

METODA PEMERIKSAAN POLYMERASE CHAIN REACTION RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM PADA DETEKSI GENOTIP POLIMORFISME C-509T GEN TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA 1 PENDERITA THALASSEMIA BETA MAYOR

Eriska Riyanti*, Roosye R. Oewen*, Edeh R. Haroen**,
Ani Melani Maskoen**, Mieke Hemiawaty Satari**

*Bagian Kedokteran Gigi Anak
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran
**Bagian Biologi Oral
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran

ABSTRAK

Thalassemia beta mayor merupakan bentuk terparah dari semua jenis thalassemia karena manifestasi klinis umumnya muncul setelah 4-6 bulan pertama kehidupan. Penderita mengalami anemia berat dengan hematokrit kurang dari 20% sehingga bergantung pada pemberian transfusi darah. Gangguan rantai globin tersebut dapat terjadi pada rantai alfa atau rantai beta dan muncul pada individu yang mempunyai sifat homozigot atau heterozigot. Thalassemia beta disebabkan oleh mutasi kromosom 11 yang memengaruhi seluruh produksi rantai beta seperti transkripsi, translasi, dan kestabilan produksi rantai globin beta. Pemeriksaan alel pada polimorfisme C-509T Gen *TGF Beta 1* menggunakan metode PCR-RFLP. DNA yang berhasil diisolasi kemudian dilakukan PCR dengan menggunakan primer TLR dan TLF untuk memperoleh fragmen DNA yang didalamnya terdapat basa target untuk mutasi *TGF Beta 1*. Produk PCR tersebut selanjutnya didigesti dengan enzim restriksi *Ec08II*. Diperoleh hasil proporsi genotip CC sebesar 1,53%, CT sebesar 63,63%, dan TT sebesar 34,84%, sehingga dapat disimpulkan bahwa genotip CT (heterozigot) merupakan genotip terbesar pada populasi penelitian.

Kata kunci: Thalassemia beta mayor, *Gen TGF Beta 1*, polimorfisme C-509T, PCR-RFLP.

ABSTRACT

Beta thalassemia major is the severe forms of thalassemia because all types of clinical manifestations generally appear after 4-6 months of life. Patients experiencing severe anemia to hematocrit of less than 20% thus depended on the provision of blood transfusion. Globin chain disorders can occur in chains of alpha or beta chains and appear in individuals who have homozygous or heterozygous nature. Beta thalassemia is caused by mutation of chromosome 11 that affect the entire production of beta chains such as transcription, translation, and stability of the production of beta globin chains. Examination for alleles at the C-509T polymorphism of TGF beta 1 gene use the PCR-RFLP method. DNA was isolated and then performed PCR using primers TLR and TLF to obtain DNA fragments of bases in which there is target for mutations of TGF Beta 1. PCR products were then digested with restriction enzyme Ec08II. The results obtained under CC genotype proportion by 1.53%, amounting to 63.63% CT, and TT of 34.84%, thus we can conclude that the CT genotype (heterozygous) is the largest genotyping in population research.

Key words: *beta thalassemia major, the genes TGF beta 1, C-509T polymorphism, PCR-RFLP.*

PENDAHULUAN

Thalassemia adalah sekelompok kelainan genetik heterogen pada sintesis hemoglobin dengan berbagai derajat keparahan. Penyakit ini ditandai dengan tidak adanya atau berkurangnya sintesis rantai globin.¹ Secara umum penyakit ini memperlihatkan anemia kronis yang parah, ditandai dengan wajah yang pucat dan badan yang lemah, letih, dan lesu. Gejala lain yang sering terjadi berupa pembesaran limpa dan hati, pertumbuhan terhambat, serta perubahan pada tulang. Perubahan tulang terjadi disebabkan oleh hiperaktivitas sumsum tulang sehingga mengakibatkan pertumbuhan berlebih tulang frontal, parietal, zigomatikus serta protrusif maksila. Perubahan bentuk ini menghasilkan wajah khas, yaitu *Facies Cooley/facies thalassemia*.^{1,2}

Thalassemia beta merupakan tipe yang paling sering ditemukan. Sekitar 3% dari populasi penduduk dunia memiliki gen thalassemia beta. Penyakit ini tersebar terutama di daerah subtropis yang disebut thalassemia belt, yaitu daerah sekitar Laut Tengah, Afrika bagian utara dan selatan, Timur Tengah, India bagian selatan RRC sampai ke Asia Tenggara termasuk Indonesia. Frekuensi thalassemia beta di Asia Tenggara adalah antara 3-9%. Beberapa daerah di Asia Tenggara sebanyak 40% populasi mempunyai satu atau lebih gen thalassemia. Di Amerika Utara kemungkinan terdapat 750 hingga 1000 penderita thalassemia beta homozigot dan hanya 15 hingga 20 kasus baru terdiagnosis setiap tahunnya.¹⁻³

Saat ini di Indonesia diperkirakan terdapat sekitar 5000 penderita thalassemia beta mayor, dari jumlah tersebut sebanyak kurang lebih 380 penderita thalassemia menjalani perawatan di RSUP Dr. Hasan Sadikin Bandung. Program pendidikan kesehatan, konseling genetik dan diagnosis prenatal dapat membekali keluarga dengan informasi yang lengkap untuk membantu memahami penyakit ini.

Setiap wilayah tempat asal thalassemia memiliki ciri mutasi gen beta globin tertentu. Seperti pada penelitian terdahulu di Polpulasi Sunda mutasi yang paling banyak ditemukan adalah IVS1-nt5 homozigot.⁴ Penanganan pasien dapat dipermudah dengan mengetahui asal atau ras pasien. Di Negara maju seperti Italia, diagnosis gen thalassemia bukan hal baru. Setiap pasangan yang akan menikah melakukan pemeriksaan kesehatan untuk mengetahui gen pembawa thalassemia. Orang Indonesia masih awam terhadap thalassemia sehingga timbul anggapan bahwa penyakit ini hanya diderita oleh individu kelas menengah ke atas. Anggapan ini salah karena penyakit ini tidak membedakan kelas sosial atau jenis kelamin. Hal yang membedakan adalah frekuensi penderita pada etnis tertentu.^{5,6}

Seiring dengan kemajuan zaman, banyak peneliti yang mulai melakukan pemeriksaan gen penderita thalassemia. Pemeriksaan gen dilakukan untuk melihat gen-gen yang terlibat di dalam keparahan tulang penderita. Salah satu gen yang diduga terlibat adalah *Transforming Growth Factor 1(TGF B1)*, yaitu suatu gen yang mengatur pertumbuhan dan memiliki peran mengontrol proliferasi, migrasi, diferensiasi dan kelangsungan hidup

beberapa tipe sel.⁷⁻⁹ Gen ini juga memengaruhi proses-proses embryogenesis, angiogenesis, inflamasi dan penyembuhan luka. Pada tulang gen *GTF B1* memiliki peran penting pada pertumbuhan dan mempertahankan terbentuknya kartilago dan metabolisme tulang. Oleh karena itu metabolisme tulang melibatkan osteoblast dan osteoklas. Osteoblas dan osteoklas mempertahankan keseimbangan antara proses dinamis resorpsi dan pembentukan tulang.⁹

Makalah ini bertujuan untuk mengetahui profil genotip polimorfisme C-509T gen *TGF Beta 1* penderita thalassemia beta mayor.

BAHAN DAN METODE

Objek penelitian adalah penderita thalassemia beta mayor yang dirawat di RSUP Dr. Hasan Sadikin Bandung. Waktu pemilihan subjek penelitian dilakukan pada bulan Januari 2008 sampai dengan juli 2008. Bahan penelitian adalah darah sejumlah 2 ml yang di ambil dari penderita thalassemia beta mayor, kemudian digunakan untuk pemeriksaan gen *GTF Beta 1* di Laboratorium Unit Penelitian Kedokteran Unpad RSUP Dr. Hasan Sadikin Bandung. Pengambilan sampel berdasarkan *consecutive sampling* dan diperoleh 66 orang penderita thalassemia beta mayor.

Pada tahap persiapan yang dilakukan adalah sebagai berikut: (1) Pengajuan proposal etik kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan FK-Unpad/RSUP Dr. Hasan Sadikin Bandung; (2) Informasi diberikan kepada orangtua mengenai penelitian yang dilakukan, kemudian orangtua menandatangani formulir *informed consent*, (3) Skrining thalassemia beta mayor pada pasien yang dirawat di Klinik Thalassemia RSUP Dr. Hasan Sadikin Bandung sesuai dengan status pasien yang telah ada dan merupakan hasil diagnosis yang ditentukan oleh dokter spesialis anak konsultan hematologi-onkologi anak. Sampel darah diambil dari *vena cubiti* sebanyak 2 ml dengan menggunakan *sprit* 10 ml. Apabila *vena cubiti* tidak teraba, darah diambil pada vena di kepala penderita. Darah dimasukkan ke dalam tabung *vacuette* mengandung EDTA sebanyak 2 ml untuk isolasi DNA.

Analisis DNA

Analisis DNA terdiri dari Isolasi DNA dan PCR-RFLP. DNA diisolasi dari darah dengan menggunakan metode Kit Isolasi DNA dari Pharmacia, kemudian 200 ng DNA digunakan sebagai template untuk PCR.

Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Metode RFLP merupakan metode analisis polimorfisme dengan menggunakan enzim spesifik. Primers yang digunakan untuk C-509T adalah:

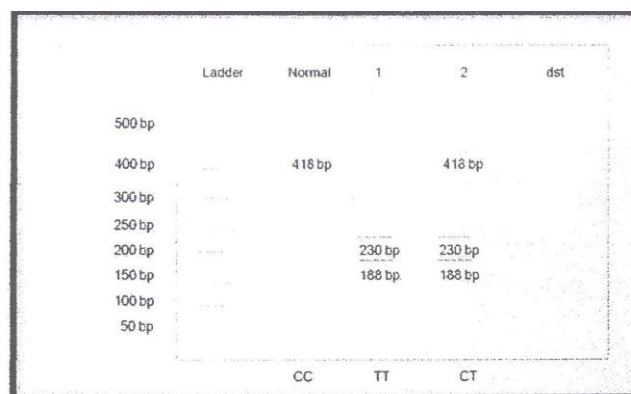
Forward 5'CAGACTCTAGAGACTGCTAG3'

Reverse 3'GCTACCAGAGAAAGAGGAC5'

Tabung berisi campuran PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (Corbette) dengan kondisi PCR sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95⁰C selama 4 menit, dilanjutkan ke siklus suhu yang terdiri dari: (1) Denaturasi pada suhu 95⁰C selama 1 menit; (2) *Annealing* pada suhu 57⁰C selama 1 menit; (3) Ekstensi pada suhu 72⁰C selama 1 menit. Tahapan tersebut dilakukan selama 35 siklus dan dilanjutkan ekstensi akhir pada suhu 72⁰C selama 10 menit.

Pemeriksaan RFLP untuk polimorfisme C-509T gen *TGF BI* dengan menggunakan enzim Eco8II yang mempunyai daerah pengenalan CCTANGG. Alel T akan terpotong menghasilkan fragmen 230 pb dan 188 pb, sedangkan alel C tidak terpotong dengan menggunakan enzim tersebut (418 pb) (Gambar 1)

Campuran enzim restriksi untuk polimorfisme C-509T gen *TGF BI* (volume 10 µL) adalah 1 µL 10x Buffer tango, 0,3 µL enzim Eco8II konsentrasi 10 µ/ µL, serta sebanyak 8,7 µL hasil PCR. Seluruh campuran ini disentrifus selama 20 detik dengan kecepatan 13.000 rpm, dan kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Hasil inkubasi dilakukan elektroforesis selama 60 menit dengan voltase tetap 100 volt. Tahap berikutnya adalah elektroforesis pada gen agarosa. Pediksi hasil pemotongan diperlihatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Pemotongan Hasil RFLP dengan Eco8II

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini diperoleh sebanyak 66 sampel yang memenuhi kriteria pulasi. Selanjutnya pada seluruh sampel darah yang diperoleh dilakukan isolasi DNA dan dilanjutkan dengan PCR. Pemeriksaan PCR menggunakan primers TLR dan TLF untuk memperoleh basa target polimorfisme C-509T gen *TGF β 1*. Gambaran elektroforesis produk PCR berupa pita DNA sebesar 418 pb.

Produk PCR tersebut selanjutnya didigesti dengan enzim restriksi Eco8II, apabila terpotong, gambaran elektroforesis memperlihatkan pita DNA sebesar 230 pb dan 188 pb, keadaan tersebut menandakan terdapatnya alel 509T, sedangkan apabila tidak terpotong maka hanya terlihat produk PCR sebesar 418 pb. Hal itu menandakan adanya alel 509C (normal).

Persentase genotip polimorfisme C-509T gen *TGF β 1* dapat terlihat pada tabel berikut ini:

Tabel 1. Persentase genotip polimorfisme C-509T gen *TGF β 1*

Genotip	n	Persentase (%)
CC	1	1,53
CT	42	63,63
TT	23	34,84
Jumlah	66	100

Gen *TGF β 1* terletak pada lokus 19q13.1 memiliki peran yang besar pada pengaturan proses biologis seperti proliferasi sel, kelangsungan hidup sel, diferensiasi sel, migrasi sel, dan produksi matriks ekstraselular.^{7,8} Pertumbuhan dan perkembangan tulang intramembranous sangat membutuhkan matriks ekstraselular sehingga gen *TGF β 1* memiliki peran yang sangat penting pada proses ini.⁹

Sesuai dengan peran penting gen *TGF β 1* pada remodeling tulang, maka pada pathogenesis kelainan tulang gen ini memiliki peran sebagai stimulator penting pembentukan osteoblast yang menyebabkan terjadinya gerakan kemotaksis, proliferasi dan diferensiasi pada seluruh osteoblast. Namun, pada penelitian in vitro masih diperdebatkan mengenai efek gen *TGF β 1* menyebabkan pertumbuhan matriks dan stimulasi osteoblast sehingga menimbulkan efek menghambat mineralisasi diferensiasi osteoklas dan resorpsi osteoklas yang telah matang.⁷⁻⁹

Terlihat bahwa kedua kelompok alel T merupakan jumlah terbanyak. Hal ini menunjukkan bahwa alel T lebih dominan jika dibandingkan dengan alel C. Alel T merupakan alel mutan, artinya pada saat dilakukan pemotongan dengan menggunakan enzim restriksi tidak dikenali sehingga alel tersebut tidak terpotong, sementara alel C dapat terpotong menghasilkan fragmen 230 pb dan 188 pb.

Beberapa SNP dapat terjadi pada gen *TGF BI*, yaitu pada region promoter maupun struktur gen. Polimorfisme yang terjadi pada region promoter adalah G-800A, G-1639A, C-509T, dan C-1384T. Pada penelitian ini dipilih SNP pada region promoter yaitu pada posisi 509 terjadi perubahan CâT (-CCATCTC/TG-). Penentuan SNP ini didasarkan pada penelitian polimorfisme gen *TGF BI* yang dilakukan pada suku Kaukasia normal dan penderita Alzheimer. Perubahan basa yang terjadi tidak mengubah asam amino yang dihasilkan.⁷⁻⁹

Defisiensi rantai beta dan produksi rantai alfa yang normal menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan pembentukan HbA sehingga kadar sel hemoglobin keseluruhan tiap sel lebih rendah serta sel tampak hipokrom dan mikrositik, akibatnya penderita mengalami anemia berat.¹⁰ Kompensasi dari menurunnya kadar HbA dan meningkatnya produksi HbA₂ serta HbF akan menimbulkan berbagai tandak linis. Kelainan ini bersifat herediter yang terjadi pada 1 dari 4 anak dengan orang tua pembawa sifat thalassemia beta. Kemunculan thalassemia beta mayor seringkali akibat diturunkannya dua mutasi yang berbeda, masing-masing mengenai sintesis globin beta (heterozigot campuran).¹¹⁻¹³

Dua faktor yang berkaitan dengan pathogenesis anemia pada thalassemia beta yaitu pengurangan sintesis globin beta dan komponen hemolisis beta thalassemia. Pengurangan sintesis globin beta berlanjut menjadi pembentukan eritroblas yang abnormal sehingga kadar hemoglobin keseluruhan tiap sel lebih rendah dan sel tampak hipokrom. Perubahan komponen hemolysis beta thalassemia bukan disebabkan oleh kekurangan globin beta tetapi oleh kelebihan rantai alfa globin dengan sintesis normal. Rantai bebas alfa membentuk himpunan yang taklarut dan mengendap dalam eritrosit. Pemasukan ini merusak selaput sel, mengurangi kelenturan dan menyebabkan sel darah merah berkurang.^{1-3,14}

Secara garis besar sindrom thalassemia dibagi dalam dua golongan sesuai dengan kelainan berkurangnya produksi rantai polipeptida. Thalassemia alfa yaitu jika terdapat gangguan pada pembentukan rantai alfa dan thalassemia beta yaitu jika terdapat pengurangan pembentukan atau tidak terditeksinya rantai beta. Thalassemia memiliki spektrum yang luas

yang berkisar dari kelainan morfologik samar sampai penyakit yang membahayakan jiwa. Thalassemia beta mayor atau disebut juga anemia cooley memberikan gejala klinis terparah dari sindrom thalassemia.¹⁻⁴

Telah dilakukan penelitian sebelumnya tentang adanya korelasi yang kuat antara metabolisme tulang dengan aktivitas eritropoiesis. Adanya ekspansi sumsum eritorid pada thalassemia beta mayor menyebabkan kelainan tulang. Hiperplasia sumsum tulang yang hebat mengakibatkan pelebaran tulang sehingga terjadi perubahan tulang yang khas pada penderita thalassemia beta mayor. Peran gen-gen yang terkait pada terjadinya kelainan tulang mulai banyak diteliti. Salah satu gen terkait dan diduga merupakan salah satu yang dapat memperparah terjadinya kelainan tulang adalah adanya mutasi pada gen *TGF B1*. *TGF B1* merupakan kelompok faktor-faktor pertumbuhan polipeptida dimerik yang termasuk protein morfogenik tulang aktivins. Seluruh faktor pertumbuhan dibagi menurut kelompok yang membentuk struktur. Proses tersebut pada umumnya dimulai dengan penyatuan beberapa sel yang membentuk ikatan disulfide intramolekuler. Keseluruhan sel dalam tubuh termasuk epitelial, endotelial, hematopoetik, neuronal, dan jaringan pendukung menghasilkan *TGF Beta* dan memiliki reseptor ini. *TGF B1* mengatur proliferasi dan diferensiasi sel, perkembangan embrionik, pembekuan luka, dan angiogenesis.⁷⁻⁹

Pada level protein proses pembentukan *TGF B1* dimulai dengan sintesa pre *TGF B1* menjadi 390-protein asam amino (pre-pro-*TGF B1*) yang berisi tiga bagian yang berbeda yaitu sinyal peptide (SP; 29 asam amino), *latency associated peptide* (LAP; 249 asam amino), dan *mature peptide* (112 asam amino). Monomer pre-pro-*TGF B1* dihasilkan dalam jumlah banyak sebelum disekresi. Faktor pertumbuhan polipeptida memiliki peran pada pembentukan osteoblast. Osteoblas merupakan struktur tulang yang akan membentuk matriks tulang. Gen *TGF B1* merupakan salah satu bagian dari osteoprogenitor. Pembentukan osteoblas akan diikuti dengan pembentukan osteoklas.⁷⁻⁹

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan genotip CT (heterozigot) merupakan genotip terbesar pada populasi penelitian dan polimorfisme C-509T gen *TGF B1* diduga merupakan salah satu gen yang berperan pada kelainan tulang rahang penderita thalassemia beta mayor. Disarankan

perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bagaimana peran secara lengkap dan menyeluruh polimorfisme C-509T gen *TGF beta 1* pada kelainan tulang rahang tersebut.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih penulis sampaikan kepada kementerian Kesehatan Republik Indonesia yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk mendapatkan bantuan dana penelitian melalui program Risbiniptekdok 2009 dan 2010 sehingga penelitian ini dapat dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Behrman RE *et al.* Williams hematology. Edisi ke-5. New York: McGraw Hill, inc; 1995.
2. Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, *et al.* William's hematology. 5th ed. USA: Mc Graw Hill; 1995. P.12, 14-15, 17.
3. Brain MC, Carbone PP. Current therapy in hematology-encology. 4th ed. Philadelphia: B.C. Decker; 1992. P. 8, 13, 20-21, 23, 47.
4. Brown JM, Thein SL, Weatherall DJ, Mar-Mar K. The spectrum of α -thalassemia in Burma. Br J Haematol 1992;81:309-12.
5. Das KS, Talukder G. Beta globin gene and related disease: A review. Int J Hum Genet 2002; 2(3): 139-52.
6. Greer JP, Foerster J, Lukens JN *et al.* Wintrobe's clinical hematology. 11th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. P. 5,8,10,12,17-18,22,48.
7. Amman AJ. Method of inducing bone growth using tgf beta. [cited 2007 Agu10]. 1989. Available from: <http://www.freepatentsonline.com/5158934.html>.
8. Blobe GC *et al.* Role of transforming growth factor beta in human disease. N Engl J Med 2000;343(3):228.
9. Janssens K, *at al.* Transforming growth factor beta 1 to the bone. Endocrine Reviews. 2005;26(6):743-74.
10. Hoffbrand AV. Petit JE, Moss PAH. Kapita selekta hematologi (Essential Haematology) 4th ed. Jakarta: EGC; 2002. P. 2,5,13,16,20-22,49.

11. Deball S, Gordy FM. Homozygous beta thalassemia in an African-American pediatric patient. *J Clin Pediatric Dentistry* 1997;21(4):315-319, 19,24.
12. Lieberman JR, et al. Current concepts review the role of growth factors in the repair of bone biology and clinical applications. *J Bone and Joint Surgery* 2002;84A(6):1032-7.
13. Lee GR, Foerster J, Lukens JN, et al. *Wintrobe's clinical hematology*. Edisi ke-10. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. P. 1,5,9,14-15,17,19,48.
14. Lie-Injo LE, Cai SP, Wahidiyat I, Moeslichan S, Lim ML, Evangelista L, et al. α -thalassemia mutations in Indonesia and their linkage to α -haplotype. *Am J Hum Genet* 1989;45:971-5.