intron 17, 36 pb merupakan bagian dari ekson 18 dan 583 pb merupakan bagian dari sekuens 3'UTR.



Gambar 1. Pita DNA hasil elektroforesis produk PCR. Keterangan (1) DNA marker 1 kb, (2) Serui-2 , (3) Pegunungan Bintang , (4) Biak – 1, (5) Wamena, (6) Biak – 2, (7) Nabire, (8) Serui – 1, (9) Yahukimo dan (10) Jayapura.

Variasi Nukleotida antar Sekuen 3'UTR

Analisis variasi nukleotida dari sekuens 3'UTR menunjukkan bahwa perbedaan nukleotida antar pasangan sekuens berkisar 0 sampai 3 nukleotida dengan rata-rata untuk seluruh populasi adalah sebesar 0,0611 nukleotida dan keragaman nukleotida () sebesar 0,00105 nukleotida. Matriks perbedaan nukleotida antar pasangan sekuens ditunjukkan pada Tabel 1. Jumlah perbedaan paling jauh ditunjukkan oleh sekuens asal Jayapura dengan sekuens asal Serui – 1 yang berbeda 3 nukleotida. Sekuens dengan jumlah perbedaan 2 nukleotida ditunjukkan oleh sekuens asal Jayapura dan Serui – 1. Sekuens dengan jumlah perbedaan 1 nukleotida diperlihatkan oleh sekuens asal Nabire, Serui – 1, Yahukimo dan Jayapura. Pasangan sekuens dengan perbedaan nukleotida 0 menunjukkan bahwa kedua sekuens adalah sama atau identik.

Tabel 1. Matriks perbedaan nukleotida antar pasangan sekuens

ID Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Serui-2									
Pegunungan Bintang	0,000								
Biak-1	0,000	0,000							
Wamena	0,000	0,000	0,000						
Biak-2	0,000	0,000	0,000	0,000					
Nabire	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000				
Serui-1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	2,000			
Yahukimo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000		
Jayapura	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	1,000	3,000	2,000	

Jarak genetik antar pasangan sekuens berkisar 0,000 – 0,003 (0,3%) dan ditunjukkan pada Tabel 2. Individu asal Pegunungan Bintang, Biak – 1, Wamena, Biak – 2 dan Yahukimo memiliki jarak genetik yang dekat antar individunya, yaitu sebesar 0,000 (0,0%). Jarak genetik antar pasangan sekuens sebesar 0,002 (0,2%) ditunjukkan oleh individu asal Serui – 1, Nabire, Yahukimo dan Jayapura. Sedangkan, jarak genetik yang paling jauh ditunjukkan oleh individu asal Jayapura dan Serui 1, yaitu sebesar 0,003 (0,3%). Nilai jarak genetik yang rendah menunjukkan kekerabatan yang dekat antar pasangan sekuens, sebaliknya apabila jarak genetik semakin tinggi maka kekerabatannya akan semakin jauh.

Tabel 2. Jarak genetik antar pasangan

ID Sampel	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Serui-2									
Pegunungan Bintang	0,000								
Biak-1	0,000	0,000							

Wamena	0,000	0,000	0,000				
Biak-2	0,000	0,000	0,000	0,000			
Nabire	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002		
Serui-1	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	
Yahukimo	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,002
Jayapura	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,000	0,003 0,002

Berdasarkan nilai rata-rata perbedaan nukleotida untuk seluruh populasi, keragaman nukleotida dan jarak genetik secara keseluruhan memperlihatkan keragaman genetik yang rendah. Keragaman nukleotida () adalah parameter yang baik digunakan untuk menentukan keragaman genetik. Penelitian yang dilakukan oleh Fagundes *et al.* (2005) pada daerah 3'UTR pada 4 populasi penduduk Afrika, Asia, Kaukasus dan Amerika memperoleh nilai dengan rata-rata $0,522 \pm 0,010$ yang jauh lebih besar dibandingkan keragaman nukleotida diperoleh pada penelitian ini (0,00105).

Polimorfisme Nukleotida Tunggal dan Haplotipe

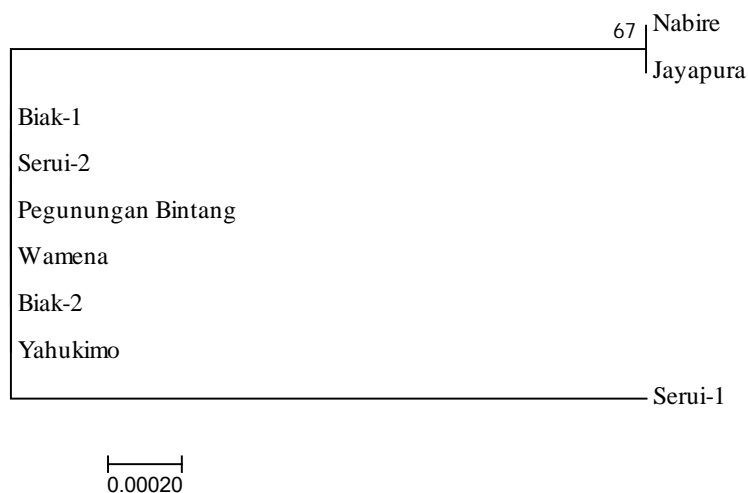
Hasil analisis terhadap sekuens daerah 3'UTR dari 9 sampel teridentifikasi 2 polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) pada posisi *315 dan *504. Berdasarkan ke – 2 SNP tersebut dihasilkan 3 haplotipe. Posisi polimorfis dan jenis haplotipe dipelihatkan pada Tabel 3. SNP ini terdiri atas dua situs variabel yaitu parsimoni informatif dan singleton. Situs variabel parsimoni informatif berada pada posisi *315 dan situs variabel singleton terletak pada posisi *504. Selain itu, setiap individu mengelompok berdasarkan jenis haplotipenya masing-masing. Haplotipe I terdiri atas individu asal Serui – 2, Pegunungan Bintang, Biak – 1, Wamena, Biak – 2, Yahukimo. Haplotipe II berasal dari individu asal Nabire dan haplotipe III berasal dari individu asal Serui – 1.

Tabel 3. Polimorfisme sekuens daerah 3'UTR

Haplotipe	Posisi nukleotida pada daerah 3'UTR		Jumlah individu	ID Sampel
	*315	*504		
Ref	C	G	-	FJ525879.1
I	C	G	6	Serui - 2, Pegunungan Bintang, Biak-1, Wamena, Biak - 2, Yahukimo
II	G	G	1	Nabire, Jayapura
III	C	A	1	Serui - 1

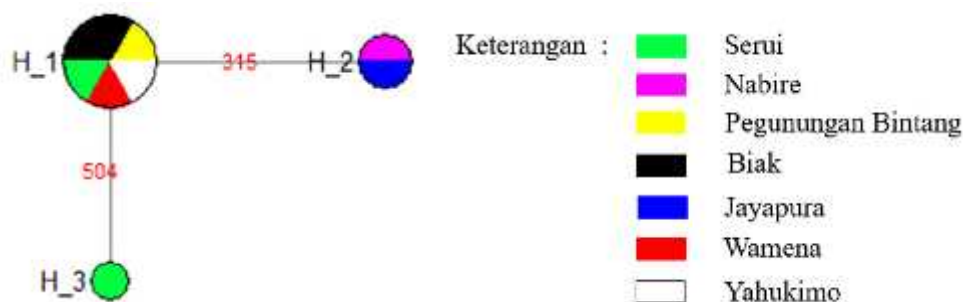
Empat haplotipe tersebut terdiri atas 2 haplotipe umum, yakni haplotipe I (CG), haplotipe II (GG) dan 1 haplotipe singleton (khusus), yakni haplotipe III (CA) dengan keragaman haplotipe $0,556 \pm 0,165$. Keragaman haplotipe yang diperoleh dalam

penelitian ini masih berada rentang keragaman haplotipe dari 14 populasi yang diteliti Heller *et al.* (2004) yaitu 0,200 – 0,830. Sedangkan penelitian yang dilakukan Fagundes *et al.* (2005) pada 4 populasi penduduk diperoleh keragaman haplotipe yang lebih besar, yakni rentang 0,751 hingga 0,860. Berdasarkan keragaman haplotipe tersebut dapat dibentuk pohon filogenetik (Gambar 2). Haplotipe yang identik dengan haplotipe referensi GenBank adalah haplotipe I. Haplotipe III adalah haplotipe dengan jumlah individu paling sedikit, yakni 1 individu, sedangkan haplotipe I adalah haplotipe dengan jumlah individu paling banyak, yakni 6 individu.



Gambar 2. Pohon filogenetik berdasarkan sekuens daerah 3'UTR. Angka pada cabang pohon menunjukkan nilai bootstrap

Hasil analisis *median-joining network* dari polimorfisme sekuens daerah 3'UTR ditunjukkan pada Gambar 3. Haplotipe I merupakan haplotipe umum untuk seluruh haplotipe yang teridentifikasi. Keseluruhan haplotipe menunjukkan jumlah perbedaan yang serupa, yakni sebesar 1 nukleotida. Haplotipe I dan haplotipe II berbeda 1 nukleotida pada posisi *315. Kemudian haplotipe I dan haplotipe III menunjukkan perbedaan 1 nukleotida pada posisi *504.



Gambar 3. Median-joning network dari polimorfisme sekuens daerah 3'UTR

Sekuen asal Serui merupakan sekuens yang paling beragam. Hal ini dikarenakan sekuens tersebut tersebar dalam dua haplotipe, yakni haplotipe I dan haplotipe II. Tinggi rendahnya keragaman genetik pada suatu populasi dipengaruhi oleh jaringan haplotipe

yang terbentuk. Keragaman genetik akan meningkat jika terjadi suatu aliran genetik dari populasi lain atau biasa disebut dengan migrasi genetik. Migrasi yang tinggi akan menyebabkan terjadinya perkawinan silang dan percampuran gen antar populasi yang berbeda, sehingga akan diperoleh variasi gen yang berbeda-beda (Slatkin, 1985).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini secara keseluruhan memperlihatkan keragaman genetik yang rendah yang ditunjukkan berdasarkan nilai keragaman nukleotida (0,00105). Terdapat 2 situs polimorfik yang teridentifikasi, yakni *315 dan *540 yang tersebar pada 3 haplotipe CG, GG dan CA dengan keragaman haplotipe sebesar $0,556 \pm 0,165$.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn, Y. I., Kamboh, M. I., Aston, C. E., Ferrell, R. E., Hamman, R. F. 1994. Role of common genetic polymorphisms in the LDL receptor gene in affecting plasma cholesterol levels in the general population. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 14(5), 663-670.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Chen, J.-M., Férec, C., Cooper, D. N. 2006. A systematic analysis of disease-associated variants in the 3 regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Human genetics*, 120(1), 1-21.
- Conne, B., Stutz, A., Vassalli, J.-D. 2000. The 3 untranslated region of messenger RNA: a molecular 'hotspot' for pathology? *Nature medicine*, 6(6), 637.
- Doherty, G. J., McMahon, H. T. 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 78, 857-902.
- 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 genetics*, 69(4), 389-400.
- Goldstein, J., Hobbs, H., Brown, M. 1995. Familial hypercholesterolemia: In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 8, 2863-2901.
- Goldstein, J. L., Anderson, R. G., Brown, M. S. 1979. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*, 279(5715), 679-685.
- Goldstein, J. L., Hobbs, H. H., Brown, M. S. 2001. *Familial hypercholesterolemia*. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disorders* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, & K. KW Eds. 8 ed.). New York: Mc Graw-Hill.
- Gunder, L., Martin, S. 2011. *Essentials of medical genetics for health professionals*: Jones & Bartlett Learning.
-

- Hobbs, H. H., Brown, M. S., Goldstein, J. L. 1992. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation*, 1(6), 445-466.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Mansoben, J. R. 2007. The sosio-cultural plurality of Papua society. In A. J. Marshall; & B. M. Beehler; (Eds.), *Ecology of Indonesian Papua Part One (Vol. IV)*. Washington DC: Conservation International Fondation.
- Muallem, H., North, K. E., Kakoki, M., Wojczynski, M. K., Li, X., Grove, M., Boerwinkle, E., Wilhelmsen, K. C., Heiss, G., Maeda, N. 2007. Quantitative effects of common genetic variations in the 3' UTR of the human LDL-receptor gene and their associations with plasma lipid levels in the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Human genetics*, 121(3-4), 421-431.
- Ngili, Y., Palit, E. I., Suaka, I. Y., Noer, A. S. 2008. Mitochondrial DNA diversity in indigenous populations of Northern Papua and its implications on native papuan haplogroups. *Proceeding of The International Seminar on Chemistry*, 621-627.
- Palit, E. I., Ubyaan, R., Ngili, Y. 2012. Pattern Analysis, Quantification of Mutations, and Biostatistics Study in the D-loop Region of Mitochondrial DNA through Markov Chain Analysis. *European Journal of Scientific Research*, 92(1), 139-148.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, 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.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual review of ecology and systematics*, 393-430.
- Südhof, T. C., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Russell, D. W. 1985. The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins. *Science (New York, NY)*, 228(4701), 815-822.
- Taher, A., Solihin, D. D., Sulistiyani. 2016. Genetic diversity within the 3'UTR of the Cynomolgus Macaque (*Macaca fascicularis*) LDLR gene. *IJSBAR*, 26(1), 237-248.
- Wilson, G., Vasa, M., Deeley, R. 1998. Stabilization and cytoskeletal-association of LDL receptor mRNA are mediated by distinct domains in its 3' untranslated region. *Journal of lipid research*, 39(5), 1025-1032.
-