

VALIDASI METODE TES STRIP (α -Globin Strip Assay) TERHADAP METODE PCR RUTIN DALAM MENDETEKSI MUTASI THALASSEMIA ALFA TIPE SOUTHEAST ASIA (--SEA)

Puspitasari, S.,¹ Supartini S¹, dan Margaretha, I N²

¹Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjajaran, Bandung

²Eijkman Institute for Molecular Biology, Jakarta

E-mail: biologiunpad@unpad.ac.id ; sioeta@yahoo.com

ABSTRACT

The aims of this research was to give information as material study to the test strip (α -Globin Strip Assay) and therefore provide an alternative or replacement method in α -thalassemia mutation detection. DNA produced from three DNA isolation methods (puregene, chelex and spin micro) were used as a genetic material for diagnostic test of strip test method in detecting two α -globin gene deletion SEA type (--SEA), the common α^0 -thalassemia (severe type) compare to PCR routine methods as a gold standard. The method used in this research was an analytical descriptive. Parameters measured were value of sensitivity and spesifisity of strip test on the three DNA template. The result showed all DNAs give 100% of sensitivity value in detecting two α -globin gene deletion SEA type. The specificity value was 94,74 ; 31,58 and 84,21 % from DNA isolated using puregene, chelex and spin micro DNA extraction methods, respectively.

Key words : Thalassemia α , DNA, strip test, sensitivity, specificity.

ABSTRAK

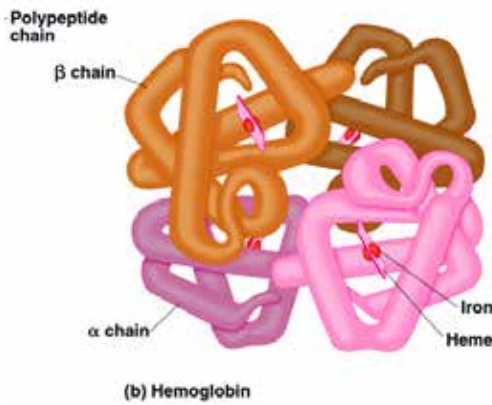
Penelitian ini bertujuan untuk memberikan informasi sebagai bahan kajian terhadap tes strip (α -Globin Strip Assay) sehingga dapat dijadikan metode alternatif atau pengganti dalam mendeteksi mutasi thalassemia α . DNA hasil tiga metode isolasi (*puregene*, *chelex* dan *spin micro*) dijadikan materi genetik untuk uji diagnostik metode tes strip dalam mendeteksi delesi dua gen globin- α tipe SEA (--SEA), jenis thalassemia- α^0 (yang umum) terhadap metode PCR rutin (PCR Multipleks dan PCR RFLP) sebagai *gold standard*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode analisis deskriptif. Parameter yang diukur adalah nilai sensitivitas dan spesifisitas tes strip pada ketiga cetakan DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tes strip memberikan nilai sensitifitas sebesar 100 % dalam mendeteksi delesi dua gen globin- α tipe SEA. Nilai spesifisitas tes strip menggunakan DNA hasil isolasi metode *puregene*, *chelex* dan *spin micro DNA extraction* berturut-turut sebesar 94,74 ; 31,58 dan 84,21 %.

Kata kunci : Thalassemia α , DNA, tes strip, sensitivitas, spesifisitas.

PENDAHULUAN

Thalassemia merupakan penyakit kelainan sintesis hemoglobin yang disebabkan oleh adanya mutasi pada gen-gen globin, ditandai oleh anemia akibat berkurangnya atau tidak disintesisnya satu atau lebih rantai globin pembentuk hemoglobin. Penyakit ini merupakan penyakit resesif autosom yang diturunkan sesuai hukum Mendel dari

orang tua kepada anak-anaknya (Weatherall 1994 dalam Stamatoyannopoulos *et al.*, 1994). Struktur hemoglobin manusia dewasa ditampilkan pada Gambar 1. Berdasarkan jenis rantai globin yang terganggu produksinya terdapat bermacam-macam jenis thalassemia, thalassemia alfa (Thalassemia- α) merupakan salah satu jenis thalassemia yang paling banyak ditemukan di dunia (Weatherall, 1995).



Gambar 1. Struktur Hemoglobin Manusia Dewasa
Sumber : King, 2009

Berdasarkan fenotipnya, thalassemia- α dibedakan menjadi thalassemia- α^0 (berat) dan thalassemia- α^+ (ringan). Di tiga populasi besar Indonesia yaitu Jawa, Sulawesi Selatan, dan Sumatera Selatan berdasarkan nilai MCH, frekuensi thalassemia α^0 adalah 2,6-3,2% dan frekuensi thalassemia α^+ berturut-turut adalah 2,7;10 dan 11%. Sampai awal tahun 1997, di seluruh dunia telah ditemukan sekitar 32 jenis mutasi non delesi, 8 jenis mutasi delesi dua gen globin- α dan 21 jenis mutasi delesi satu gen globin- α penyebab thalassemia α , sedangkan di Indonesia baru ditemukan 11 jenis mutasi yang menyebabkan thalassemia α (Huisman *et al.*, 1997). Di antara mutasi-mutasi tersebut, delesi 2 gen globin α tipe South East Asia (SEA) dan delesi 1 gen tipe 3,7 kb adalah mutasi yang paling sering ditemukan pada pasien thalassemia α (Setianingsih dkk., 2003). Penyakit ini (dalam keadaan mutasi homozigot/heterozigot ganda dikedua alel) umumnya menyebabkan anemia berat pada penderitanya sehingga membutuhkan transfusi darah seumur hidup. Tindakan pencegahan antara lain skrining dan diagnosis prenatal thalassemia sehingga diperlukan suatu metode diagnostik yang diarahkan kepada pemanfaatan teknologi dengan menggunakan materi genetik sebagai bahan pengujiannya.

Di Lembaga Eijkman, untuk mendeteksi adanya mutasi thalassemia α umumnya digunakan metode tabung tunggal PCR Multipleks, PCR RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), dan metode isolasi *puregene* untuk memperoleh

materi genetik (DNA), namun metode ini kurang efisien baik dari segi waktu dan biaya karena membutuhkan proses yang cukup lama dan reagen yang tidak sedikit. Dengan berkembangnya teknologi dalam bidang biologi molekular, maka dikembangkan suatu metode baru yaitu metode tes strip (*α -Globin Strip Assay*) yang dapat mendeteksi 21 macam mutasi di gen globin α secara simultan dalam satu paket reaksi sehingga lebih efisien. Mutasi di gen globin α yang dapat dideteksi oleh tes strip yaitu dua tipe delesi satu gen α ($-\alpha^{3.7}$ dan $-\alpha^{4.2}$), lima tipe delesi dua gen α ($--^{MED}$, $--^{SEA}$, $--^{THAI}$, $--^{FIL}$, $--(\alpha)^{20.5}$), $\alpha\alpha^{anti-3.7}$ gen triplikasi, dua tipe mutasi titik di gen $\alpha 1$ (cd 14 dan Hb Adana) dan sebelas tipe mutasi titik di gen $\alpha 2$ (kodon inisiasi T>C, kodon 19, IVS1-5nt, kodon 59 G>A, Hb Quong Sze, Hb Constant Spring, Hb Icaria, Hb Pakse, Hb Koya Dora, polyA-1 dan polyA-2). Test strip menggunakan protokol yang sederhana dan peralatan yang biasa digunakan pada laboratorium biomolekuler umumnya, yaitu mesin PCR dan penangas air (Puehringer *et al.*, 2007). DNA (*deoxyribonucleic acid*) sebagai sumber materi genetik makhluk hidup digunakan dalam mendeteksi mutasi penyakit thalassemia, oleh karena itu isolasi DNA merupakan tahap yang sangat penting dalam keberhasilan mendeteksi mutasi menggunakan metode PCR.

Koleksi sampel darah kering pada kertas saring merupakan metode koleksi sampel yang mudah, praktis dan lebih stabil untuk kegiatan studi lapangan dibandingkan dengan koleksi sampel menggunakan darah utuh EDTA (McCabe, 1991). Oleh karena itu dilakukan penelitian terhadap 19 pasien untuk mengetahui keberhasilan deteksi mutasi thalassemia tipe SEA dengan tes strip dan sebagai sumber DNA digunakan DNA genom hasil tiga metode isolasi (darah utuh EDTA puregene, darah kering pada kertas saring chelex dan spin micro DNA extraction (ViennaLab)). Hasil deteksi mutasi thalassemia α menggunakan DNA hasil ketiga macam metode isolasi DNA tersebut kemudian dilakukan uji diagnostik untuk mendapatkan nilai berupa sensitivitas dan spesifisitas.

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi DNA Genom

Ekstraksi DNA genom pasien thalassemia α dilakukan dengan menggunakan tiga metode, yaitu:

Pertama: DNA genom dari darah vena yang diberi EDTA diekstraksi dengan metode *puregene*. Metode ini adalah metode konvensional yang dilakukan secara rutin di Lembaga Eijkman untuk mendapatkan DNA sebagai sumber genetik deteksi mutasi thalassemia α tipe SEA. Sel-sel darah merah dan darah putih dilisis dengan menggunakan *Red Blood Cell (RBC) Lysis Solution* dan *Cell Lysis solution*. RNA yang tidak diperlukan didegradasi dengan RNase (5 mg/ml) dan diinkubasi dalam penangas air yang bersuhu 37°C selama 30 menit kemudian protein dipresipitasi dengan ammonium asetat 5 M. Supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan isopropanol untuk mengikat DNA. DNA yang berupa pelet putih dicuci dengan etanol 70%, pelet DNA yang telah dicuci kemudian diencerkan dengan TE buffer dan diinkubasi selama 4-24 jam pada penangas air bersuhu 37°C.

Kedua: DNA genom dari darah kering pada kertas saring metode *chelex* diisolasi dengan penambahan larutan PBS yang mengandung 0,5% saponin pada potongan kertas saring dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 4-24 jam (*overnight*). Pencucian DNA dilakukan dengan penambahan 1 ml PBS, dan diinkubasi lagi disuhu 4°C selama 4 jam. Setelah disentrifugasi, ditambahkan 50 μ L larutan *Chelex* 20 % pH 10,5 dan 100 μ L akuades steril dimasukkan dan diinkubasi pada air mendidih selama 10 menit (divortex setiap 2-3 menit). Setelah diinkubasi dan disentrifugasi, cairan supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke tabung yang baru. *Chelex* adalah suspensi resin dengan afinitas tinggi untuk mengikat dan membuang ion-ion dalam proses isolasi DNA khususnya ion metal yang merupakan inhibitor *DNA Polymerase* dalam proses PCR. Dengan penambahan *chelex* ini diharapkan akan meminimalisasi kegagalan proses PCR (Polski *et al.*, 1998).

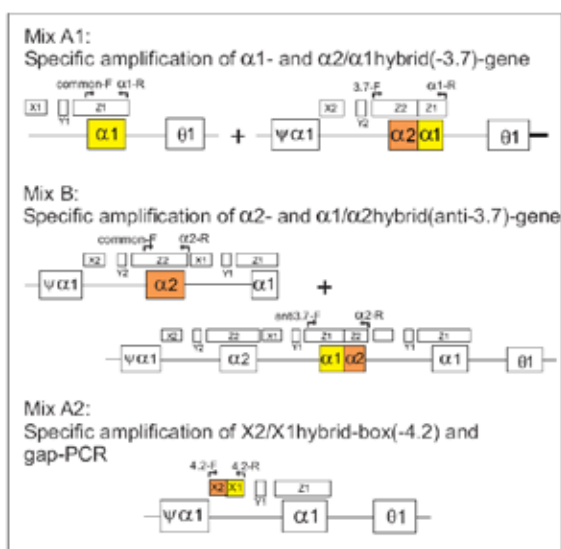
Ketiga: Ekstraksi DNA genom metode *spin micro* merupakan isolasi DNA genom menggunakan kit isolasi *spin micro DNA Extraction* (VenaLab). Resin pengikat DNA berupa membran filter. Sel darah merah yang terdapat di kertas saring dilisis menggunakan *lysis buffer* dan DNA diikat pada membran filter dengan bantuan *binding buffer* dan sentrifugasi untuk membuang komponen lain yang tidak diperlukan. Untuk mengelusi DNA yang telah diikat pada membran filter ditambahkan 50 μ l *elution buffer* hangat (suhu 56°C).

Multipleks PCR

Amplifikasi DNA genom yang telah diisolasi dari ketiga metode isolasi DNA menggunakan kit *α -Globin Strip Assay* (ViennaLab) untuk thalassemia α . Untuk masing-masing reaksi terdiri dari 5 μ l DNA (10-50 ng) yang ditambahkan ke dalam 20 μ l amplification mix. Amplification mix mengandung primer yang telah dilabel dengan label biotin untuk tiga campuran reaksi terpisah. Campuran A1 mengandung primer yang akan mengamplifikasi seluruh wilayah di gen $\alpha 1$ untuk mendeteksi adanya mutasi $-\alpha^{3.7}$. Campuran A2 mengamplifikasi fragmen DNA yang dihasilkan dari mutasi-mutasi delesi yaitu $-\alpha^{4.2}$, $--^{MED}$, $-(\alpha)^{20.5}$, $--^{SEA}$, $--^{THAI}$, dan $--^{FIL}$. Campuran B mencakup semua mutasi di sepanjang gen $\alpha 2$ dan mutasi $\alpha\alpha\alpha^{anti-3.7}$ (Puehringer *et al.*, 2007). Daerah pengamplifikasian ketiga campuran reaksi ini dapat dilihat pada Gambar 2. PCR dilakukan didalam tabung tipis 0,2 ml dan dalam kondisi PCR sebagai berikut: Denaturasi awal pada suhu 95°C selama 5 menit, 37 siklus thermocycling denaturasi pada suhu 97°C selama 40 detik, annealing pada suhu 64°C selama 40 detik elongasi pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik, dan akhir elongasi pada suhu 72°C selama 3 menit.

Reverse Hibridization

Hibridisasi asam nukleat terjadi apabila antara dua untai DNA komplementer berpasangan secara tepat. DNA yang telah diberi label biotin pada saat PCR, akan dideteksi pada kondisi hibridisasi



Gambar 2. Daerah spesifik amplifikasi tes strip pada gen globin α

Sumber : Puehringer, 2007.

(45°C). Oligonukletida spesifik alel normal dan mutan yang secara paralel terikat pada membran nilon akan berhibridisasi dengan DNA target berlabel biotin. Untuk mendeteksi mutasi thalassemia alfa, masing-masing 10 μ l hasil amplifikasi A1 dan A2 yang berlabel biotin dihibridisasi ke tes strip A dan hasil amplifikasi B yang berlabel biotin dihibridisasi ke tes strip B.

Validasi Tes Strip (α -Globin StripAssay)

Validasi bertujuan untuk memastikan dan mengkonfirmasi suatu metode melalui pengujian. Uji ini biasanya digunakan untuk suatu metode yang baru dibuat atau dikembangkan serta harus menyertakan metode referensi atau *gold standard*. Metode PCR Multipleks digunakan sebagai prosedur referensi atau *gold standard* dan metode tes strip dijadikan sebagai metode yang akan diuji. Hasil tes yang akan diperoleh hanya akan memberikan hasil yang positif atau negatif dan akan diekspresikan dengan tabel 2. Kecocokan dan ketidakcocokan hasil deteksi mutasi thalassemia α menggunakan metode tes strip dihitung menggunakan rumus sensitivitas dan spesifisitas. Tabel uji sensitivitas dan spesifisitas dapat dilihat pada Tabel 1 (Pusponegoro, H. D., dkk.)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembacaan StripAssay

DNA hasil amplifikasi dengan 3 *Amplification mix* yang berbeda dihibridisasikan ke membran nilon yang telah mengandung 21 macam probe spesifik terhadap mutasi thalassemia α baik mutasi delesi maupun mutasi titik. Dalam proses hibridisasi diperlukan suatu DNA untai tunggal untuk berikatan dengan probe yang telah menempel pada membran nilon. Salah satu cara agar membuat DNA hasil amplifikasi beruntai tunggal adalah dengan penambahan suatu senyawa alkali seperti NaOH yang terkandung dalam DNAT yang berfungsi memecah ikatan hidrogen antara basa nitrogen (Yuwono, 2005).

Tabel 1. Tabel Uji Sensitivitas dan Spesifisitas 2x2

Tes Strip (Bahan Uji)	PCR rutin (<i>Gold standard</i>)	
	Positif	Negatif
Positif	a	b
Negatif	c	d

Keterangan: Dimana a adalah positif benar, b adalah positif salah, c adalah negatif salah, dan d adalah negatif benar.

Nilai Sensitivitas = $a / (a + c)$, dimana: a = positif benar, c = negatif salah

Nikai Spesifisitas = $d / (b + d)$, dimana: d = negatif benar, b = positif salah

Tabel 2. Tabel Hasil Uji Sensitifitas dan Spesifisitas 2x2

Tes Strip (Bahan Uji)	PCR rutin (<i>Gold standard</i>)					
	DNA Puregene		DNA Chelex		DNA Spin Micro	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Positif	19	1	19	13	19	3
Negatif	0	18	0	6	19	16

Prinsip dari *reverse hibridisasi* ini adalah terjadinya ikatan antara dua unsur utama dari proses hibridisasi, yaitu DNA target dan probe yang menempel pada membran nilon yang memiliki urutan basa spesifik untuk 21 tipe mutasi thalassemia α .

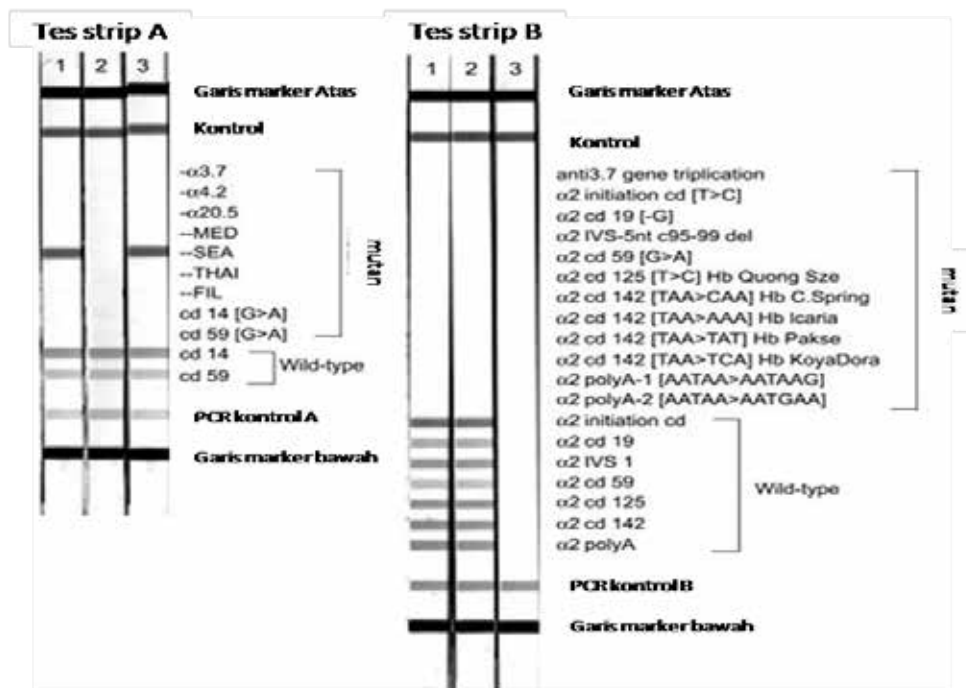
DNA target telah diberi label biotin selama proses amplifikasi sehingga pada saat terjadi ikatan antara DNA target dan probe akan dapat terdeteksi dan menghasilkan sinyal. Sinyal tersebut akan ditangkap oleh *streptavidin-alkaline phosphate* yang terkandung dalam *conjugate solution* yang menandakan bahwa ikatan antara probe mutasi dan DNA target berhasil. *Colour developer* yang mengandung nitro blue tetrazolium akan berikatan dengan streptavidin dan akan menimbulkan warna ungu pada membran nilon.

Tipe mutasi thalassemia α yang digunakan dalam uji diagnosis ini adalah delesi dua gen globin α tipe *Southeast Asia* /SEA ($--^{SEA}$) yang merupakan tipe mutasi delesi besar yang sering ditemukan pada pasien-pasien thalassemia α di klinik GenNeka, Lembaga Eijkman Jakarta. Delesi dua gen globin α tipe SEA ini merupakan tipe delesi yang sering ditemukan pada pasien dengan latar belakang etnik *Chinese* dan merupakan thalassemia jenis berat (thalassemia α^0) karena hanya mempunyai 2 globin α yang berfungsi (Setianingsih dkk., 2003). Subjek yang membawa delesi dua gen globin α tipe SEA ini digunakan untuk menentukan nilai sensitivitas dan spesifisitas dari bahan uji yaitu metode tes strip terhadap metode rutin (PCR Multipleks).

Hasil deteksi mutasi thalassemia α menggunakan tes strip dilakukan dengan cara menginterpretasikan hasil tes strip A dan tes strip B pada masing-masing sampel untuk menentukan genotipe pasien atau pembawa sifat yang menjadi subjek penelitian. Tes strip A dapat mendeteksi beberapa jenis mutasi delesi di gen α dan mutasi titik pada gen $\alpha 1$, sedangkan tes strip B dapat mendeteksi beberapa mutasi titik dan mutasi delesi kecil yang ada di gen $\alpha 2$. Pada Gambar 3 dapat dilihat sampel yang tidak mempunyai delesi dua gen tipe SEA, tes strip A dan B hanya akan positif terwarnai pada probe normal saja. Pada sampel dengan genotipe delesi dua gen tipe SEA heterozigot, probe yang terwarnai adalah probe dengan alel mutan dan probe dengan alel normal baik pada tes strip A maupun B. Pada sampel dengan genotipe delesi dua gen tipe SEA homozigot, yang terwarnai adalah probe mutan dan probe normal pada tes strip A sedangkan probe normal pada tes strip B tidak terwarnai.

Validasi α -Globin Strip Assay

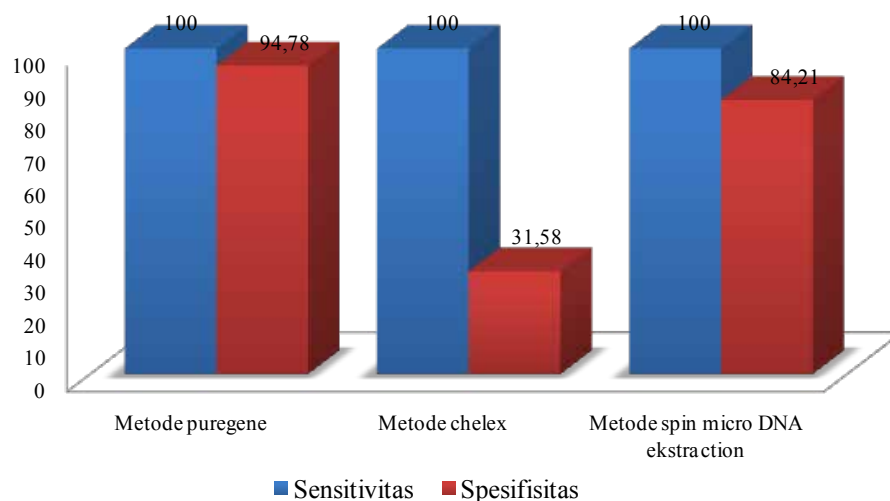
Hasil uji diagnostik tes strip dalam mendeteksi pasien yang mempunyai delesi dua gen globin α tipe SEA dengan ketiga metode isolasi DNA memberikan nilai sensitivitas yang sama besar yaitu 100 %.



Gambar 3. Interpretasi hasil tes strip : 1. $--^{SEA}$ heterozigot, 2. Normal, 3. $--^{SEA}$ homozigot

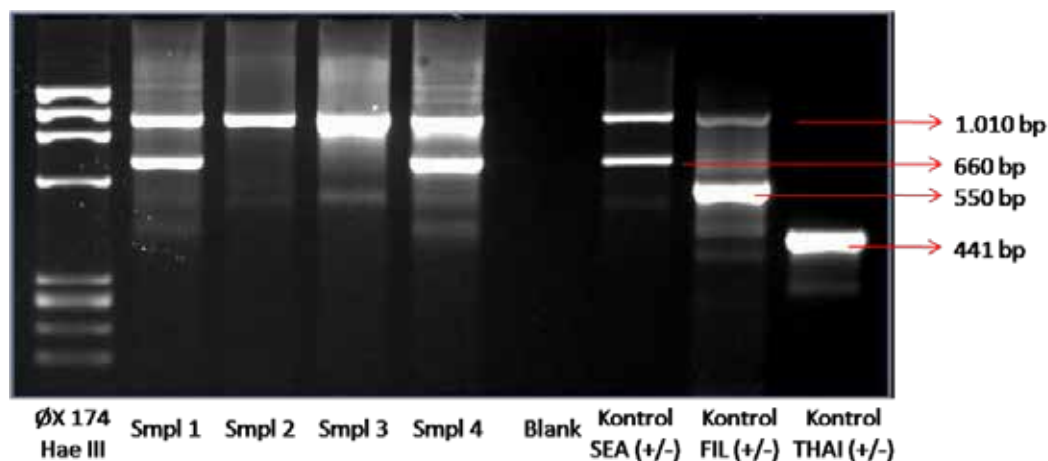
Spesifisitas tes strip menggunakan DNA *chelex* (31,58%) menunjukkan nilai yang lebih rendah dibandingkan baik dengan DNA *spin micro* (84,21%) maupun dengan DNA *puregene* (94,74%) (Gambar 4). Semakin rendah spesifisitas menyebabkan semakin tingginya kemungkinan kesalahan dalam diagnosis genotipe dari pasien-pasien atau pembawa sifat thalassemia α . Sebagai contoh, pembawa sifat thalassemia α memiliki genotipe delesi dua gen α tipe SEA yang heterozigot pada pendeteksian menggunakan metode rutin (Multipleks PCR). Hasil deteksi mutasi tes strip menggunakan cetakan DNA hasil metode *chelex* ada yang menghasilkan

genotipe homozigot untuk pembawa sifat thalassemia tersebut. Hasil deteksi tes strip dengan genotipe delesi dua gen tipe SEA homozigot pada sampel-sampel pasien thalassemia menyebabkan diagnosis yang salah, karena individu yang mempunyai delesi dua gen globin α homozigot tidak mempunyai gen globin α sama sekali (empat buah gen globin α hilang), keadaan ini akan menyebabkan pasien mengalami sindrom Hb Bart hydrop fetalis. Penderita thalassemia ini umumnya tidak akan bertahan hidup lama, dan akan gugur dalam kandungan atau meninggal setelah beberapa saat dilahirkan (Weatherall, 1995).



Gambar 4. Diagram Sensitivitas dan Spesifisitas Ketiga Isolasi DNA

Lampiran PCR Multipleks Rutin Untuk Deteksi Mutasi Delesi 2 Gen α



Interpretasi Hasil :

Genotipe	Panjang Fragmen
Normal	1.010 bp
Delesi 2 gen tipe SEA Heterozigot	1.010 bp, 660 bp
Delesi 2 gen tipe SEA Homozigot	660 bp
Delesi 2 gen tipe FIL Heterozigot	1.010 bp, 550 bp
Delesi 2 gen tipe FIL Homozigot	550 bp
Delesi 2 gen tipe THAI Heterozigot	1.010 bp, 411 bp
Delesi 2 gen tipe THAI Homozigot	411 bp

Hasil :

Sampel 1 dan Sampel 4 = Sampel termutasi delesi dua gen tipe --^{SEA} heterozigot

Sampel 2 dan Sampel 3 = Sampel normal

SIMPULAN

Nilai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dapat mengurangi kesalahan dalam mendeteksi mutasi thalassemia alfa tipe SEA. Berdasarkan penelitian, DNA yang diisolasi dari darah vena EDTA menggunakan metode *puregene* memiliki nilai validasi tes strip yang tinggi terhadap metode PCR, sedangkan untuk deteksi mutasi thalassemia- α yang lebih mudah dan praktis dalam pengambilan dan pengkoleksian sampel maka DNA dari darah kering pada kertas saring yang diisolasi dengan metode *spin micro* akan memberikan hasil validasi yang baik dibandingkan dengan nilai validasi tes strip menggunakan DNA hasil metode isolasi DNA *chelex*.

DAFTAR PUSTAKA

- Stamatoyannopoulos G., Nienhuis, A.W., Majerus, P.W., & Varmus, H. 1994. The Molecular Basis of Blood Diseases. Second edition WB Saunders Company. Philadelphia. Hal: 104.
- Weatherall, D. J. 1995. The Molecular Basis For Phenotypic Variability Of The Common Thalassemias. *Mol Med Today*. Hal : 15-19.

Setianingsih, I., Harahap, A. & Nainggolan, I.M. 2003. Alpha thalassaemia in Indonesia: phenotypes and molecular defects. *Tropical Diseases*, Edited by Marzuki, Verhoef, and Snippe. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 47-56.

Huisman, T.H.J., Carver, M.F.H. & Baysal, E. 1997. A Syllabus of Thalassemia Mutations. The Sick Cell Anemia Foundation, Augusta. GA. Hal : 235.

McCabe, E. R. B. 1991. Utility of PCR for DNA Analysis from Dried Blood Spots on Filter Paper Blotters. *Genome Research*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Hal : 99-106

Polski, J.M., Kimzey, S., Percival, R.W. & Grosso, L.E. 1998. Rapid and Effective Processing of Blood Specimens for Diagnostic PCR Using Filter Paper and Chelex-100. *J Clin Pathol vol 51*. Hal 215 – 217.

Sastroasmoro, S. & Ismael, S. 2008. Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis Edisi ke-3. Sagung Seto. Jakarta. Hal: 194 – 216.

Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction. Penerbit ANDI. Yogyakarta. Halaman: 1-4.

Puehringer, H., Najmabadi, H., Law, H., Krugluger, W., Viprakasit, V., Pissard, S., Baysal, E., Taher, A., Farra, C., Al-Ali, A., Al-Ateeq, S. & Oberkanis, C. 2007. Validation of reverse-hybridization Strip Assay for the simultaneous analysis of common α -thalassemia point mutation and deletions. *Clin Chem Lab Med Journal*. Hal: 605-610.