

**DETEKSI MUTASI EKSON 2 GEN β -GLOBIN DAN DAERAH PENGAPITNYA
PADA PEMBAWA SIFAT β -THALASSEMIA DENGAN METODE *POLYMERASE
CHAIN REACTION-SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM*
(PCR-SSCP)**

**MUTATION DETECTION OF EXON 2 β -GLOBIN GENE AND ITS FLANKING
REGIONS ON β -THALASSEMIA CARRIER BY USING *POLYMERASE CHAIN
REACTION-SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM*
(PCR-SSCP)**

Priyambodo^{1*}, Niken Satuti Nur Handayani²

¹Mahasiswa Program Pascasarjana Fakultas Biologi,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

* priyambodo@mail.ugm.ac.id, Sinduadi, Mlati, Sleman, DIY, +6285236925774
²Laboratorium Genetika Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Thalassemia is a hereditary disorder with autosomal recessive inheritance pattern. In Indonesia, 10 % of the population is thought to be carriers of thalassemia. β -thalassemia carrier has the highest prevalence rate among other hemoglobin-related genetic disorders. There were 21 individuals of 96 thalassemia screening participants who showed β -thalassemia carrier indications based on the results of hematological test. This study aims to perform the molecular detection of mutations in exon 2, the longest exon, of β -globin gene and its flanking regions by using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) as a confirmatory test for the hematological test. DNA of each individual suspected β -thalassemia carriers was isolated from blood samples and was used as template for amplification of the exon 2 and its flanking regions. Individuals with mutant alleles will show more than two DNA bands. PCR-SSCP results showed that among 21 carries mentioned above there were 4 individuals who have mutations in the region.

Keywords: β -thalassemia, exon 2, carrier, mutation detection, PCR-SSCP

ABSTRAK

Thalassemia merupakan kelainan herediter dengan pola pewarisan autosomal resesif. Di Indonesia 10% penduduknya diduga merupakan pembawa sifat thalassemia. β -thalassemia memiliki angka prevalensi tertinggi di antara kelainan genetik terkait hemoglobin lainnya. Dari 96 peserta skrining thalassemia terdapat 21 individu yang menunjukkan indikasi pembawa sifat β -thalassemia berdasarkan hasil pemeriksaan hematologis. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan deteksi molekuler mutasi ekson 2 gen β -globin dan daerah pengapitnya dengan metode *polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism* (PCR-SSCP) sebagai uji konfirmasi (*confirmatory test*) terhadap hasil pemeriksaan hematologis. Ekson 2 gen β -globin merupakan ekson dengan sekuens terpanjang pada gen β -globin. DNA setiap individu terduga pembawa β -thalassemia diisolasi dari sampel darah dan digunakan sebagai *template* untuk amplifikasi ekson 2 gen β -globin dan daerah pengapitnya. Individu dengan alel mutan akan menunjukkan lebih dari dua pita DNA. Hasil PCR-SSCP menunjukkan diantara 21 individu tersebut di atas, terdapat 4 individu pembawa yang memiliki mutasi pada daerah yang diteliti.

Kata kunci: β -thalassemia, ekson 2, pembawa, deteksi mutasi, PCR-SSCP

1 PENDAHULUAN

Thalassemia merupakan kelainan genetik yang disebabkan karena kurangnya sintesis rantai globin pembentuk hemoglobin (Hb) yang sering ditemukan di daerah Mediterania, Afrika, Asia Selatan dan Asia Tenggara [1]. Beta (β) thalassemia merupakan kelainan herediter pada darah dengan pola pewarisan autosomal resesif akibat gangguan pembentukan rantai β -globin pada hemoglobin sehingga produksi Hb berkurang, produksi eritrosit berkurang, dan menyebabkan anemia [2]. β -thalassemia berdasarkan genotipnya dikelompokkan menjadi β -thalassemia mayor, β -thalassemia intermedia dan β -thalassemia minor. β -thalassemia mayor dan β -thalassemia intermedia membawa gen resesif homozigot sehingga memerlukan transfusi darah secara rutin, sedangkan β -thalassemia minor membawa gen heterozigot. Kerusakan pada β -glogin disebabkan karena adanya mutasi di gen β -globin yang terletak pada kromosom nomor 11 [3]. Gen β -globin memiliki tiga buah ekson, ekson 2 mempunyai ukuran terbesar pada gen ini. Mutasi yang umumnya berupa substitusi, insersi atau delesi, dapat terjadi pada ketiga ekson tersebut [4].

Thalassemia yang merupakan kelainan yang banyak dijumpai di daerah Mediteranian, Timur Tengah, dan banyak daerah lainnya, telah banyak diteliti secara klinis maupun molekular [5]. Di Indonesia, data molekular terkait kelainan thalassemia sangat terbatas, terlebih untuk pembawa sifat thalassemia. Penelitian yang pernah dilaporkan adalah pola mutasi pada pembawa sifat β -thalassemia di Palembang dengan menggunakan primer *Amplification Refractory Mutation System* (ARMS) [4].

Peningkatan jumlah penyandang β -thalassemia di Indonesia terus terjadi setiap tahun, sehingga diperlukan strategi untuk menekan populasi penyandang. Strategi global *World Health Organization* (WHO) dalam mengurangi jumlah populasi penyandang kelainan genetik meliputi skrining massal, skrining individu yang mempunyai riwayat thalassemia pada keluarga, skrining premarital, diagnosis prenatal, dan terminasi kehamilan [6]. Skrining pembawa sifat kelainan genetik ini sangat efektif, sebagaimana di Israel yang mampu menekan prevalensi lahirnya bayi thalassemia dari 13 bayi per 10.000 kelahiran per tahun menjadi 5 bayi per 10.000 [7].

Pembawa sifat β -thalassemia tidak dapat dilihat secara fisik, karena fenotipnya normal [8]. Prosedur sederhana untuk mengetahui pembawa sifat β -thalassemia dilakukan dengan analisis hematologi. Pembawa sifat β -thalassemia dapat dilihat dengan gejala mikrositosis dan penurunan jumlah Hb pada sel darah merah, namun metode ini masih dimungkinkan terjadi kesalahan jika terdapat berbagai macam kelainan hematologis pada populasi tersebut sebagaimana yang pernah terjadi di Sardinia [5]. Diagnosis molekular akhirnya dikembangkan untuk menyempurnakan deteksi pembawa sifat thalassemia [9].

Yayasan Thalassemia Indonesia (YTI) cabang Yogyakarta bekerja sama dengan laboratorium klinis Prodia dan Fakultas Biologi UGM mulai tahun 2012 mengadakan agenda skrining bagi masyarakat yang mempunyai riwayat keluarga thalassemia. Pada skrining tahun 2012, terdapat 16 individu dari 47 peserta yang terduga pembawa sifat β -thalassemia berdasarkan profil klinis dari pemeriksaan darah, sedangkan hasil skrining pada tahun 2013 dari 49 peserta terdapat 5 individu terduga pembawa sifat β -thalassemia. Sebagai kelanjutan tes tersebut disarankan adanya diagnosis molekular.

Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) telah dikembangkan untuk mendeteksi mutasi pada banyak kasus, baik pada manusia maupun hewan. Deteksi menggunakan PCR-SSP dapat melihat perubahan satu sekuens basa nukleotida melalui migrasi pita DNA pada elektroforesis dengan gel poliakrilamid [10]. PCR-SSCP selain dapat sensitif mendeteksi adanya mutasi pada DNA, juga tidak menggunakan unsur radioaktif dan mudah untuk diaplikasikan [11]. Oleh karena itu dalam penelitian ini digunakan metode PCR-SSCP sebagai uji konfirmasi (*conformatory test*) dari data pemeriksaan darah yang telah dilaksanakan.

2 METODE PENELITIAN

2.1 Pengambilan Sampel

Sampel darah diperoleh dari 96 peserta skrining pembawa sifat thalassemia yang diselenggarakan oleh Yayasan Thalassemia Indonesia/Perhimpunan Orangtua Penyandang Thalassemia Indonesia (YTI/POPTI) cabang Yogyakarta bekerja sama dengan laboratorium klinik Prodia dan Fakultas Biologi UGM. Sampel darah disimpan dalam tabung *vacutainer EDTA* 3 ml dan dimasukkan dalam *freezer* -20°C.

2.2 Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan berdasarkan instruksi kit isolasi *GeneAid Genomic DNA Mini Kit for Frozen Blood Protocol* dengan modifikasi, yang meliputi tahap lisis sel, pengikatan DNA pada kolom *silica gel*, pencucian, dan elusi DNA. Hasil isolasi DNA diuji kualitatif dengan elektroforesis gel agarosa 0,8 % dalam TBE 1× 100 Volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis direndam dalam *ethidium bromide* 30 menit dan dilihat dengan *UV transiluminator*.

2.3 Amplifikasi Ekson 2 Gen β -Globin

Amplifikasi daerah ekson 2 gen β -globin dilakukan pada mesin *thermocycler* (*Eppendorf Mastercycler Personal*) dengan menggunakan PCR kit *KAPA 2GTM Fast Ready Mix*. Pasangan primer yang digunakan adalah 5' TAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATT 3' dan 5' CCTTCCTATGACATGAACTTAACATT 3' (Gupta&Argawal, 2003).

Amplifikasi ekson 2 gen β -globin dilakukan dengan campuran 12,5 μ l PCR *master mix*, 3 μ l DNA *template*, 1,25 μ l *forward primer*, 1,25 μ l *reverse primer* dan 7 μ l ddH₂O steril. Campuran diinkubasi dalam mesin *thermocycler* dengan kondisi suhu *pre-denaturation* 95°C selama 3 menit, 35 siklus (*denaturation* 95°C selama 15 detik, *annealing* 53°C selama 30 detik, *elongation* 72°C selama 45 detik), *post-elongation* 72°C selama 5 menit dan *colling* 4°C selama 5 menit.

Hasil amplifikasi ekson 2 gen β -globin diuji kualitatif dengan elektroforesis gel agarosa 1% dalam TBE 1× 50 Volt 45 menit. Hasil elektroforesis direndam dalam *ethidium bromide* 30 menit dan dilihat dengan *UV transiluminator*.

2.4 PCR-SSCP

PCR-SSCP dilakukan berdasarkan metode Fitriani (2009) dengan modifikasi. Sebanyak 10 µl produk PCR ditambah dengan 15 µl *loading buffer* (campuran *bromo phenol blue*, *formamide*, EDTA, gliserol) diinkubasi dalam *waterbath* 95⁰C selama 10 menit, kemudian secepatnya dimasukkan dalam *freezer* -20⁰C selama 10 menit. Sebanyak 25 µl campuran produk PCR dan *loading buffer* dimasukkan dalam sumuran gel poliakrilamid (*acrylamide:bis-acrylamide* 29:1). Elektroforesis dilakukan pada 100 Volt, 50 mA selama 100 menit dalam TBE 0,5x. Visualisasi hasil PCR-SSCP dilakukan dengan pewarnaan *ethidium bromide* yang diamati dengan *UV transiluminator*.

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel darah yang diperoleh dari 96 peserta skrining thalassemia dilakukan serangkaian tes hematologis yang mencakup uji darah lengkap, pemeriksaan *mean corpuscular*, analisis hemoglobin dan pemeriksaan gambaran darah tepi. Uji darah lengkap memeriksa beberapa parameter hematologis di dalam tubuh, yaitu jumlah hemoglobin, eritrosit, leukosit, trombosit, dan hematokrit. Pemeriksaan *mean corpuscular* meliputi tiga parameter yaitu volume rata-rata sel darah merah (*mean corpuscular volume/MCV*), kadar rata-rata hemoglobin pada setiap sel darah merah (*mean corpuscular haemoglobin/MCH*) dan rata-rata konsentrasi hemoglobin dalam tiap sel darah merah (*mean corpuscular haemoglobin concentration/MCHC*). Analisis hemoglobin memberikan informasi terkait jumlah HbA₂ dan HbF dalam eritrosit, sedangkan pemeriksaan darah tepi akan memberikan gambaran terkait bentuk dan ukuran dari sel darah yang diperiksa.

Data pemeriksaan hematologis yang didapat dari 96 peserta skrining thalassemia tersebut selanjutnya dilakukan pengamatan dari beberapa parameter yang menunjukkan adanya kecenderungan ke arah pembawa sifat thalassemia. Parameter pertama yang diamati adalah kadar hemoglobin dan eritrosit di dalam tubuh. Thalassemia merupakan kelainan yang disebabkan tidak terbentuknya rantai globin dalam jumlah normal, sehingga kadar hemoglobin yang rendah dapat menjadi satu gejala seseorang merupakan pembawa sifat thalassemia. Namun dijumpai seseorang yang merupakan pembawa sifat thalassemia tetapi memiliki jumlah hemoglobin normal. Keadaan ini dapat terjadi karena tubuh mensintesis eritrosit dalam jumlah yang lebih banyak daripada normal.

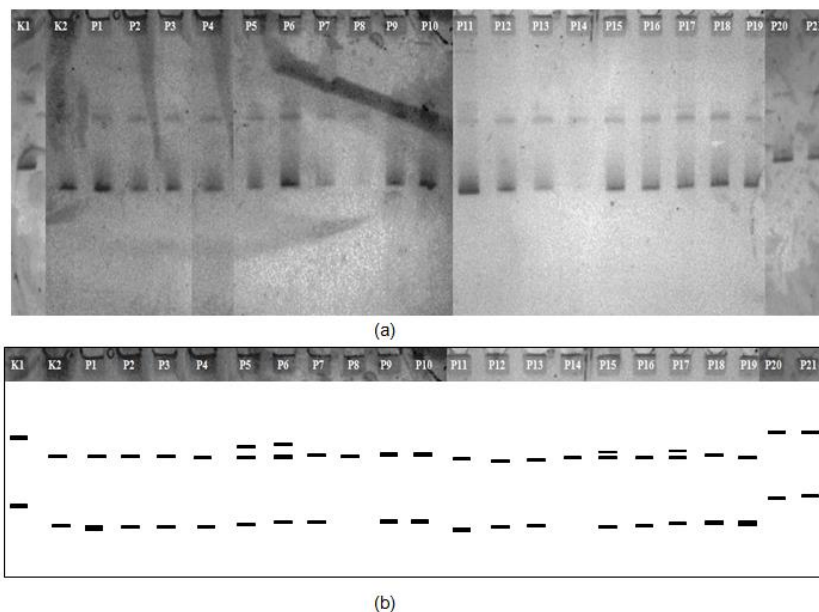
Parameter *mean corpuscular* memberikan informasi terkait kondisi eritrosit setiap peserta skrining. Pengukuran MCV menunjukkan rata-rata ukuran eritrosit seseorang. Nilai MCV normal untuk manusia dewasa adalah 80-100 fL, sedangkan untuk anak-anak adalah 69-93 fL. Apabila rata-rata volume eritrosit seseorang lebih rendah daripada nilai rujukan maka disebut mikrosit, sedangkan apabila lebih tinggi disebut makrosit. Adanya gejala mikrosit merupakan salah satu tanda bahwa seseorang tersebut merupakan pembawa sifat thalassemia. MCH menunjukkan rata-rata kandungan hemoglobin dalam setiap sel darah merah seseorang. Nilai MCH normal bagi orang dewasa adalah 26 – 34 pg, sedangkan untuk anak-anak berkisar antara 23 – 31 pg. Nilai MCH yang lebih rendah dibandingkan normal ditunjukkan dengan warna yang lebih pudar juga dilihat di bawah mikroskop. Gejala ini disebut hipokromik yang juga merupakan pertanda pembawa

sifat thalassemia. Parameter ke tiga yang diamati adalah MCHC yang menunjukkan konsentrasi hemoglobin dalam tiap sel darah merah. Nilai MCHC normal baik untuk dewasa maupun anak-anak yaitu berkisar antara 32 hingga 36 g/dL.

Dalam pemeriksaan hematologis, dilakukan pula pengamatan untuk menganalisis jenis hemoglobin dalam darah dengan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC). Analisis Hb dengan menggunakan HPLC ini memberikan informasi terkait komposisi HbA₂ dan HbF dari setiap individu. HbA₂ merupakan jenis hemoglobin yang tersusun atas rantai $\alpha_2\delta_2$ sedangkan HbF adalah jenis hemoglobin yang tersusun atas rantai $\alpha_2\gamma_2$. Pada individu pembawa sifat thalassemia beta, terjadi reduksi sintesis rantai β -globin, sehingga jenis HbA dalam tubuh berkurang. Kondisi ini direspon oleh tubuh dengan membentuk rantai δ -globin sehingga jumlah HbA₂ di dalam tubuh meningkat (lebih dari 3,6%). Peningkatan pada HbF di atas 1 % juga merupakan salah satu gejala yang terjadi pada individu pembawa sifat thalassemia beta.

Pengamatan hasil tes hematologis menunjukkan bahwa terdapat 21 dari 96 sampel yang mengindikasikan pembawa sifat thalassemia. Sebagai kelanjutan pemeriksaan hematologis direkomendasikan dilakukannya uji DNA. Metode PCR-SSCP digunakan sebagai *confirmatory test* terhadap hasil tes hematologis yang telah dilakukan. PCR-SSCP digunakan untuk deteksi molekuler pembawa sifat thalassemia karena mampu mendeteksi perbedaan satu basa nukleotida pada untai tunggal DNA pada elektroforesis gel poliakrilamid [12].

Prinsip kerja PCR-SSCP dimulai dengan proses denaturasi untai ganda DNA menjadi untai tunggal DNA. Amplikon DNA yang telah dicampur dengan *loading buffer* dimasukkan dalam *waterbath* 95°C selama 10 menit dan sesegera mungkin dimasukkan dalam es. Langkah ini bertujuan agar untai DNA yang telah terdenaturasi tidak kembali membentuk struktur *double helix*. Hasil PCR-SSCP pada ekson 2 gen β -globin ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1 (a) Hasil PCR-SSCP region II gen β -globin. Keterangan: K1: Kontrol 1, K2: Kontrol 2, P1-P21: Individu terduga pembawa sifat β -thalassemia, (b) Representasi pita tunggal DNA hasil PCR-SSCP region II gen β -globin. Keterangan: K1: Kontrol 1, K2: Kontrol 2, P1-P21: Individu terduga pembawa sifat β -thalassemia.

Gambar 1 menunjukkan empat dari 21 individu yang terindikasi pembawa sifat β -thalassemia mempunyai tiga pita DNA. Keempat individu tersebut adalah P5, P6, P17 dan P17, sedangkan 17 individu lain menunjukkan hanya ada dua pita DNA. Adanya tiga pita DNA pada hasil elektroforesis menunjukkan alel yang heterozigot. Adanya pasangan alel yang berbeda menyebabkan lebih dari dua macam konformasi yang terbentuk dalam gel poliakrilamid. Konformasi yang berbeda dari untai tunggal DNA yang terbentuk pada gel poliakrilamid akan mengakibatkan perbedaan laju migrasinya, sehingga akan membentuk lebih dari dua pita DNA.

Dalam penelitian ini diketahui bahwa individu P5, P6, P17 dan P17 mengalami mutasi pada ekson 2 gen β -globin, sedangkan 17 individu *suspect* lain tidak terdeteksi mengalami mutasi pada daerah ekson 2. Individu yang menunjukkan hasil negatif pada *confirmatory test* pada ekson 2 ini dapat mengalami mutasi pada bagian gen yang lain karena mutasi gen β -globin penyebab β -thalassemia diketahui lebih dari 60 macam [5].

4 PENUTUP

4.1 Simpulan

Terdapat empat dari 21 individu terduga pembawa sifat β -thalassemia dengan mutasi pada ekson 2 dan daerah pengapitnya.

4.2 Saran

Perlu dilakukannya metode PCR-SSCP pada daerah gen β -globin yang lain untuk menentukan letak mutasi pada sampel dengan hasil deteksi negatif. Metode *direct DNA sequencing* diperlukan untuk menentukan jenis mutasi pada individu pembawa sifat thalassemia yang telah diketahui letak mutasinya.

4.3 Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini dilaksanakan dengan sebagian dana Hibah Penelitian UPR-BOPTN-UGM 2013 no. LPPM-UGM/1168/LIT/2013 atas nama Niken Satuti Nur Handayani.

5 PUSTAKA

- [1] Hoffbrand, A.V., Pettit, J.E., Moss, P.A.H. 2006. *Essential Haematology Fifth Edition*. Massachusetts: Blackwell Science, Inc.
- [2] Galanello, R. & Origa, R. 2010. Beta Thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 5 (1): 1-15.
- [3] Cao, Antonio & Moi, Paolo. 2002. *Regulation of the Globin Gene*. International Pediatric Research Foundation, Inc. USA.

- [4] Sofro, A.S.M, Clegg, J.B., F, Lanni, Sianipar, O., Himawan, & Liliani, R.V. 1996. Application of ARMS promoters for their molecular characterization of β -thalassemia carrier in Palembang, South Sumatra. *Indonesian Journal of Biotechnology*. Vol 12: 59-65.
- [5] Cao, Antonio & Galanello, Renzo. 2010. Beta-thalassemia. *GeneTest Review*. Genetics in Medicine 12:2.
- [6] Ansari, SH., Shamsi, TS. 2010. *Thalassemia Prevention Programme*. Karachi: National Institute of Blood Disease and Bone Marrow Transplantation.
- [7] Zlotogora, J., Carmi, R., Lev, B., Shalev, Stavit A. 2009. A Targeted Population Carrier Screening Program for Severe and Frequent Genetic Diseases in Israel. *European Journal of Human Genetics*. 17: 591 – 597.
- [8] Wintrobe, Maxwell M. 2009. *Clinical Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- [9] Calzolari, Roberta, McMorrow, Tara, Yannoutsos, Nikos, Langeveld, An, Grosveld, Frank. 1999. Deletion of a Region that is a Candidate for the Difference between the Deletion Forms of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin and $\delta\beta$ -thalassemia Affects β - but not γ -Globin Gene Expression. *European Molecular Biology Organization*. 18: 4 pp 949 – 958.
- [10] Gruszczynska J, Brokowska K, Charon KM, & Swiderek WP. 2005. Restriction Fragment Length Polymorphism of Exon 2 Ovar-DRB1 Gene in Polish Heath Sheep and Polish Lowland Sheep. *J Appl Genet* 46:311-314.
- [11] Kakavas, V, Konstantinos,, Plageras, P., Vlachos, Antonios, Papaioannou, A. 2008. PCR-SSCP: A Method for the Molecular Analysis of Genetics Disease. *Mol Biotechnol* (2008) 38:155–163
- [12] Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Res* 1991 1: 34-38.