

**ISOLASI SEKUEN GEN *HEMOGLOBIN SUBUNIT EPSILON 1* (HBE1)  
GENOM DARAH PASIEN  $\beta$ -THALASSEMIA DI RSUD DR. H. ABDUL  
MOELOEK BANDAR LAMPUNG**

**Skripsi**

**CHANDA RIZKIA RAHMA  
NPM 2217061050**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2026**

**ISOLASI SEKUEN GEN *HEMOGLOBIN SUBUNIT EPSILON 1* (HBE1)  
GENOM DARAH PASIEN  $\beta$ -THALASSEMIA DI RSUD DR. H. ABDUL  
MOELOEK BANDAR LAMPUNG**

Oleh

**CHANDA RIZKIA RAHMA**

**2217061050**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Biologi**

**Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Lampung**



**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2026**

## ABSTRAK

### ISOLASI SEKUEN GEN *HEMOGLOBIN SUBUNIT EPSILON 1* (HBE1) GENOM DARAH PASIEN $\beta$ -THALASSEMIA DI RSUD DR. H. ABDUL MOELOEK BANDAR LAMPUNG

Oleh

CHANDA RIZKIA RAHMA

$\beta$ -thalassemia merupakan kelainan genetik akibat mutasi pada gen HBB yang menyebabkan gangguan sintesis rantai  $\beta$ -globin sehingga menghasilkan hemoglobin yang tidak stabil dan mudah terdegradasi, yang pada akhirnya menimbulkan anemia dengan tingkat keparahan yang bervariasi. Penyakit ini masih menjadi masalah kesehatan di Indonesia yang termasuk dalam kawasan *thalassemia belt*. Salah satu pendekatan molekuler untuk memahami mekanisme genetik  $\beta$ -thalassemia adalah melalui analisis gen yang berperan dalam sistem hemoglobin, seperti gen *Hemoglobin Subunit Epsilon 1* (HBE1). Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi sekuen gen HBE1 dan menganalisis hubungan kekerabatannya secara filogenetik pada genom darah pasien  $\beta$ -thalassemia di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek. Tahapan penelitian meliputi isolasi DNA genom, pengukuran kemurnian dan konsentrasi DNA, amplifikasi gen target menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), visualisasi hasil amplifikasi dengan elektroforesis gel agarosa, serta penentuan urutan nukleotida menggunakan metode *Sanger sequencing*. Analisis sekuen dilakukan menggunakan BioEdit, BLAST pada NCBI, dan MEGA XII. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolasi dan amplifikasi sekuen gen HBE1 berhasil dilakukan. Analisis filogenetik mengungkapkan bahwa sekuen gen HBE1 dari genom darah pasien RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung memiliki kemiripan 98% dengan sekuen HBE1 dari populasi lain yang telah terdeposit di *GenBank*.

Kata Kunci:  $\beta$ -thalassemia, gen, HBE1, sekuensing, filogenetik

## ABSTRACT

### ISOLATION OF THE *HEMOGLOBIN SUBUNIT EPSILON 1* (HBE1) GENE SEQUENCE FROM THE BLOOD GENOME OF B-THALASSEMIA PATIENTS AT RSUD DR. H. ABDUL MOELOEK BANDAR LAMPUNG

By

CHANDA RIZKIA RAHMA

$\beta$ -thalassemia is a genetic disorder caused by mutations in the HBB gene, leading to impaired synthesis of the  $\beta$ -globin chain and resulting in unstable hemoglobin that is easily degraded, which ultimately causes anemia with varying degrees of severity. This disease remains a major health problem in Indonesia, which is included in the thalassemia belt region. One molecular approach to understanding the genetic mechanism of  $\beta$ -thalassemia is through the analysis of genes involved in the hemoglobin system, such as the *Hemoglobin Subunit Epsilon 1* (HBE1) gene. This study aimed to isolate the HBE1 gene sequence and to analyze its phylogenetic relationship in the blood genome of  $\beta$ -thalassemia patients at RSUD dr. H. Abdul Moeloek. The research procedures included genomic DNA isolation, measurement of DNA purity and concentration, amplification of the target gene using the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) technique, visualization of the amplified products by agarose gel electrophoresis, and nucleotide sequencing using the Sanger sequencing method. Sequence data were analyzed using BioEdit, BLAST at NCBI, and MEGA XII. The results showed that the isolation and amplification of the HBE1 gene sequence were successfully performed. Phylogenetic analysis revealed that the HBE1 gene sequence obtained from the blood genome of patients at RSUD dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung showed 98% similarity to HBE1 sequences from other populations deposited in *GenBank*.

Keywords:  $\beta$ -thalassemia, gene, HBE1, sequencing, phylogenetics

Judul Skripsi : ISOLASI SEKUEN GEN *HEMOGLOBIN SUBUNIT EPSILON 1 (HBE1)* GENOM DARAH PASIEN  $\beta$ -THALASSEMIA DI RSUD DR. H. ABDUL MOELOEK BANDAR LAMPUNG

Nama Mahasiswa : Chanda Rizkia Rahma

Nomor Pokok Mahasiswa : 2217061050

Program Studi : Biologi Terapan

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**1. Komisi Pembimbing**

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. Wawan Abdullah Setiawan, M. Si.**

**dr. Putu Ristyning Ayu Sangging,  
M.Kes, Sp.PK, Subsp.H.K(K)**

NIP. 197912302008121001

NIP. 231401760222201

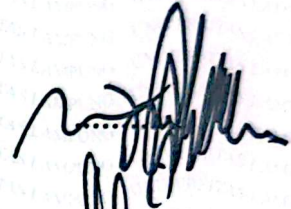
**2. Ketua Jurusan Biologi FMIPA**

**Dr. Jani Mastek, S.Si., M.Si.**  
NIP. 198301312008121001

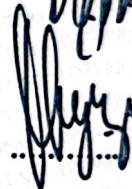
**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

**Ketua : Dr. Wawan Abdullah Setiawan, M.Si.**



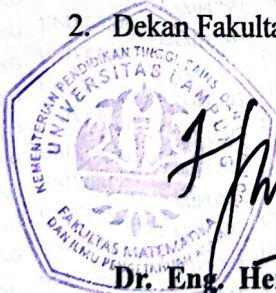
**Sekretaris : dr. Putu Ristyaning Ayu Sangging, M.Kes,  
Sp.PK, Subsp.H.K(K).**



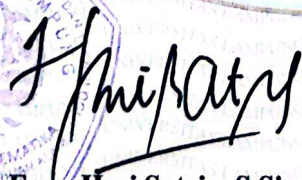
**Anggota : Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si.**



**2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**  
NIP 197110012005011002



**Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 23 April 2026**

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Chanda Rizkia Rahma  
NPM : 2217061050  
Jurusan : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya dan sejujurnya, bahwa skripsi saya berjudul

**“Isolasi Sekuen Gen *Hemoglobin Subunit Epsilon 1* (HBE1) Genom Darah Pasien  $\beta$ -Thalassemia Di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung”**

Baik gagasan dan pembahasannya Adalah karya saya sendiri yang saya susun dengan mengikuti norma dan etika akademik yang berlaku. Jika di kemudian hari terbukti pernyataan saya ini tidak benar, saya bersedia menerima sanksi akademik baik berupa pencabutan gelar sarjana maupun tuntutan hukum.

Bandar Lampung, 03 Mei 2026

Yang menyatakan,



Chanda Rizkia Rahma  
NPM 2217061050

## RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Desa Tebing, Kecamatan Melinting, Lampung Timur pada tanggal 16 Juni 2004 sebagai anak pertama dari tiga bersaudara, dari Bapak Husen dan Ibu Junaidah. Penulis memulai pendidikan di Sekolah Dasar Negeri 1 Tebing, Lampung Timur pada tahun 2010–2016. Penulis melanjutkan tingkat pendidikannya di Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 17 Bandar Lampung pada tahun 2016–2019 dan tingkat Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 4 Bandar Lampung pada tahun 2019–2022. Penulis resmi diterima sebagai mahasiswa Jurusan Biologi, Program Studi Biologi Terapan, Universitas Lampung pada tahun 2022. melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN). Selama menjadi mahasiswa di Jurusan Biologi, Universitas Lampung. Penulis aktif menjadi asisten praktikum mata kuliah Biomolekuler. Penulis juga berkesempatan menjadi Awardee Beasiswa Generasi Impian oleh yayasan Generasi Impian dan Beasiswa Asrama #BalikK(L)ampung oleh Yayasan Bina Lampung Madani.

Penulis juga aktif dalam berbagai kegiatan organisasi baik di dalam Universitas ataupun di luar Universitas, di antaranya sebagai Sekretaris Bidang Finansial UKM Pusat Informasi dan Konseling Remaja (PIK R) RAYA Universitas Lampung pada tahun 2024. Penulis juga tergabung sebagai anggota Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO), anggota komunitas Senyum Anak Nusantara (SAN) Chapter Lampung, mengikuti kegiatan volunteer di bidang lingkungan.

Bersama komunitas Gajahlah Kebersihan Lampung. Penulis juga pernah menjadi finalis Kompetisi Nasional Business Plan pada tahun 2024.

Penulis juga memiliki pengalaman kerja sebagai tutor di lembaga bimbingan belajar Smart Tower dan Baitun Najaah *Institute* di Bandar Lampung dengan mengampu mata pelajaran Biologi. Selain itu, penulis menjalankan usaha mandiri bernama Chandatawastore yang bergerak di bidang penjualan berbagai produk dan jasa sebagai bentuk pengembangan jiwa kewirausahaan.

Penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan di BPSI Tanah Dan Pupuk Kebun Percobaan Taman Bogo, Lampung Timur pada tahun 2025 dengan judul “ Pengukuran Kualitas Tanah (Uji Kimia Dan Uji Biologi) Pada Tanaman Jeruk BW (*Citrus Reticulata B.*) Di BPSI Tanah Dan Pupuk Kebun Percobaan Taman Bogo, Lampung Timur”. Pada bulan juli 2025 penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Panjang Utara, Bandar Lampung, Lampung selama 30 hari. Penulis melaksanakan kegiatan penelitian di INALAB Laboratorium dikelola oleh Bapak Dr. Wawan Abudllah Setiawan, S.Si., M.Si. dan Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas lampung.

## PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan penuh rasa syukur kepada Allah SWT, karya ini kupersembahkan sebagai ungkapan cinta, hormat, dan terima kasih yang mendalam kepada:

Kedua orang tuaku tercinta, Mak dan Minak, yang senantiasa mendoakan dan menyertai setiap langkah hidupku. Kalian adalah dua sosok paling kuat yang selalu berjuang dan tidak pernah berhenti percaya kepadaku, bahkan di saat keadaan terasa begitu sulit dan hampir mustahil. Segala bentuk pengorbanan, dukungan, dan kasih sayang yang tulus dari kalian menjadi sumber kekuatan bagiku untuk terus bertahan, bangkit, dan akhirnya mencapai titik ini. Tanpa kalian, pencapaian ini tidak akan pernah terwujud.

Adikku tercinta, Almarhum Irang Alif Falano dan Meisya Wulan Nada, yang senantiasa menjadi sumber kekuatan dan motivasi bagi penulis.

Bapak dan Ibu dosen yang dengan sabar, Ikhlas dan tulus membagikan ilmu serta membimbingku hingga mampu menyelesaikan karya ini.

Teman-teman seperjuangan yang selalu kebersamai dalam setiap suka dan duka, menjadi bagian penting dalam perjalanan ini.

Serta almamater tercinta, Universitas Lampung, yang telah menjadi tempatku belajar, tumbuh, dan menggapai mimpi.

## SANWACANA

Alhamdulillah rabbil'alamin, puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat, karunia, dan ridho-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "**Isolasi Sekuen Gen *Hemoglobin Subunit Epsilon 1 (HBE1)* Genom Darah Pasien  $\beta$ -Thalassemia di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung**" sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat berbagai keterbatasan dan kekurangan. Namun, berkat rahmat Allah SWT serta dukungan, bantuan, bimbingan, dan kerja sama dari berbagai pihak, seluruh kendala yang dihadapi dapat teratasi dengan baik. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis menyampaikan rasa hormat dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A I.P.M selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam atau FMIPA, Universitas Lampung.
3. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
4. Ibu Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si., selaku Ketua Program Studi S1 Biologi Terapan, Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung. Serta sebagai dosen penguji. Penulis mengucapkan banyak banyak terimakasih karena telah banyak membimbing dan mengarahkan penulis dalam penyusunan skripsi.

5. Bapak Dr. Wawan Abdullah Setiawan, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing I yang telah memberikan bimbingan, arahan, ilmu pengetahuan, serta motivasi dengan penuh kesabaran selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala saran, nasihat, dan dukungan yang telah diberikan, serta atas peran beliau yang tidak hanya sebagai pembimbing skripsi, tetapi juga sebagai sosok orang tua selama masa perkuliahan yang senantiasa membimbing dan memotivasi penulis.
6. Ibu dr. Putu Ristyaning Ayu Sangging, M.Kes., Sp.PK., Subsp.H.K(K)., selaku Dosen Pembimbing II yang dengan penuh kesabaran telah memberikan bimbingan, arahan, ilmu pengetahuan, serta motivasi kepada penulis selama proses penyusunan skripsi ini. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala saran, nasihat, dan bimbingannya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
7. Kepada Bapak Ir. Salman Farisi, M.Si., selaku dosen Pembimbing Akademik yang senantiasa memberikan bimbingan, perhatian, serta dukungan dengan penuh ketulusan. Terima kasih atas kebaikan, kesabaran, dan nasihat yang begitu berarti, sehingga penulis tidak hanya mendapatkan arahan dalam bidang akademik, tetapi juga merasakan sosok beliau layaknya seorang kakek sendiri. Semoga segala ilmu dan kebaikan yang telah diberikan menjadi amal yang bernilai dan membawa keberkahan.
8. Kedua orang tuaku tercinta, yaitu Bapak Husen dan Ibu Junaidah serta Adikku yaitu, Almarhum Irang Alif Falano dan Meisya Wulan Nada yang selalu memberikan dukungan, semangat dan motivasi bagi penulis dalam menyelesaikan perkuliahan dan skripsi.
9. Kepada Ibu Ulia kesayanganku (istri dari Bapak Wawan) beserta adik-adik Indra, Nisa, dan Atsar, yang senantiasa memberikan perhatian, bantuan, dan dukungan kepada penulis. Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya atas kebaikan dan ketulusan yang diberikan, serta atas kehadiran Ibu Ulia yang telah penulis anggap sebagai sosok ibu bagi penulis selama masa perkuliahan.
10. Kepada kakak-kakak di laboratorium, yaitu Mbak Adinda dan Kak Diana, yang senantiasa membimbing, memberikan arahan, serta membantu penulis dengan

penuh kesabaran selama proses penelitian dan penyusunan skripsi ini. Penulis menyampaikan terima kasih atas segala dukungan dan kebaikan yang telah diberikan.

11. Kepada Tim Biomolekuler INALAB DNA, Ferdinie, Rani, Yayun, Mbak Rintan, Kafka, Desi, Mas Damar, Karin, Nora, Dona, Dea, Dian, Dyah, Eva, Miko, dan Sony yang telah membantu penulis dalam mengumpulkan data dan menyelesaikan penulisan skripsi.
12. Kepada teh leha atau teteh Soleha, mas Fajar, dan ibu Rusnah, S.E., serta keluarga besar Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung yang tidak bisa disebutkan satu-persatu. Terimakasih telah memberikan bantuan kepada penulis.
13. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung yang tidak bisa disebutkan satu-persatu. Terimakasih telah memberikan banyak ilmu, bimbingan, nasihat, dan bantuan kepada penulis.
14. Kepada sahabat penulis, Naghmah Syifa Bilqis dan Talita Tazkia R, yang telah kebersamai penulis sejak masa SMP hingga saat ini, serta senantiasa memberikan dukungan, semangat, dan kebersamaan dalam setiap proses perkuliahan hingga penyusunan skripsi ini. Penulis mengucapkan terima kasih atas segala perhatian, kebaikan, dan dukungan yang telah diberikan.
15. Kepada sahabat penulis selama masa perkuliahan, Akira Arsy Maesya dan Zhea Fahra Nuzila, yang senantiasa memberikan dukungan, semangat, dan kebersamaan kepada penulis hingga proses penyusunan skripsi ini. Penulis menyampaikan terima kasih atas segala perhatian, kebaikan, serta ketulusan yang telah diberikan.
16. Kepada Ferdinie Vira Kirany, yang telah kebersamai penulis sejak awal penelitian hingga akhir, serta melalui setiap tahapan bersama, mulai dari seminar proposal, seminar hasil sampai Sidang Skripsi. Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya atas kebersamaan, dukungan, dan kerja sama yang begitu berarti, yang turut menjadi bagian penting dalam proses dan keberhasilan penulis menyelesaikan skripsi ini.
17. Kepada Ayuhana Aprilintan, yang dengan penuh kesabaran senantiasa menemani dan memberikan dukungan kepada penulis sejak masa Praktik Kerja

Lapangan (PKL) hingga proses penyusunan skripsi ini. Penulis menyampaikan terima kasih atas kebersamaan, perhatian, serta dukungan yang telah diberikan, yang menjadi bagian penting dalam perjalanan penulis hingga sampai pada tahap ini.

18. Kepada Zahra Fania Qud Rani, rekan satu laboratorium yang telah menjadi sosok kakak dan senantiasa kebersamai penulis sejak awal. Penulis menyampaikan terima kasih atas kebersamaan, dukungan, dan semangat yang telah diberikan selama proses penelitian hingga penyusunan skripsi ini.
19. Kepada Yayun Kumala Sari yang telah kebersamai penulis sejak awal perkuliahan, satu PA, satu kelas dan bahkan satu penelitian. Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya atas kebersamaan, dukungan, kebaikan, serta ketulusan yang begitu berarti.
20. Kepada Keluarga Besar Asrama Balik Lampung yang telah mendoakan, mendukung dan kebersamai penulis dalam penulisan skripsi.
21. Kepada Annisa Nur Aulia yang telah kebersamai penulis selama proses penyusunan karya ini. Terima kasih atas segala bantuan, dukungan, serta perhatian yang diberikan dengan tulus. Kehadiranmu memberikan semangat tersendiri bagi penulis, layaknya seorang adik yang selalu hadir dan peduli. Segala kebaikan yang diberikan menjadi bagian penting dalam perjalanan ini.
22. Kepada seluruh teman seperjuangan selama masa perkuliahan yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, penulis menyampaikan terima kasih atas kebersamaan, dukungan, serta berbagai pengalaman berharga yang telah diberikan selama proses perkuliahan hingga penyusunan skripsi ini.
23. Terakhir, terima kasih kepada diriku, yang telah memilih untuk tetap bertahan dan melangkah hingga sejauh ini. Di tengah berbagai keterbatasan dan hal-hal yang pada awalnya terasa mustahil, tidak menyerah dan terus berjuang, tetap melangkah meskipun dalam kondisi lelah serta tetap percaya meskipun diliputi keraguan. Terima kasih karena telah berani bermimpi dan lebih dari itu berani memperjuangkannya. Perjalanan ini tidaklah mudah, namun seluruh proses, air mata, usaha, dan doa yang telah dilalui akhirnya mengantarkan penulis hingga pada titik ini. Skripsi ini bukan hanya tentang pencapaian akademik, tetapi juga menjadi bukti bahwa penulis mampu melewati setiap tantangan dan

bahwa tidak ada perjuangan yang sia-sia. Hal ini menjadi langkah awal untuk perjalanan yang lebih besar di masa mendatang. Terima kasih karena telah bertahan dan tidak menyerah. Dengan penuh rasa syukur, kepada-Mu ya Allah, kupersembahkan terima kasih atas segala kekuatan, kemudahan, dan jalan yang Engkau berikan; semoga setiap langkah ke depan senantiasa berada dalam ridha-Mu, dan apa yang diraih hari ini menjadi awal dari perjalanan yang lebih besar, lebih bermakna, dan penuh keberkahan.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diperlukan dalam penyusunan karya tulis ilmiah di kemudian hari.

Bandar Lampung, 03 Mei 2026

Penulis

Chanda Rizkia Rahma

## MOTTO

*“finish what you started”*

*“Selesaikan apa yang anda mulai”*

— **Chanda Rizkia Rahma)**

*“Karena pelaut hebat*

*Tak pernah lahir di laut yang tenang*

*Hai kawan teruslah kau berjuang”*

— **HiVi**

**“JANGAN MENGEJAR MATI-MATIAN APA YANG TIDAK DI BAWA  
MATI”**

— Asrama Putri #BalikK(L)ampung

*"Sesungguhnya keadaan-Nya apabila Dia menghendaki sesuatu hanyalah berkata  
kepadanya: 'Jadilah!' maka terjadilah ia."*

— **QS. Yasin: 82**

*“Dan pada sisi Allah-lah kunci-kunci semua yang gaib; tidak ada yang  
mengetahuinya kecuali Dia sendiri, dan Dia mengetahui apa yang di daratan dan  
di lautan, dan tiada sehelai daun pun yang gugur melainkan Dia mengetahuinya  
(pula), dan tidak jatuh sebutir biji pun dalam kegelapan bumi, dan tidak sesuatu  
yang basah atau yang kering, melainkan tertulis dalam kitab yang nyata (Lauh  
Mahfuzh).”*

— **QS. Al-An'am (6): 59**

## DAFTAR ISI

<b>DAFTAR ISI</b> .....	xvii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xix
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xx
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xxi
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	4
1.3 Manfaat Penelitian .....	4
1.4 Kerangka Pikir .....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Sel Darah .....	6
2.2 Heme .....	8
2.3 Globin.....	10
2.4 Hemoglobin .....	10
2.5 Genom dan Gen.....	11
2.6 <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (DNA).....	12
2.7 Gen <i>Hemoglobin Subunit Epsilon 1</i> (HBE1) .....	13
2.8 Peran Gen HBE1 .....	14
2.9 Thalassemia .....	14
2.9.1 Definisi Thalassemia .....	14
2.9.2 Klasifikasi Thalassemia.....	15
2.10 Pewarisan Genetik Thalassemia berdasarkan Hukum Mendel .....	16
2.11 Isolasi Gen.....	18
2.12 Faktor yang Mempengaruhi Kualitas DNA .....	19
2.13 Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA .....	19
2.14 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) .....	20
2.15 Primer PCR .....	21
2.16 Standar Kualitas DNA untuk PCR dan Sekuensing.....	22
2.17 Elektroforesis .....	22

2.18 Metode Sekuensing Gen Menggunakan Sanger Sekuensing.....	23
2.19 Analisis Filogenetik.....	24
<b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>25</b>
3.1 Waktu dan Tempat .....	25
3.2 Populasi Sampel .....	25
3.3 Desain Penelitian .....	26
3.4 Alat dan Bahan .....	26
3.5 Metode Kerja .....	27
3.5.1 Isolasi Sekuen Gen <i>Hemoglobin Subunit Epsilon 1</i> (HBE1) .....	27
3.5.1.1 Ekstraksi DNA .....	27
3.5.1.2 Analisis Kemurnian dan Konsentrasi DNA Hasil Ekstraksi .....	28
3.5.1.3 Amplifikasi Gen dengan Metode PCR.....	29
3.5.1.4 Elektroforesis Hasil PCR .....	30
3.5.1.5 Sekuensing Hasil PCR .....	31
3.5.2 Analisis Filogenetik .....	31
3.6 Diagram Alir Penelitian .....	33
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>34</b>
4.1 Isolasi Sekuen Gen <i>Hemoglobin Subunit Epsilon 1</i> (HBE1).....	34
4.1.1 Ekstraksi DNA Sampel Darah $\beta$ -thalassemia dan Pengukuran Kemurnian DNA.....	34
4.1.2 Amplifikasi Gen HBE1 .....	38
4.1.3 Visualisasi Hasil PCR menggunakan Elektroforesis.....	39
4.2 Analisis Filogenetik.....	42
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>47</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>48</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>57</b>

**DAFTAR TABEL**

Tabel	Halaman
1. Komposisi reagen PCR untuk amplifikasi DNA.....	29
2. Sekuen Primer RS72872548.....	30
3. Hasil kemurnian dan konsentrasi sampel .....	36
4. Tahapan PCR Gen HBE1.....	38

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi sel darah merah.....	6
2. Morfologi sel darah merah tidak normal.....	8
3. <i>Heme biosynthesis</i> .....	9
4. Struktur Hemoglobin.....	11
5. Struktur heliks DNA .....	12
6. Letak gen HBE1 .....	13
7. Pola autosomal resesif.....	17
8. Pola pewarisan Thalassemia .....	18
9. Diagram Alir Penelitian .....	33
10. Pohon Filogenetik Gen HBE1.....	45
11. Sampel Darah dalam Tabung EDTA.....	58
12. Proses Ekstraksi DNA .....	58
13. Hasil Analisis Kemurnian dan Konsentrasi .....	58
14. Proses Amplifikasi Metode PCR.....	58
15. Sampel setelah di PCR.....	58
16. Visualisasi Pita DNA menggunakan Elektroforesis.....	58
17. Grafik Elektroferogram Sekuen 72SB .....	59
18. Hasil BLAST di NCBI.....	59
19. Hasil Sekuen <i>Aligment</i> .....	60
20. <i>Pairwise Distance</i> .....	60
21. <i>Models Analist</i> .....	61

## DAFTAR SINGKATAN

ALA	: $\delta$ -Aminolevulinat
BLAST	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	: <i>Base pair</i> (pasang basa)
CO <sub>2</sub>	: Karbon dioksida
ddNTP	: <i>Dideoxynucleotide Triphosphate</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	: <i>Deoxynucleotide Triphosphate</i>
EDTA	: <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
Fe <sup>2+</sup>	: Ion besi <i>ferrous</i>
GC	: <i>Guanine-Cytosine</i>
Hb	: Hemoglobin
HbA	: Hemoglobin dewasa ( $\alpha_2\beta_2$ )
HbA <sub>2</sub>	: Hemoglobin dewasa minor ( $\alpha_2\delta_2$ )
HbF	: Hemoglobin fetal
HbS	: Hemoglobin S
HBA1	: <i>Hemoglobin Subunit Alpha 1</i>
HBA2	: <i>Hemoglobin Subunit Alpha 2</i>
HBB	: <i>Hemoglobin Subunit Beta</i>
HBD	: <i>Hemoglobin Subunit Delta</i>
HBE1	: <i>Hemoglobin Subunit Epsilon 1</i>
HBG	: <i>Hemoglobin Subunit Gamma</i>
MEGA	: <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
ML	: <i>Maximum Likelihood</i>
NCBI	: <i>National Center for Biotechnology Information</i>

NJ	: <i>Neighbor Joining</i>
ORF	: <i>Open Reading Frame</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	: <i>Ribonucleic Acid</i>
RSUD	: <i>Rumah Sakit Umum Daerah</i>
SNP	: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TAE	: <i>Tris-Acetate-EDTA</i>
TE	: <i>Tris-EDTA</i>
T <sub>m</sub>	: <i>Melting Temperature</i>
UV	: <i>Ultraviolet</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Thalassemia merupakan kelainan genetik yang disebabkan oleh mutasi pada gen penyandi rantai globin, sehingga mengakibatkan gangguan pada proses pembentukan hemoglobin dan fungsi sel darah merah. Kondisi ini menyebabkan penderita mengalami anemia dan memerlukan terapi transfusi darah secara rutin sepanjang hidup. Data dari *World Bank* menunjukkan bahwa sekitar 7% populasi manusia di seluruh dunia merupakan pembawa sifat (*carrier*) thalassemia. Indonesia termasuk salah satu negara dengan prevalensi pembawa sifat thalassemia yang tergolong tinggi (Paloma, 2023).

$\beta$ -thalassemia adalah salah satu jenis thalassemia yang paling sering ditemukan.  $\beta$ -thalassemia terjadi akibat berbagai perubahan genetik yang memengaruhi proses sintesis rantai  $\beta$ -globin. Perubahan genetik tersebut menyebabkan hemoglobin yang dihasilkan menjadi mudah mengalami kerusakan dan tidak stabil, sehingga menurunkan kemampuan sel darah merah dalam mengangkut oksigen. Kondisi ini menimbulkan anemia dengan tingkat keparahan yang bervariasi, mulai dari ringan hingga berat (Praramdana dkk., 2023). Secara genetik,  $\beta$ -thalassemia diklasifikasikan menjadi 2 tipe utama berdasarkan karakteristik mutasinya, yaitu  $\beta^0$ , yang ditandai dengan tidak adanya produksi rantai  $\beta$ -globin sama sekali, dan  $\beta^+$ , yang ditandai dengan penurunan produksi rantai  $\beta$ -globin (Rao *et al.*, 2023).

Menurut data *World Health Organization* (WHO), jumlah penderita  $\beta$ -thalassemia mayor di seluruh dunia pada tahun 2019 mencapai sekitar 39,96 juta orang atau sekitar 5,2% dari total populasi dunia. Pada tahun 2020, jumlah tersebut meningkat menjadi sekitar 54,35 juta orang atau sekitar 7% dari populasi dunia, dengan proporsi kasus tertinggi berada di kawasan Asia, yaitu sekitar 40% dari total kasus global. Selanjutnya, pada tahun 2021 diperkirakan jumlah penderita  $\beta$ -thalassemia mayor di seluruh dunia terus meningkat hingga mencapai 156,74 juta orang atau sekitar 20% dari populasi dunia (WHO, 2019; WHO, 2020; WHO, 2021).

Indonesia berada dalam kawasan yang dikenal sebagai *thalassemia belt*, yaitu wilayah yang membentang dari kawasan Mediterania hingga Asia Tenggara dan memiliki tingkat pembawa sifat thalassemia yang tinggi. Menurut WHO, prevalensi pembawa sifat thalassemia di Indonesia berkisar antara 6–10%, yang berarti sekitar 6 hingga 10 dari setiap 100 penduduk merupakan *carrier* thalassemia (WHO, 2021). Diperkirakan sekitar 2.500 bayi di Indonesia lahir setiap tahunnya dengan kondisi  $\beta$ -thalassemia mayor. Berbagai studi genetik pada pasien thalassemia di Indonesia juga menunjukkan adanya keragaman genetik yang berkontribusi terhadap perbedaan manifestasi klinis penyakit (Wahidiyat *et al.*, 2022).

Distribusi kasus thalassemia di Indonesia menunjukkan variasi antar wilayah. Provinsi Jawa Barat dilaporkan sebagai wilayah dengan jumlah penderita thalassemia tertinggi, dengan sekitar 40% pengidap thalassemia nasional berasal dari provinsi tersebut (Robila dkk., 2024). Di Provinsi Lampung, berdasarkan penelitian Siahaan dan Yanti (2024), tercatat sekitar 520 kasus thalassemia yang dirawat di Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. H. Abdul Moeloek. Data ini menunjukkan bahwa thalassemia merupakan salah satu permasalahan kesehatan yang signifikan di Indonesia.

Hemoglobin merupakan protein penting dalam sel darah merah yang tersusun atas dua komponen utama, yaitu heme dan globin. Heme berperan dalam mengikat oksigen, sedangkan globin merupakan bagian

protein yang menentukan struktur dan fungsi hemoglobin. Gen-gen yang menyandi globin tersusun dalam dua klaster utama, yaitu klaster  $\alpha$ -globin yang terletak pada kromosom 16 dan klaster  $\beta$ -globin pada kromosom 11. Pada klaster  $\beta$ -globin terdapat beberapa gen yang diekspresikan secara bertahap sesuai dengan tahap perkembangan manusia, yaitu gen  $\epsilon$  (HBE1),  $\gamma$  (HBG),  $\delta$  (HBD), dan  $\beta$  (HBB). Pola ekspresi yang bersifat temporal ini menunjukkan adanya regulasi genetik yang kompleks selama proses perkembangan (Fontana *et al.*, 2023).

Gen HBE1 adalah gen yang aktif pada saat pembentukan Hemoglobin Embrionik. Gen HBE1 yang mengode rantai globin epsilon pada fase embrionik, berperan penting dalam pembentukan hemoglobin pada tahap paling awal perkembangan manusia. Sepanjang kehidupan, tubuh menghasilkan berbagai varian hemoglobin yang muncul secara bertahap, dimulai dari hemoglobin embrionik, kemudian bergeser ke hemoglobin fetal, dan akhirnya digantikan oleh hemoglobin dewasa segera setelah kelahiran (Fontana *et al.*, 2023).

Menurut (Liu *et al.*, 2024), Penelitian terkait gen  $\epsilon$ -globin (HBE1) masih terbatas. Oleh karena itu, diperlukan pendekatan molekuler berbasis analisis sekuens DNA untuk memperoleh informasi genetik yang lebih akurat. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan menganalisis kekerabatan sekuens gen HBE1 genom darah pasien  $\beta$ -thalassemia di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung dengan data yang ada di *GenBank*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai sekuens gen HBE1 pada pasien  $\beta$ -thalassemia di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung sebagai informasi dasar untuk mendukung kajian genetik lanjutan.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengisolasi sekuen gen *Hemoglobin Subunit Epsilon 1* (HBE1) dari genom pasien  $\beta$ -thalassemia di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung.
2. Menganalisis kekerabatan sekuen gen HBE1 dari genom pasien  $\beta$ -thalassemia di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung secara filogenetik.

## 1.3 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi ilmiah yang bermanfaat sebagai sumber data dasar mengenai keragaman sekuen gen HBE1 pasien  $\beta$ -thalassemia di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung, yang dapat digunakan untuk mendukung analisis genetik lanjutan.

## 1.4 Kerangka Pikir

$\beta$ -thalassemia merupakan kelainan genetik yang disebabkan oleh mutasi pada gen penyandi rantai  $\beta$ -globin, sehingga mengganggu sintesis hemoglobin dan fungsi sel darah merah. Kondisi ini menyebabkan anemia akibat berkurangnya jumlah eritrosit fungsional. Tingginya angka pembawa sifat thalassemia di dunia, termasuk di Indonesia yang berada dalam wilayah *thalassemia belt*, menunjukkan bahwa penyakit ini masih menjadi permasalahan kesehatan yang signifikan. Selain itu, adanya variasi genetik pada pasien  $\beta$ -thalassemia menyebabkan perbedaan manifestasi klinis, sehingga diperlukan kajian genetik yang lebih mendalam untuk memahami mekanisme molekuler yang mendasarinya.

Hemoglobin sebagai komponen utama eritrosit tersusun atas heme dan globin, dengan gen globin yang terorganisasi dalam klaster  $\alpha$  dan  $\beta$ . Pada klaster  $\beta$ -globin terdapat beberapa gen yang diekspresikan secara bertahap

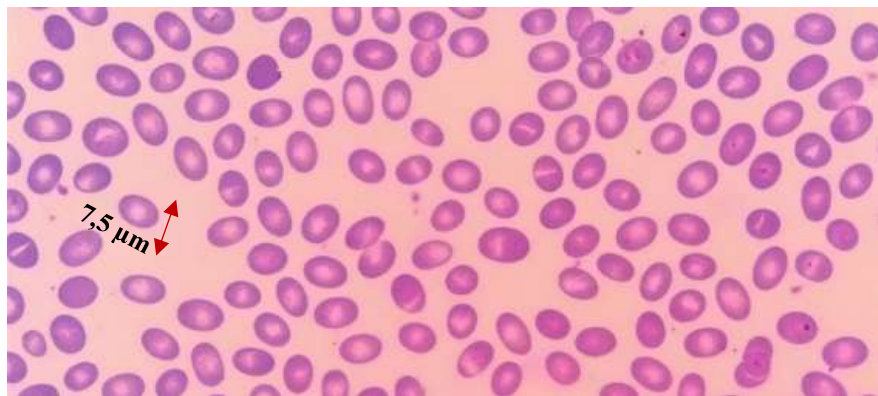
selama perkembangan, termasuk gen  $\epsilon$  (*HBE1*) yang aktif pada fase embrionik. Gen *HBE1* berperan dalam pembentukan hemoglobin embrionik serta menjadi bagian dari regulasi ekspresi gen globin dalam satu klaster yang saling berkaitan.

Informasi mengenai variasi sekuens gen *HBE1*, khususnya pada pasien  $\beta$ -thalassemia, masih terbatas (Liu *et al.*, 2024), sehingga diperlukan pendekatan molekuler melalui analisis sekuens DNA untuk memperoleh data genetik gen *HBE1*. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan menganalisis kekerabatan sekuens gen *Hemoglobin Subunit Epsilon 1 (HBE1)* dari genom darah pasien  $\beta$ -thalassemia di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung dengan membandingkannya terhadap data yang tersedia pada *GenBank*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai variasi sekuens gen *HBE1* pada pasien  $\beta$ -thalassemia serta mendukung pengembangan kajian genetika molekuler di bidang tersebut.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Sel Darah

Sel darah adalah salah satu komponen penting pada tubuh manusia yang mempunyai berbagai fungsi. Sel darah membawa oksigen dan zat-zat gizi ke jaringan, mengangkut produk sisa dari proses metabolisme, serta berperan dalam sistem pertahanan tubuh. Sel darah tersusun dari beberapa komponen yaitu plasma, sel darah merah (eritrosit), sel darah putih (leukosit), dan trombosit (Syaravicena dkk, 2023). Menurut Situmorang dkk (2023), morfologi eritrosit normal yang memiliki bentuk seperti cakram ditengahnya berwarna pucat, biokonkaf, tidak memiliki inti sel, berdiameter 7,5  $\mu\text{m}$  dan tebal 2,0  $\mu\text{m}$ . Adapun Morfologi sel darah merah atau eritrosit normal pada Gambar 1.

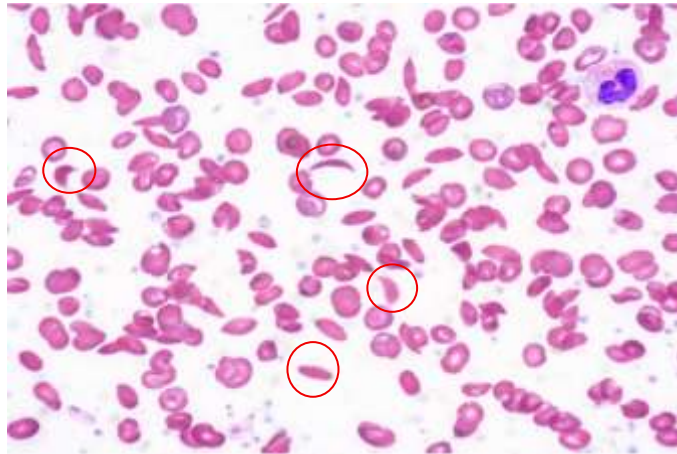


Gambar 1. Morfologi sel darah merah normal (Situmorang dkk, 2023).

Fungsi utama eritrosit adalah mengangkut oksigen dari paru-paru ke seluruh jaringan tubuh serta membawa karbon dioksida dari jaringan kembali ke paru-paru untuk dikeluarkan melalui proses pernapasan.

Komponen utama sel darah yang berperan dalam pengangkutan oksigen adalah hemoglobin. Hemoglobin adalah suatu protein kompleks yang terdapat di dalam eritrosit. Komponen ini tersusun dari empat subunit globin (dua rantai  $\alpha$ -globin dan dua rantai  $\beta$ -globin) yang masing-masing mengandung gugus heme dengan satu atom besi ( $\text{Fe}^{2+}$ ) di pusatnya. Atom besi inilah yang mampu mengikat molekul oksigen ( $\text{O}_2$ ), memungkinkan hemoglobin mengangkut oksigen dari alveolus paru-paru ke jaringan perifer. Hemoglobin juga berperan dalam transportasi  $\text{CO}_2$ , sebagian melalui pembentukan karbaminohemoglobin ( $\text{CO}_2$  terikat pada rantai globin), dan sebagian besar  $\text{CO}_2$  diangkut dalam bentuk ion bikarbonat yang dibentuk oleh aksi enzim karbonat anhidrase. Selain itu, hemoglobin membantu menjaga pH darah tetap stabil melalui sistem *buffer*. Selain itu, hemoglobin membantu dalam sistem respirasi, tetapi juga memiliki peran penting dalam homeostasis tubuh secara keseluruhan (Zhao *et al.*, 2021).

Pada kondisi tertentu, sel darah merah dapat mengalami gangguan struktur dan fungsi yang berdampak pada penurunan kemampuan dalam mengangkut oksigen. Kelainan tersebut terjadi akibat mutasi pada gen  $\beta$ -globin sehingga menghasilkan hemoglobin S (HbS) (Mangla dkk, 2023). Keberadaan HbS menyebabkan hemoglobin lebih mudah berpolimerisasi ketika kadar oksigen menurun, yang kemudian mengakibatkan perubahan bentuk eritrosit menjadi menyerupai sabit. Perubahan ini membuat sel darah merah menjadi lebih kaku, kurang elastis, serta lebih mudah mengalami kerusakan sehingga umur sel menjadi lebih singkat serta efisiensi pengangkutan oksigen ikut menurun. Adapun Morfologi sel darah merah atau eritrosit tidak normal pada Gambar 2.



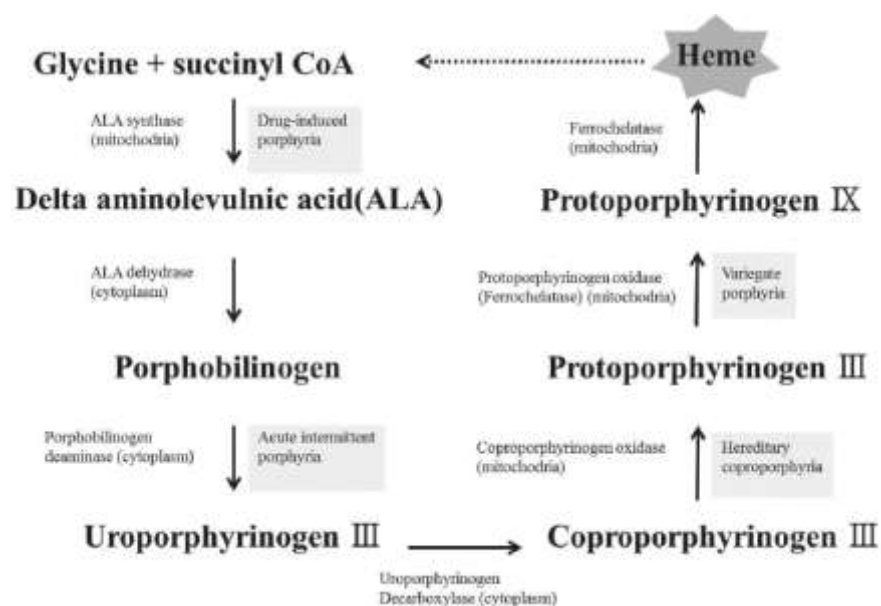
Gambar 2. Morfologi sel darah merah tidak normal (Mangla *et al.*, 2023).

Selain perubahan bentuk, sel darah merah yang tidak normal memiliki kecenderungan untuk saling beradhesi dan menyumbat pembuluh darah kecil (*vaso-occlusion*). Keadaan ini dapat menghambat aliran darah ke jaringan dan memicu terjadinya iskemia. Dampaknya, penderita dapat mengalami berbagai manifestasi klinis seperti nyeri berulang, anemia kronis, hingga gangguan organ akibat berkurangnya suplai oksigen. Dengan demikian, perubahan struktur hemoglobin tidak hanya memengaruhi morfologi eritrosit, tetapi juga memberikan dampak luas terhadap fungsi fisiologis darah dalam mempertahankan keseimbangan tubuh secara keseluruhan (Mangla *et al.*, 2023).

## 2.2 Heme

Heme adalah salah satu jenis senyawa porfirin. Senyawa ini mengandung unsur besi dan memiliki peran yang sangat penting bagi keberlangsungan hampir seluruh organisme hidup (Yang *et al.*, 2024). Molekul ini berperan sebagai komponen prostetik dalam berbagai jenis protein yang menjalankan fungsi biologis utama, termasuk pengangkutan dan penyimpanan oksigen, proses perpindahan elektron (Voltarelli *et al.*, 2023). Heme juga berperan dalam mekanisme perlindungan sel terhadap stres oksidatif melalui keterlibatannya dalam sistem enzimatik tertentu (Ryter *et al.*, 2019).

Heme disintesis melalui jalur metabolisme porfirin. Pembentukan heme berawal dari perubahan glisin dan suksinil-KoA menjadi senyawa porfirin di mitokondria dan sitosol sel prekursor eritrosit. Tahap pembatas reaksi dimulai dengan pembentukan  $\delta$ -aminolevulinat (ALA) oleh enzim ALA sintase, yang kemudian diubah secara bertahap menjadi porfobilinogen, uroporfirinogen III, koproporfirinogen III, hingga protoporfirin IX. Pada tahap akhir, enzim ferokelatase memasukkan ion besi ferrous ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ke dalam protoporfirin IX sehingga terbentuk heme. Heme kemudian berikatan dengan rantai globin membentuk hemoglobin fungsional, sehingga jalur ini berperan penting dalam menjamin pembentukan hemoglobin yang optimal untuk pengangkutan oksigen (Dailey dan Medlock, 2022). Adapun gambar Biosintesis heme yang menjadi salah satu bagian dari jalur metabolisme porfirin pada Gambar 3.



Gambar 3. *Heme biosynthesis* (Kim et al., 2015).

Secara keseluruhan, proses ini menunjukkan koordinasi kompleks antara mitokondria dan sitoplasma dalam menghasilkan heme sebagai komponen penting hemoglobin dan berbagai protein lainnya.

### 2.3 Globin

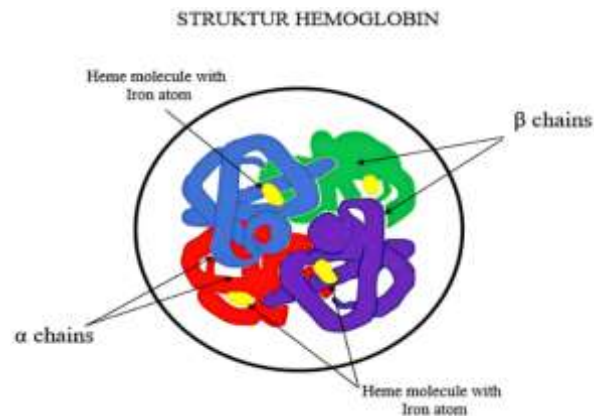
Globin adalah salah satu protein yang mempunyai struktur khas (*myoglobin fold*) dan memiliki gugus prostetik heme di dalam rongga hidrofobik struktur tersebut. Secara genetik, globin awalnya dikenal dari hemoglobin dan mioglobin yang mengikat oksigen. Berkembangnya data genomik ditemukan bahwa globin tidak hanya ada pada manusia dan hewan dan hampir semua organisme, termasuk erchaea, bakteri, dan eukarya mempunyai globin (Keppner *et al.*, 2020).

Globin adalah komponen protein penyusun hemoglobin. Hemoglobin tersusun atas rantai polipeptida globin (pada manusia dewasa terdiri dari dua  $\alpha$ -globin dan dua  $\beta$ -globin), dan setiap rantai globin mengikat satu molekul heme. Gabungan antara globin dan heme inilah yang membentuk hemoglobin fungsional yang berfungsi mengangkut oksigen dalam darah. Tanpa globin, heme tidak dapat berfungsi secara stabil, dan tanpa heme, globin tidak mampu mengikat oksigen ((Keppner *et al.*, 2020).

### 2.4 Hemoglobin

Hemoglobin adalah protein penting dalam darah yang berfungsi mengikat dan mengangkut oksigen dari paru-paru ke seluruh jaringan tubuh. Struktur hemoglobin tersusun atas empat subunit, yaitu dua rantai  $\alpha$  dan dua rantai  $\beta$ , yang membentuk struktur tetramerik. Sintesis rantai globin diatur oleh gen-gen yang tersusun dalam dua klaster utama, yaitu klaster  $\alpha$ -globin yang terletak pada lengan pendek kromosom 16, meliputi gen HBZ serta HBA1 dan HBA2, dan klaster  $\beta$ -globin yang berada pada kromosom 11, meliputi gen HBE, HBG1, HBG2, HBD, dan HBB. Gen ini menyandi pembentukan hemoglobin sesuai dengan tahap perkembangan manusia. Pada fase embrio, hemoglobin yang terbentuk terdiri dari Hb Gower-1, Hb Gower-2, dan Hb Portland. Selanjutnya, pada fase fetal, hemoglobin didominasi oleh HbF yang terutama mengandung rantai  $\gamma$ , kemudian setelah kelahiran hemoglobin dewasa seperti HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ) dan HbA2

( $\alpha_2\delta_2$ ) mulai diekspresikan (Langer, 2024). Adapun gambar struktur hemoglobin pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur Hemoglobin (Syafira dkk, 2024).

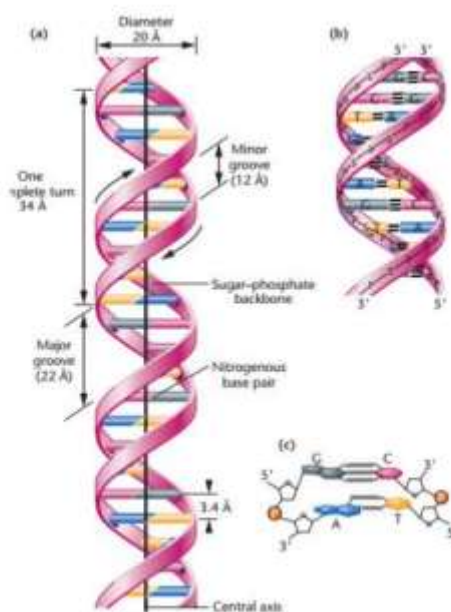
## 2.5 Genom dan Gen

Keseluruhan materi genetik suatu organisme disebut genom, genom memuat seluruh informasi biologis yang tersimpan di dalam DNA. Ukuran dan tingkat kompleksitas genom berbeda-beda tergantung pada jenis organisme yang bersangkutan. Secara konseptual, genom dapat dipandang sebagai suatu sistem informasi genetik yang tersusun atas banyak gen yang saling berinteraksi dan bekerja secara terkoordinasi. Dengan demikian, genom tidak hanya dipahami sebagai kumpulan urutan DNA semata, tetapi sebagai sistem yang bersifat dinamis, di mana hubungan antar gen memegang peranan penting dalam mengatur berbagai fungsi biologis sel dan organisme secara keseluruhan (Costanzo *et al.*, 2019).

Gen adalah segmen spesifik dari DNA yang menjadi bagian dari genom. Gen membawa informasi genetik yang mengarahkan pembentukan protein atau molekul fungsional lain yang berperan dalam menentukan karakteristik atau sifat suatu organisme. Perubahan pada susunan gen, termasuk adanya mutasi, dapat menyebabkan munculnya perbedaan sifat yang dapat diamati dalam suatu populasi (Azmi dkk, 2025).

## 2.6 Deoxyribonucleic Acid (DNA)

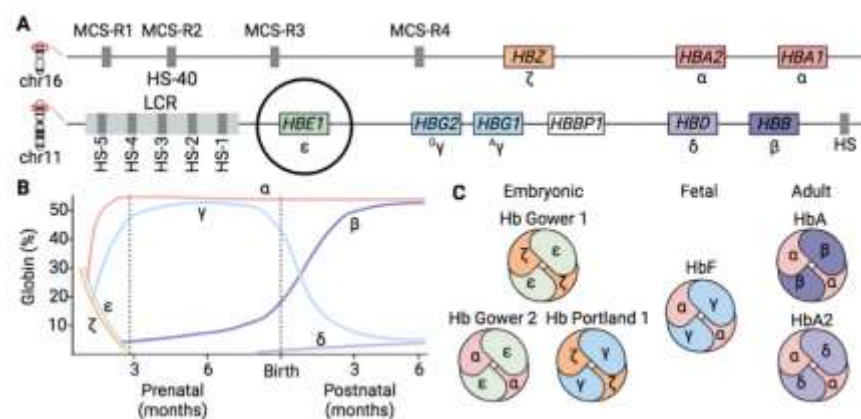
*Deoxyribonucleic Acid* atau DNA merupakan molekul asam nukleat yang berperan sebagai pembawa utama informasi genetik pada makhluk hidup. Molekul ini tersusun atas rangkaian nukleotida yang membentuk struktur heliks ganda, dengan setiap nukleotida terdiri dari gula deoksiribosa, gugus fosfat, serta basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, timin). Susunan basa-basa tersebut menyimpan kode genetik yang digunakan sel sebagai pedoman dalam pembentukan protein dan pengaturan berbagai fungsi biologis. Meskipun tidak seluruh bagian DNA secara langsung mengode protein, keseluruhan informasi yang dikandungnya tetap berperan penting dalam mengendalikan aktivitas sel dan menentukan karakteristik organisme. Selain itu, sifat DNA yang stabil memungkinkan molekul ini mempertahankan dan mewariskan informasi genetik dari satu generasi ke generasi selanjutnya melalui proses replikasi (Franjic, 2021). Adapun gambar struktur DNA pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur heliks DNA (Effendi, 2020).

## 2.7 Gen Hemoglobin Subunit Epsilon 1 (HBE1)

Gen HBE1 (*Hemoglobin Subunit Epsilon 1*) adalah bagian dari kelompok gen  $\beta$ -globin yang terletak pada kromosom 11 (tepatnya di wilayah 11p15.4). Gen ini memiliki struktur yang terdiri atas tiga ekson dan dikenal berperan penting selama tahap awal perkembangan embrionik, khususnya dalam pembentukan hemoglobin pada eritrosit yang berasal dari kantung kuning (*yolk sac*). Produk gen HBE1 adalah rantai globin epsilon ( $\epsilon$ ) yang bergabung dengan rantai globin zeta ( $\zeta$ ) untuk membentuk hemoglobin Gower I dan dengan rantai globin alfa ( $\alpha$ ) untuk membentuk hemoglobin Gower II. Gen HBE1 termasuk dalam urutan kluster  $\beta$ -globin bersama gen HBG2 ( $G\gamma$ ), HBG1 ( $A\gamma$ ), HBD ( $\delta$ ), dan HBB ( $\beta$ ), yang masing-masing diekspresikan secara bertahap selama perkembangan. Setelah periode embrio selesai, ekspresi gen HBE1 berhenti, digantikan oleh ekspresi gen HBG2 ( $G\gamma$ ) dan HBG1 ( $A\gamma$ ) pada fetal dan gen HBB pada fase dewasa. Karena ekspresinya terbatas hanya pada tahap awal hematopoiesis, HBE1 sering dimanfaatkan sebagai penanda biologis dalam studi diferensiasi sel eritroid (NCBI, 2025). Adapun letak Gen HBE1 pada Gambar 6.



Gambar 6. Letak Gen HBE1 pada kromosom 11 dan lokus  $\alpha$  dan  $\beta$  globin pada manusia serta pergantian hemoglobin pada setiap perkembangan (Fontana *et al.*, 2023).

## 2.8 Peran Gen HBE1

Gen HBE1 merupakan bagian dari gugus gen  $\beta$ -globin yang berperan penting pada tahap awal perkembangan embrio. Gen ini menyandi rantai  $\epsilon$ -globin yang diekspresikan secara dominan selama fase embrionik dan berfungsi dalam pembentukan hemoglobin embrionik untuk mendukung transport oksigen pada tahap awal kehidupan. Seiring perkembangan, ekspresi HBE1 akan mengalami penurunan dan digantikan oleh gen globin lain yang aktif pada fase janin dan dewasa. Oleh karena itu, HBE1 memiliki peran utama dalam memastikan kebutuhan oksigen terpenuhi pada fase awal sebelum sistem hematopoiesis berkembang lebih lanjut (Khandros dan Blobel, 2024).

Gen HBE1 tidak hanya berfungsi sebagai penyandi globin embrionik, tetapi juga merupakan bagian dari sistem regulasi dalam gugus gen  $\beta$ -globin yang saling berinteraksi. Menurut (Munkongdee *et al.*, 2021), variasi genetik di sekitar gen HBE1, dapat memengaruhi ekspresi hemoglobin lain seperti hemoglobin fetal (HbF). Hal ini berdampak pada tingkat keparahan  $\beta$ -thalassemia, karena peningkatan HbF dapat mengompensasi kekurangan hemoglobin dewasa.

## 2.9 Thalassemia

### 2.9.1. Definisi Thalassemia

Thalassemia adalah gangguan genetik pada pembentukan hemoglobin yang diturunkan secara autosomal resesif sehingga menyebabkan terbentuknya hemoglobin yang abnormal. Thalassemia termasuk dalam kelompok anemia hereditas yang terjadi akibat penurunan sintesis salah satu rantai globin penyusun hemoglobin (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ ). Gangguan ini ditandai oleh ketidakseimbangan produksi rantai globin. Kondisi ini disebabkan oleh mutasi pada gen penyandi rantai  $\alpha$  atau  $\beta$  globin sehingga mengakibatkan penurunan atau tidak adanya produksi salah satu subunit hemoglobin. Ketidakseimbangan tersebut menyebabkan

kerusakan sel darah merah melalui peningkatan hemolisis dan penurunan efektivitas produksi eritrosit, sehingga menimbulkan anemia kronis. Progresivitas penyakit bervariasi mulai dari tingkatan ringan (thalassemia minor) hingga tingkatan tinggi (thalassemia mayor) yang membutuhkan transfusi darah berkala sejak masa anak-anak (Sadiq *et al.*, 2024).

Thalassemia termasuk kelompok penyakit darah turunan yang paling sering dijumpai. Thalassemia disebabkan oleh perubahan pada gen yang mengkode rantai globin hemoglobin khususnya rantai  $\alpha$  dan  $\beta$ . Gangguan ini menyebabkan anemia yang timbul karena produksi sel darah merah yang tidak efektif (*ineffective erythropoiesis*) yaitu kematian prekursor eritroid atau perusakan sel darah merah akibat ketidakseimbangan antara rantai globin. Ada beberapa jenis Thalassemia seperti  $\alpha$ -thalassemia dan  $\beta$ -thalassemia. Gen yang terlibat pada Thalassemia adalah Gen HBA1, HBA2 untuk alpha ( $\alpha$ ), HBB untuk beta ( $\beta$ ), serta HBG1/HBG2 untuk gen gamma ( $\gamma$ ) (Fontana *et al.*, 2023).

### **2.9.2. Klasifikasi Thalassemia**

Thalassemia dibedakan menjadi dua jenis utama, yaitu  $\alpha$ -thalassemia dan  $\beta$ -thalassemia, berdasarkan jenis rantai globin yang mengalami gangguan.  $\alpha$ -thalassemia merupakan kelainan genetik yang terjadi akibat penurunan atau tidak terbentuknya rantai  $\alpha$ -globin yang disebabkan oleh delesi atau mutasi pada gen HBA1 dan HBA2 di kromosom 16. Defisiensi rantai  $\alpha$ -globin ini mengakibatkan terbentuknya hemoglobin abnormal yang bersifat tidak stabil dan mudah mengalami degradasi. Kondisi tersebut dapat memicu stres oksidatif, hemolisis, serta eritropoiesis yang tidak efektif. Tingkat keparahan  $\alpha$ -thalassemia bergantung pada jumlah gen yang terdampak, mulai dari tanpa gejala hingga kondisi berat seperti hydrops fetalis yang dapat berakibat fatal (Musallam *et al.*, 2024 dan Taher *et al.*, 2018).

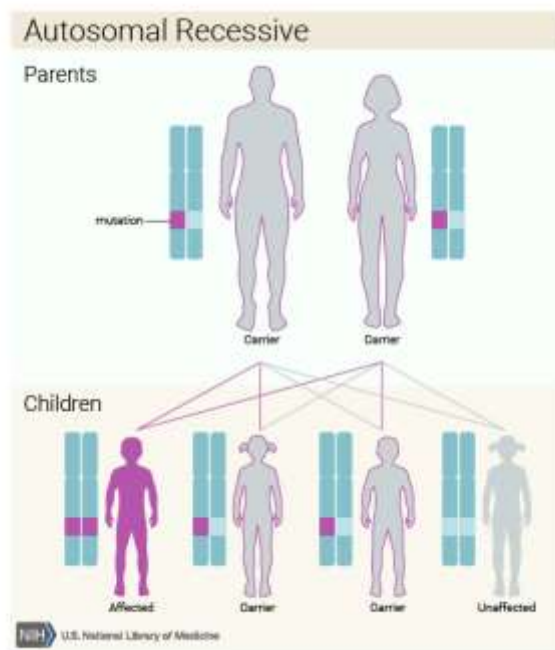
$\beta$ -thalassemia merupakan bentuk thalassemia yang lebih banyak mendapat perhatian karena dampak klinisnya yang lebih kompleks.  $\beta$ -thalassemia disebabkan oleh mutasi pada gen HBB yang mengakibatkan berkurang atau tidak terbentuknya rantai  $\beta$ -globin. Kondisi ini menyebabkan ketidakseimbangan dengan rantai  $\alpha$ -globin yang tetap diproduksi, sehingga terjadi akumulasi rantai  $\alpha$  dalam eritrosit yang bersifat toksik dan merusak membran sel. Akibatnya, terjadi hemolisis dan anemia (Cappellini *et al.*, 2020 dan Taher *et al.*, 2021).

Thalassemia dapat dibedakan menjadi tiga kategori berdasarkan tingkat keparahannya, yaitu thalassemia minor yang umumnya bersifat ringan tanpa gejala klinis sehingga sering terdeteksi secara tidak sengaja dan tidak memerlukan penanganan khusus, thalassemia intermedia yang menunjukkan tingkat keparahan sedang dengan kemungkinan membutuhkan transfusi darah secara berkala serta berpotensi menimbulkan komplikasi seperti gangguan pertumbuhan dan penumpukan zat besi, serta thalassemia mayor sebagai bentuk paling berat yang ditandai dengan anemia serius sejak usia dini sehingga memerlukan transfusi darah rutin disertai terapi kelasi besi untuk mencegah kerusakan organ, di mana klasifikasi ini penting sebagai dasar dalam menentukan penatalaksanaan dan pemantauan klinis yang optimal guna meningkatkan kualitas hidup pasien serta menekan risiko komplikasi (Rujito, 2019).

## **2.10. Pewarisan Genetik Thalassemia Berdasarkan Hukum Mendel**

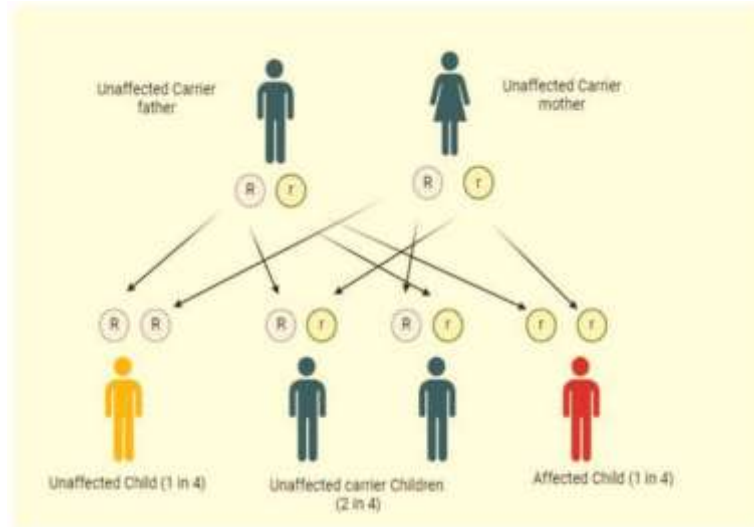
Hukum Mendel, khususnya hukum segregasi, menjelaskan bahwa setiap individu memiliki dua alel untuk suatu sifat yang masing-masing diwarisi dari kedua orang tua. Pada saat pembentukan gamet, kedua alel tersebut akan berpisah sehingga setiap gamet hanya membawa satu alel, kemudian pada proses fertilisasi alel dari masing-masing orang tua akan bergabung kembali dan membentuk kombinasi genetik baru yang menentukan

genotipe serta fenotipe individu (Sadiq *et al.*, 2024). Prinsip ini menjadi dasar dalam memahami pola pewarisan sifat, termasuk pola autosomal resesif. Pola tersebut ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Pola autosomal resesif (*National library of medicine, 2022*).

Prinsip pemisahan alel yang dijelaskan dalam hukum segregasi Mendel menjadi dasar dalam memahami mekanisme pewarisan penyakit genetik yang mengikuti pola autosomal resesif, seperti thalassemia. Penyakit ini diturunkan ketika individu mewarisi dua alel mutan (homozigot resesif) dari kedua orang tuanya, sedangkan individu dengan satu alel mutan (heterozigot) umumnya tidak menunjukkan gejala klinis, tetapi berperan sebagai pembawa sifat (*carrier*) yang dapat menurunkan alel tersebut kepada keturunannya (Taher *et al.*, 2021). Dengan demikian, kemungkinan munculnya thalassemia pada keturunan sangat dipengaruhi oleh kombinasi alel yang diwariskan oleh kedua orang tua. Gambaran pola pewarisan thalassemia dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. pola pewarisan thalassemia (Sadiq *et al.*, 2024).

Gambar tersebut menunjukkan bahwa pada pasangan carrier terdapat kemungkinan 25% anak normal, 50% *carrier*, dan 25% menderita thalassemia, yang merupakan karakteristik dari pola pewarisan autosomal resesif sesuai dengan hukum Mendel (*National Library of Medicine*, 2022).

### 2.11. Isolasi Gen

Isolasi gen merupakan tahapan penting dalam biologi molekuler yang bertujuan untuk memisahkan dan memperoleh fragmen gen tertentu dari keseluruhan genom suatu organisme sebagai dasar analisis genetik lanjutan. Proses ini umumnya meliputi beberapa tahap utama, yaitu ekstraksi DNA. Menurut Syfriandani dkk. (2020), proses ekstraksi DNA merupakan tahap awal yang sangat penting dalam analisis molekuler karena bertujuan untuk memperoleh DNA dengan kualitas dan kuantitas yang memadai untuk digunakan pada tahap analisis selanjutnya. Keberhasilan ekstraksi DNA sangat dipengaruhi oleh metode yang digunakan, karena metode yang tepat dapat menghasilkan DNA yang murni dan stabil sehingga mendukung untuk analisis lanjutan.

Kemudian, amplifikasi target gen menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), pemurnian produk amplifikasi, serta penentuan urutan nukleotida melalui metode sekuensing. Pelaksanaan isolasi gen biasanya memanfaatkan kit komersial yang disesuaikan dengan jenis dan karakteristik sampel guna memperoleh hasil yang optimal. Prinsip dasar isolasi DNA diawali dengan proses lisis sel untuk melepaskan materi genetik dari membran sel dan inti, yang dapat dilakukan secara kimiawi, enzimatik, atau mekanik (Sheershika dan Ram, 2024).

### **2.12. Faktor yang Mempengaruhi Kualitas DNA**

Ekstraksi DNA dilakukan agar memperoleh DNA murni atau DNA yang terpisah dari protein, lemak maupun karbohidrat. Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi konsentrasi DNA hasil ekstraksi. Salah satu faktor yang memengaruhi keberhasilan ekstraksi DNA adalah proses lisis. Proses lisis yang optimal mampu menghancurkan dinding sel secara sempurna tanpa merusak komponen intraseluler. Penggunaan *buffer* juga menjadi faktor penting dalam proses ekstraksi DNA. *Buffer* berperan dalam menjaga kualitas DNA yang dihasilkan, sedangkan kondisi sampel yang digunakan turut memengaruhi mutu DNA yang diperoleh (Rosari dkk., 2024).

### **2.13. Pengukuran Konsentrasi dan Kemurnian DNA**

Penentuan konsentrasi dan kemurnian DNA dapat dilakukan dengan memanfaatkan karakteristik penyerapan cahaya pada panjang gelombang tertentu. DNA memiliki puncak penyerapan pada panjang gelombang 260 nm, sehingga nilai absorbansi pada panjang gelombang ini digunakan sebagai dasar untuk memperkirakan jumlah DNA dalam suatu sampel. Sebaliknya, protein menyerap cahaya lebih kuat pada panjang gelombang 280 nm karena adanya asam amino aromatik dalam strukturnya. Oleh sebab itu, perbandingan nilai absorbansi pada 260 nm dan 280 nm yang

dikenal sebagai rasio A260/A280 digunakan secara luas sebagai indikator untuk menilai tingkat kemurnian DNA (Matlock, 2015).

Sejalan dengan hal tersebut, nilai rasio A260/A280 yang berada pada kisaran sekitar 1,8–2,0 umumnya menunjukkan bahwa DNA berada dalam kondisi relatif murni. Nilai rasio dalam rentang ini mencerminkan rendahnya tingkat kontaminasi, terutama oleh protein atau senyawa lain yang menyerap pada panjang gelombang 280 nm. Sebaliknya, nilai rasio yang lebih rendah dari kisaran tersebut biasanya mengindikasikan adanya kontaminasi protein, sedangkan nilai yang lebih tinggi dapat menunjukkan kemungkinan keberadaan RNA atau senyawa lain yang menyerap pada panjang gelombang 260 nm (Yulianti dkk., 2024).

#### **2.14. *Polimerase Chain Reaction (PCR)***

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah istilah untuk teknik ilmiah dalam biologi molekuler yang mampu menghasilkan salinan dari fragmen DNA tertentu menggunakan dua urutan oligodeoksinukleotida pendek (primer) melalui reaksi termal berulang yang bergantung pada enzim polimerase (Setiawan dkk, 2015). Prinsip metode PCR adalah menggunakan siklus termal yang memanfaatkan sifat termodinamika pada interaksi antara asam nukleat. Proses dalam Metode PCR terdiri dari tiga tahap utama, yaitu *denaturation*, *annealing*, dan ekstensi atau *elongasi*.

Pada tahap *denaturation*, untai ganda DNA dipisahkan menjadi dua untai tunggal melalui proses pemanasan hingga suhu sekitar 95°C. Tahap berikutnya adalah *annealing*, di mana primer menempel pada untai tunggal DNA hasil *denaturation* untuk memulai pembentukan pasangan basa nitrogen, yang berlangsung pada suhu antara 55-60°C. Selanjutnya, tahap terakhir disebut ekstensi atau *elongasi*, di mana enzim DNA polimerase memperpanjang dan menyusun rantai basa nitrogen baru berdasarkan urutan pada cetakan DNA pada suhu sekitar 72°C. Ketiga tahap tersebut

berlangsung secara berulang dalam beberapa siklus hingga menghasilkan jumlah salinan DNA yang melimpah (Putra dkk, 2020).

### 2.15. Primer PCR

Primer PCR adalah sekuen DNA pendek berbentuk oligonukleotida yang dirancang secara spesifik untuk menempel pada daerah tertentu dari DNA target dan sebagai titik awal sintesis DNA dalam metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Primer menjadi komponen yang sangat penting dalam PCR karena enzim DNA polimerase tidak dapat mensintesis DNA secara tanpa adanya ujung 3'-OH yang disediakan oleh primer. Primer PCR terdiri dari primer *forward* dan primer *reverse* yang akan berikatan pada untai DNA komplementer di sisi berlawanan dari sekuen target. Kedua primer ini berfungsi untuk mengapit daerah gen yang akan diamplifikasi sehingga hanya fragmen DNA yang diinginkan yang diperbanyak selama proses PCR (Kurniati *et al.*, 2025)

Penentuan primer yang efektif merupakan tahapan krusial dalam memastikan proses amplifikasi DNA pada teknik *polymerase chain reaction* (PCR) berlangsung secara spesifik dan efisien. Primer berfungsi sebagai titik awal sintesis DNA, sehingga karakteristik primer sangat menentukan keberhasilan reaksi PCR. Primer yang ideal harus memiliki suhu leleh (*melting temperature*,  $T_m$ ) yang sesuai agar dapat berikatan secara stabil dengan sekuen target DNA pada tahap *annealing*. Perbedaan  $T_m$  yang terlalu besar antara primer *forward* dan *reverse* dapat menyebabkan *annealing* yang tidak optimal dan menurunkan efisiensi amplifikasi. Selain itu, kandungan basa guanin dan sitosin (*G/C content*) yang seimbang juga berperan penting dalam menentukan kestabilan ikatan antara primer dan DNA cetakan, karena pasangan basa G dan C memiliki 3 ikatan hidrogen yang lebih kuat dibandingkan pasangan basa A dan T yang hanya mempunyai 2 ikatan hidrogen (Batubara dkk, 2024).

Kandungan GC yang terlalu rendah dapat menyebabkan ikatan primer menjadi lemah, sedangkan kandungan GC yang terlalu tinggi berpotensi meningkatkan pembentukan struktur sekunder yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, perancangan primer perlu mempertimbangkan keseimbangan antara suhu leleh dan kandungan GC agar primer dapat melekat secara optimal pada sekuen target tanpa mengganggu proses amplifikasi. Dengan memperhatikan parameter-parameter tersebut, primer yang dirancang diharapkan mampu menghasilkan produk PCR yang spesifik, konsisten, dan dapat direproduksi, sehingga mendukung keakuratan analisis molekuler yang dilakukan (Batubara dkk, 2024).

### **2.16. Standar Kualitas DNA untuk PCR dan Sequencing**

Kualitas DNA adalah salah satu faktor penting dalam keberhasilan amplifikasi dengan PCR maupun Sekuensing metode Sanger. Standar kualitas DNA untuk metode PCR dan sekuensing tidak hanya bergantung pada primer dan enzim polimerase yang digunakan, tetapi juga sangat dipengaruhi oleh mutu DNA yang menjadi templatnya. DNA dengan kemurnian tinggi, konsentrasi optimal, serta bebas dari kontaminan seperti fenol, etanol, atau protein akan menghasilkan amplifikasi yang efisien dan spesifik. Parameter umum yang digunakan untuk menilai kualitas DNA meliputi rasio absorbansi A260/A280 sekitar 1,8 dan rasio A260/A230 di atas 2,0, serta integritas DNA yang dapat diverifikasi melalui elektroforesis *gel agarose* (Mercer *et al.*, 2021).

### **2.17. Elektroforesis**

Elektroforesis adalah teknik pemisahan molekul yang didasarkan pada perbedaan ukuran atau panjang molekul dengan memanfaatkan arus listrik. Dalam bidang biologi molekuler, metode ini banyak digunakan untuk memisahkan DNA, RNA, dan protein. DNA dapat bergerak dalam medan listrik karena memiliki gugus fosfat yang bermuatan negatif. Ketika molekul bermuatan negatif dilewatkan melalui suatu medium, seperti gel

agarosa, lalu dialiri oleh arus listrik, molekul tersebut akan berpindah dari kutub negatif menuju kutub positif (Azalia dkk, 2023).

Prinsip kerja elektroforesis adalah pergerakan partikel bermuatan atau ion di dalam medium setengah padat akibat pengaruh medan listrik. Teknik ini dapat dimanfaatkan untuk memperkirakan ukuran fragmen DNA dengan bantuan DNA marker yang ukurannya sudah diketahui. Marker tersebut digunakan sebagai pembanding sehingga ukuran DNA sampel dapat ditentukan secara relatif. Saat DNA yang bermuatan negatif dijalankan pada gel agarosa yang diberi arus listrik, maka molekul DNA (bermuatan negatif) akan bergerak menuju kutub positif. Dengan demikian, pemisahan DNA dapat terjadi berdasarkan perbedaan panjang fragmennya (Azalia dkk, 2023).

## 2.18. Metode Sekuensing Gen Menggunakan Sanger Sekuensing

Sekuensing gen adalah metode yang digunakan untuk menentukan urutan basa nukleotida dalam suatu segmen DNA. Teknik ini sangat penting dalam mendeteksi variasi genetik, mutasi, atau kelainan pada gen tertentu yang berperan dalam penyakit seperti thalassemia. Salah satu pendekatan yang paling banyak digunakan adalah *Sanger sequencing*. *Sanger sequencing* adalah metode untuk menentukan urutan DNA yang bekerja dengan cara memasukkan nukleotida dideoksi penghenti rantai secara selektif oleh enzim DNA polimerase selama proses replikasi DNA in vitro.

Metode Sanger dalam sekuensing DNA membutuhkan DNA untai tunggal sebagai cetakan, primer sebagai titik awal replikasi, enzim DNA polimerase, nukleotida normal (dNTP), serta sedikit dideoksinukleotida berlabel (ddNTP). Sampel DNA kemudian dibagi menjadi empat reaksi terpisah, masing-masing mengandung DNA polimerase, dNTP, dan hanya satu jenis ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, atau ddTTP). Karena ddNTP tidak memiliki gugus OH pada posisi 3', penambahan nukleotida akan berhenti di titik tertentu. Akibatnya, terbentuk fragmen DNA dengan

panjang berbeda-beda, tetapi selalu berakhir pada basa sesuai ddNTP yang dimasukkan. Fragmen-fragmen ini dipisahkan melalui elektroforesis, sehingga urutan basa DNA dapat ditentukan dari posisi berhentinya rantai (Suwardji, 2023).

## **2.19. Analisis Filogenetik**

Analisis filogenetik adalah metode untuk mempelajari keanekaragaman organisme dengan merekonstruksi hubungan kekerabatan di antara berbagai macam organisme menggunakan aplikasi bioinformatika. Melalui analisis ini, informasi mengenai proses evolusi yang dialami oleh organisme tersebut dapat diperoleh dan digambarkan dalam bentuk diagram bercabang yang disebut pohon filogenetik. Kesamaan karakteristik menjadi dasar utama dalam menentukan hubungan antara spesies yang diteliti. Tujuan dari analisis filogenetik adalah untuk mengelompokkan serta memberikan pemahaman tentang evolusi dan kekerabatan antar organisme (Oktafia dan Badruzsaufari, 2021).

Dalam kajian biologi evolusi, filogenetik digunakan sebagai metode ilmiah untuk menelusuri keterkaitan evolusioner serta proses perkembangan berbagai kelompok organisme dengan memanfaatkan data molekuler. Pendekatan ini tidak lagi hanya bertumpu pada kesamaan bentuk atau ciri luar organisme, tetapi lebih mengutamakan bukti genetik sebagai dasar penentuan kekerabatan. Informasi yang digunakan dapat berasal dari berbagai sumber, seperti sekuen gen inti, materi genetik dari kloroplas, hingga data genom secara keseluruhan. Melalui pemanfaatan data tersebut, filogenetik mampu memberikan gambaran yang lebih mendalam dan akurat mengenai hubungan kekerabatan, pola evolusi, serta sejarah diversifikasi, sehingga pemahaman tentang asal-usul dan perkembangan kelompok ini dapat dijelaskan secara lebih ilmiah dan menyeluruh (Liu dan Han, 2025).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September–Desember 2025 di Laboratorium INA LAB DNA dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lampung. Kegiatan penelitian yang dilakukan di Laboratorium INA LAB DNA meliputi isolasi DNA, amplifikasi gen menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan visualisasi hasil amplifikasi menggunakan metode Elektroforesis. Sementara itu, kegiatan yang dilakukan di Laboratorium Biokimia yaitu pengukuran konsentrasi dan kemurnian hasil isolasi DNA.

#### 3.2 Populasi Sampel

Populasi penelitian ini meliputi sepuluh sampel darah pasien  $\beta$ -thalassemia yang berasal dari RSUD Dr. H. Abdul Moeloek, Bandar Lampung, Provinsi Lampung. Seluruh sampel yang telah disekuensing selanjutnya dievaluasi berdasarkan elektrogram hasil sekuensing, kemudian satu sampel dengan kualitas terbaik dipilih untuk dianalisis lebih lanjut melalui analisis filogenetik untuk mengetahui hubungan kekerabatan genetik berdasarkan sekuens yang diperoleh.

### 3.3 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kualitatif dengan pendekatan eksperimen untuk mengisolasi dan menganalisis gen HBE1 dari sampel darah pasien  $\beta$ -thalassemia. Proses dimulai dengan isolasi DNA menggunakan kit ekstraksi, diikuti dengan pengujian kualitas DNA melalui Implen NanoPhotometer N50. DNA yang memenuhi syarat kemudian diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer spesifik. Produk amplifikasi diperiksa melalui elektroforesis gel agarosa sebelum dikirim untuk sekuensing menggunakan metode Sanger. Hasil sekuensing dianalisis secara bioinformatika, termasuk analisis filogenetik untuk mempelajari hubungan evolusioner berdasarkan kesamaan sekuen gen. Desain ini memastikan validitas dan keakuratan data penelitian.

### 3.4 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi gelas ukur yang berfungsi untuk mengukur volume larutan, mikropipet untuk mengambil dan memindahkan cairan dalam volume mikro secara presisi, serta mikrotube berukuran 1,5 mL dan 0,2 mL sebagai wadah reaksi dan penyimpanan sampel selama proses ekstraksi DNA dan amplifikasi PCR. Wrap digunakan untuk menutup dan melindungi alat dan bahan dari kontaminasi. Laminar air flow digunakan sebagai area kerja steril guna meminimalkan risiko kontaminasi selama penanganan sampel. Autoclave berfungsi untuk mensterilkan alat dan bahan menggunakan uap bertekanan tinggi, sedangkan centrifuge digunakan untuk memisahkan komponen sampel berdasarkan perbedaan densitas melalui gaya sentrifugal. Oven digunakan untuk sterilisasi kering dan pengeringan alat gelas, sementara freezer digunakan untuk penyimpanan sampel dan reagen pada suhu rendah guna menjaga stabilitas dan kualitasnya. Vortex digunakan untuk menghomogenkan larutan dan sampel.

IMPLEN Nanophotometer N50 (IMPLEN GmbH, Munich, Jerman) digunakan untuk mengukur konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA genom hasil ekstraksi, *Thermal cycler LineGene Mini S Quantitative Detection System* (Hangzhou Bioer Technology Co.,Ltd, Tiongkok, China) digunakan untuk proses amplifikasi sekuen gen *Hemoglobin Subunit Epsilon 1* (HBE1) menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) serta Elektroforesis Mupid-exu (Advance Co., Ltd., Tokyo, Jepang) digunakan untuk visualisasi DNA hasil amplifikasi.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi 1 sampel darah pasien  $\beta$ -thalassemia, alkohol 70% yang digunakan sebagai bahan sterilisasi, kit Ekstraksi Genomic DNA Mini Kit (*Blood/Cultured Cell*)-GB100/GB300 untuk isolasi DNA genomik, kit pereaksi PCR untuk proses amplifikasi gen target, serta kit elektroforesis untuk visualisasi hasil amplifikasi DNA elektroforesis.

### 3.5 Metode Kerja

#### 3.5.1 Isolasi Sekuen Gen *Hemoglobin Subunit Epsilon 1* (HBE1)

Tahapan isolasi sekuen gen *Hemoglobin Subunit Epsilon 1* (HBE1) meliputi beberapa tahapan yaitu, ekstraksi DNA dari sampel darah pasien  $\beta$ -thalassemia, pengukuran kemurnian dan konsentrasi hasil ekstraksi DNA, amplifikasi sekuen gen HBE1 menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer spesifik gen HBE1. Produk amplifikasi yang dihasilkan selanjutnya dianalisis melalui elektroforesis gel agarosa untuk mengonfirmasi keberhasilan proses amplifikasi berdasarkan terbentuknya pita DNA dan terakhir, sampel siap untuk dianalisis melalui proses sekuensing di PT Genetika Science Indonesia.

##### 3.5.1.1 Ekstraksi DNA

Sampel darah atau *Whole Blood* diambil sebanyak 0,3 ml ke dalam mikrotube (1,5 ml), lalu divortex selama  $\pm$  1 menit. Sampel di tambahkan *buffer* lisis RBC sebanyak 900  $\mu$ l (3 kali dari volume

sampel), kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Larutan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang hingga hanya tersisa pelet sel. Ke dalam larutan tersebut, ditambahkan *buffer* lisis RBC sebanyak 100  $\mu$ l. Setelah itu, ditambahkan *buffer* GB 200  $\mu$ l dan dikocok kuat. Larutan lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 10 menit (inversi setiap 3 menit). Setelah itu, ditambahkan 200  $\mu$ l *Absolute ethanol* ke lisat dan dikocok kuat selama 10 detik. Setelah itu, larutan dipindahkan ke GD *Column* yang sudah terpasang tabung 2 ml lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan GD *Column* dipindahkan ke tabung koleksi setelah disentrifugasi. Selanjutnya, ditambahkan *buffer* WI sebanyak 400  $\mu$ l dan larutan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit.

Setelah disentrifugasi, supernatan dibuang dan pasang kembali GD *Column* ke tabung koleksi. Ke dalam GD *Column* tersebut, ditambahkan *Wash Buffer* sebanyak 600  $\mu$ l dan larutan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Setelah itu, tabung koleksi dikeringkan dengan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 3 menit. GD *Column* dipindahkan ke tabung baru (tube lancip). Sebanyak 30  $\mu$ l *Elution Buffer* yang telah dipanaskan pada suhu 65°C ditambahkan ke GD *Column*, larutan didiamkan selama 3 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit dan disentrifugasi kembali tanpa penambahan dengan kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit agar memperoleh DNA murni. Hasil ekstraksi kemudian dianalisis dengan spektrofotometer atau NanoPhotometer untuk memperoleh nilai kemurnian dan konsentrasi DNA.

### **3.5.1.2 Analisis Kemurnian dan Konsentrasi DNA Hasil Ekstraksi**

Pengukuran konsentrasi dan tingkat kemurnian DNA genom dilakukan menggunakan Implen NanoPhotometer N50 yaitu alat spektrofotometer UV-Vis mikrovolum yang dirancang untuk analisis asam nukleat dan

protein dengan volume sampel yang sangat kecil. Pengoperasian alat dilakukan dengan menempatkan sejumlah kecil sampel DNA pada permukaan pengukuran tanpa menggunakan kuvet, kemudian alat secara otomatis mengukur nilai absorbansi pada panjang gelombang tertentu untuk menentukan konsentrasi DNA serta rasio kemurnian, seperti A260/A280 dan A260/A230. Perangkat ini dapat dioperasikan secara mandiri maupun dihubungkan dengan perangkat eksternal, seperti komputer atau tablet, sehingga memudahkan proses akuisisi dan penyimpanan data. Dengan sistem pengukuran yang cepat dan mudah digunakan, Implen NanoPhotometer N50 mendukung analisis kualitas DNA secara efisien dalam penelitian biologi molekuler.

### 3.5.1.3 Amplifikasi Gen HBE1 dengan Metode PCR

Hasil ekstraksi DNA yang telah diperoleh kemudian diamplifikasi menggunakan metode PCR. Dengan komposisi komponen PCR terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Komposisi reagen PCR untuk amplifikasi DNA

Campuran	Volume
Mastermix <i>MyTaq</i> <sup>TM</sup>	10,5 µl
<i>Buffer</i> TE	8 µl
Primer <i>Forward</i> RS72872548	0,25 µl
Primer <i>Reverse</i> RS72872548	0,25 µl
DNA <i>Template</i>	2 µl

PCR dilakukan dengan mencampurkan seluruh komponen reaksi, yang terdiri atas 10,5 µl mastermix *MyTaq*<sup>TM</sup>, 0,25 µl primer *forward* dan 0,25 µl primer *reverse*, 8 µl TE *buffer*, serta 2 µl templat DNA. Primer yang digunakan adalah primer RS72872548. Primer ini merupakan primer hasil desain (primer baru) dengan sekuen primer yang terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2. Sekuen primer RS72872548

Primer	Sekuen Primer (5'-3')
RS72872548-F	5'-GCCCTGTA CTATCTGGTCTT-3'
RS72872548-R	5'-AAGAAGGAGCTGTTAGTGGT-3'

Proses pencampuran seluruh reagen PCR dilakukan di dalam *laminar air flow* untuk menjaga kondisi tetap steril dan mencegah terjadinya kontaminasi. Campuran reaksi PCR selanjutnya dimasukkan ke dalam *microtube* berkapasitas 0,2  $\mu$ l dan ditempatkan pada mesin PCR untuk menjalani proses amplifikasi. Program *Thermal Cycler* yang digunakan meliputi tahap *pra-denaturation* pada suhu 95°C selama 5 menit, diikuti *denaturation* pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 52,3°C selama 30 detik, *elongasi* awal pada 72°C selama 40 detik, dan *elongasi* akhir pada 72°C selama 5 menit, serta diakhiri dengan tahap *Cooling* atau pendinginan pada suhu 20°C selama 10 menit. Siklus PCR diulang sebanyak 35 kali untuk memperoleh hasil amplifikasi yang optimal. Produk PCR yang dihasilkan kemudian disimpan pada suhu -4°C di dalam lemari pendingin untuk mencegah terjadinya degradasi DNA.

#### 3.5.1.4 Elektroforesis Hasil PCR

Hasil amplifikasi dengan metode PCR divisualisasikan menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa dengan konsentrasi agar 1,2%. Pembuatan gel agarosa dilakukan dengan melarutkan 0,48 g serbuk agarosa dalam 40 ml *buffer* TAE 1x, kemudian dipanaskan hingga mendidih dan menghasilkan larutan homogen yang jernih. Larutan tersebut didinginkan selama  $\pm$ 10 menit, lalu ditambahkan 2  $\mu$ l pewarna *redsafe* dalam kondisi minim cahaya untuk mencegah degradasi pewarna, dan dihomogenkan. Larutan gel agarosa kemudian dituang ke dalam cetakan elektroforesis (*tray*) dan dipasang sisir (*comb*) untuk membentuk sumuran, dan dibiarkan memadat sambil ditutup dengan tisu untuk mencegah kontaminasi. Setelah gel

memadat, 7  $\mu$ l penanda DNA (*size marker*) dimasukkan ke dalam sumuran di tengah gel agarosa, dan 2  $\mu$ l sampai 2,5  $\mu$ l sampel hasil PCR dimasukkan ke sumuran lainnya. Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 Volt selama 25 menit. Setelah migrasi DNA selesai, pita DNA pada gel diamati menggunakan alat dokumentasi gel (*gel doc*) dengan bantuan sinar ultraviolet.

### 3.5.1.5 Sekuensing Hasil PCR

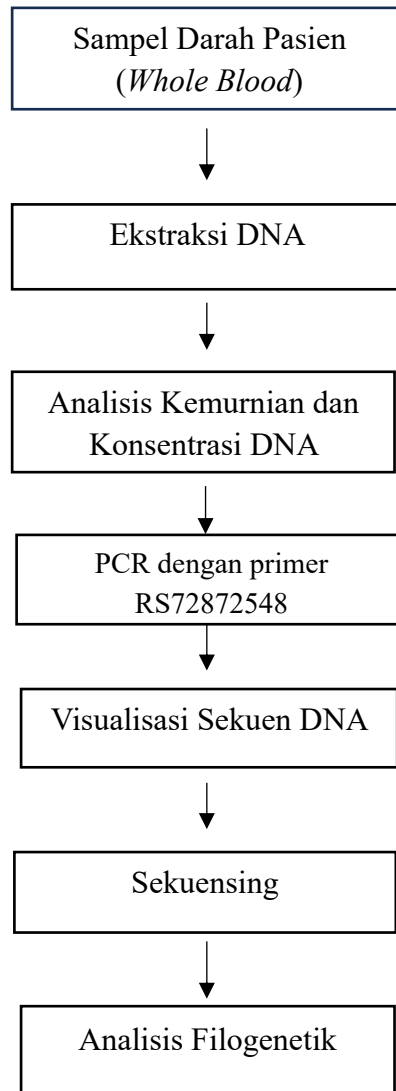
Produk hasil PCR yang menunjukkan pita amplicon pada visualisasi menggunakan sistem *gel documentation* kemudian disekuensing dengan metode Sanger melalui layanan PT Genetika Science Indonesia. Sampel yang dikirim terdiri atas produk PCR dan satu set primer yang digunakan, dikemas dalam *microtube* berkapasitas 0,2 ml. Sampel dan satu set primer tersebut dikemas dalam wadah yang dilengkapi gel es untuk mempertahankan suhu rendah selama proses pengiriman. Hasil sekuensing dianalisis menggunakan perangkat lunak BioEdit Versi 7.7.1 untuk mengevaluasi kualitas sekuensing dari sampel yang dilihat melalui elektroferogram yang dihasilkan.

### 3.5.2 Analisis Filogenetik

Hasil sekuensing selanjutnya di analisis dengan analisis filogenetik yang dilakukan melalui beberapa tahapan menggunakan berbagai perangkat lunak. Tahap awal berupa penyuntingan dan perapihan data sekuen menggunakan BioEdit agar diperoleh data yang akurat dan siap dianalisis. Selanjutnya, sekuen yang telah diperoleh dibandingkan dengan data referensi melalui BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) di situs web NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), tahapan ini digunakan untuk melihat sekuen-sekuen yang kemiripan tinggi dengan sekuen gen HBE1. Setelah dilakukan BLAST, maka akan muncul sekuen-sekuen yang sama dengan tingkat kemiripannya, data yang tingkat kemiripannya tinggi didownload dalam file berformat FASTA agar dapat dianalisis lebih lanjut. Selanjutnya, file dianalisis dengan aplikasi MEGA

XII (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) untuk melihat perbedaan dan kesamaan antar sekuen yang akan muncul dalam bentuk pohon filogenetik. Pohon filogenetik akan menghasilkan gambaran mengenai hubungan kekerabatan evolusioner antar organisme atau gen berdasarkan tingkat kesamaan sekuennya.

### 3.6 Diagram Alir Penelitian



Gambar 9. Diagram Alir Penelitian

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Adapun kesimpulan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Isolasi sekuen gen *Hemoglobin Subunit Epsilon 1* (HBE1) dari genom darah pasien  $\beta$ -thalassemia berhasil dilakukan.
2. Analisis filogenetik menunjukkan bahwa sekuen gen HBE1 berkelompok dalam satu *clade* yang sama dengan nilai kemiripan 98% pada sekuen HBE1 dari populasi lain yang telah terdeposit di *GenBank*.

### 5.2 Saran

Disarankan agar penelitian berikutnya melakukan analisis lanjutan mengenai variasi SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) gen HBE1 pasien  $\beta$ -thalassemia di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung, untuk memperkuat analisis variasi genetik dan meningkatkan ketepatan interpretasi hasil molekuler.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahyani, D., Diamahesa, W. A. 2025. Identifikasi VNN dengan metode PCR pada ikan kerapu cantang (*Epinephelus fuscoguttatus* × *Epinephelus lanceolatus*): Studi kasus di BPBAP Situbondo. *Journal of Fish Nutrition*. 5(1):23–33.
- Al-Farsi, K., Al-Aamri, M., Al-Khabori, M., Al-Riyami, A. 2022. Genetic manipulation strategies for  $\beta$ -thalassemia: A review. *Frontiers in Pediatrics*. 10. 856190.
- Ali, S., Mumtaz, S., Shakir, H. A., Khan, M., Tahir, H. M., Mumtaz, S., Mughal, T. A., Hassan, A., Kazmi, S. A. R., Sadia, I., Irfan, M., Khan, M. A. 2021. Current status of beta-thalassemia and its treatment strategies. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 9(12).
- Al-Shuhaib, M. B. S., Hashim, H. O. 2023. Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 21, 115.
- Anstee, D. J., Steward, M. E., Higgs, D. R. 2020. New insights into pathophysiology of  $\beta$ -thalassemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 34 (2) : 223–239.
- Aulia, N., Kanaya, O. N., Sari, R. M., Achyar, A. 2022. Deteksi cemaran Salmonella berbasis PCR pada makanan takjil di kawasan Universitas Negeri Padang. Dalam Prosiding SEMNAS BIO 2022. *UIN Syarif Hidayatullah Jakarta*. hlm. 414–421. ISSN 2809-8447.
- Azalia, S. N., Achyar, A., Wahyuni, I. 2023. Perbandingan metoda pewarnaan elektroforesis dengan menggunakan Gel Red (pre-cast, direct-staining, dan post-staining). Dalam Prosiding SEMNAS BIO 2023: Produktivitas dan Pelestarian Biodiversitas Lahan Basah dalam Perwujudan Ekonomi Rendah Karbon menuju SDGs 2045 (hlm. 1266–1272). *UIN Raden Fatah Palembang*. ISSN: 2809-8447.

- Azmi, B. N., Novianti, H., Oktavia, N. A., Marani, R. 2025. Hubungan antara struktur DNA, gen, dan genom dalam pewarisan sifat pada makhluk hidup. *Journal of Artificial Intelligence and Digital Business (RIGGS)*. 4 (4) : 4463–4469.
- Batubara, J., Gultom, R., Hutagaol, A., Sihotang, H. 2024. Desain primer PCR in silico berdasarkan suhu leleh dan kandungan GC untuk meningkatkan spesifisitas amplifikasi DNA. *Jurnal Biologi Tropis*. 24(2):145–153.
- Bohme K, Calo-Mata P, Barros-Velazques J, Ortea I. 2019. Review of recent DNA-based methods for main food authentication topics. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 67: 3854–3864
- Brodzka, S., Kamiński, P., Baszyński, J., Mroczkowski, S., Rektor, K., Stanek, E., Kwiecińska-Piróg, J., Grochowalska, R., Kurhaluk, N., Tkaczenko, H. 2025. Optimized protocol for DNA extraction from human whole blood. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 59. 47–64
- Bruijns, B., Hoekema, T., Oomens, L., Tiggelaar, R., Gardeniers, H. 2022. Performance of spectrophotometric and fluorometric DNA quantification methods. *Analytica*. 3(3):371–3
- Costanzo, M., Kuzmin, E., van Leeuwen, J., Mair, B., Moffat, J., Boone, C., Andrews, B. 2019. Global genetic networks and the genotype-to-phenotype relationship. *Cell*. 177(1):85–100.
- Dailey, H. A., Medlock, A. E. 2022. A primer on heme biosynthesis. *Biological Chemistry*. 403(11-12), 985–1003.
- Effendi, Y. 2020. *Buku ajar genetika dasar*. Pustaka Rumah C1nta.
- Ejaz, S., Abdullah, I., Usman, M., Iqbal, M. A., Munawar, S., Khan, M. I., Imtiaz, N., Tahir, H., Bari, M. I., Rasool, T., Fatima, A., Anwar, R., Durrani, A., Hameed, Y. 2023. Mutational analysis of hemoglobin genes and functional characterization of detected variants, through in-silico analysis, in Pakistani beta-thalassemia major patients. *Scientific Reports*. 13. Article 13236. NCBI. 2025. *Gene ID: 3046, HBE1 Hemoglobin Subunit Epsilon 1 [Homo sapiens]*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3046>. Diakses pada 2 Oktober 2025
- Fietri, W. A., Razak, A., Ahda, Y. 2021. Analisis filogenetik ikan tuna (*Thunnus* spp) di perairan Maluku Utara menggunakan COI (Cytochrome Oxidase I). *Bioma: Jurnal Biologi Makassar*. 6 (2) : 31–39.
- Fontana, L., Alahouzou, Z., Miccio, A., Antoniou, P. 2023. Epigenetic Regulation of  $\beta$ -Globin Genes and the Potential to Treat Hemoglobinopathies through Epigenome Editing. *MDPI journal*. 14 (3) : 577.

- Franjic, S. 2021. DNA is the basic molecule of inheritance. *JSM Biotechnology and Biomedical Engineering*. 7 (1) :1089.
- Harahap, M. R. 2018. Elektroforesis: Analisis elektronika terhadap biokimia genetika. *CIRCUIT: Jurnal Ilmiah Pendidikan Teknik Elektro*. 2 (1) : 21-26.
- Implen GmbH. 2023. NanoPhotometer N50/N60 user manual. <https://www.Implen.de>. Diakses pada 7 Oktober 2025
- Implen. 2020. NanoPhotometer™ Pearl User Manual. Implen GmbH. <https://www.Implen.de>. Diakses pada 7 Oktober 2025
- Jaing, T. H. 2021. Molecular genetics of  $\beta$ -thalassemia: A narrative review. *Frontiers in Pediatrics*. 9. 766983.
- Jannah, M. 2023. Optimalisasi kondisi PCR untuk amplifikasi sekuen gen HBB. *ORYZA: Jurnal Pendidikan Biologi*. 12 (1) : 36–42.
- KEGG. 2024. *Thalassemia (Entry ID: H00228)*. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Database. <https://www.kegg.jp/entry/H00228>. Diakses pada 8 Oktober 2025.
- KEGG. 2025. *hsa00860: Porphyrin metabolism; N00601: Heme biosynthesis*. Diambil dari KEGG PATHWAY: Homo sapiens. KEGG. <https://www.kegg.jp/pathway/hsa00860+N00601>. Diakses pada 15 Oktober 2025.
- Keppner, A., Maric, D., Correia, M., Koay, T. W., Orlando, I. M. C., Vinogradov, S. N., Hoogewijs, D. 2020. Lessons from the post-genomic era: Globin diversity beyond oxygen binding and transport. *Redox Biology*. 37.
- Khandros, E., Blobel, G. A. 2024. Elevating fetal hemoglobin: Recently discovered regulators and mechanisms. *Blood*. 144 (8) : 845–852.
- Kholifah, A. N. 2024. Analisis filogenetik *Clitoria ternatea* menggunakan MEGA XI (Skripsi). Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta. <https://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/76995/1/ADELIA%20NUR%20KHOLIFAH-FST.pdf>. Diakses pada 30 Oktober 2025.
- Kumar, A., Verma, P., Verma, G., Khan, F. 2024. Mutation analysis of exon 1 in the hemoglobin subunit beta (HBB) gene in beta-thalassemia. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 22 (1) : 32–40.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2023. MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Molecular Biology and Evolution*. 41 (12).
- Kurniati, D. E., Riani, C., Hardiyanti, R., Rachmawati, D. 2025. Optimization of PCR primers for detection of extended-spectrum beta-lactamase targeting

CTX-M and TEM genes. *3BIO: Journal of Biological Science, Technology and Management*. 7 (1) : 326–333.

- Langer, A. L. 2024. Beta-Thalassemia. In M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, *et al.* (Eds.), GeneReviews®. University of Washington, Seattle. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1426/>. Diakses pada 8 Oktober 2025.
- Leclerc, L., Agoutin, G., Brévault, T., Champion, A., Mainguy, J., Nègre, N., Yainna, S., Pascal, G., Gaudriault, S., Ogier, J.-C. 2025. Nested PCR to optimize rpoB metabarcoding for low-concentration and host-associated bacterial DNA. *Microbiology Spectrum*. 13 (9). 1417-25.
- Leclerc, L., Agoutin, G., Brévault, T., Champion, A., Mainguy, J., Nègre, N., Yainna, S., Pascal, G., Gaudriault, S., Ogier, J.-C. 2025. Nested PCR to optimize rpoB metabarcoding for low-concentration and host-associated bacterial DNA. *Microbiology Spectrum*. 13 (9) : 7-25.
- Lee, J. S., Cho, S. I., Park, S. S., Seong, M. W. 2021. Molecular basis and diagnosis of thalassemia. *Blood Research*. 56 (S1) : S39–S43.
- Lee, K., Tripathi, A. 2020. Parallel DNA extraction from whole blood for rapid sample generation in genetic epidemiological studies. *Frontiers in Genetics*. 11: 1–16.
- Listiani, L., Dhanti, K. R., Kurniawan, Widodo, O. S. Y. 2023. Optimization annealing temperature gene blaZ of bacterial Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in medical equipment. *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology (BJMLT)*. 6 (1) : 420–425.
- Liu, J., Park, K., Shen, Z., Ye, Y., Lee, E., Herman, R. A., Zhu, X., Lu, W., Nuhfer, J., Bassal, M. A., Tenen, D. G., Brunker, P., Xu, X., Chai, L. 2024. Exploring novel strategies to alleviate symptoms of  $\beta$ -globinopathies: Examining the potential role of embryonic  $\epsilon$ -globin induction. *Transfusion Medicine Reviews*. 1-8.
- Liu, Z., Han, Y. 2025. Phylogenetic relationships and evolutionary history of major algal lineages: A comprehensive review. *International Journal of Marine Science*. 15(2).
- Malabarba, L. R., Malabarba, M. C. 2019. Phylogeny and classification of neotropical fish. In *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815872-2.00001-4>. Diakses pada 8 Oktober 2025
- Mangla, A., Agarwal, N., Maruvada, S. 2023. Sick Cell Anemia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Matlock, B. 2015. *Assessment of nucleic acid purity (Technical Note 52646)*. Thermo Fisher Scientific.

- Mazlan, A. H., Muhamad Najib, M. H. A., Hassan, M. H., Mohd Hatta, F. H., Yusoff, R. M. 2024. Effect of DNA template concentration on standard polymerase chain reaction. *International Journal of Pharmaceuticals, Nutraceuticals and Cosmetic Science*. 7 (1) :1–11.
- Mercer, T. R., Xu, J., Mason, C. E., Tong, W., 2021. The Sequencing Quality Control 2 study: Establishing community standards for sequencing in precision medicine. *Genome Biology*. 22 (1) : 306.
- Muktiningsih, Kurniadewi, F., Orchidea, I. O. R. P. 2016. Isolasi, amplifikasi dan sekuensing fragmen satu koma sembilan kilobasa gen heat shock protein 70 Salmonella enterica serovar Typhi. *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia (JKPK)*. 1 (1) : 32–40.
- Munkongdee, T., *et al.* 2021. Predictive SNPs for  $\beta$ 0-thalassemia/HbE disease severity. *Scientific Reports*. 11. 10339.
- Munkongdee, T., Tongsima, S., Ngamphiw, C., Wangkumhang, P., Peerapittayamongkol, C., Hashim, H. B., Fucharoen, S., Svasti, S. 2021. Predictive SNPs for  $\beta$ 0-thalassemia/HbE disease severity. *Scientific Reports*. 11 (1) : 10352.
- Musallam, K. M., Cappellini, M. D., Coates, T. D., Kuo, K. H. M., Al-Samkari, H., Sheth, S., Viprakasit, V., Taher, A. T. 2024. Alpha-thalassemia: A practical overview. *Blood Reviews*. 64. 101165.
- Mussolino, C., and Strouboulis, J. 2021. Recent approaches for manipulating globin gene expression in treating hemoglobinopathies. *Frontiers in Physiology*. 12. 631479.
- Ngouénam, R. J., Njapndounke, B., Momo Kenfack, C. H., Foko Kouam, E. M., Piame, L. T., Fotso Techeu, U. D., ... dan Zambou Ngoufack, F. 2024. Technological properties and genetic profile of lactic acid bacteria isolated from Cameroonian tropical fruits. *Current Science Publishing*. Diakses dari <https://www.currentsci.com/article-detail/136>.
- Oktafia, R. E., Badruzsaufari. (2021). Analisis filogenetik *Garcinia* spp. berdasarkan sekuens gen rRNA (Phylogenetic analysis of *Garcinia* spp. based on rRNA gene sequences). *Jurnal Biologi*. 46 (2) : 259–264.
- Origa, R. 2017. Beta-thalassemia. GeneReviews. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1426/>.
- Paloma, I. D. A. N. C. 2023. Talasemia: Sebuah tinjauan pustaka. *IOCIITY Journal of Pharmacy Bioscience and Clinical Community*. 1 (2) : 93–104.
- Putra, L. A. G., Yonathan, C. J., Niedhatrata, N. I., Firdaus, M. H. R., Yoewono, J. R. 2020. A review of the development of polymerase chain

- reaction technique and its uses in scientific field. Stannum. *Jurnal Sains dan Terapan Kimia*. 2 (1) : 17–30.
- Rao, E., Chandraker, S. K., Singh, M. M., Kumar, R. 2023. Global distribution of  $\beta$ -thalassemia mutations: An update. *Gene*. 896. 148022.
- Riondino, S., Nanni, U., Betsou, F., Rossetti, L., Campisi, C., Fiorentino, R., Palmirotta, R., Ferroni, P., Roselli, M., Guadagni, F. 2015. Sample preanalytical code for labeling of biospecimens: An analysis of specimen labeling protocols. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. 3. 13–22.
- Robila, T., Amirulloh, M. R., Sampurna, R. H. 2024. Kualitas pelayanan kesehatan pada penyintas thalasemia di Kota Sukabumi. *Kebijakan: Jurnal Ilmu Administrasi*. 15 (2) : 284–292.
- Rohman, F. H. 2017. Deteksi dan identifikasi molekuler expression-site-associated gene (ESAG) 6 pada Trypanosoma evansi (Tesis, Universitas Gadjah Mada).
- Rosari, A., Sabdaningsih, A., Ayuningrum, D., Jati, O. E. 2024. Optimasi konsentrasi primer dan suhu *annealing* untuk deteksi gen PKS-I pada bakteri asosiasi mangrove *Avicennia marina* asal Pantai Tirang, Semarang [*Optimization of primer concentration and annealing temperature for detection of PKS-I genes in mangrove associated bacteria Avicennia marina from Tirang Beach, Semarang*]. *Jurnal Pasir Laut*. 8 (2) :123–129.
- Roslim, D. I., Andariyusti, F. 2021. Analisis sekuens DNA penyandi 18S rRNA pada tumbuhan cocor bebek (*Kalanchoe × laetivirens*). *Jurnal Bios Logos*. 11 (2) : 109-113.
- Rujito, L. 2019. *Thalassemia: Genetik Dasar dan Pengelolaan Terkini*. Universitas Jenderal Soedirman.
- Ryter, S. W., Ma, K. C., Choi, A. M. K. 2019. Role of heme oxygenase as a modulator of heme-mediated pathways. *Antioxidants*. 8 (10) : 475.
- Sadiq, I. Z., Abubakar, F. S., Usman, H. S., Abdullahi, A. D., Ibrahim, B., Kastayal, B. S., Ibrahim, M., Hassan, H. A. 2024. Thalassemia: Pathophysiology, Diagnosis, and Advances in Treatment. *Thalassemia Reports*. 14 (4) : 81–102.
- Sadiq, M., et al. 2024. Thalassemia: Pathophysiology, diagnosis, and advances in treatment. *Thalassemia Reports*. 14 (4) :10.
- Sanchez Villalobos, M., Blanquer, M., Moraleda, J. M., Salido, E. J., Perez Oliva, A. B. 2022. New Insights Into Pathophysiology of  $\beta$  Thalassemia. *Frontiers in Medicine*. 9. 880752.

- Saputri, S. A., Wibowo, M. T. 2023. Talasemia Beta: Etiologi, klasifikasi, faktor risiko, diagnosis, dan tatalaksana. *Jurnal Kesehatan dan Agromedicine*. 10 (2) : 19–26.
- Setiawan, A., Suryani, E., Wiharto. 2014. Segmentasi citra sel darah merah berdasarkan morfologi sel untuk mendeteksi anemia defisiensi besi. *ITSMART*. 3 (1) : 1–7.
- Setiawan, W. A., Timotiwu, P. B., Anjar Sari, D. 2022. Analisis kemelimpahan bakteri rhizosfer beberapa varietas tanaman kedelai berbasis PCR. Prosiding/Abstrak Seminar, Universitas Lampung.
- Setiawan, W. A., Widyastuti, U., Yuhana, M. 2015. Detection of *Luminous Vibrio harveyi* in *Penaeid* shrimp through nested PCR using haemolysin gene primer. *HAYATI Journal of Biosciences*. 22 (2) : 60–66.
- Sheershika, S., Ram, M. 2024. Advances in DNA extraction techniques: A comprehensive review of methods and applications. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*. 25 (5–6) : 30–42.
- Siahaan, E. R., Yanti, F. 2024. Aplikasi proses keperawatan anak thalasemia dengan masalah keperawatan defisit nutrisi di RSUD. *Jurnal Ilmu Keperawatan Indonesia*. 5 (2) : 362–370.
- Situmorang, P. R., Tampubolon, R., Tarigan, R. V. B. 2023. Analisis morfologi eritrosit packed red cell (PRC) berdasarkan waktu penyimpanan di UDD PMI Medan. *Jurnal Kesehatan Saemakers PERDANA*. 6 (2) : 417–431.
- Sophian, A. 2021. Analysis of purity and concentration of extracted DNA on salted fish processed food products. *Sains dan Ilmu Alam Jurnal Nasional Terapan Biochemistry (Biofar)*. 19 (1) : 21–24.
- Sophian, A., Purwaningsih, R., Muindar, M., Igirisa, E. P. J., Amirullah, M. L. 2021. Analysis of purity and concentration of DNA extracted from processed crab food product samples. *Asian Journal of Tropical Biotechnology*. 18 (1) : 13–27.
- Suwardji, K. V., Prayuni, K., Andayani, S. H., Zulhamidah, Y., Sofwan, A., Muflihah, L., and Judasah, I. 2023. Detection of ADAM33 gene variants using sanger sequencing. *Majalah Sainstekes*. 10 (2) : 117-125.
- Syafira, M., Sribudiani, Y., dan Maskoen, A. M. (2024). Systematic review: Pemodifikasi genetik  $\beta$ -thalassemia. *Journal of Medicine and Health (JMH)*. 6 (1) : 91–102.
- Syaravicena, D., Jayanthi, S., Ramadila, A., Sapitri, S. N., Annisa, V., Anisa, D., Meutiasari, C. S. 2023. Identification of blood types of biology education students at Samudra University. *Jurnal Biologi Tropis*. 23 (1) : 499–504.

- Syfriandani, A., Setiawan, W. A., Handayani, K., Setiawan, A. 2020. Optimasi ekstraksi DNA *Pseudocardia carboxydivorans*. *Jaring SainTek*. 2 (2) : 41–45.
- Taher, A. T., Musallam, K. M., Cappellini, M. D. 2021.  $\beta$ -thalassemias. *New England Journal of Medicine*. 384 (8) : 727–743.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28 (10) : 2731–2739.
- Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 38 (7) : 3022–3027.
- U.S. National Library of Medicine. 2022. What are the different ways a genetic condition can be inherited?. MedlinePlus Genetics. Diakses dari <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/inheritance/inheritancepatterns/>.
- Voltarelli, V. A., Alves de Souza, R. W., Miyauchi, K., Hauser, C. J., Otterbein, L. E. 2023. Heme: The Lord of the Iron Ring. *Antioxidants*. 12 (5): 074.
- Vutukuru, Srinivasa Rao, Reddy, K. Venkata, dan Rao, M. V. S. 2025. A Rapid and High-Yield Method for Nucleic Acid Extraction. *Scientific Reports*.
- Wahidiyat, P. A., Sari, T. T., Rahmartani, L. D., Iskandar, S. D., Pratanata, A. M., Yapiy, I., Setianingsih, I., Atmakusuma, T. D., Lubis, A. M. 2022. Thalassemia in Indonesia. *Pediatric Reports*. 14 (3) : 324–336.
- Wilber, A., Nienhuis, A. W., Persons, D. A. 2011. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. *Blood*. 117 (15) : 3945-3953.
- World Health Organization (WHO). 2019. *Global prevalence estimates of  $\beta$ -thalassemia major*.
- World Health Organization (WHO). 2020. *World health data on  $\beta$ -thalassemia incidence and distribution*.
- World Health Organization (WHO). 2021. *Global estimates of  $\beta$ -thalassemia distribution*.
- Yang, Q., Sun, X., Wang, H., Chen, T., Wang, Z. 2024. Multi-modular metabolic engineering of heme synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Synthetic and Systems Biotechnology*. 9 (2) : 101–110.

- Yang, S., Guo, Z., Sun, J., Wei, J., Ma, Q., Gao, X. 2024. Recent advances in microbial synthesis of free heme. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 108 (68) : 1–11.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13.134.
- Yulianti, S., Islami, R. Z., Mansyur, M., Pramudyawardani, E. F. 2024. Analisis konsentrasi dan kemurnian Deoxyribo Nucleic Acid (DNA) dari rumput pakan ternak. *AGRIVET: Jurnal Ilmu Pertanian dan Peternakan*. 12 (2) : 167–174.
- Zhao, Y., Zhang, J., Zhang, X., Wang, Y. 2021. Structure, Function, and Physiology of Hemoglobin. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 8 : 703778.