

ARTIKEL PENELITIAN

Karakteristik Gen NRF2 (Nuclear Respiratory Factor 2) dan Gen ACTN-3 (R577X) Siswa Sekolah Sepak Bola di Kota Medan

Karolina. S,^{1,2,3} Martina Evlyn. R.H,³ Gusbakti.R,⁴ Bintang.Y.M. Sinaga⁵

¹Politeknik Kesehatan Kemenkes Medan Jurusan Analis Kesehatan .

²Akademi Keperawatan Rumah Sakit Umum Herna Medan

³Program Magister Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara

⁴Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara

⁵Departemen Pulmonologi Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara

Email: surbakti.karolina@yahoo.com

Abstrak: Penelusuran genetik dapat menjadi salah satu metode *talent profiling* pada atlet sepak bola. Gen yang berhubungan dengan performa atletik adalah gen NRF2 dan ACTN3. Gen NRF2 dikenal juga *GA-binding protein transcription factor sub unit β (GABPBI)* gen ini terdapat pada DNA mitokondria dan merupakan faktor transkripsi pada biogenesis mitokondria. Gen ACTN-3 merupakan gen yang mengkode sebuah protein sarkomer yang hampir secara keseluruhan diekspresikan dalam serat otot cepat dan menghasilkan daya ledak. Tujuan penelitian ini untuk melihat variasi gen NRF2 dan gen ACTN3 pada siswa sekolah sepak bola yang berusia 11-14 tahun yang berjumlah 33 orang. Identifikasi gen NRF2 dan gen ACTN-3 diidentifikasi menggunakan PCR-RFLP dari sampel sel bukal. Hasil studi menunjukkan varian gen NRF2 secara mayoritas adalah genotip AA (*homozygote*) sebanyak 29 orang (87,90%) sebanyak 29 orang (87,90%), sedangkan genotip AG sebanyak 4 orang (12,12%) (*heterozygote*). Varian genotip GG tidak ditemukan dalam penelitian ini. Varian genotif ACTN-3 adalah genotip RX (*heterozygote*) sebanyak 14 orang (42,4%), sedangkan genotip XX sebanyak 13 orang (39,4%) (*homozygote*) dan varian genotip RR sebanyak 6 orang (18,2%) (*homozygote*)

Kata Kunci: NRF2, ACTN-3, Polimorfisme

Characteristics of NRF2 Genes (Nuclear Respiratory Factor 2) and ACTN-3 Genes (R577X) Students of Soccer Schools in Medan City

Abstract : Genetic can be one of the talent profiling methods for soccer athletes. The genes related to athletic performance are the NRF2 and ACTN3 genes. NRF2 gene known as GA-binding protein transcription factor β unit (GABPBI) is found in mitochondrial DNA and is a transcription factor in mitochondrial biogenesis. The ACTN-3 gene is a gene that encodes a sarcomere protein that is almost entirely expressed in fast muscle fibers and produces explosive power. The purpose of this study was to look at variations in the NRF2 gene and ACTN3 gene in soccer school students aged 11-14 years totaling 33 people. Identification of the NRF2 gene and ACTN-3 gene was identified using PCR-RFLP from a buccal cell sample. The results of the study showed that the majority of the NRF2 gene variants were AA (homozygote) genotypes as many as 29 people (87.90%) as many as 29 people (87.90%), while AG genotypes were 4 people (12.12%) (heterozygote). The GG genotype variant was not found in this study. The genotype variant of ACTN-3 is the RX (heterozygote) genotype as many as 14 people (42.4%), while XX genotype is 13 people (39.4%) (homozygote) and RR genotype variant is 6 people (18.2%) (homozygote)

Keyword: NRF2, ACTN-3, Polimorfisme

PENDAHULUAN

Pengembangan metode dan identifikasi bakat dalam olahraga merupakan langkah yang penting. Sebagian penelitian berfokus pada keterampilan dan kemampuan pemain yang paling berbakat dan konsekuensinya dapat memprediksi menjadi atletik elit profesional nantinya.¹

Namun faktor genetik juga memiliki pengaruh yang besar dalam menentukan performa seorang

atletik. Beberapa dari variasi DNA sangat mempengaruhi performa seorang atletik, seperti: daya tahan (*endurance*), daya ledak otot, kerentanan cedera pada otot, komposisi massa tubuh, dan bakat psikologis, dimana hal ini dapat menjadi keuntungan dan hambatan bagi performa seorang atlet.²

Sepak bola merupakan salah satu olah raga terpopuler di kalangan masyarakat dunia, hampir seluruh penjuru dunia mengenal

sepak bola. Pencapaian prestasi puncak dalam bidang olahraga sepak bola merupakan upaya yang kompleks karena dipengaruhi banyak faktor. Tersedianya energi yang cukup merupakan salah satu faktor penting yang menentukan keberhasilan seorang atlet dalam mencapai prestasi puncak. Dalam sepak bola karakteristik sistem energi yang paling dominan digunakan adalah sistem energi *anaerob* yaitu proses metabolisme tanpa menggunakan oksigen untuk menghasilkan ATP (*Adenosine Tri Phosphate*) sebagai sumber energi pada saat kontraksi otot, karena para pemain banyak melakukan *sprint* atau berlari cepat dalam jarak pendek berkali-kali untuk melakukan serangan, merebut bola maupun berlari untuk mengamankan daerahnya. Namun dengan lamanya waktu pertandingan yaitu selama 2 x 45 menit, maka perlu didukung oleh sistem energi *aerob* yaitu proses metabolisme menggunakan oksigen untuk menghasilkan ATP (*Adenosine Tri Phosphate*).³

Penelusuran genetik dapat menjadi salah satu metode *talent profiling* pada atlet sepak bola. Gen yang berhubungan dengan performa atletik adalah gen NRF2 dan ACTN3. Gen NRF2 dikenal juga *GA-binding protein transcription factor sub unit β (GABPBI)* gen ini terdapat pada DNA mitokondria dan merupakan faktor transkripsi pada biogenesis mitokondria.

Gen NRF2 A/G ini terletak pada kromosom 15q21.2, dan menurut study *Heritage family* wilayah ini berhubungan dengan peningkatan maksimal pengambilan oksigen (VO_2 max) pada latihan daya tahan (*endurance*).⁴ Gen NRF2 ini, sering disebut gen *endurance*, gen ini berfungsi pada biogenesis mitokondria. Polimorfisme gen NRF2 A/G ini merupakan promotor pada sitokrom oksidasi sub unit IV(COX IV) pada sistem rantai pernafasan dalam pembentukan ATP (*Adenosine Tri Phosphate*) di mitokondria. Pembentukan ATP ini melalui proses fosforilasi oksidatif, yang membutuhkan oksigen dan melibatkan lima kompleks enzim

rantai pernafasan sehingga energi ini dapat digunakan untuk proses selular yang berbeda seperti kontraksi otot.^{5,6,7}

Gen ACTN-3 terletak pada kromosom manusia 11q13.2 terdiri atas 21 ekson. Gen ini mengkode sebuah protein sarkomer yang hampir secara keseluruhan diekspresikan dalam serat otot cepat (*fast glycolytic*) yaitu serat otot tipe II yang berperan penting dalam kecepatan dan kontraksi kekuatan otot penuh atau pembangkit daya ledak.⁸

Terjadinya *nonsense mutation* pada gen ACTN3 ini, yaitu substitusi satu basa sitosin (C) menjadi tymin (T) pada posisi 1747 (C1747) ekson ke 16 (basa CGA menjadi TGA) sehingga membentuk *stop codon* (X) pada asam amino arginin (R) di posisi rantai protein 577, yang mengakibatkan pembentukan protein yang tidak aktif.⁹

Individu dengan genotype 577XX tidak memiliki ACTN-3 pada serat otot putih (*fast-twitch fibres*). Versi basa *sitosin* (R) menghasilkan gen ACTN-3 yang berfungsi penuh

menghasilkan protein *alpha actinin* dalam jumlah yang banyak. Beberapa penelitian membuktikan bahwa atlet elit *sprint* secara signifikan memiliki frekuensi alel R yang lebih tinggi. Versi basa *tymin* (X) menghasilkan protein ACTN-3 yang non fungsional. Defisiensi protein ACTN-3 ini tidak menunjukkan fenotip penyakit atau gangguan fungsional otot.^{8,10,11}

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui variasi genetik gen NRF2 dan ACTN3 pada siswa sekolah sepak bola di kota Medan.

METODE

Desain penelitian ini adalah deskriptif dengan menggunakan pendekatan *Cross Sectional*. Penelitian dilakukan di dua sekolah sepak bola di kota Medan, yaitu sekolah sepak bola (SSB) Sejati Pratama, SSB Universitas Sumatera Utara (SSB USU). Isolasi DNA sel bukal dari setiap sampel akan dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. Populasi pada penelitian ini adalah siswa

sepakbola yang terdaftar sebagai anggota pada sekolah sepakbola (SSB) di kota Medan. Jumlah sampel sebanyak 33 orang. Sampel diambil dengan teknik *Consecutive Sampling* yaitu pemilihan sampel dengan menetapkan subjek sesuai dengan kriteria inklusi yaitu berusia 11 – 14 tahun, menjalani latihan secara rutin minimal 3 kali dalam seminggu di klub SSB selama 6 bulan .

Sel bukal diambil menggunakan *buccal-brush*. Isolasi DNA dari sel bukal dilakukan di Laboratorium Terpadu FK USU. Bahan yang digunakan untuk isolasi DNA, antara lain; Proteinase K (100 µg/mL), Presto™ *Buccal Swab gDNA Extraction Kit* (Geneaid), 10x Tris-Acetate-EDTA (TAE) *Buffer* (Vivantis). Untuk mengukur konsentrasi dan kemurnian DNA digunakan Nanophotometer.

PCR RFLP gen NRF2 intron 3: *forward primer* 5'- AGT TTA GTG TCT CCC AGT GT -3' dan *reverse primer* 5'- CTT AGT TTT CTT GTA TCC GT -3'. Reaksi PCR terdiri atas . Reaksi PCR terdiri atas *forward primer* 1,0 µL, *reverse*

primer 1,0 µL, *GoTaq(R) Green Master Mix* (Promega, USA) 12,5 µL, sampel DNA 2,0 µL dan *Nucleus Free Water* 8,5 µL hingga volume 25 µL. Tahap *Denaturation* : 95°C selama 5 menit diikuti 35 siklus *denaturation* suhu 94 °C selama 1 menit, tahap *Annealing* : 50°C selama 1 menit, tahap *Extension*: 72°C selama 1 menit, *final Extension*:72°C selama 2 menit. Produk PCR yang didapat sebesar 483 bp, kemudian dipotong oleh enzim restriksi *RsaI* dengan komposisi sebagai berikut NE 10x Buffer sebanyak 1,0 µL, *Acetylated BSA* 0,1 µL, Enzim restriksi *RsaI* 0,2 µL, *Nucleus Free Water* 3,7 µL dan produk PCR 5,0 µL, kemudian diinkubasi pada suhu 75°C selama 60 menit. Hasil PCR-RFLP kemudian dielektroforesis menggunakan larutan TAE dan gel agarose 3% dengan tegangan sebesar 100 Volt selama 60 menit dan divisualisasi menggunakan pewarnaan etidium bromida.

PCR RFLP gen ACTN3 :Primer dari *Gen Bank Sequence Database - NCBI* (accession number

NG_013304.2, GeneID : 641451071) yang digunakan untuk *amplifikasi* adalah *primer forward* 5'-CTG TTG CCT GTG GTA AGT GGG-3' dan *reverse primer* 5'-TGG TCA CAG TAT GCA GGA GGG-3'. Reaksi PCR terdiri atas *forward primer* 1,0 µL, *reverse primer* 1,0 µL, GoTaq(R) *Green Master Mix* (Promega, USA) 12,5 µL, sampel DNA 2,0 µL dan *Nucleus Free Water* 8,5 µL hingga volume 25 µL. Program PCR yang digunakan adalah *denaturasi* awal 95°C selama 3 menit, *denaturasi* 95°C selama 30 detik, *annealing* 53°C selama 20 detik, *extension* 72°C selama 18 detik, dilakukan sebanyak 35 siklus dan terakhir *final extension* 72°C selama 10 menit. Produk PCR yang didapat sebesar 291 bp, kemudian dipotong oleh enzim restriksi *DdeI* dengan komposisi sebagai berikut NE 10x Buffer sebanyak 1,0 µL, *Acetylated BSA* 0,1 µL, Enzim restriksi *DdeI* 0,2 µL, *Nucleus Free Water* 3,7 µL dan produk PCR 5,0 µL, kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Hasil PCR-RFLP kemudian dielektroforesis

menggunakan larutan TAE dan gel agarose 4% dengan tegangan sebesar 100 Volt selama 50 menit dan divisualisasi menggunakan pewarnaan etidium bromida.

HASIL

Klasifikasi polimorfisme gen NRF2 ini dibagi menjadi 3 varian gen yaitu: AA, AG, GG. Berdasarkan tabel 1 varian gen NRF2 secara mayoritas pada siswa sekolah sepak bola adalah genotip AA (*homozygote*) sebanyak 29 orang (87,90%), sedangkan genotip AG sebanyak 4 orang (12,12%) (*heterozygote*). Varian genotip GG tidak ditemukan dalam penelitian ini.

Klasifikasi polimorfisme gen ACTN3 dibagi menjadi 3 varian gen yaitu RR, RX, dan XX. Berdasarkan tabel 2 varian gen ACTN-3 secara mayoritas pada siswa sekolah sepak bola adalah genotip RX (*heterozygote*) sebanyak 14 orang (42,4%), sedangkan genotip XX sebanyak 13 orang (39,4%) (*homozygote*) dan varian genotip RR sebanyak 6 orang (18,2%) (*homozygote*).

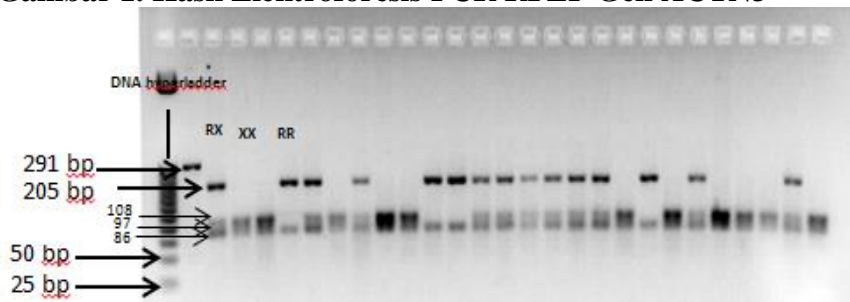
Tabel 1. Distribusi data varian gen NRF2 A/G terhadap usia pada siswa sekolah sepak bola (SSB Sejati Pratama dan SSB USU) tahun 2017(n = 33)

Usia	Genotip NRF2		Total (%)
	AA (%)	AG (%)	
11 tahun	8(24,2%)	1(3,0 %)	9(28,3%)
12 tahun	8(24,2%)	2(6,1%)	10 (30,3%)
13 tahun	10(30,3%)	1(3,0%)	11 (33,3%)
14 tahun	3 (9,1%)	0(0%)	3 (9,1%)
Total	29(87,9)	4(12,1%)	33 (100%)

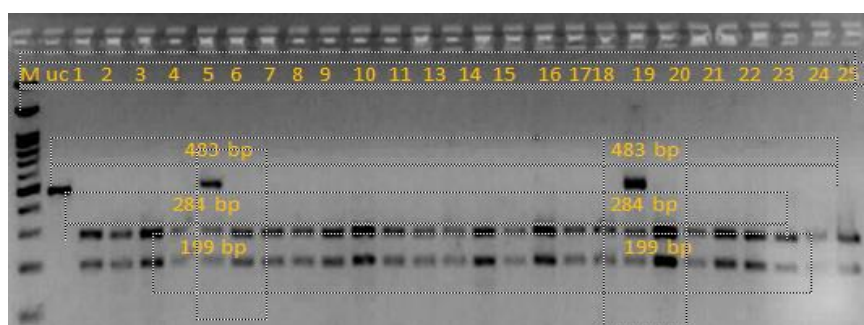
Tabel 2. Distribusi data varian gen ACTN-3 Ekson 16 R/X terhadap usia pada siswa sekolah sepak bola (SSB Sejati Pratama dan SSB USU) tahun 2017(n = 33)

Usia	Genotip ACTN-3			Total (%)
	RR (%)	RX (%)	XX (%)	
11 tahun	2 (6,1%)	4 (12,1%)	3 (9,1%)	9(27,3%)
12 tahun	2 (6,1%)	5 (15,2%)	3 (9,1%)	10 (30,3%)
13 tahun	2 (6,1%)	4 (12,1%)	5 (15,2%)	11 (33,3%)
14 tahun	0 (15,6%)	1 (3%)	2 (6,1%)	3 (9,1%)
Total	6 (18,2%;)	14 (42,4%)	13 (39,4%)	33 (100%)

Gambar 1. Hasil Elektroforesis PCR RFLP Gen ACTN3



Gambar 2. Hasil Elektroforesis PCR RFLP Gen NRF2



DISKUSI

Pada penelitian ini Gen NRF 2 varian genotip AA paling banyak diperoleh yaitu sebanyak 29 orang (87,9%) dan varian genotip AG sebanyak 4 orang (12,1%), namun untuk genotip GG tidak ada diperoleh. Hal ini sama dengan penelitian yang dilakukan di negara Polandia, Spanyol, Israel dimana genotip AA paling banyak sedangkan genotip GG juga tidak ditemukan, hal ini mungkin terkait dengan etnis caucasian (4,12–14)

Pada penelitian ini, genotif RX memiliki persentase terbesar (42,4%) diikuti genotif XX (39,39%) dan RR (18,2%). Penelitian lain tentang ACTN-3 di Indonesia juga memperoleh hasil yang sama dengan penelitian ini. penelitian Ambardini varian genotif RX (72,5%), diikuti RR (14,9%), dan XX (12,6%);(15) penelitian Candrawati (16) menunjukkan varian genotif RX; 54,9%, XX; 26,8% dan RR; 18,3% (n=82). Pada populasi Polandia, varian genotif RX menunjukkan persentase yang paling besar (43,75%) (17). Penelitian Ahmetov

(18) pada atlet enduren di Rusia juga menunjukkan genotif RX 55% sedangkan genotif RR 39,3% (n=456). Kothari (19), dan Fattahi & Najmabadi (20) yang menyatakan bahwa genotif RX ditemukan lebih banyak pada bangsa Asia dibandingkan RR dan XX. Sebaliknya, hasil ini berbeda di Afrika (Kenya, Nigeria dan Afrika Selatan), genotif RR lebih banyak dibandingkan genotif RX dan XX (10,21)

KESIMPULAN

Varian polimorfisme pada gen *Nuclear respiratory factor* (NRF2) secara mayoritas adalah genotip AA dan di Indonesia penelitian ini belum pernah dilakukan. Varian genotip ACTN-3 pada penelitian ini adalah secara RX (42,4%), XX (39,4%) dan RR (18,2%), ini membuktikan bahwa pada suku bangsa Asia genotip RX ditemukan lebih banyak dibandingkan RR dan XX.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr.med.dr.

Yahwardiah Siregar yang telah memberi izin menggunakan DNA yang tersimpan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara dan yang mendanai pengumpulan sampel sel bukal sampai proses isolasi DNA, terima kasih kepada Roy Wilson, Binayanti dan Karin yang telah bekerja keras mengumpulkan sampel sel bukal dan melakukan isolasi DNA di Laboratorium Terpadu USU.

DAFTAR PUSTAKA

1. Larkin P, Connor DO. Talent identification and recruitment in youth soccer: Recruiter 's perceptions of the key attributes for player recruitment. 2017;1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0175716>
2. Kambouris M, Ntalouka F, Ziogas G, Maffulli N. Predictive Genomics DNA Profiling for Athletic Performance. 2012;229–39.
3. Morgans R, Orme P, Anderson L, Drust B. ScienceDirect Principles and practices of training for soccer. J Sport Heal Sci [Internet]. 2014;3(4):251–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jshs.2014.07.002>
4. Eynon N, Alves AJ, Sagiv M, Yamin C, Sagiv M, Meckel Y. Interaction between SNPs in the NRF2 gene and elite endurance performance. 2010;78–81.
5. Eynon N, Moran M, Birk R, Lucia A. The champions' mitochondria: is it genetically determined? A review on mitochondrial DNA and elite athletic performance. Physiol Genomics [Internet]. 2011;43(13):789–98. Available from: <http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physiolgenomics.00029.2011>
6. Drake JC, Wilson RJ, Yan Z. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal

- muscle. *FASEB J.* 2016;30(1):13–22.
7. Rusip G, Suhartini SM, Suen AB. Influence of exercise on plasma ammonia and urea after ingestion beverages of carbohydrate electrolyte. *Influence of exercise on plasma ammonia and urea after ingestion beverages of carbohydrate electrolyte.* 2018;
 8. Quinlan KGR, Seto JT, Turner N, Vandebrouck A, Floetenmeyer M, Macarthur DG, et al. a -Actinin-3 deficiency results in reduced glycogen phosphorylase activity and altered calcium handling in skeletal muscle. *Hum Mol Genet.* 2010;19(7):1335–46.
 9. Candrawati S, Ag NS, Hk MN, A PE, Rs MC. Hubungan Polimorfisme Gen ACTN3 dengan Kelincahan , Daya Ledak , dan Kecepatan The Relationship of ACTN3 Gene Polymorphisms with Agility , Explosive Power , and Speed. *2017;29(4):329–34.*
 10. Macarthur DG, Seto JT, Chan S, Quinlan KGR, Joanna M, Turner N, et al. An Actn3 knockout mouse provides mechanistic insights into the association between a -actinin-3 deficiency and human athletic performance. *2008;17(8):1076–86.*
 11. Ahmetov II, Vinogradova OL, Williams AG. Gene Polymorphisms and Fiber-Type Composition of Human Skeletal Muscle. *2012;292–303.*
 12. Ahmetov II, Fedotovskaya ON. Current Progress in Sports Genomics [Internet]. 1st ed. Vol. 70, *Advances in Clinical Chemistry.* Elsevier Inc.; 2015. 247-314 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.acc.2015.03.003>
 13. Eynon N, Ruiz JR, Bishop DJ, Santiago C, Gomez-Gallego F, Lucia A, et al. The rs12594956 polymorphism in the NRF-2 gene is associated with top-level Spanish athlete's performance

- status. *J Sci Med Sport*. 2013;16(2):135–9.
14. Maciejewska-Karłowska A, Leońska-Duniec A, Ciężczyk P, Sawczuk M, Eider J, Ficek K, et al. The GABPB1 gene A/G polymorphism in Polish rowers. *J Hum Kinet*. 2012;31(31):115–20.
15. Ambardini RL. Hubungan Antara Polimorfisme R577X Gena ACTN3 Dan Performa Fisik Dalam Olahraga Atlet Indonesia. In Yogyakarta; 2015.
16. Candrawati S, AG NS, HK MN, A PE, RS MC, AR SS. Hubungan Polimorfisme Gen ACTN3 dengan Kelincahan , Daya Ledak , dan Kecepatan. *J Kedokt Brawijaya*. 2017;29(4):329–34.
17. Holdys J, J K, D. S, P G. POLYMORPHISM OF THE α - ACTN3 GENE IN INDIVIDUALS PRACTISING DIFFERENT. 2011;101–6.
18. Ahmetov II, Druzhevskaya AM, Astratenkova I V., Popov D V., Vinogradova OL, Rogozkin VA. The ACTN3 R577X polymorphism in Russian endurance athletes. *Br J Sport Med*. 2010;44(9):649–52.
19. Kothari ST, Chheda P, Chawla S, Chatterjee L, Chaudhry SK, Das BR. ACTN3 R577X polymorphism in Asian Indian athletes. *Int J Hum Genet*. 2011;11(3):149–53.
20. Fattahi Z, Najmabadi H. Prevalence of ACTN3 (the athlete gene) R577X polymorphism in Iranian population. *Iran Red Crescent Med J*. 2012;3(10).
21. Bernasovska J, Boronova I, Poracova J, Blascakova MM, Szabadosova V, Ruzbarsky P, et al. ACTN3 Genotype Association with Motoric Performance of Roma Children. *Int J Soc Behav Educ Econ Bus Ind Eng*. 2014;8(11):3735–8.