

**ANALISIS MUTASI PADA EKSON INTRON 6 DAN 10
GEN *RET* DARI PASIEN *HIRSCHSPRUNG DISEASE* DI
RSUP M. DJAMIL PADANG**



Oleh :

REZKY SAVNA PUTRI

NIM.20032085/2020

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2024**

**ANALISIS MUTASI PADA EKSON INTRON 6 DAN 10
GEN *RET* DARI PASIEN *HIRSCHSPRUNG DISEASE* DI
RSUP M. DJAMIL PADANG**

SKRIPSI

*Diajukan sebagai salah satu persyaratan guna memperoleh gelar
Sarjana Sains*



Oleh :

REZKY SAVNA PUTRI

NIM.20032085/2020

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2024**

PERSETUJUAN SKRIPSI

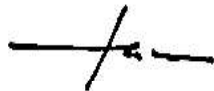
**ANALISIS MUTASI PADA EKSON INTROJEN 6 DAN 10 GEN *RET*
DARI PASIEN *HIRSCHSPRUNG DISEASE* DI RSUP M. DJAMIL
PADANG**

Nama : Rezky Savna Putri
NIM : 20032085
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 19 Agustus 2024

Mengetahui:
Ketua Departemen Biologi

Disetujui Oleh:
Pembimbing



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 19750815 200604 2 001



Dr. Yuni Ahda, S.Si., M.Si
NIP. 19690629 199403 2 003

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI




Nama : Rezky Savna Putri
NIM : 20032085
Program Studi : Biologi
Departemen : Biologi
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

ANALISIS MUTASI PADA EKSON INTRON 6 DAN 10 GEN *RET* DARI PASIEN *HIRSCHSPRUNG DISEASE* DI RSUP M. DJAMIL PADANG

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi
Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Padang, 19 Agustus 2024

Tim Penguji

Nama	Tanda Tangan
Ketua : Dr. Yuni Ahda, S.Si, M.Si	
Anggota : Afifatul Achyar, M.Si	
Anggota : Siska Alicia Farma, S.Pd., M.Biomed	

SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Rezky Savna Putri

NIM : 20032085

Program Studi : Biologi

Departemen : Biologi

Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya yang dengan judul “Analisis Mutasi Pada Ekson Intron 6 dan 10 Gen *RET* Dari Pasien *Hirschsprung Disease* di RSUP M. Djamil Padang” adalah benar hasil karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat orang lain.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran dan rasa tanggung jawab sebagai anggota Masyarakat ilmiah.

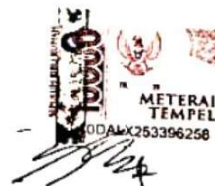
Padang, 19 Agustus 2024

Saya yang menyatakan

Mengetahui:
Ketua Departemen Biologi



Dr. Dwi Hilda Putri, S.Si., M.Biomed.
NIP. 19750815 200604 2 001



Rezky Savna Putri
NIM. 20032085

**Analisis Mutasi Pada Ekson Intron 6 dan 10 Gen *RET* dari Pasien
Hirschsprung Disease di RSUP M.Djamil Padang**

REZKY SAVNA PUTRI

ABSTRAK

Hirschsprung disease merupakan suatu penyakit multigenetik kompleks yang umumnya ditandai dengan tidak adanya ganglion intrinsik sel-sel pada pleksus submukosa dan mienterikus dari saluran usus. Gen utama yang bertanggung jawab terhadap *hirschsprung disease* adalah gen *RET*. Pada penelitian ini dilakukan analisis mutasi pada ekson intron 6 dan 10 gen *RET* untuk mengetahui ada atau tidaknya mutasi serta tipe mutasi yang terdapat pada ekson intron 6 dan 10 gen *RET* yang terkait *hirschsprung disease*.

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian deskriptif yang dilakukan pada Juli 2023-Februari 2024 di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Departemen Biologi FMIPA UNP. Darah diekstraksi dari 7 sampel pasien *hirschsprung disease*. Amplifikasi DNA dengan sekuen gen *RET* dilakukan dengan metode PCR. Produk PCR divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarose. Produk PCR kemudian *sequencing* untuk mendeteksi ada atau tidaknya mutasi dengan menggunakan Geneious Prime.

Hasil penelitian menemukan mutasi hanya ditemukan pada intron 6 gen *RET*. Tipe mutasi yang ditemukan adalah mutasi substitusi (transisi) homozigot dan mutasi substitusi (transisi) heterozigot pada basa ke-37.434 serta mutasi substitusi (transversi) homozigot dan mutasi substitusi (transversi) heterozigot pada basa ke-36.874. Pada ekson intron 10 gen *RET* tidak terdapat mutasi.

Kata kunci : Ekson-intron, gen *RET*, *hirschsprung disease*, *sequencing*

**Mutation Analysis In Exons 6 and 10 Of The RET Gene from Hirschsprung
Disease Patients at RSUP. M.Djamil Padang**

REZKY SAVNA PUTRI

ABSTRACT

Hirschsprung disease is a complex multigenetic disease commonly characterized by the absence of intrinsic ganglion cells in the submucosal and myenteric plexus of the intestinal tract. The main gene responsible for hirschsprung disease is the RET gene. This study analyzed mutations in exons intron 6 and 10 of the RET gene to determine the presence or absence of mutations and the type of mutations contained in exons intron 6 and 10 of the RET gene associated with hirschsprung disease.

The type of research used is descriptive research conducted in July 2023-February 2024 at the Genetics and Biotechnology Laboratory of the Department of Biology FMIPA UNP. Blood was extracted from 7 hirschsprung disease patient samples. DNA amplification with the RET gene sequence was performed by PCR method. PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis. PCR products were then sequenced to detect the presence or absence of mutations using Geneious Prime.

The results found that mutations were only found in intron 6 of the RET gene. The types of mutations found were homozygous substitution (transition) mutations and heterozygous substitution (transition) mutations at base 37,434 and homozygous substitution (transversion) mutations and heterozygous substitution (transversion) mutations at base 36,874. There is no mutation in exon intron 10 of the RET gene.

Keywords: Exon-intron, RET gene, hirschsprung disease, sequencing

KATA PENGANTAR



Alhamdulillahirobbil'alamin. Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Analisis Mutasi Pada Ekson Intron 6 dan 10 Gen *RET* dari Pasien *Hirschsprung Disease* di RSUP M. Djamil Padang**”. Selanjutnya, sholawat serta salam semoga tetap tercurah kepada Nabi Muhammad SAW *Allahumma Sholli 'alaa Muhammad wa'alaa Ali Muhammad.*

Penulisan skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu persyaratan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang. Keberhasilan Penulis dalam menyelesaikan skripsi ini tidak terlepas dari bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dalam kesempatan ini dengan segala kerendahan hati Penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dr. Yuni Ahda, S. Si., M. Si. sebagai Dosen Pembimbing yang telah memberikan waktu, tenaga, pikiran serta selalu sabar dalam membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.
2. Ibu Irma Leilani Eka Putri S.Si., M. Si sebagai Penasihat Akademik.
3. Ibu Afifatul Achyar, M. Si. sebagai Dosen Penguji I yang telah memberi saran, nasehat dan saran selama proses penelitian.
4. Ibu Siska Alicia Farma S.Pd M. Biomed sebagai Dosen Penguji II yang memberikan kritikan dan saran dalam penulisan skripsi ini.
5. Bapak/Ibu staf dosen departemen Biologi yang telah membantu untuk kelancaran penulisan skripsi ini.

6. Sebagai ungkapan Terimakasih, skripsi ini penulis persembahkan kepada Orang tua tercinta Mama Asnita Jisar dan Papa Syamsunar Jalil yang selalu memberikan kasih sayang, cinta, semangat, dan doa-doa terbaik yang tidak ada hentinya sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini dan meraih gelar sarjana ini

7. Saudara tercinta, kakak Selvia Cindy Kartika dan Adik Harra Heiko Rasaki. Terimakasih atas semangat, doa dan cinta yang selalu diberikan kepada penulis.

8. Hidayatullah Al Arif yang selalu menemani dan selalu menjadi support system penulis menjalani hari-hari yang tidak mudah selama pengerjaan skripsi ini. Terimakasih telah ikut serta mendoakan, memberikan semangat, dukungan dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini.

9. Kepada diri sendiri yang telah berusaha, berjuang, serta mampu melewati setiap proses sulit hingga sampai dititik ini. Terimakasih telah bertahan dan selalu semangat sesulit apapun keadaannya.

Semoga segala bantuan, bimbingan, dukungan dan petunjuk yang telah diberikan kepada penulis menjadi amal ibadah dan mendapatkan pahala dari Allah SWT. Penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi semua yang membacanya.

Padang, Mei 2024

REZKY SAVNA PUTRI

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	ivi
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	Error! Bookmark not defined.
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	5
D. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. <i>Hirschsprung Disease</i> (HD).....	6
B. Mutasi Gen.....	9
C. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	11
D. Elektroforesis.....	13
E. <i>Sequencing</i>	15
BAB III METODE PENELITIAN	18
A. Jenis Penelitian.....	18
B. Waktu Dan Tempat Penelitian.....	18
C. Alat Dan Bahan.....	18
D. Prosedur Penelitian.....	20
E. Teknik Analisis Data.....	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	27
A. Hasil Penelitian.....	27
B. Pembahasan.....	29
BAB V PENUTUP	33
A. Kesimpulan.....	33
B. Saran.....	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	40

DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
1. Berbagai mutasi pada gen <i>RET</i>	11
2. Primer yang digunakan.....	19
3. Komponen PCR.....	24
4. Tahapan PCR.....	24
5. Hasil Kemurnian dan Konsentrasi DNA Pasien HD.....	27
6. Mutasi Pada Intron 6 dan 10 Gen <i>RET</i>	29

DAFTAR GAMBAR

GAMBAR	Halaman
1. Bayi penderita Hirschsprung Disease.	7
2. HD segmen pendek dan segmen panjang	8
3. Analogi yang menunjukkan efek mutasi titik dan frameshift.	10
4. Posisi penempelan primer pada gen RET	20
5. Visualisasi hasil elektroforesis gen RET	28
6. Mutasi pada intron 6 gen RET	29

DAFTAR LAMPIRAN

LAMPIRAN	Halaman
1. Kode etik	40
2. Hasil spektrofotometri DNA.....	41
3. Hasil sequencing sampel HD.....	42

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Hirschsprung Disease dapat terjadi karena kegagalan dalam perkembangan *enteric nervous system* (ENS). *Enteric nervous system* merupakan suatu sistem saraf intrinsik saluran pencernaan atau gastrointestinal yang berfungsi untuk mengatur motilitas, pencernaan makanan, penyerapan nutrisi, dan sebagai fungsi pembatas. Komponen terbesar dari sistem saraf otonom diwakili oleh ENS dengan 500 juta lebih neuron pada manusia yang terdiri dari 40 sub tipe neurotransmitter yang berbeda (Fan *et al.*, 2023).

Hirschsprung disease menjadi salah satu penyebab banyaknya kematian bayi pada masa neonatus yang menyebabkan bayi tidak mengeluarkan feses pertamanya sehingga mengganggu saluran pencernaan (Wilananda *et al.*, 2022). *Hirschsprung disease* merupakan suatu penyakit multigenetik kompleks yang umumnya ditandai dengan tidak adanya ganglion intrinsik sel-sel pada pleksus submukosa dan mienterikus dari saluran usus (Ambartsumyan *et al.*, 2020). *Hirschsprung disease* biasanya terjadi pada anak-anak dengan kasus 1 dari 5000 anak mengalaminya perbandingan 4:1 yang didominasi oleh anak laki-laki (Banh *et al.*, 2023).

Hirschsprung Disease (HD) mulai terjadi pada 6 minggu pertama kehidupan yang disertai dengan demam, diare, distensi perut, muntah, dan sembelit. Namun, pada beberapa kasus gejala tersebut tidak muncul sampai masa kanak-kanak (Tjan *et al.*, 2021). Berdasarkan variasi panjang segmen aganglionik, *hirschsprung disease* dikelompokkan pada beberapa tipe yaitu: (1) HD segmen pendek (S-HD)

adalah HD dengan aganglionik terbatas pada daerah rectum sigmoid (2) HD segmen panjang (L-HD) adalah HD dengan aganglionik memanjang dari rectum, kolon sigmoid, usus besar sampai fleksi limpa, dan (3) HD dengan aganglionik pada seluruh usus besar yang diklasifikasikan menjadi *total colonic aganglionosis* (TCA) (Karim *et al.*, 2018). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Henna (2011) dari Maret-Oktober pada tahun 2009, jumlah kasus *hirschsprung disease* ditemukan sebanyak 51 pasien di Pakistan. Berdasarkan penelitian Rahman (2010) tahun 2005-2009 ditemukan 181 kasus *hirschsprung disease* dari RS Chittagong Bangladesh.

Sekitar 10-20% kasus HD terjadi karena riwayat penyakit dari keluarga yang positif HD. Penyakit ini bersifat heterogen pewarisannya dapat disebabkan oleh berbagai kombinasi faktor genetik (Klein *et al.*, 2020). Terjadinya HD dikaitkan juga dengan sindrom genetik seperti sindrom trisomi 21 (sindrom Down). Gen penting yang ikut terlibat dan sudah menyeluruh ditemukan dalam kasus HD yaitu *rearranged during transfection (RET)*, *SRY-box 10 (SOX10)*, *endothelin 3 (EDN3)*, *glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)*, dan *endothelin receptor type B (EDNRB)* (Takawira *et al.*, 2015).

Gen utama yang bertanggung jawab terhadap *hirschsprung disease* adalah gen *RET* (Pini *et al.*, 2013). Gen *RET* terdiri dari 21 ekson dan 5 intron (Bhattarai *et al.*, 2022). Gen *RET* terletak pada kromosom 10 (10q11.2) berperan dalam jalur pensinyalan seluler selama perkembangan embrio untuk mengatur kelangsungan hidup, proliferasi, diferensiasi, migrasi sel progenitor sistem saraf enterik dan regenerasi sel saraf dan ginjal (Krampitz *et al.*, 2014). Mutasi pada gen *RET* ditemukan pada 50% kasus familial dan 15-30% dari kasus HD sporadis

(Virtanen *et al.*, 2013). Sekitar 5-20% kasus HD merupakan mutasi heterozigot gen *RET* pada daerah *coding sequence* (CD) dari kasus *total colonic aganglionosis* (TCA) sedangkan mutasi pada *non-coding sequence* (NCD) atau mutasi nukleotida tunggal sering terjadi dalam kasus S-HD. Mutasi pada *coding sequence* (CD) dan *non-coding sequence* (NCD) dapat menyebabkan ekspresi *RET* yang menyimpang dengan sebagian besar mutasi pada *coding sequence* (CD) ditemukan pada domain ekstraseluler *RET* yang dapat mengganggu proses pematangan protein *RET*, sehingga mengarah ke penurunan ekspresi *RET* yang menunjukkan bahwa keterbatasan fungsi gen *RET* dapat menjadi penyebab HD (Lai *et al.*, 2017).

Mutasi adalah perubahan urutan nukleotida suatu organisme yang terjadi secara mendadak serta dapat diwariskan. Mutasi dapat terjadi pada skala yang berbeda mulai dari kecil (basa tunggal) hingga skala besar (banyak gen). Pergantian genetik akibat mutasi, terutama pada daerah pengkodean gen menunjukkan pengaruh pada berbagai perkembangan penyakit dan kelainan fisik (Paul *et al.*, 2019). Dampak yang terjadi karena adanya variasi genetik terhadap fungsi serta ekspresi gen atau protein pada suatu individu sangat luas yaitu dapat memisahkan protein multi-dominan menjadi beberapa protein dominan tunggal, menimbulkan variasi tingkat ekspresi pada protein tertentu dan dapat mengubah beberapa ekspresi gen pada wilayah genom sehingga analisis variasi genetik memberikan informasi seberapa besar pengaruh varian pada masing-masing protein suatu gen serta memberikan informasi biologis yang dapat diekstrapolasi pada penelitian lain untuk memahami dampak dari suatu mutasi (Cardoso *et al.*, 2015). Metode yang paling umum digunakan untuk menganalisis berbagai variasi

genetik yaitu: sekuensing DNA, *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dan pohon filogenetik (Achyar *et al.*, 2021). Dalam penelitian ini dilakukan analisis mutasi menggunakan metode PCR sekuensing. Sekuensing adalah suatu teknik dalam mengurutkan nukleotida DNA atau gen serta pengurutan asam amino yang dikodekan secara tepat dan cepat. Hasil sekuensing dapat digunakan untuk menentukan tingkat homologi suatu urutan nukleotida DNA dengan berbagai organisme (Shofa *et al.*, 2019). Keunggulan dari metode sekuensing adalah dapat mengurutkan ratusan sampel DNA secara bersamaan sehingga lebih efisien waktu dalam penggunaannya, metode ini dapat membaca urutan DNA yang panjangnya hingga ratusan basa serta dapat menghasilkan gigabase data dalam sekali proses. Keakuratan serta kemudahan dalam analisis menyebabkan metode ini paling umum digunakan untuk mengurutkan DNA (Heather *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Nunez-Torres *et al* (2011) ditemukan mutasi *germline* pada ekson 6 dan 10. Berdasarkan penelitian Ruiz-Ferrer *et al* (2006) terjadi mutasi penyambungan pada intron 6 dan mutasi *nonsense* pada ekson intron 10. Pada penelitian Auricchio *et al* (1999) ditemukan 2 mutasi *missense* pada ekson 10. Berdasarkan uraian diatas maka pada penelitian ini dilakukan analisis mutasi pada ekson intron 6 dan 10 gen *RET* menggunakan metode PCR sekuensing pada sampel DNA pasien *Hirschsprung Disease* yang berasal dari RSUP M. Djamil Padang.

B. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

- a. Apakah terdapat mutasi pada ekson intron 6 dan 10 gen *RET* pada

pasien *Hirschsprung Disease* di RSUP M. Djamil Padang?

- b. Bagaimana tipe mutasi pada ekson intron 6 dan 10 gen *RET* pada pasien *Hirschsprung Disease* di RSUP M. Djamil Padang?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

- a. Menganalisis mutasi yang terdapat pada ekson intron 6 dan 10 gen *RET* pada pasien *Hirschsprung Disease* di RSUP M. Djamil Padang.
- b. Menganalisis tipe mutasi yang ada pada ekson intron 6 dan 10 gen *RET* pada pasien *Hirschsprung Disease* di RSUP M. Djamil Padang.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

- a. Memberikan informasi mengenai mutasi yang terdapat pada ekson intron 6 dan 10 gen *RET* dari penderita *Hirschsprung Disease*.
- b. Sebagai referensi dan acuan untuk penelitian selanjutnya.