

**ANALISIS MUTASI EKSON DAN INTRON 4 GEN *RET*  
DARI PASIEN PENYAKIT *HIRSCHSPRUNG* DI  
RSUP Dr. M. DJAMIL PADANG**



**SALSA NOVELA AZALIA  
NIM. 20032091/2020**

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

**ANALISIS MUTASI EKSON DAN INTRON 4 GEN *RET*  
DARI PASIEN PENYAKIT *HIRSCHSPRUNG* DI  
RSUP Dr. M. DJAMIL PADANG**

**SKRIPSI**

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



**Oleh :**

**SALSA NOVELA AZALIA  
NIM. 20032091/2020**

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

## PERSETUJUAN SKRIPSI

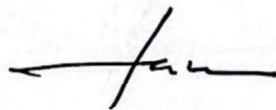
### ANALISIS MUTASI EKSON DAN INTRON 4 GEN *RET* DARI PASIEN PENYAKIT *HIRSCHSPRUNG* DI RSUP Dr. M. DJAMIL PADANG

Nama : Salsa Novela Azalia  
NIM : 20032091  
Program Studi : Biologi  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, 26 Juli 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 : Salsa Novela Azalia  
NIM : 20032091  
Program Studi : Biologi  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

### ANALISIS MUTASI EKSON DAN INTRON 4 GEN *RET* DARI PASIEN PENYAKIT *HIRSCHSPRUNG* DI RSUP Dr. M. DJAMIL PADANG

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

Padang, 26 Juli 2024

#### Tim Penguji

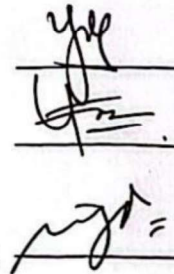
Nama

Tanda Tangan

Ketua : Dr. Yuni Ahda, S.Si., M.Si

Anggota : Afifatul Achyar, M.Si

Anggota : Dr. dr. Elsa Yuniarti, S.ked., M.Biomed., AIFO-K



## SURAT PERNYATAAN TIDAK PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Salsa Novela Azalia

NIM : 20032091

Program Studi : Biologi

Departemen : Biologi

Fakultas : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

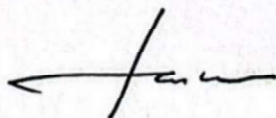
Dengan ini menyatakan bahwa, skripsi saya yang dengan judul “Analisis Mutasi Ekson dan Intron 4 Gen *RET* dari Pasien Penyakit *Hirschsprung* di RSUP Dr. M. Djamil Padang” adalah benar hasil karya saya sendiri dan bukan hasil plagiat orang lain.

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

Padang, 26 Juli 2024

Mengetahui:

Ketua Departemen Biologi



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

Saya yang menyatakan



Salsa Novela Azalia  
NIM. 20032091

**ANALISIS MUTASI EKSON DAN INTRON 4 GEN *RET*  
DARI PASIEN PENYAKIT *HIRSCHSPRUNG* DI  
RSUP Dr. M. DJAMIL PADANG**

**Salsa Novela Azalia**

**ABSTRAK**

Penyakit *Hirschsprung* (HSCR) merupakan salah satu kelainan kongenital. HSCR adalah kelainan bawaan yang mempengaruhi saluran pencernaan yang disebabkan oleh gangguan perkembangan sistem saraf enterik yang berasal dari *Neural Crest Cells* (NCCs). HSCR dikaitkan dengan adanya mutasi pada 20 gen berbeda yang telah teridentifikasi. Gen utama yang mengakibatkan HSCR yaitu gen *RET*. Pada penelitian sebelumnya, telah ditemukan beberapa mutasi pada intron dan ekson pada gen *RET*. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme molekuler disfungsi *RET* sangat bergantung pada lokasi mutasi yang terjadi. Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis tipe mutasi pada ekson dan intron 4 gen *RET* pada pasien HSCR di RSUP Dr. M Djamil Padang.

Jenis penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang dilakukan di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi, Departemen Biologi FMIPA UNP. Sampel DNA diekstraksi dari darah 7 pasien HSCR. Sekuens gen *RET* ekson dan intron 4 dari sampel tersebut diamplifikasi menggunakan metode *Polymerase chain reaction* (PCR). Hasil dari proses PCR divisualisasikan menggunakan gel elektroforesis. Selanjutnya, produk PCR *disequencing* untuk menemukan keberadaan mutasi.

Hasil penelitian menunjukkan mutasi pada pasien HSCR di RSUP Dr. M. Djamil Padang. Pada intron 4 ditemukan mutasi pada dua sampel yaitu AY dan SN. Mutasi yang ditemukan yaitu mutasi heterozigot yang termasuk kedalam mutasi titik (*point mutation*), berupa mutasi substitusi yang termasuk ke dalam jenis mutasi transisi.

**Kata Kunci: Penyakit *Hirschsprung*, Mutasi, Gen *RET*, PCR, *Sequencing***

**ANALYSIS OF EXON 2 AND INTRON 4 MUTATIONS OF RET GENES  
FROM HIRSCHSPRUNG DISEASE PATIENTS  
IN Dr. M. DJAMIL PADANG HOSPITAL**

**Salsa Novela Azalia**

**ABSTRACT**

Hirschsprung's disease (HSCR) is one of the congenital disorders. HSCR is an inherited disorder affecting the gastrointestinal tract caused by impaired development of the enteric nervous system derived from Neural Crest Cells (NCCs). HSCR is associated with mutations in 20 different genes that have been identified. The main gene that causes HSCR is the RET gene. In previous studies, several intron and exon mutations in the RET gene have been found. This suggests that the molecular mechanism of RET dysfunction is highly dependent on the location of the mutation. The purpose of this study was to analyze the type of mutation in exon and intron 4 of the RET gene in HSCR patients at Dr. M Djamil Padang Hospital.

This type of research is a descriptive study conducted at the Genetics and Biotechnology Laboratory, Department of Biology FMIPA UNP. DNA samples were extracted from the blood of 7 HSCR patients. RET exon and intron 4 gene sequences from the samples were amplified using Polymerase chain reaction (PCR) method. The results of the PCR process were visualized using gel electrophoresis. Furthermore, PCR products were sequenced to find the presence of mutations.

The results showed mutations in HSCR patients at Dr. M. Djamil Padang Hospital. Intron 4 mutations were found in two samples, AY and SN. Mutations found are heterozygous mutations that are included in point mutations, in the form of substitution mutations that are included in the type of transition mutations.

**Keywords: Hirschsprung disease, Mutation, RET gene, PCR, Sequencing**



## KATA PENGANTAR

Penulis mengucapkan syukur kepada Allah SWT. yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat melaksanakan dan menyelesaikan skripsi tentang “Analisis Mutasi Ekson dan Intron 4 Gen *RET* dari Pasien Penyakit *Hirschsprung* di RSUP Dr. M. Djamil Padang”. Skripsi ini diajukan untuk memenuhi sebagian persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S1) pada Program Studi Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada :

1. Ibu Dr. Yuni Ahda, S. Si, M. Si selaku pembimbing yang telah memberikan waktu, pikiran dan tenaga untuk membimbing dan mengarahkan penulis dengan sangat sabar dalam memberikan arahan dalam penyelesaian skripsi.
2. Ibu Afifatul Achyar, S. Si, M. Si dan Ibu Dr. dr. Elsa Yuniarti, S. Ked, M. Biomed., AIFO-K sebagai penguji yang telah memberikan arahan, saran dan kritikan untuk kesempurnaan penulisan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Dwi Hilda S. Si., M. Biomed, selaku Ketua Departemen Biologi dan Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.
4. Ibu Irma Leilani Eka Putri, S.Si, M.Si selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan nasehat dan saran.
5. Bapak dan Ibu Dosen staf Departemen Biologi yang telah membantu kelancaran penulisan skripsi.
6. Orang tua tercinta, Mama Risananijar, S.Tr. Keb dan Papa Rudianto Putra serta Adik terkasih Amanda Dwi Attaya yang selalu memberikan do'a,



semangat dan dukungan yang diberikan selama ini hingga bisa mencapai titik ini.

7. Keluarga besar I Made Tangsi dan keluarga besar NJR tercinta untuk setiap do'a dan dukungannya kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini.
8. Sahabat penulis di bangku perkuliahan yaitu, Aufa, Atika, Amanda, Dara, Hafizah, Rara, Sharah dan Yani yang telah menemani selama menjalankan masa perkuliahan ini dan tak pernah henti saling memberikan semangat.
9. Teman-teman mahasiswa bimbingan Ibu Yuni Ahda, terima kasih untuk semua dukungan dan bantuannya. Terima kasih untuk selalu sabar dan berproses hingga dapat mencapai titik ini.
10. Teman-teman mahasiswa Biologi 2020 yang telah memberikan semangat dan membantu dalam penyelesaian skripsi ini.
11. Terakhir, terima kasih kepada diri saya sendiri karena tidak menyerah dan tetap berjuang dalam keadaan apapun. Terima kasih telah berusaha sabar dan tetap bertahan dalam menghadapi setiap rintangan dan cobaan hingga bertahan sampai saat ini.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih banyak kekurangan. Untuk itu, kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan. Semoga skripsi ini bermanfaat bagi penulis dan pembaca.

Padang, 14 Mei 2024

Penulis

## DAFTAR ISI

ABSTRAK.....	i
ABSTRACT.....	ii
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	5
C. Tujuan Penelitian .....	5
D. Manfaat Penelitian .....	5
BAB II KAJIAN TEORI.....	6
A. Penyakit <i>Hirschsprung</i> (HSCR).....	6
B. Mutasi Gen <i>RET</i> .....	9
C. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	12
D. Elektroforesis .....	13
E. <i>Sequencing</i> .....	14
BAB III METODE PENELITIAN.....	17
A. Jenis Penelitian .....	17
B. Waktu dan Tempat.....	17
C. Alat dan Bahan.....	17
D. Prosedur Penelitian .....	18
E. Analisis Data.....	23

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....	24
A. Hasil Penelitian.....	24
B. Pembahasan .....	26
BAB V PENUTUP.....	31
A. Kesimpulan.....	31
B. Saran .....	31
DAFTAR PUSTAKA .....	32
LAMPIRAN .....	40

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Macam – macam Mutasi yang Terjadi pada Gen <i>RET</i> .....	11
2. Primer yang digunakan untuk Amplifikasi Ekson dan Intron 4 dari Gen <i>RET</i> .....	18
3. Komponen PCR .....	21
4. Tahapan PCR .....	22
5. Hasil nanophotometer sampel penderita penyakit <i>Hirschsprung</i> .....	24

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ciri – ciri Penyakit <i>Hirshcsprung</i> .....	7
2. Lokasi gen <i>RET</i> pada kromosom 10 . .....	10
3. Ilustrasi posisi Penempelan Primer Pada Ekson 4 .....	12
4. Amplikon sekuen gen <i>RET</i> ekson dan intron 4 sampel pasien penyakit <i>Hirschsprung</i> .....	25
5. Mutasi pada intron 4 gen <i>RET</i> .....	26

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Surat Kode Etik .....	40
2. Format Persetujuan Ikut Dalam Penelitian ( <i>Informed Consent</i> ) .....	41
3. Hasil nanophotometer sampel penderita penyakit <i>Hirschsprung</i> .....	43
4. Primer yang digunakan untuk amplifikasi ekson dan intron 4 dari gen <i>RET</i> .....	44
5. Hasil sequencing sampel pasien penyakit <i>Hirschsprung</i> .....	46

# BAB I

## PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Kelainan kongenital merupakan suatu kondisi ketidaknormalan struktur maupun fungsi tubuh yang muncul saat lahir (Purwoko, 2019). Penyakit *Hirschsprung* (HSCR) merupakan salah satu kelainan kongenital. HSCR adalah kelainan bawaan yang mempengaruhi saluran pencernaan yang disebabkan oleh gangguan perkembangan sistem saraf enterik yang berasal dari *Neural Crest Cells* (NCCs) (Diposarosa *et al.*, 2021). Dengan demikian, menyebabkan tidak adanya sel ganglion pada *pleksus submucosa* (Meissner) dan *pleksus muscularis* (Auerbach) (Rahardjo *et al.*, 2023). Berdasarkan hal tersebut, bagian-bagian usus besar kehilangan kemampuan untuk berkontraksi dan mengeluarkan feses (Chirul *et al.*, 2016)

Penyakit *Hirschsprung* biasanya terjadi pada bayi yang baru lahir. Bayi yang sehat biasanya mengeluarkan mekonium (feses pertama) dalam waktu 24-48 jam setelah kelahiran. Namun, sebagian besar bayi HSCR gagal mengeluarkan mekonium dan menderita sembelit parah. Gejala lain termasuk perut kembung secara bertahap, muntah dan demam. Meskipun bayi dengan HSCR biasanya menunjukkan gejala dalam waktu pertama setelah kelahiran, beberapa anak dengan HSCR dapat tidak menunjukkan gejala selama beberapa bulan (McKeown *et al.*, 2013).

Prevalensi penyakit *Hirschsprung* diseluruh dunia berkisar 1:5000 sampai 1:10000 kelahiran hidup dan memiliki variasi yang berbeda di setiap negara (Ali *et al.*, 2021). HSCR paling sering terjadi di Asia, diikuti Afrika-Amerika dan Eropa. Dilaporkan bahwa di Eropa berkisar 1,5:10000; Afrika-Amerika



2,1:10000; dan di Asia 2,8:10000 (Ambartsumyan *et al.*, 2020). Jumlah kasus HSCR di Indonesia yaitu 3,1 kasus per 10000 kelahiran hidup (Gunadi *et al.*, 2022). Mayoritas penderita HSCR merupakan pria, dengan perbandingan pria : wanita 4:1 (Ambartsumyan *et al.*, 2020).

Penyakit *Hirschsprung* merupakan penyakit akibat tidak adanya sel ganglion pada dinding saluran pencernaan pada bagian distal, dan dapat memanjang ke arah proksimal dengan panjang segmen aganglionosis yang beragam (Neumann *et al.*, 2013). Berdasarkan tingkat keparahan fenotip HSCR yang ditentukan oleh panjang aganglionosis dapat dikategorikan beberapa segmen. Aganglionosis segmen pendek (S-HSCR), segmen ini hanya mempengaruhi rektum dan kolon sigmoid, kasus pada segmen ini terjadi sebanyak 80%. Berikutnya, aganglionosis segmen panjang (L-HSCR) kasus yang terjadi sebanyak 15% yang mempengaruhi usus bagian proksimal. Lalu, aganglionosis kolon total (TCA) yang terjadi sebanyak 5% yang dapat mempengaruhi seluruh usus besar (Gui *et al.*, 2013).

Penyakit *Hirschsprung* dikaitkan dengan adanya mutasi pada 20 gen berbeda yang telah teridentifikasi (Diposarosa *et al.*, 2021). Gen yang telah teridentifikasi tersebut yaitu *Rearranged During Transfection (RET)*, *Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)*, *GDNF Family Receptor Alpha 1 (GFR $\alpha$ 1)*, *Persefin (PSPN)*, *Neurturin (NRTN)*, *Endothelin Receptor Type B (EDNRB)*, *Endothelin 3 (EDN 3)*, *Zinc Finger Homeobox 1B (ZFHX1B) or ZEB2*, *Paired-Like Homeobox 2b (PHOX2B)*, *SRY-box 10 (SOX10)*, *Neuregulin 1 (NRG1)*, *Indian Hedgehog (IHH)* dan *Sonic Hedgehog (SHH)*

(Alves *et al.*, 2013; Tomuschat & Puri, 2015; Schriemer *et al.*, 2016; Sribudiani *et al.*, 2018; Diposarosa *et al.*, 2021).

Gen utama yang mengakibatkan penyakit *Hirschsprung* yaitu gen *RET* (Sancandi *et al.*, 2000). Gen *RET* terdiri dari 21 ekson dan 20 intron yang terletak pada kromosom 10 (10q11.2) (Martucciello *et al.*, 2012; Krampitz & Norton, 2014). Mutasi *RET* dikaitkan dengan sekitar 50% kasus familial dan 35% kasus pasien HSCR sporadis (Diposarosa *et al.*, 2021). Mutasi pada gen *RET* bertanggung jawab atas migrasi, proliferasi, diferensiasi maupun kelangsungan hidup *Enteric Neural Crest Cells* (ENCC) yang dapat mengakibatkan kegagalan pengembangan sistem saraf enterik yang mengarah pada fenotip HSCR (Abdelrahman *et al.*, 2022).

Mutasi pada gen *RET* dapat mengganggu pembentukan dan fungsi normal sel-sel saraf, sehingga menyebabkan gejala khas penyakit *Hirschsprung* (Karim *et al.*, 2021). Varian yang berbeda pada gen *RET* dapat menghasilkan spektrum fenotip pada individu dengan penyakit *Hirschsprung* (Tomuschat & Puri, 2015a). Berdasarkan penelitian Moore & Zaahl (2012), telah ditemukan mutasi pada intron 1 gen *RET* yang telah terbukti mengganggu fungsi *RET*, sehingga meningkatkan risiko patogenesis HSCR. Selanjutnya, pada penelitian Ruiz-Ferrer *et al* (2006) ditemukan *germline mutation* pada intron 6 pada salah satu penderita HSCR dengan dengan aganglionosis kolon total. Lalu, intron 13 juga ditemukan *germline mutation* pada salah satu penderita HSCR dengan aganglionosis segmen pendek.

Pada penelitian Sangkhathat *et al* (2006) ditemukan *missense mutation* pada ekson 4. Mutasi tersebut terjadi pada satu bayi penyakit *Hirschsprung*

dengan aganglionosis kolon total yang memiliki dua titik *missense mutation* pada gen *RET*. Selain itu, mutasi pada ekson 4 juga ditemukan pada penelitian Ruiz-Ferrer *et al.* (2006) yaitu terjadinya *germline mutation* pada salah satu pasien penyakit *Hirschsprung*. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme molekuler disfungsi *RET* sangat bergantung pada lokasi mutasi yang terjadi.

Ada beberapa metode untuk melacak mutasi seperti *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP), *Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism* (PCR-SSCP), dan *PCR-Sequencing* (Konstantinos *et al.*, 2008). Dalam penelitian pelacakan mutasi dilakukan dengan metode *PCR-Sequencing*. Pemilihan metode *PCR-Sequencing* karena pada produk PCR yang dihasilkan tidak terdapat situs restriksi untuk enzim restriksi. Sedangkan, pada metode PCR-RFLP bergantung pada adanya situs pengenalan enzim restriksi (Hashim & Al-Shuhaib, 2019). Selain itu, metode *PCR-Sequencing* memberikan informasi langsung tentang perubahan nukleotida yang terjadi dan dapat mendeteksi hampir semua mutasi pada wilayah yang ditargetkan (Huseynova & Ansarova., 2023). Metode ini memiliki akurasi cukup tinggi serta mudah dilakukan untuk teknik analisis sehingga dapat digunakan untuk membedakan antara gen mutan dengan gen normal (Lu *et al.*, 2016).

Berdasarkan data RSUP Dr. M. Djamil Padang sebagai rumah sakit rujukan di Sumatera Barat terdapat 265 kasus penyakit *Hirschsprung* pada tahun 2021-2023. Oleh karena itu, informasi ini sangat penting dilakukan untuk mengetahui dan menganalisis mutasi yang terjadi pada ekson dan intron 4 gen

*RET* dari sampel yang terjadi di RSUP Dr. M. Djamil, sehingga dapat membantu pemahaman genetik mengenai penyakit *Hirschsprung*.

#### **B. Rumusan Masalah**

1. Apakah terdapat mutasi pada ekson dan intron 4 gen *RET* pada pasien penyakit *Hirschsprung* di RSUP Dr. M. Djamil?
2. Bagaimana tipe mutasi pada ekson dan intron 4 gen *RET* pada pasien penyakit *Hirschsprung* di RSUP Dr. M. Djamil?

#### **C. Tujuan Penelitian**

1. Menganalisis ada atau tidak mutasi pada ekson dan intron 4 gen *RET* pasien penyakit *Hirschsprung* di RSUP Dr. M. Djamil Padang.
2. Menganalisis tipe mutasi pada ekson dan intron 4 gen *RET* pada pasien penyakit *Hirschsprung* di RSUP Dr. M. Djamil Padang.

#### **D. Manfaat Penelitian**

1. Memberikan informasi mengenai mutasi ekson dan intron 4 gen *RET* pada pasien penyakit *Hirschsprung* di RSUP Dr. M. Djamil Padang.
2. Menambah wawasan ilmu pengetahuan di bidang genetika molekuler.
3. Sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya.