

ANALISIS PROMOTER GEN β GLOBIN DENGAN MENGGUNAKAN SOFTWARE PROMOTER PREDICTION SERVER : KAJIAN PADA GEN β THALASSEMIA

Mala Kurniati, Dwi Marlina, T. Marwan Nusri, Maikel Emos Malau

ABSTRAK

Latar belakang : Mekanisme di tingkat molekuler merupakan kunci penting dalam membuka banyak misteri yang belum terungkap, seperti bagaimana mengungkap fungsi suatu gen yang terkait dengan onset suatu penyakit genetik, interaksi pemaparan nutrisi yang tepat dalam metabolisme gen-gen target, atau mengidentifikasi hubungan evolusi genetik, atau identifikasi DNA forensik, dan sebagainya. Analisis biologi molekuler diperlukan untuk mempermudah memahami mekanisme molekuler termasuk mengidentifikasi gen-gen, ekspresi dan eksplorasi protein/enzim, serta menganalisis fungsi gen dan protein, dimana promoter adalah urutan DNA spesifik yang berperan dalam mengendalikan transkripsi suatu gen struktural, jika suatu gen terjadi gangguan pada bagaia promoter, gangguan tersebut akan mempengaruhi ekspresi dari gen tersebut.

Tujuan : Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis Promoter Gen β Globin dengan menggunakan *Software* Promoter Prediction server : Kajian Pada Gen β Thalassemia.

Metode : Penelitian ini menggunakan metode analisis Bioinformatika dengan teknik Biologi Komputasional sehingga di dapatkan analisis informasi biologis, sequence alignment, prediksi struktur untuk meramalkan bentuk struktur protein maupun struktur sekunder RNA, analisis ekspresi gen dan juga informasi terkait promoter gen.

Hasil penelitian : Hasil dari penelitian ini didapatkan bahwa adanya mutasi pada kotak TATA (TATA BOX) sehingga mengakibatkan perubahan ekspresi gen (*Stop Expression*) yang akan menimbulkan penyakit β thalassemia.

Kesimpulan : Dari penelitian ini selain adanya mutasi pada kotak TATA (TATA BOX) didapatkan pula variasi mutasi gen β Globin pada berbagai populasi di dunia

Kata kunci : Promoter, Gen β Globin, *Software*

ABSTRACT

Background: mechanisms in molecular levels are important keys in uncovering mysteries, such as uncovering a gene function related to onsets of genetically diseases, interaction of correct nutrient exposure in metabolisms of target genes, or identifying correlations of genetic evolutions, identifying forensic DNA, etc. The molecular biology analysis is required to facilitate molecular mechanism understanding including identifying genes, expressions of proteins/enzymes, and analyzing genes and proteins functions, where promoters are specific DNA sequences having roles in controlling transcriptions of a structural gene. If a particular gene undergoes disorder in its promoter, this disorder will also influence the gene expression.

Objective: the objective of this research is to analysis β globin gene promoter by using promoter prediction server software: a study on β thalassemia gene.

Method: this was a research by using bioinformatics analysis method with computerized biology engineering to obtain biological information, alignment sequence, and structure prediction to predict protein structure forms and secondary RNA structure, gene expression analysis and related information about gene promoter.

Results: the results showed that there was a mutation in TATA box so therefore, it caused gene expression change (stop expression) which resulted in β thalassemia disease.

Conclusion: in addition to finding mutation in TATA box, this research found variation of β globin gene mutation in varying population in the world.

Keywords : Promoter, β globin gene, software

PENGANTAR

Thalassemia merupakan salah satu contoh dari penyakit yang ada hubungannya dengan gangguan genetik khususnya Gen α -globulin dan gen β - globulin yang berasal dari mutasi hemoglobin. Hemoglobin adalah protein besi di dalam darah yang fungsinya untuk membawa oksigen ke sel-sel diseluruh tubuh. Pada orang dengan thalassemia beta, rendahnya tingkat hemoglobin menyebabkan kurangnya oksigen di banyak bagian tubuh. Individu yang terkena juga memiliki kecenderungan untuk terkena anemia yang menyebabkan kulit pucat, lemas, kelelahan dan komplikasi yang lebih serius, orang dengan thalassemia beta berada pada peningkatan risiko terjadinya pembekuan darah yang abnormal.¹

Di seluruh dunia, 15 juta orang memiliki presentasi klinis dari thalassemia. Fakta ini mendukung thalassemia sebagai salah satu penyakit turunan yang terbanyak; menyerang hampir semua golongan etnik dan terdapat pada hampir seluruh negara di dunia.¹

Salah satu bentuk studi variasi sekuen promoter adalah mempelajari tentang karakteristik *database* sekuen mutasi pada manusia dan transkripsi faktor pada promoter gen. Variasi gen pada genom manusia dikenal sebagai bentuk polimorfik, 1% dari pasangan basa nukleotida pada manusia dapat menyebabkan penyakit genetik, salah satu penyebabnya yaitu pada bagian daerah promoter. Ekspresi gen diregulasi dibanyak tahap, termasuk pengemasan, modifikasi histon, inisiasi transkripsi, polyadenilasi RNA, pre-mRNA *splicing*, stabilisasi mRNA, dan inisiasi translasi. Tidak setiap variasi pada sekuen promoter mempunyai pengaruh pada regulasi transkripsi. Pengaruh tersebut tergantung pada lokasi dan masalah genetik bawaan secara alami yang terjadi.²

Terjadinya gangguan pada daerah promoter menyebabkan regulasi gen menjadi terganggu baik dari aktivas gen tersebut dan proses inisiasi transkripsi sehingga menimbulkan penurunan atau peningkatan

jumlah produk mRNA dan berdampak pada ekspresi protein. Mutasi yang terjadi di daerah promoter disebabkan karena adanya gangguan pada proses aktivasi oleh transkripsi faktor pada promoter. Sebagai hasil dari terjadinya mutasi pada bagian promoter dapat menurunkan atau menaikkan level dari mRNA dan juga protein.² Mutasi pada promoter merupakan permasalahan kompleks dan memerlukan tes untuk mengetahui hubungan antara mutasi dan penyakit yang sulit dilakukan, sehingga membutuhkan studi yang komprehensif dari berbagai aspek penelitian.³

Pada September 2013, the *National Human Genome Research Institute* meluncurkan *Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE) yaitu berupa hasil riset yang mengidentifikasi semua elemen fungsional pada gen manusia dengan menggunakan pendekatan hasil eksperimen dan komputasi. *Human Genome Mutation Database* (HGMD) database berisi 49 database untuk Hemoglobin Beta (HBB), yang terdiri dari 234 (48%) jenis mutasi missense/ nonsense, 28 (6%) mutasi pada bagian promoter. Salah satu penelitian yang telah dilakukan diantaranya yaitu ditemukannya perubahan basa nukleotida pada posisi -28 dibagian TATA BOX Gen HBB, database seperti HGMD, *National Center For Biotechnology Information* (NCBI), dan *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMMIM) dapat digunakan sebagai langkah pertama untuk mengetahui apakah ada variasi urutan promoter yang dapat diketahui dan bisa berhubungan dengan penyakit yang sebelumnya telah ada.³

Kemajuan teknik biologi molekuler dalam mengungkap sekuens biologi protein sejak awal tahun 1950 dan asam nukleat sejak tahun 1960 mengawali perkembangan pangkalan data dan teknik analisis sekuens biologi. Pangkalan data sekuens protein mulai dikembangkan pada tahun 1960an di Amerika Serikat, sementara pangkalan data sekuens *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) dikembangkan pada akhir 1970an di Amerika Serikat dan Jerman pada Laboratorium Biologi Molekuler Eropa (*European Molecular Biology Laboratory*). Penemuan teknik sekuensing DNA menjadi salah satu pembuka jalan bagi

penelitian lebih lanjut terhadap genom, serta meningkatkan kebutuhan akan pengelolaan dan analisis sekuens, dan pada akhirnya menyebabkan lahirnya bioinformatika.³

Peranan bioinformatika dalam bidang klinis dunia kedokteran ini dikenal sebagai istilah informatika klinis (*clinical informatics*).

Dalam cabang ini, perangkat utamanya merupakan manajemen dari data-data klinis pasien yang diperoleh dari suatu rekam medik lengkap mulai dari hasil konsultasi, analisa diagnosis laboratorium berikut seluruh pemeriksaan yang dilakukan, yang diolah kedalam bentuk elektronik berupa data enkripsi dan nantinya akan diaplikasikan kepengolahan data berikutnya.

Metode :

Penelitian ini menggunakan metode analisis Bioinformatika dengan teknik Biologi Komputasional sehingga di dapatkan analisis informasi biologis, sequence alignment, prediksi struktur untuk meramalkan bentuk struktur protein maupun struktur sekunder RNA, analisis ekspresi gen dan juga informasi terkait promoter gen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

>gi|28380636:26531-31358 Homo sapiens beta globin region (HBB@); and beta globin locus transcript 3 (non-protein coding) (BGLT3); and hemoglobin subunit beta (HBB); and hemoglobin subunit delta (HBD); and hemoglobin subunit epsilon 1 (HBE1); and hemoglobin subunit gamma 1 (HBG1); and hemoglobin subunit gamma 2 (HBG2), RefSeqGene on chromosome 11

Hasil Analisis Bioinformatika Gen β Globin Sekuen Gen β Globin Berdasarkan NCBI (NG_000007)

Untuk menentukan analisis dari gen β Globin diperlukan data sekuens yang diperoleh dari NCBI. Pada penelitian ini peneliti menggunakan database dengan *accession number* NG_000007, panjang gen 81706 bp yaitu *Homo sapiens beta globin region (HBB@); and beta globin locus transcript 3 (non-protein coding) (BGLT3); and hemoglobin subunit beta (HBB); and hemoglobin subunit delta (HBD); and hemoglobin subunit epsilon 1 (HBE1); and hemoglobin subunit gamma 1 (HBG1); and hemoglobin subunit gamma 2 (HBG2), RefSeqGene on chromosome 11*. Dalam perhitungan prediksinya dari panjang gen 81706 bp peneliti hanya menggunakan gen β Globin sepanjang 4827 bp yaitu pada posisi (26531 – 31358).

Di bawah ini merupakan datasekuens dari gen β Globin yang digunakan pada penelitian, untuk melihat data sekuens selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 5.

Prediksi Mapping Gene Berdasarkan Software Softberry

Berdasarkan perhitungan fasta sequence dan prediksi software <http://www.softberry.com/> maka didapatkan hasil sebagai berikut.

Prediction of potential genes in Homo_sapiens genomic DNA

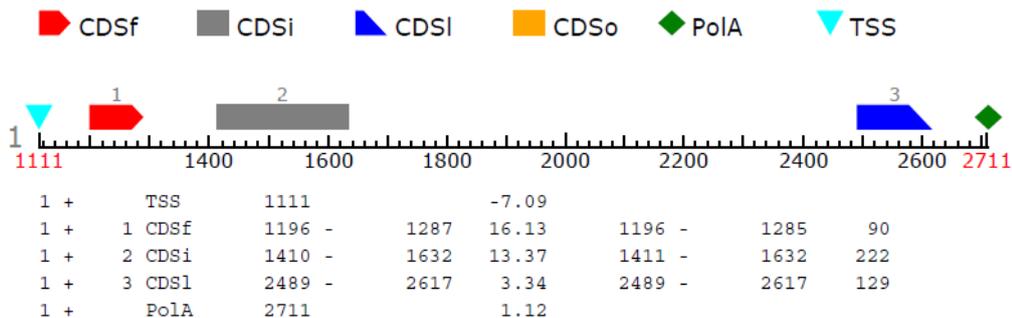
Seq name: test sequence

Length of sequence: 4827

Number of predicted genes 1: in +chain 1, in -chain 0.

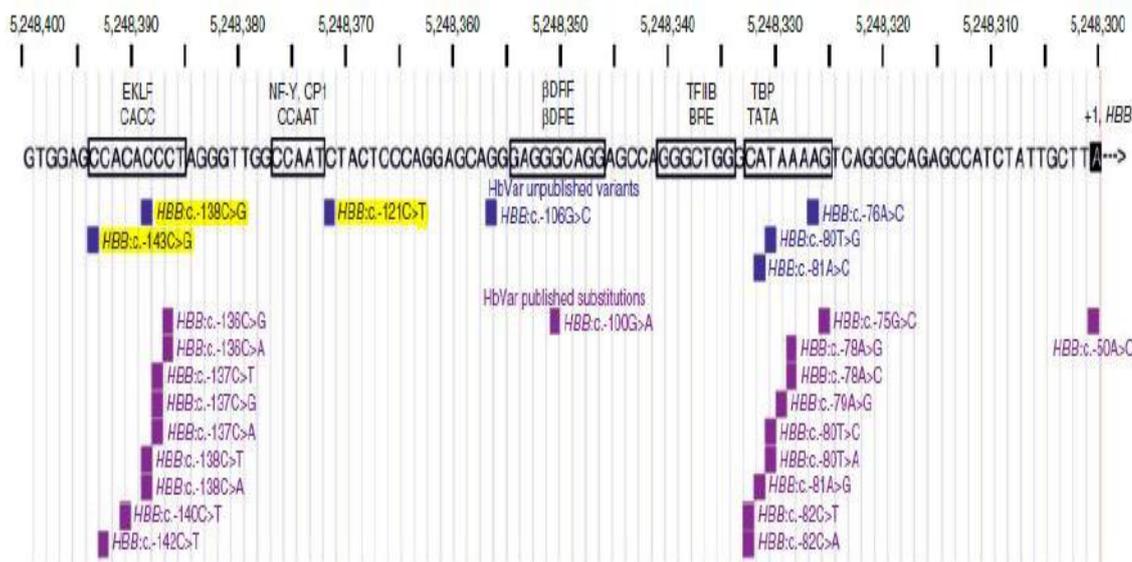
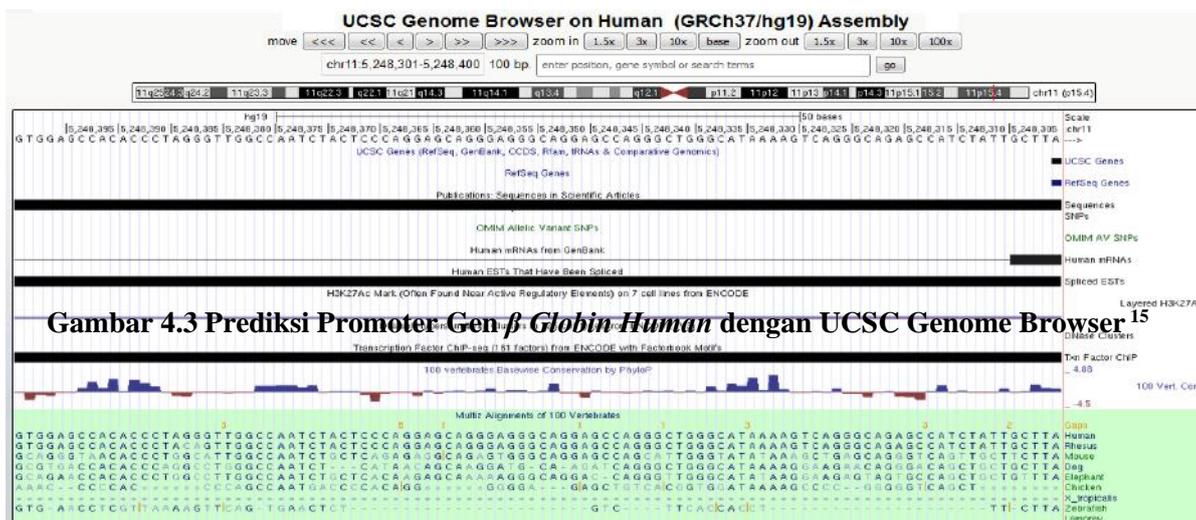
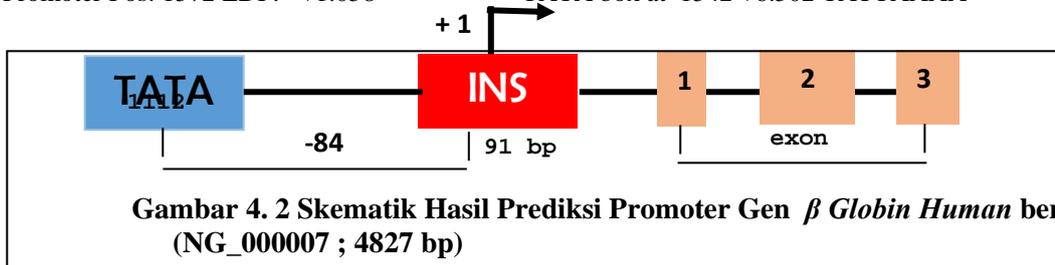
Number of predicted exons 3: in +chain 3, in -chain 0.

Positions of predicted genes and exons: Variant 1 from 1, Score:26.265961



Gambar 4.1 Prediksi Gen β Globin Human berdasarkan NG_000007

Sequence 1 of 1, Name: test sequence
 Length of sequence: 4827
 3 promoter/enhancer(s) are predicted
Promoter Pos: 1135 LDF: +4.024 TATA box at 1112 +7.013 AATAAAAG
 Promoter Pos: 2416 LDF: +2.671 TATA box at 2389 +5.280 TATAAAGC
 Promoter Pos: 1572 LDF: +1.058 TATA box at 1542 +6.502 TATTAATA



Sekuen Gen β Globin Berdasarkan NCBI (NC_000011)

Pada database NCBI sekuen Gen β Globin dapat dihasilkan dari berbagai *Accession Number* selain dari NG_000007, sekuen juga

dapat dihasilkan dari NC_000011 dengan panjang 1606 bp yang terdiri dari gen struktur tanpa promoter. Berikut tabel hasil perhitungan dari NC_000011 untuk Gen β Globin.

Tabel 4.1 Bagian Struktur Gen β Globin Human NC_000011 (1606 bp)

Bagian Gen	Panjang (bp)	Sekuen
EXON 1 (1-142)	142	ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAA CCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGA GGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGG TGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAAGCCCTGGG CAGACATTTTGAAGTAGCTAGCTTGTCA
INTRON 1 (143-273)	131	GTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAG ACCAATAGAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAG ACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGC CTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAG
EXON 2 (Part 1) (274 – 495)	222	GCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCT TTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTG TTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAA GAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGCTC ACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTG AGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCC TGAGAACTTCAGG
INTRON 2 (496 – 1345)	850	GTGAGTCTATGGGACGCTTGATGTTTTCTTTCCCCT TCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGG GATAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAAC AGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGG ATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGTTCATAACAA TTGTTTTCTTTGTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTT CTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAATGCCTT AACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGA TACATTAAGTAACTTAAAAAAAACCTTACACAGT CTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTG CTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTT CTTTTATTTTTAATTGATACATAATCATTATACATA TTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAATATGTGTAC ACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGT AATTTTAAAAAATGCTTTCTTTTAAATATACTTT TTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCT TTCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGC CTCTTTCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAAT TTCTGGGTAAAGGCAATAGCAATATCTCTGCATAT AAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTATGTAAG AGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGC TACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGC TGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCT AATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCCCTCCCACAG
EXON 2 (Bag. 2) (1346 – 1487)	142	CTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCA TCACTTTGGCAAAGAATTCACCCCACCAGTGCAGG CTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAAT GCCCTGGCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCT TG

EXON 3 (1488 – 1606)	120	CTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCCCTTTGTTCCCTA AGTCCAACACTAACTGGGGGATATTATGAAGG GCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACA TTTATTTTCATTGC
--------------------------------	------------	---

>gi|568815587:c5227071-5225466 Homo sapiens chromosome 11, GRCh38.p2 Primary Assembly

ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGAC
TCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG
GTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAACT
GGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTG
GTCTATTTTCCACCCTTAG**GCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCT**
TTGGGGATCTGTCCACTCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGA
AAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCA
CACTGATGACTGCAC**CTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGA**ACTTCAGGGTGAGTCTAT
GGGACGCTTGATGTTTTCTTTCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAT
AAGTAACAGGGTACAGTTTGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCA
GGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTGCTGTTTATAACAATTGTTTTCTTTTGTAAATTCTTGCTT
TCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAA
AGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAAAAAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACA
TTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTA
TTTTTAATTGATACATAATCATTATACATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAATATGTGTA
CACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTTTAAAT
ATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGAT
ACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCA
ATAGCAATATCTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTACTGATGTAAGAGGTTTCAT
ATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTG
GATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTGCTAATCATGTTTACATACCTCTTATCTTCTCCCA
CAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTCACCCCA
CCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCCAAGTAT
CACTAAGCTCGCTTTCTTG**CTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCCCTTTGTTCCCTAAGTCCAAC**
ACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATT
ATTTTCATTGC

Keterangan warna huruf :

1. Hitam (Exon 1)
2. Biru (Intron 1)
3. Merah (Exon 2 bagian 1 dan bagian 2)
4. Orange (Intron 2)
5. Hijau (Exon 3)

Jenis Mutasi pada Inisiasi Kodon ATG -> ATA pada Gen β Globin

Di bawah ini merupakan sekuen mutasi yang terjadi pada Gen β Globin yang menyebabkan thalassemia berdasarkan NC_000011.

(Original) Nucleotide Sequence (444 nt)

ATGGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGG
TGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTG
GACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAA
CCCTAAGGT**G**AAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGT**G**ATGGCCTGGCTC
ACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCCACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTG
CACGTGGATCCTGAGA**ACTTCAGGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCA**
TCACTTTGGCAAAGAATTCACCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTG
GTGTGGCTAATGCCCTGGCCCAAGTATCACTAA

(Original) Translation (147 aa):

MVHLTPEEKSAVTALWGKVNVD~~E~~VGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGN
PKVKAHGKKVLGAFSDGLAHL~~D~~NLKGTFATLSELHCDKLHVDPENFRLLGNVLCVLAHH
FGKEFTPPVQAA~~Y~~QKVVAGVANALAHKYH

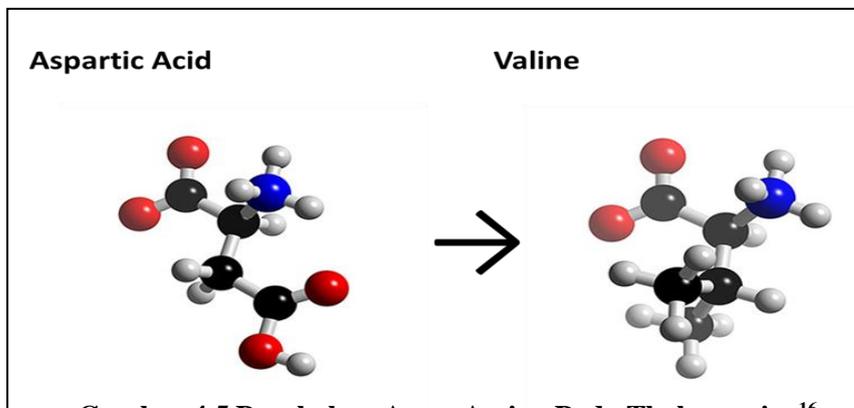
Keterangan :

Merah : Inisiasi kodon dimana yang seharusnya ATG menjadi ATA

Biru : Area nukleotida, asam amino, dan protein yang tidak terbaca
Karena adanya mutasi pada kodon.

Orange : Kodon yang menjadi *START* kodon tetapi semula terbagi atas
dua kodon sebelum terjadinya mutasi dan kemudian asam amino
akan berubah pada saat translasi.

Hijau : Kodon yang baru.



Gambar 4.5 Perubahan Asam Amino Pada Thalassemia .¹⁶

Variasi mutasi Gen β Globin pada Berbagai Populasi di Dunia

Berdasarkan *National Center For Biotechnology Information* tabel 3 menunjukkan variasi mutasi gen β Globin di beberapa kawasan di dunia seperti Mediterania, Timur Tengah, Thailand, China dan Amerika Afrika.

Pembahasan

Peran *Software* Prediksi Dalam Menentukan Mutasi pada Gen β Globin

Software merupakan alat bantu atau *tools* yang digunakan untuk berbagai macam keperluan. Pada bidang biologi molekuler alat bantu komputasi ini memberikan manfaat yang besar untuk mempermudah para pengguna (*user*) khususnya para *scientist* dalam suatu riset. Kemampuan analisa, perhitungan dan ketepatan pemilihan *software* bioinformatika menjadi sangat penting untuk tujuan-tujuan riset tertentu. Pada penelitian ini

peneliti mencoba menganalisis sekuen nukleotida pada Gen β Globin dan membuat prediksi skematik posisi bagian penting dari Gen yang mengalami mutasi dan secara manifestasi klinik menyebabkan penyakit tertentu khususnya thalassemia.

Pemilihan *software* menjadi faktor penentu keberhasilan suatu penelitian yang bersifat *in silico* (tidak menggunakan pasien). Para pengembang *software* berlomba-lomba menghasilkan *software* yang *user friendly* dengan fitur yang lengkap dan mudah di akses oleh seluruh masyarakat dunia. Database dari profil organisme tingkat rendah prokariot hingga organisme tingkat tinggi (eukariot) terus mengalami pembaruan baik dari nukleotidanya, varian mutasinya, protein dan bahkan organisme-organisme transgenik yang telah mengalami modifikasi secara *engineering* genetik. Spesifitas dan sensitifitas suatu *software* juga memberikan pengaruh bagi hasil yang dapat ditampilkan. Ketepatan

secara algoritmatis dalam menentukan letak, posisi dan sekuens yang dibutuhkan peneliti menjadi satu alasan para *scientist* menggunakan *software* prediksi baik secara online, *trial programme*, maupun dengan membeli *software* tersebut.

Prediksi yang dilakukan peneliti menggunakan *software* dari *softberry* sebagai perusahaan pengembang yang berasal dari Amerika. Pemilihan ini berdasarkan kemudahan dan ketepatan yang didapat peneliti sesuai dengan tujuan penelitian yang dilakukan. Spesifitas, sensitifitas dan analisa perbandingan yang dilakukan dengan *software* lain yang menunjukkan kesamaan hasil membuat peneliti memilih *software* tersebut disamping itu *software* ini juga sangat mudah diaplikasikan dan dimengerti oleh kalangan analis maupun masyarakat biasa namun untuk menganalisis suatu data sekuens pada *software* ini kita harus mendapatkan data sekuens dari *software* lain seperti NCBI.

Selain itu untuk memberikan perbandingan peneliti juga menggunakan sebuah *software* yang berbeda yaitu *UCSC Genome Browser* yang diselenggarakan oleh *University Of California, Santa Cruz*. Situs ini menawarkan sebuah program pendeteksi yang lengkap mulai dari golongan gen prokariotik sampai dengan eukariotik yang membentang luas dengan berbagai informasi genetik dimulai dari *Group* dari Gen tersebut, *Genome*, *Gen Position* sampai dengan variabilitas dari suatu gen namun dalam penggunaan awalnya membutuhkan waktu yang lama dikarenakan untuk menggunakan *software* ini harus melewati proses penngunduhan dan tidak

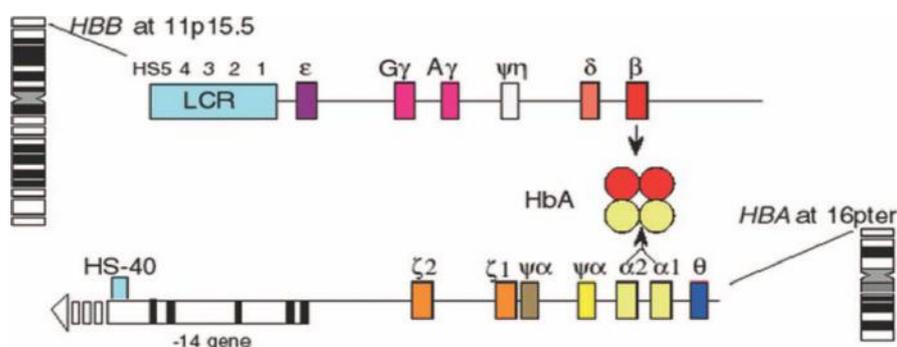
dianjurkan untuk masyarakat biasa dikarenakan banyak istilah-istilah yang sulit dimengerti oleh masyarakat biasa.

Hasil analisis yang didapat menunjukkan sekuens gen yang sangat panjang yaitu gen 81706 bp, tetapi untuk ketepatan prediksi maka peneliti mengurangi panjang sekuens hingga hasil akhir yang diprediksi yaitu 4827 bp. Pengurangan panjang tersebut bertujuan agar input data yang dibaca *software* tidak terlalu besar dan memberikan pilihan lokasi bagian gen yang termasuk ke dalam kriteria yang peneliti inginkan.

Daerah *promoter region* memiliki beberapa variasi genetik yang terkait dengan ekspresi dari gen β Globin. Banyak variasi genetik dari gen β Globin yang telah banyak dipublikasi namun beberapa jurnal mengungkapkan fenotip dari variant dibagian promoter gen seperti pada tabel 2 dan tabel 3 contohnya pada publikasi terdahulu yaitu pada gen β Globin terjadi mutasi di titik -121 C>T yang terletak di kotak CCAAT. Motif ini diakui 30 tahun yang lalu sebagai bagian dari sekuens promoter namun mutasi baru dilaporkan pada awal tahun 2000 an bahwa variasi genetik pada kotak CCAAT mempengaruhi ekspresi gen HBB pada manusia.¹⁷

Genetika Molekular Gen β Globin

Gen β Globin (HBB) adalah gen yang terdapat dilengan pendek kromosom 11 terdiri atas gen delta globin, gen epsilon embrionik, gen gamma-A dan gamma-G yang terekspresi saat fetus, serta pseudogen. Lima gen globin fungsional tersebut tersusun dalam urutan ekspresi seperti pada gambar dibawah ini.¹⁸



Gambar 4.6 Lokalisasi dan Struktur Kromosom dari α , β Globin Cluster.¹⁸

Gen HBB mempunyai panjang 1,6 kb terdiri atas tiga ekson dan bagian 3' dan 5' yang tidak dapat diterjemahkan (disebut UTR-kepanjangan dari *untranslated region*). Gen β Globin diregulasi oleh bagian promoter yang terdiri dari TATA, CAAT, dan kotak CACCC. Pada gen ini mempunyai Bagian utama d promoter yang terdiri dari enhancer yang terletak 50 Kb dari gen beta globin. Lokasi ini disebut dengan *dubbed locus control* (LCR) yang terdiri atas empat bagian yang dinamakan dengan istilah erytroid spesifik (HS-1 hingga HS-4) situs-situs hipersensitif DNase (HS), yang merupakan reseptor adanya interaksi protein-DNA. Setiap situs HS dibentuk oleh kombinasi dari beberapa motif DNA yang berinteraksi dengan faktor-faktor transkripsi, diantaranya yang paling penting adalah GATA 1 (GATA menunjukkan motif pengenalan relatif), *nuclear faktor erythroid 2*, faktor *erythroid kruppel-like*. Beberapa faktor transkripsi yang mengikat dan mengatur fungsi HBB yang paling penting adalah *erythroid kruppel-like* faktor 1 dimana fungsinya adalah mengikat kotak proximal CACCC yang telah diteliti pada tikus percobaan dimana pada percobaan tersebut menyebabkan adanya gambaran β -thalassemia.¹⁸

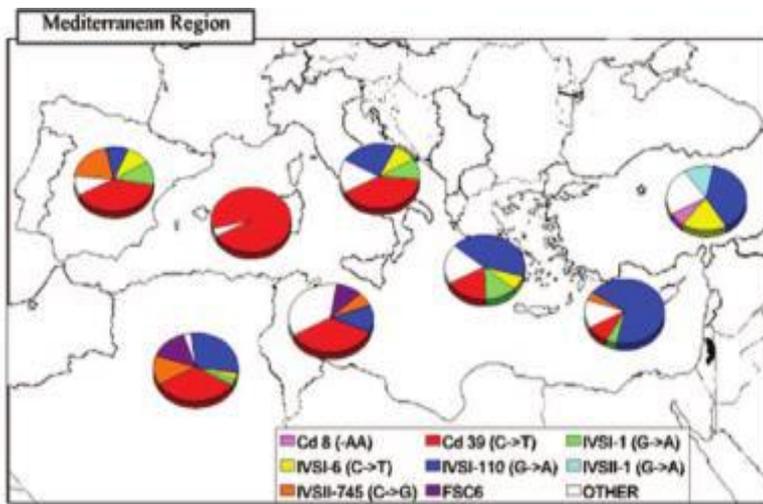
Mutasi-mutasi yang mempengaruhi ekspresi β Globin digolongkan kedalam tiga kategori yang berbeda : mutasi-mutasi yang menyebabkan transkripsi gen- β yang cacat (mutasi promotor dan UTS 5'); mutasi-mutasi yang mempengaruhi (mutasi sambung yang bedekatan / *splice-junction* dan mutasi runtutan konsensus, polyadenylasi dan mutasi-mutasi UTR 3' lainnya); dan mutasi-mutasi yang mengakibatkan mRNA tidak terjemah secara normal (*mutasi nonsense, frameshift, dan initiation codon*).¹⁸

Menurut Lippincott Williams dan Wilkins pada *Genetics in Medicine* penurunan output rantai β , mutasi-mutasi β - thalassemia dapat dibagi menjadi mutasi berat, ringan, dan

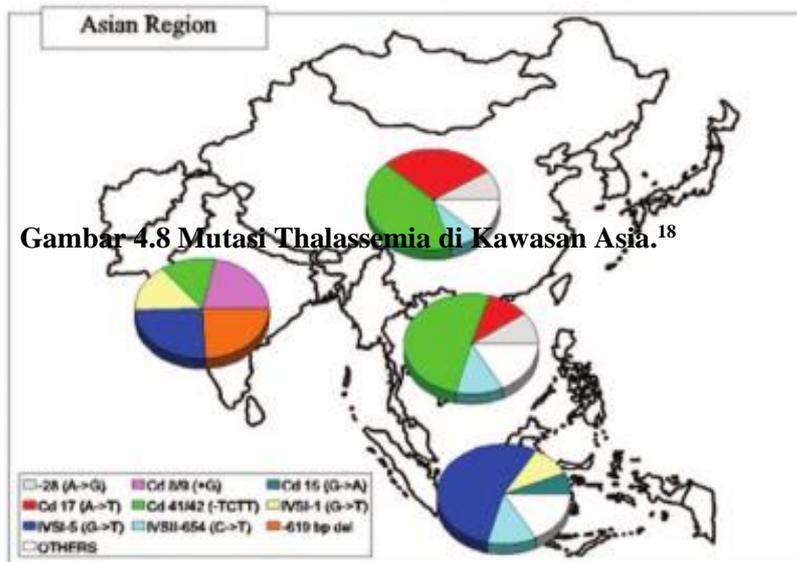
mutasi diam (*silent mutation*). Daftar mutasi ringan (*mild mutation*) dan diam (*silent mutation*) dapat dilihat pada tabel ke-2. Ciri dari *silent mutation* dilihat dari adanya temuan-temuan hematologis normal dan hanya dapat didefinisikan dengan rasio sintesis globin α/β yang tidak seimbang secara ringan sebagai akibat dari mutasi distal pada kotak CACCC, UTR 5', Sinyal polydenylasi, dan beberapa kerusakan pada tahap *splicing* sedangkan mutasi yang ringan menunjukkan gambaran hematologis yaitu terjadinya sintesis dari rantai globin yang dapat menyebabkan perubahan pada tahap *splicing* (Hb Malay, HbE, dan Codon 24 T \rightarrow A), atau dalam konsensus urutan *splicing*, UTR 3', dan situs poly-A.¹⁸

Dalam beberapa keadaan β -thalassemia menunjukkan fenotip ringan (contohnya cd-6-A dan cd8-AA) karena adanya keterkaitan dengan mutasi yang terjadi pada promoter dan tidak terjadinya delesi pada gen gamma-G (-158 gamma-G) yang berkaitan dengan produksi HbF yang tinggi selama stres hematologis. Peristiwa delesi yang terjadi yang dapat mempengaruhi gen β Globin sangatlah jarang, kecuali terjadinya delesi pada posisi 619 bp dimana terjadi pelepasan ujung gen β Globin 3', delesi tersebut bersifat umum pada populasi Sindi dan Punjabi di India dan Pakistan.¹⁸

Gambar 4.6 menunjukkan bahwa adanya perbedaan mutasi gen β Globin yang menyebabkan thalassemia di berbagai negara khususnya di daerah Mediterania dan Asia. Bisa disimpulkan bahwa pada daerah mediterania mutasi terbanyak terjadi pada IVSII-745 (C>G) (Merah), sedangkan di selanjutnya disusul dengan adanya mutasi pada IVS-110 (G>A) (Biru). Jika dibandingkan dengan daerah asia mutasi terbanyak disebabkan oleh perubahan pada cd 41M2 (-TCTT) (Hijau), sedangkan selanjutnya disusul oleh perubahan pada IVSII (G>T) (Biru).¹⁸



Gambar 4.7 Mutasi Thalassemia di Kawasan Mediterania.¹⁸



Gambar 4.8 Mutasi Thalassemia di Kawasan Asia.¹⁸

Mutasi Gen β Globin

Globin beta (juga disebut HBB,- β globin, hemoglobin beta, atau sebaiknya hemoglobin subunit beta) adalah protein globin yang bersama alpha globin (HBA), membuat bentuk yang paling umum dari hemoglobin pada manusia dewasa. Gen globin beta terletak pada kromosom 11. Fungsi dari gen globin beta ini salah satunya adalah mengatur pembentukan salah satu komponen pembentuk hemoglobin. Pada saat proses pembuahan, anak akan mendapat satu gen globin beta dari ibunya dan satu lagi dari ayahnya.¹⁹

Mutasi setiap gen globin terdiri dari tiga wilayah pengkode (ekson) dan dua daerah bukan pengkode (intron). Untuk membentuk mRNA matang, urutan intron RNA awal yang ditranskripsi dari DNA dalam inti sel akan dihapus dan urutan ekson akan disambung secara bersamaan. Ada berbagai promotor dan elemen pengontrol DNA yang mengatur berbagai ekspresi gen. Sekitar 150 mutasi yang berbeda telah dilaporkan pada orang dengan β thalassemia. Sekitar 20 mutasi bertanggung jawab untuk 80% dari Talasemia beta.¹²

Mutasi berasal dari kata *Mutatus* (bahasa latin) yang artinya adalah perubahan. Mutasi didefinisikan sebagai perubahan materi genetik (DNA) yang dapat diwariskan secara genetik keketurunannya. Istilah mutasi pertama kali digunakan oleh Hugo de Vries, untuk mengemukakan adanya perubahan fenotipe yang mendadak pada bunga *Oenothera lamarckiana* dan bersifat menurun. Ternyata perubahan tersebut terjadi karena adanya penyimpangan dari kromosomnya.¹⁹

Mutasi dapat mempengaruhi DNA maupun kromosom. DNA dapat dipengaruhi pada saat sintesis DNA (replikasi). Pada saat tersebut faktor mutagenik mempengaruhi pasangan basa nukleotida sehingga tidak berpasangan dengan basa nukleotida yang seharusnya (mismatch). Misalnya triplet DNA cetakan adalah TTA. Namun karena adanya mutagen menyebabkan DNA polimerase memasangkan A dengan C, bukan dengan T.¹⁹

Beberapa penyakit yang diakibatkan oleh karena mutasi dari gen β Globin diantaranya *Shepherd's Bush*, *Hb Mainz*, *M Saskaton*, *Thalassemia Mutation on the initiation Codon ATG to ATA*, *Hb Rocky Mountain*. Berikut ini akan dijelaskan beberapa contoh etiologi penyakit yang diakibatkan karena adanya mutasi pada gen β Globin. *Shepherd's Bush* disebabkan dikarenakan adanya perubahan *Glycine* menjadi *Aspartic Acid*, sedangkan *Hb Mainz* dikarenakan adanya perubahan pada asam amino valine non-polar hidrofobik menjadi asam glutamat sehingga menyebabkan perubahan struktur protein. Perubahan tersebut dapat mempengaruhi koneksi heliks pada protein, disamping adanya variasi pada database *Hb Mainz* juga menyebabkan adanya ketidakstabilan pada hemoglobin dalam tubuh sehingga penderita penyakit ini akan mengalami anemia hemolitik berat.¹⁶

Simpulan

Simpulan yang didapat setelah dilakukan penelitian ini adalah :

1. Penelitian ini menggunakan sekuens β Globin yang diambil dari NG (*Number of Genome*) dengan jumlah sekuens 81076 bp dan gen β Globin yang digunakan sebanyak 4827 bp pada posisi (26531-31358).
2. Penelitian ini menggunakan *Software Promoter Prediction Server* dimana setelah dilakukan analisis didapatkan bahwa gen β Globin menunjukkan suatu wilayah tempat melekatnya RNA Polimerase yaitu INS pada posisi 91 bp dan wilayah kotak TATA pada posisi 1112 bp dengan jarak antara INS dan kotak TATA 84 bp.
3. Dari penelitian ini didapatkan bahwa adanya mutasi pada kotak TATA (TATA BOX) sehingga mengakibatkan perubahan ekspresi gen (*Stop Expression*) yang akan menimbulkan penyakit β thalassemia.

Saran

1. Bagi Peneliti

Dapat menggunakan hasil ini sebagai perbandingan untuk melakukan penelitian yang sama dikemudian hari.

2. Bagi Institusi Pendidikan

Penelitian ini dapat dijadikan sumber informasi ilmiah sehingga dapat menambah wawasan dan memberikan sumbangan pengetahuan dibidang Genetika Kedokteran terutama khususnya mengenai Analisis Promoter Gen β Globin Dengan Menggunakan *Software Promoter Prediction Server* Pada Penderita Thalassemia β .

3. Bagi Dunia Medis

Dengan adanya hasil dari penelitian ini diharapkan bagi dunia medis agar lebih mengetahui tentang etiologi suatu penyakit terutama yang mempunyai hubungan dengan genetis bukan hanya secara global melainkan sampai ketingkat molekuler, dapat mendeteksi suatu kelainan genetis pada tingkat molekuler serta dapat membantu menegakan suatu diagnosis pada suatu penyakit khususnya yang mempunyai hubungan dengan genetis.

4. Bagi Dinas Terkait

Dengan adanya hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan dalam pelayanan medis pada bidang informasi teknologi (IT) untuk pelayanan kesehatan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Atmakusuma, D, Setyaningsih, I. Ilmu Penyakit Dalam, Dasar-Dasar Thalassemia : Salah Satu Jenis Hemoglobinopati : 5-6.
2. Elord, S and Stanssfield, W. Genetika Edisi keempat : Scaum's Outlines PT. Erlangga Jakarta 2006 Pp: 68-69
3. de vough, t KMK, van Wijik, R, van Solige, WW. Management of Gene Promoter Mutations in Molecular Diagnostics. Clinical Chemistry. 2009 : 55 (4) : 698-708.
4. Yunanda, Y. Thalassemia Berikut Komponenya. USU e-Repository. Medan 2008 Pp : 8-10
5. Dewi, A. Hematologi. Penerbit Buku Kedokteran EGC Jakarta 2007 Pp : 43-45.
6. Atul, B. Hematologi Klinik Uji Keterampilan Diagnostik. Penerbit Widya Medika Jakarta 2007 Pp : 29-30
7. Gannie, dkk. Kajian DNA Thalassemia α . USU Press Medan 2006 Pp : 20-22.
8. Gale, RE, Clegg, JB and Huhens ER. Human Embrionic Hemoglobin Gower 1 and Gower 2. Nature. 2006 : 280 (5718) : 162-4-164.
9. Albright, SR. Introduction and Classification of Thalassemia. <http://www.us.elsevierhealth.com/media/us/samplechapters.pdf>. Diakses Pada 12 November 2015.
10. Boehm, CD and Kazazian, HH. Prenatal Diagnosis of Hemoglobinopathies by DNA Analysis. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2007 : 4 (4) : 155-167.
11. Dewi, A. Hematologi. Penerbit Buku Kedokteran EGC Jakarta 2007 Pp : 43-45.
12. Deborah R. Beta Thalassemia Institute of Tropical Medicine, N Engl J Med. <http://content.nejm.org/cgi/content/full/353/11/1135>. Diakses pada 5 Desember 2015.
13. Aprijani, DA dan Elfaizi, MA. Bioinformatika : Perkembangan, Disiplin dan Penerapanya di Indonesia. <http://ikc.vlsm.org/copyleft/fdl.html>. Diakses Pada 1 November 2015.
14. Maston GA, Evans SK, Green MR. Transcriptional Regulatory Elements in The Human Genome. Stanford University. 2006 Pp: 31
15. Childs,A and Edwards, R. Hb Mainz. http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3?mode=output&display_format=page&i=451. Diakses Pada 7 Maret 2016.
16. Childs, A and Edwards, R. Shapered Bush. Syllabus of Human Hemoglobin Variants. <http://www.umm.edu/blood/anehemol.htm>. Diakses Pada 6 Maret 2016.

17. Giardine, B, Borg, J, Higs , RD, Peterson, KR, Phillipsen, S, Maglott, D dkk. Systematic Documentation and Analysis of Human Genetic Variation in Hemoglobinopathies Using The Microattribution Approach. Nature genetic 2011Apr; Vol 43, No. 4
18. Chao, A and Galanello, R. GENETICS in Medicine volume 12. 2010 Pp : 63-66
19. Chaidar warianto. Mutasi HBB Gene. http://skp.unair.ac.id/repository/GuruIndonesia/Mutasi_ChaidarWarianto_17.pdf. Diakses Pada 6 Maret 2016.