

MUTASI *MISSENSE* (P.374PHE/LEU) PADA EKSON 5 GEN *MATP*, PENYEBAB *OCULOCUTANEOUS ALBINISM* TIPE 4 (OCA4) DI WONOSOBO, JAWA TENGAH

Niken Satuti Nur Handayani¹⁾, Feri Sukmawati¹⁾, dan Rarastoeti Pratiwi²⁾

¹⁾Laboratorium Genetika; ²⁾Laboratorium Biokimia

Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

Jl. Teknika Selatan, Sekip Utara, Berek, Yogyakarta 55281

Email: niken_satuti@ugm.ac.id

ABSTRAK

Albinisme merupakan kelainan genetik autosomal resesif berupa gangguan sintesis melanin yang terjadi pada manusia. Albinisme dibagi menjadi dua kelompok besar, yaitu *Ocular Albinism* (OA) dan *Oculocutaneous Albinism* (OCA). Berdasarkan gen yang mengalami mutasi, OCA dibedakan menjadi 4 tipe yaitu OCA1, OCA2, OCA3 dan OCA4. OCA4 disebabkan mutasi pada gen *MATP*. Penelitian yang telah dilakukan dengan PCR-SSCP (*Polymerase Chain Reaction-Single Stranded Conformation Polymorphism*) mendeteksi adanya mutasi pada ekson 5 gen *MATP*, pada penderita albinisme di Wonosobo, Jawa Tengah. Sekuensing ekson 5 gen *MATP* dilakukan untuk mengidentifikasi tipe mutasinya.

DNA diisolasi dari sampel darah penderita dan digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi ekson 5 gen *MATP* dengan metode PCR. Produk PCR selanjutnya digunakan sebagai *template* untuk sekuensing dengan metode Sanger. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan program *Clustal-W* dan dibandingkan dengan sekuens ekson 5 gen *MATP* dari *International DNA Data Base* (nomer akses AF172849.1). Hasil analisis menunjukkan adanya perubahan basa nukleotida no.1122 dari C menjadi G (c.1122 C>G) yang mengakibatkan mutasi *missense*, yaitu fenilalanin menjadi leusin, pada asam amino nomer 374 (p.374 Phe/Leu).

Kata kunci : OCA4, mutasi, ekson 5, gen *MATP*

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Albinisme merupakan kelainan genetik berupa gangguan sintesis melanin yang terjadi pada berbagai ras manusia dan merupakan kelainan autosomal resesif. Berdasarkan ciri fenotip, albinisme dibagi menjadi dua kelompok besar, yaitu: *Ocular Albinism* (OA) dan *Oculocutaneous Albinism* (OCA).

Menurut Newton *et al.* (2001), *Ocular Albinism* (OA) dapat dibagi menjadi 3 tipe, yaitu OA1, OA2, dan OA3. Penderita *Ocular Albinism* (OA) kekurangan pigmen hanya pada mata, sedangkan rambut dan kulit memiliki pigmen normal. Sedangkan *Oculocutaneous Albinism* (OCA) dapat dibagi menjadi beberapa tipe, yaitu OCA1A, OCA1B, OCA2, OCA3, dan OCA4. Newton *et al.* (2001) melaporkan bahwa penyandang *Oculocutaneous Albinism* (OCA) rata-rata terjadi pada 1/20.000 orang diseluruh dunia.

OCA4 merupakan *Oculocutaneous Albinism* yang jarang ditemukan. Inagaki *et al.* (2004) melaporkan dari 75 penderita OCA pada populasi Jepang yang diteliti, 18 penderita (24%) merupakan OCA4 dengan mutasi pada gen *MATP*, dan ditemukan tujuh macam mutasi pada ekson 1, 2, 3, dan 7. Ketujuh mutasi tersebut adalah 4 jenis *missense mutation* (P58S, D157N, G188V, dan V507L) dan 3 jenis *frameshift mutation* yang berupa insersi dan delesi (S90CGGCCA→GC, V144insAAGT, dan V469delG).

Penderita Albinisme juga dijumpai di beberapa daerah di Indonesia, antara lain di Muncak Kabau, Sumatra Selatan; Wonosobo, Jawa Tengah; dan Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) yang berdasar analisis fenotip digolongkan sebagai OCA2 atau OCA4 (Handayani, *et al.*, 2007). Berdasarkan analisis fenotip, penderita albinisme tipe OCA2 atau OCA4 sulit dibedakan, sehingga dilakukan penelitian lanjutan berupa deteksi mutasi gen *MATP* pada penderita *Oculocutaneous Albinism* (OCA) di Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) dan Wonosobo (Jawa Tengah). Fitriani (2009) menunjukkan bahwa dua penderita *Oculocutaneous Albinism* (OCA) dari DIY dan Wonosobo (Jawa Tengah) tersebut digolongkan dalam OCA4. Hal ini ditunjukkan dengan hasil skrining mutasi menggunakan metode PCR-SSCP (*Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism*).

Penelitian tersebut menunjukkan bahwa penderita OCA4 di Wonosobo diduga mengalami mutasi pada ekson 5. Namun, tipe mutasi yang terjadi pada ekson tersebut belum diketahui, sehingga diperlukan penelitian untuk mengetahui secara pasti tipe mutasi yang terjadi pada ekson-ekson tersebut.

Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi tipe mutasi pada ekson 5 gen *MATP* pada penderita *Oculocutaneous Albinism* Tipe 4 (OCA 4) di Wonosobo, Jawa Tengah



METODE PENELITIAN

Subyek dan Tempat Penelitian

Subyek adalah penderita OCA4 dari Wonosobo, Jawa Tengah (H3) yang telah dianalisis ciri fenotip dan silsilahnya oleh Handayani, *et al.* (2007) dan telah dideteksi adanya mutasi pada gen *MATP* dengan metode PCR-SSCP (*Polymerase Chain Reaction – Single Strand Conformation Polymorphism*) oleh Fitriani (2009). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Genetika dan Laboratorium Biokimia Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada (Indonesia), serta 1st *BASE Laboratory I* Singapore untuk sekuensing DNA.

Bahan, Alat, dan Cara Kerja

A. Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan adalah sampel darah penderita albinisme tipe OCA4 dari Wonosobo, Jawa Tengah (H3), Pure Link Genomic DNA Kit (QIAamp Gene) yang terdiri dari proteinase K sebagai pelisis protein, bufer AI, bufer AW1 dan AW2, serta bufer AE (QIAGEN), PCR Green Master Mix (Promega), primer forward (M5F), primer reverse (M5R), gel agarose 0,8% dan 2 %, bufer TBE 1X, ethidium bromida, loading dye, Gene ruler 100bp DNA ladder (Fermentasi)

Alat utama yang digunakan adalah Qiamp Spin Coulomn, vortex, microcentrifuge, refrigerator, micropipette (0,5-10 µl, 5-50 µl dan 50-200 µl), mesin PCR (Mastercycler Eppendorf), UV transilluminator, mini run gel elektroforesis system, dan Big Dye Terminator (R) v3.1 cycle sequencing kit.

B. Cara Kerja

a. Isolasi DNA darah

DNA darah diisolasi dengan cara sesuai dengan yang tertulis pada manual *Pure Link Genomic DNA Kit (QIAamp Gene)* (QIAGEN). DNA yang diperoleh digunakan sebagai template untuk amplifikasi ekson 5 gen *MATP*.

b. Amplifikasi ekson 5 gen *MATP* dengan metode PCR

Reaksi PCR terdiri atas *Promega PCR Green MasterMix* (18 µl), Primer *forward* (*M₅F* 10µM), Primer *reverse* (*M₅R* 10µM) dan *DNA template*, dengan total volume reaksi 30 µl.

Kondisi PCR yang dilakukan adalah Predenaturasi (94 °C, 3 menit), Denaturasi (94 °C, 45 detik), *Annealing* (57 °C, 30 detik), Elongasi (72 °C, 1 menit 30 detik), Post Elongasi (72 °C, 5 menit), reaksi dilakukan sebanyak 35 siklus.

c. Elektroforesis

Visualisasi DNA genom dilakukan dengan elektroforesis pada 0,8% gel agarosa. Sedangkan visualisasi hasil PCR dilakukan dengan elektroforesis pada 2% gel agarosa.

d. Sequencing

Sequencing ekson 5 gen *MATP* dilakukan dengan mengirim produk hasil PCR ekson 5 gen *MATP* ke *1st BASE Laboratory I*, Singapore melalui PT.Genetika Science, Jakarta. Produk PCR tersebut dipurifikasi dan sekuensing dilakukan dengan menggunakan *Big Dye Terminator*^(R) v3.1 cycle sequencing kit dengan metode Sanger. Primer yang digunakan adalah M5F : 5 - AGAGGTGGAGAAGCAGAGTG - 3' (Newton *et al.*, 2001).

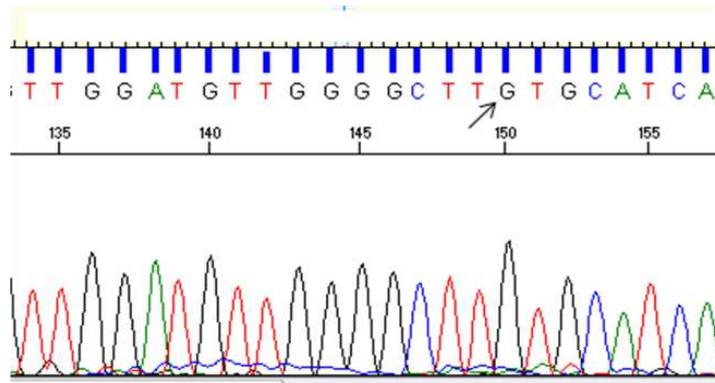
e. Analisis Data

Hasil sekuensing dianalisis menggunakan program *Clustal W* dari situs www.ebi.ac.uk untuk mengetahui persamaan basa nukleotida sekuens ekson 5 gen *MATP* individu H3 dengan sekuens ekson 5 gen *MATP* normal yang diperoleh dari *Gene Bank* (NCBI) dengan *accession number* NG_011691.1 (keseluruhan gen *MATP*) dan AF172849.1 (mRNA dari protein *MATP*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil sekuensing ekson 5 gen *MATP* individu H3 dengan sekuens ekson 5 gen *MATP* manusia normal sepanjang 236 bp yang diperoleh dari *database* NCBI (NG_011691.1). Hasil *alignment* (Gambar 1) menunjukkan adanya mutasi titik pada satu basa nukleotida no.1122 dari C menjadi G (c.1122 C>G).





```

H3_E5_M5F      NNNNNNNNNNANNNNNTCTACATTGCATTTGTACCTCAACAGCCTCCAATC  50
Ekson5_NCBI    -----

H3_E5_M5F      TCTCTTTTCAGATTGTGTACCGCGGGGATCCCTATAGTGCACACAACCTCCA  100
Ekson5_NCBI    -----ATTGTGTACCGCGGGGATCCCTATAGTGCACACAACCTCCA  40
                *****

H3_E5_M5F      CAGAGTTTCTCATCTACGAAAGAGGAGTCGAGGTTGGATGTTGGGGCTT  150
Ekson5_NCBI    CAGAGTTTCTCATCTACGAAAGAGGAGTCGAGGTTGGATGTTGGGGCTT  90
                *****

H3_E5_M5F      TGCATCAACTCCGTGTTTTTCCTCACTTTATTCTTGTAAGTCTTTCTCTCT  200
Ekson5_NCBI    TGCATCAACTCCGTGTTTTTCCTCACTTTATTCTT-----  124
                *****

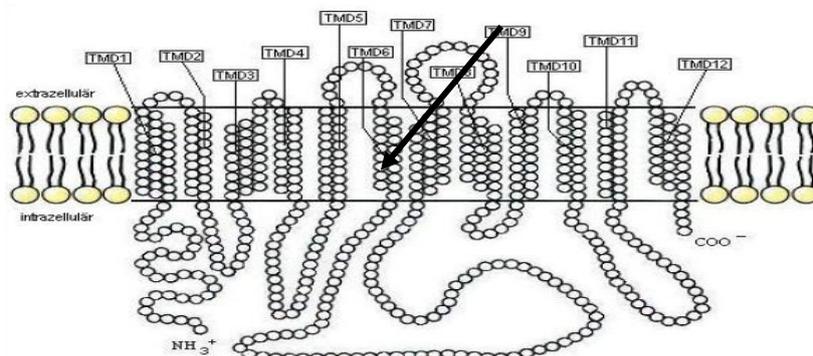
H3_E5_M5F      CCTAAGGATGTCTTCCTTCTGCTCAAAA  229
Ekson5_NCBI    -----

```

Gambar 1. Hasil Sekuensing DNA dan Alignment Hasil Sekuensing Ekson 5 Gen MATP Individu H3 dengan Ekson 5 Gen MATP Normal dari Gen Bank-NCBI (NG_011691.1).

Macam mutasi dapat diketahui dengan mencocokkan hasil *alignment* dengan *database Homo sapiens AIM-1 protein mRNA, complete cds* (AF172849). Hasil analisis menunjukkan bahwa mutasi titik terjadi pada kodon 374 dan menyebabkan perubahan asam amino fenilalanin (UUC) menjadi asam amino leusin (UUG), sehingga dapat ditulis p.374Phe/Leu dan merupakan mutasi *missense*.

Mutasi *missense* (c.1122 C>G) ini berpengaruh pada susunan asam amino yang terdapat pada transmembran domain 8, karena asam amino 374 terletak diantara asam amino 365 – 387 yang merupakan penyusun transmembran domain 8. Susunan transmembran domain gen *MATP* dan letak perubahan asam amino 374 ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Protein MATP dengan 12 daerah transmembran (Schwinger, 2004) dan letak mutasi pada asam amino 374 (ditunjuk tanda panah)

Protein membran terdiri atas protein integral dan protein perifer. Protein integral umumnya merupakan protein transmembran, dengan daerah hidrofobik yang seluruhnya membentang sepanjang interior hidrofobik membran tersebut. Daerah hidrofobik protein integral terdiri atas satu atau lebih rentangan asam amino non-polar yang biasanya bergulung menjadi heliks- α . Protein membran yang merupakan



protein integral berperan penting dalam pengaturan transport. Setiap protein transport bersifat spesifik untuk substansi yang ditranslokasikannya. Sedangkan protein perifer sama sekali tidak tertanam dalam bilayer lipid. Protein ini merupakan anggota yang terikat secara longgar pada permukaan membran. Protein MATP berfungsi sebagai pengangkut asam amino tirosin dan transporter membran yang mengatur lalulintas protein melanosomal dan substansi lain ke melanosom (Newton *et al*, 2001, Yuasa, *et al*, 2006). Daerah transmembran pada gen *MATP* memiliki peranan penting untuk mengarahkan enzim menuju ke melanosom (Gertrude *et al.*, 2003). Perubahan asam amino fenilalanin menjadi asam amino leusin pada transmembran domain 8 tersebut menyebabkan perubahan fungsi dari protein yang dibentuk sehingga mengakibatkan protein primer yang terbentuk menjadi abnormal dan tidak fungsional untuk transporter.

Fenilalanin (*phenilalanin*) merupakan asam amino esensial kelompok aromatik yang memiliki cincin benzene dan bersifat non-polar serta hidrofobik. Fenilalanin sebagai penyusun protein membran mempunyai peranan yang sangat penting karena berfungsi sebagai penghantar atau transduksi sinyal. Dalam keadaan normal, tubuh akan mengubah fenilalanin melalui reaksi yang dikatalis oleh enzim fenilalanin hidroksilase menjadi tirosin, sebuah asam amino yang dibutuhkan dalam proses sintesis protein, zat kimiawi otak serta L-DOPA. Sedangkan leusin merupakan asam amino esensial yang mempunyai rantai alifatik dan bersifat non-polar serta hidrofobik. Asam amino ini berperan dalam menjaga perombakan dan pembentukan protein otot. Fenilalanin dan leusin memiliki karakteristik yang sama yaitu bersifat non-polar dan hidrofobik tetapi fungsi dari kedua asam amino tersebut berbeda sehingga keberadaan fenilalanin tidak dapat digantikan dengan leusin. Adanya perubahan pada asam amino penyusun protein tersebut dapat menyebabkan kerusakan pada struktur protein yang akan menyebabkan perubahan fungsi protein.

Terbentuknya protein MATP abnormal tersebut menyebabkan proses pengemasan protein pada *post golgi* terganggu, sehingga tirosin dibawa oleh protein MATP abnormal menuju melanosit yang belum matang yang mengakibatkan proses produksi tirosinase dan jalur intraselular ke melanosom ikut terganggu. Gangguan pada jalur intraselular menyebabkan tirosinase tidak dibawa ke melanosom dengan sempurna untuk memproduksi melanin, tetapi disekresikan ke luar sel. Hal ini mengakibatkan enzim tirosinase yang dihasilkan beraktivitas rendah.

Tirosinase berfungsi dalam dua tahap melanogenesis, yaitu perubahan tirosin menjadi 3,4 dihidroksifenil alanin (DOPA) kemudian DOPA menjadi *dopaquinone*, yang selanjutnya dikonversi setelah melalui beberapa tahap transformasi menjadi melanin (feomelanin dan eumelanin) (Suzana *et al.*, 2009). Pada kondisi normal, granula melanin yang terbentuk ditransfer menuju keratinosit terdekat dengan perantara dendrite pada melanosit. Di keratinosit, granula melanin berakumulasi di dalam sitoplasma keratinosit pada bagian supra nuklear, sehingga mampu melindungi nukleus dari efek buruk radiasi matahari. Menurut Miot *et al.* (2009), perpindahan melanin dari dendrit melanosit menuju keratinosit melalui membran sel terjadi melalui kontak dan komunikasi antar sel (hubungan interselular) dengan *gab junction*. *Gab junction* menjadi perantara dalam mengatur lalulintas ion-ion dan molekul kecil melalui pori hidrofilik yang menghubungkan sitoplasma suatu sel dengan sel yang berdekatan.

Aktivitas enzim tirosinase yang rendah mengakibatkan sintesis melanin kurang dari kebutuhan normal sehingga terjadi hipopigmentasi. Hipopigmentasi inilah yang menimbulkan warna rambut putih hingga pirang, warna mata biru, warna kulit putih hingga kemerahan, serta timbulnya gangguan penglihatan berupa *nystagmus* dan *strabismus* pada individu H3.

Mutasi yang terjadi pada penderita albinisme Wonosobo (individu H3), yaitu mutasi *missense* dengan perubahan basa nukleotida c.1122C>G dan menyebabkan efek pada *coding sequence* p.374Phe/Leu, pernah ditemukan oleh Newton (2001) serta Hutton dan Spritz (2008) pada penderita albinisme tipe OCA4 pada populasi Turki.

KESIMPULAN

Penyebab albinisme OCA4 individu H3 adalah mutasi *missense* pada ekson 5 gen *MATP* basa nukleotida no.1122 (c.1122 C>G), yang mengakibatkan perubahan asam amino 374 fenilalanin menjadi leusin (p.374 Phe/Leu).

DAFTAR PUSTAKA

- Fitriani, I. 2009. *Deteksi Mutasi Gen MATP Pada Penderita Oculocutaneous Albinism (OCA) di DIY dan Wonosobo, Jawa Tengah*. Thesis. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Gertrude, E., Costin, Julio, C., Valencia, Wilfred, D., Vieira, M., Lynn, Lamoreux and Vincen, J.H. 2003. Tyrosinase Processing and Intracellular Trafficking is Disrupted in Mouse Primary Melanocytes



- Carrying The Underwhite (uw) Mutation: A Model of Oculocutaneous Albinism (OCA) Type 4 . *J.Cell Sci.* 116:3203-3212
- Handayani NSN., Agustin HE., Ramadhani R., and Pratiwi R. 2007. *Phenotype Analysis of Oculocutaneous Albinism (OCA) in Indonesian Families*. Proceeding of The International Seminar on Biology 2007: Advanced in Biological Science: Contribution Toward a Better Human Prosperity. The Faculty of Biology, Gadjah Mada University.
- Inagaki, K., Suzuki, T. Shimizu, H.Ishii, N., Umezawa, Y.,Tada, J., Kikuchi, N., Takata, M., Takamori, K., Kishibe, M., Tanaka, M., Miyamura, Y.,Ito, S., and Tomiya, Y. 2004. Oculocutaneous Albinism Type 4 is One of The Most Common Types of Albinism in Japan. *Am. J. Hum. Gen.* 74 (3): 466-471
- Miot, L.D.B., H.A. Miot., M.G da Silva., M.E.A. Marques. 2009. Physiopathology of Melasma.Review.Bras.Dermatol J. 84 (6):1
- Newton, J.M., Cohen-Barak,O., Hagiwara, N., Gardner, J.M., Davisson, M.T., King, R.A. and Brilliant. 2001. Mutation in Human Orthologue of The Mouse Underwhite Gene (uw) Underlie A New Form of Oculocutaneous Albinism OCA 4. *Am. J. Hum. Gen.*c.69: 981-988.
- Suzana, M., Nur Nadia M.A., Zahariah I., Chua KH., Yasmin AMY., Wan ZWN. 2009. Melanogenesis Inhibition by Palm Tocotrienol Rich Fraction in Cellular Ageing. *J. Med. Health.* 4 (1) : 25-34.
- Yuasa, I., K. Umetsu, S.Harihara, A.Kido, A. Miyoshi, N.Saitou, B.Dashnyam, F.Jin, G.Luccote, P.K. Chattopadhyay, L.Henke, and J.Henke. 2006. Distribution of the F374 Allel of SLC45A2 (MATP) gene and Founder-Haplotype Analysis. *J. Com.* 70 (6): 802-811

PERTANYAAN

Penanya: Bambang Fajar (PS Biologi FMIPA, Universitas Mataram)

Apakah pada saat mengandung bisa terjadi mutasi sehingga menimbulkan kejadian albinisme? Apakah sensitifitas antisipasi orang tua untuk anak?

Jawab:

Teknik untuk kelainan kromosom dengan karya frighting. Deteksi mutasi pada DNA. Albinisme merupakan kelainan tetapi tidak ada resiko kematian, bukan penyakit. Tidak ada perlakuan untuk menggugurkan. Gangguan sensitifitas pada sinar, deteksi dilakukan analisis. Biasanya pengambilan cairan dari uterus, namun tidak dianjurkan

