



Deteksi Mutasi Langka, Delesi 619 bp, pada Gen Beta-Globin dari Etnis Melayu Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas YARSI

Detection of a Rare 619 bp Deletion on Beta-Globin Gene In YARSI University Faculty of Medicine Students of Malay Ethnicity

Kenconoviyati¹, Rika Yuliwulandari^{3,5}, Kinasih Prayuni^{2,5}, RW. Susilowati¹, dan Abdul Salam M. Sofro⁴

¹Department of Histology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

²Department of Anatomy, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

³Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta

⁴Graduate School, YARSI University, Jakarta

⁵Genomic Medicine Research Group, YARSI Research Centre, YARSI University, Jakarta

KATA KUNCI *Beta-thalassemia; gen Beta-globin; Etnis Melayu; gap-PCR; elektroforesis gel; Delesi 619 bp*

KEYWORDS *Beta-thalassemia; Beta-globin gene; Malay Ethnic; gap-PCR; gel electrophoresis; 619 bp deletion mutation*

ABSTRAK *Beta-thalassemia merupakan gangguan hematologis autosomal yang secara genetis mengakibatkan berkurangnya sintesis beta-globin di hemoglobin. Beta-talasemia sebagian besar disebabkan oleh mutasi titik, insersi atau delesi dalam gen beta-globin yang terletak pada lengan pendek kromosom 11. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan terdapat sekitar 1,5% dari populasi global (80-90 juta orang) adalah pembawa β -thalassemia. Tidak ada studi komprehensif untuk mendeteksi pembawa beta-thalassemia di Indonesia, terutama untuk mutasi delesi 619 bp, yang mencakup ekson 3 dan memiliki prevalensi yang tinggi. Kami menggunakan metode gap-PCR yang dikombinasikan dengan metode elektroforesis gel untuk memperkirakan adanya mutasi delesi 619 bp pada 48 siswa Fakultas Kedokteran Universitas YARSI dengan etnis Melayu. Analisis Blast hasil sekuensing dari ketiga sampel menunjukkan bahwa terdapat similaritas 98% antara hasil amplifikasi dengan ke daerah gen beta-globin pada kromosom 11 (No. Akses U01317.1). Berdasarkan hasil visualisasi elektroforesis gel, semua produk PCR dari 48 sampel, menunjukkan bahwa semua sampel tidak membawa mutasi delesi 619 bp yang ditunjukkan*

dengan ukuran produk PCR yang sama dari semua sampel, yaitu berukuran 1.457 bp dan 2.291 bp dari PCR I dan 1.212 bp dari PCR II.

ABSTRACT

Beta-thalassaemia is an autosomal haematological disorder resulting in a genetically deficient synthesis of the β -globin chain in haemoglobin. It is mostly caused by point mutations, a small deletions or insertions within the beta-globin gene which is located as a cluster on the short arm of chromosome 11. The World Health Organization has estimated that about 1.5% of the global population (80 to 90 million people) were carriers of β -thalassemia. There are no comprehensive study to detect carrier of β -thalassemia in Indonesia especially for 619 bp deletion mutation, which encompasses exon 3, that has greater prevalence. We used gap-PCR combined with gel electrophoresis methods to roughly screen the presence of major indel mutation in 48 Medical Faculty, Universitas YARSI students with Malay ethnic. To validate whether the PCR product obtained is the beta-globin gene, a direct sequencing of 3 PCR products were performed. The Blast analysis of the sequence was also done using NCBI database. The result showed that the PCR products obtained in this study showed 98% identity to human beta-globin gene region on chromosome 11 (No. Acc. U01317.1). In the electrophoresis of all PCR products of 48 samples, the result showed that all the samples did not carry any major indel mutation showing by the presence of similar length of PCR products in gel electrophoresis, which has 1.457 bp and 2.291 bp product from PCR I and 1.212 bp product from PCR II.

Beta-talasemia merupakan kelainan hematologis autosomal yang secara genetik mengakibatkan berkurangnya sintesis rantai beta-globin di hemoglobin (Thein, 2005). Beta-thalassaemia umum ditemukan di negara Mediterania, Timur Tengah, Asia Tengah, India, Cina Selatan dan Asia Timur serta negara-negara di sepanjang pantai utara Afrika dan Amerika Selatan. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) melaporkan bahwa terdapat sekitar 1,5% dari populasi global (80-90 juta orang) merupakan karier (pembawa) beta-talasemia dan frekuensi karier tertinggi yang

dilaporkan adalah di Cyprus (14%), Sardinia (10.3%), dan Asia Tenggara (Gallanello & Origa, 2010). Pemeriksaan karier beta talasemia di Asia Tenggara menunjukkan frekuensi yang tinggi, yaitu berkisar antara 3% sampai 10% di Indonesia, 0,5% menjadi 1,5% di Myanmar, 0,93% di Singapura, 1,5% di Vietnam, dan 3% sampai 9% di Thailand (Fucharoen & Winichagoon 2007).

Correspondence:

Dr. Hj. Rika Yuliwulandari, PhD., Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, YARSI University, Jakarta, Jalan Letjen. Suprpto, Cempaka Putih, Jakarta Pusat 10510, Tel. 021-4206674-76, Email: rika.yuliwulandari@yarsi.ac.id

Hassan *et. al.*, (2012) melaporkan sekitar 4.5% dari populasi Malaysia merupakan karier beta talasemia dan umumnya diantara Malaysia melayu dan Cina. Kebanyakan beta talasemia disebabkan oleh mutasi titik yang telah dilaporkan lebih dari 200 mutasi dan sangat jarang disebabkan oleh delesi atau insersi pada gen beta globin yang terletak di lengan pendek kromosom 11 (Rund & Rachmilewitz, 2005; Gallanello and Origa, 2010). Tabel 1 memperlihatkan mutasi yang umum ditemukan berdasarkan etnis. Metode molekulas diagnosis telah banyak dikembangkan, diantaranya adalah denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Elektroforesis temporal temperature gel, analisis mutasi

mismatch, elektroforesis singlestrand conformation polymorphism, dan analisis heteroduplex dengan denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC).

Strategi deteksi spesifik pada mutasi tertentu juga telah banyak dikembangkan, seperti tehnik yang menginkorporasi probe oligonukleotida spesifik alel, sistem amplifikasi mutasi refraktori, allele specific polymerase chain reaction (PCR), reverse dot blot, restriction fragment length polymorphisms (RFLP), single base extension, PCR enzyme linked immunosorbent assay (PCR-ELISA), real time PCR, and teknologi array based (Shih *et. al.*, 2009; Marashi *et. al.*, 2012; Lin *et. al.*, 2014).

Tabel 1. Mutasi gen beta-globin yang umum ditemukan pada beberapa etnis

Populasi	Mutasi Beta-globin
India	-619 del
Mediterrania	-101 CTT IVS1-nt6TTC IVS1-nt110GTA IVS2-nt745 CTG codon 39 CTT codon 5 -CT AATAAA to AATGAA codon 27 GTT Hb (Hb Knossos)
Black	-88CTT
Mediterrania, Afrika	-87CTG
Jepang	-31ATG
Afrika	-29ATG
Asia tenggara	-28ATC codon 41/42 -TTCT codon 79 G>A (Hb E) Codon 19 G>A (Hb Malay)
Mediterrania, India Asia	IVS1-nt1GTA
Asia Timur, India Asia	IVS1-nt5GTC
Cina	IVS2-nt745CTT
Mediterrania, Afrika-Amerika	codon 6-A
Afrika-Amerika	AATAAA to AATGAA

(Gallanello & Origa, 2010)

Mutasi duplikasi dan delesi pada gen beta-globin merupakan mutasi yang langka, namun demikian mutasi delesi 619 bp, yang mencakup keseluruhan ekson 3, adalah pengecualian yang memiliki prevalensi yang sangat tinggi (Baysal *et al.*, 1994; Orkin *et al.*, 1980; Orkin *et al.*, 1979). Mutasi tersebut terkait, terutama dengan subpopulasi India dan Pakistan tertentu, terdapat hingga 7,5% dari subtipe beta-talasemia yang ditemukan pada populasi India (Thein *et al.*, 1984; Munshi *et al.*, 2008; Sheth *et al.*, 2008). Berdasarkan hal tersebut, tidak menutup kemungkinan prevalensi delesi 619 bp pada populasi melayu di Indonesia juga tinggi, karena data terkait delesi 619 bp masih minim. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan *screening* delesi 619 bp pada etnis melayu yang di Indonesia, yang dimulai dari mahasiswa fakultas kedokteran etnis melayu di Universitas YARSI.

Kami menggunakan metode Chan *et al.* (2010) yang merupakan modifikasi dari Wang *et al.* (2003). Wang *et al.* (2003) melakukan sekuensing terbatas untuk mendeteksi mutasi di populasi Asia Tenggara dan India yang dapat juga mendeteksi delesi langka 619 bp. Chan *et al.* (2010) mengkombinasikan gap PCR dan sekuensing untuk mendeteksi delesi 619 bp pada populasi Pan-Ethnic. Metode tersebut merupakan metode yang cepat dan mudah dalam mendeteksi delesi langka 619 bp. Metode sekuensing kemudian digunakan untuk mengkonfirmasi gen beta-globin yang dideteksi.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel

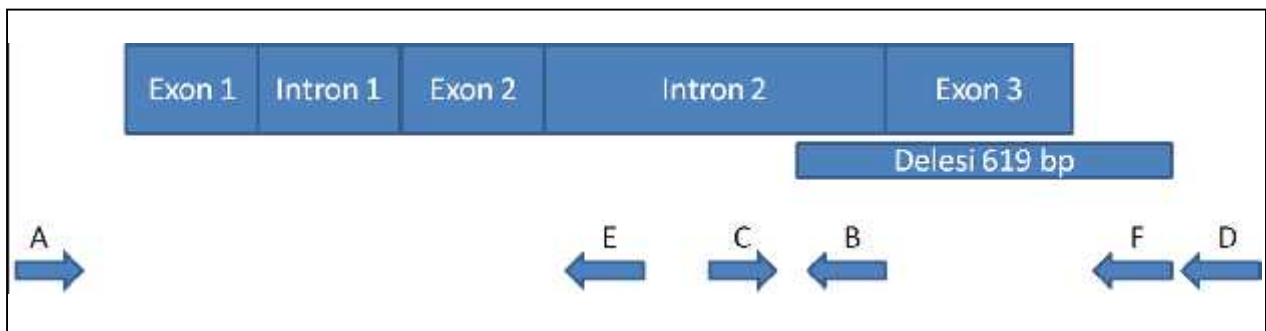
Sebanyak 48 DNA genomik mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas YARSI digunakan dalam penelitian ini. Ekstraksi DNA dari darah dilakukan menggunakan QiAmp Blood mini kit (Qiagen).

Amplifikasi DNA dengan metode gap-PCR

Amplifikasi sekuen beta globin menggunakan primer yang telah didesain berdasarkan Chan *et al.* (2012) seperti terlihat pada Tabel 1. DNA genomik diamplifikasi dalam dua mix yang berbeda yaitu PCR I dan PCR II, dengan total volume 25 μ L per reaksi. PCR I dan PCR II berisi 1x FastStart PCR Master Mix (Qiagen, Germany), 1 μ M Primers, and 50-100 ng DNA genomik. Kondisi amplifikasi pada thermocycler adalah 1 siklus denaturasi pada 95°C selama 10 menit, diikuti dengan 35 siklus dari 95°C selama 2 menit, 63.3°C selama 1 menit, dan 72°C selama 2 menit. Tahap elongasi akhir dilakukan pada 72°C selama 10 menit. Produk amplifikasi kemudian dielektroforesis pada gel agarosa 1% (Invitrogen) untuk melihat efisiensi dan ukuran produk PCR. Produk PCR akan menghasilkan beberapa ukuran tergantung pada sampel. Sampel normal akan menghasilkan produk berukuran 1.457 bp dan 2.291 bp dari PCR I (pasangan primer A dan B, juga A dan D) serta produk berukuran 1.212 bp dari PCR II (pasangan primer C dan D).

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi dan sekuensing gen beta-globin

Primer	Sequence (5' → 3')
PCR I	
Amplification	ACGGCTGTCATCACTTAGAC
Forward-A	AAGAGGTATGAACATGATTAGC
Reverse-B	CAGATTCCGGGTCACTGTG
Reverse-D	
PCR II	
Amplification	GTGTACACATATTGACCAAATC
Forward-C	CAGATTCCGGGTCACTGTG
Reverse-D	
PCR I	
Sequencing	ACGGCTGTCATCACTTAGAC
Forward-A	CTCCCCTTCCTATGACATGA
Reverse-E	
PCR II	
Sequencing	GTGTACACATATTGACCAAATC
Forward-C	AATGCACTGACCTCCACAT
Reverse-F	



Gambar 1. Ilustrasi lokasi primer untuk deteksi delesi langka 619 bp

Pada sampel yang homozigous yang memiliki mutasi delesi 619 bp, PCR I akan menghasilkan produk berukuran 1.671 bp dari pasangan primer A dan D karena adanya delesi 619 bp, sehingga situs pengikatan primer B tidak ada, dan PCR II akan menghasilkan produk berukuran 593 bp dari pasangan primer C dan D).

Sampel heterozigous akan memiliki kombinasi ukuran 1.457 bp

dan 2.291 bp dari PCR I serta ukuran 1.212 bp dan 593 bp dari PCR II. Gambar 1 menunjukkan posisi pasangan primer dan juga daerah dengan kandidat mutasi serta target utama delesi langka 619 bp.

Sekuensing

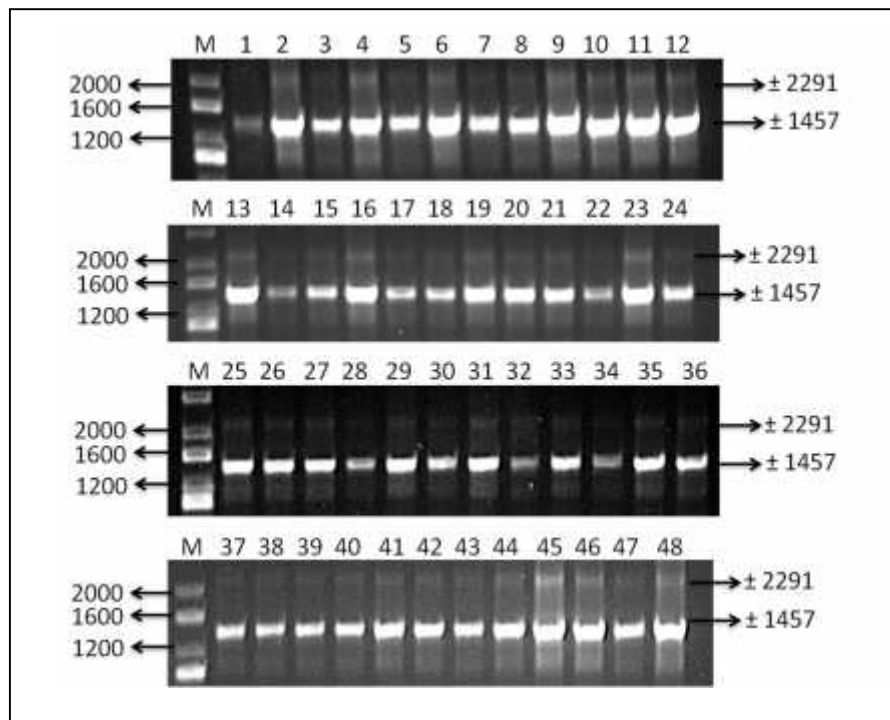
Sekuensing dilakukan untuk mengkonfirmasi hasil amplifikasi PCR pada gen beta-globin. Proses

sekuensing hanya menggunakan 3 sampel dari total 48 sampel. Sebelum disekuensing produk amplicon dipurifikasi dengan QiaQuick PCR Purification Kit (Qiagen). Setelah dipurifikasi, 20 ng digunakan sebagai template untuk sekuensing menggunakan ABI PRISM Big Dye terminator version 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystem). Konsentrasi primer yang digunakan untuk sekuensing 4 pM dengan kondisi *cycle sequencing* terdiri dari satu siklus denaturasi pada 96°C selama 1 menit diikuti dengan 25 siklus 96°C selama 10 detik, 50°C selama 5 detik, dan 60°C selama 4 menit. Produk *cycle sequencing* kemudian dipurifikasi dengan metode NaOAc-EDTA dan kemudian disekuensing dengan ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). Data sekuensing kemudian di analisis

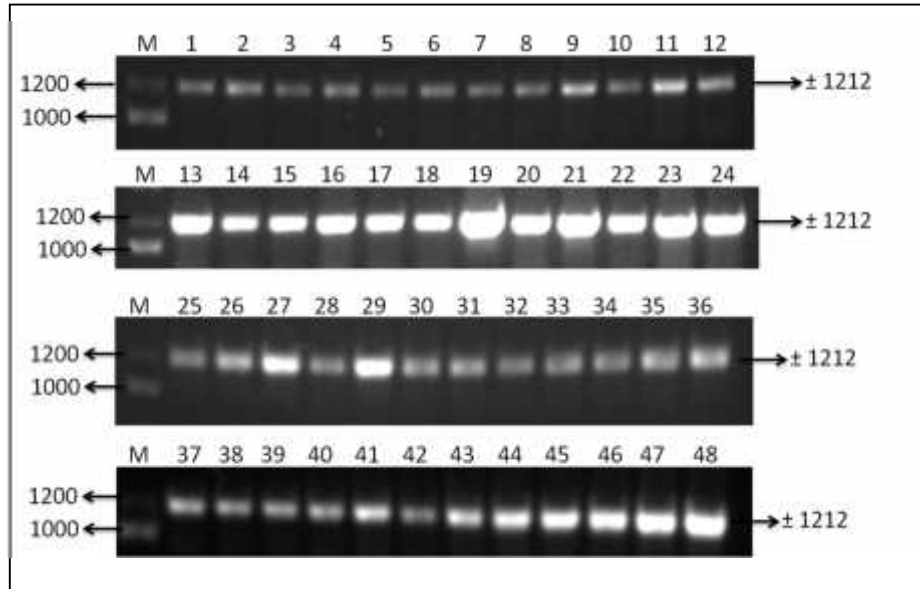
dengan Sequencing Analysis Software, version 5.2 (Applied Biosystem) dan software BioEdit untuk proses penjejakan dengan sekuen acuan Homo Sapiens Chromosome 11, GrCh38, no. akses NC_000011.

HASIL

Hasil amplifikasi PCR I dan PCR II yang ditunjukkan dengan visualisasi gel agarosa PCR I pada gambar 2 dan PCR II pada gambar 3, memperlihatkan bahwa tidak terdapat mutasi langka delesi 619 bp pada 48 sampel mahasiswa Fakultas Kedokteran Yarsi etnis melayu. Visualisasi agarosa tersebut memperlihatkan produk PCR berukuran 1.457 bp dan 2.291 bp dari PCR I (pasangan primer A dan B serta A dan D) dan ukuran 1.212 bp dari PCR II (pasangan primer C dan D).



Gambar 2. Visualisasi gel agarosa dari produk PCR I



Gambar 3. Visualisasi gel agarosa dari produk PCR II

Hasil analisis sekuensing memperlihatkan pada 3 sampel yang dipilih menunjukkan bahwa terdapat similaritas 98% antara produk amplifikasi dengan human beta globin region on chromosome 11 (No. Akses U01317.1) dari database NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

PEMBAHASAN

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) melaporkan bahwa terdapat sekitar 1,5 % dari populasi global (80-90 juta orang) merupakan karier (pembawa) beta-talasemia dan frekuensi tertinggi berada di Cyprus (14%), Sardinia (10.3%), dan Asia Tenggara (Gallanello & Origa, 2010). Pemeriksaan karier beta-talasemia yang dilakukan Fucharoen & Winichagoon (2007) di Asia Tenggara menunjukkan bahwa di Indonesia terdapat 3% sampai 10% karier beta-talasemia.

Oleh karena itu, sangat penting untuk setiap orang melakukan pemeriksaan untuk mengetahui apakah

mereka merupakan karier atau penderita beta-talasemia.

Pemeriksaan terkait delesi 619 bp belum banyak dilakukan, walaupun mutasi delesi pada gen beta-globin merupakan mutasi yang langka, namun demikian mutasi delesi 619 bp, yang mencakup keseluruhan ekson 3, adalah pengecualian yang memiliki prevalensi yang sangat tinggi (Baysal *et. al.*, 1994; Orkin *et. al.*, 1980; Orkin *et. al.*, 1979). Mutasi tersebut diketahui banyak ditemukan pada subpopulasi India dan Pakistan tertentu, dengan frekuensi hingga 7,5% dari subtipe beta-talasemia yang ditemukan pada populasi India (Thein *et. al.*, 1984; Munshi *et. al.*, 2008; Sheth *et. al.*, 2008).

Penelitian ini mengembangkan metode yang mudah untuk pemeriksaan mutasi langka delesi 619 bp di gen beta-globin menggunakan metode molekuler, yaitu gap PCR dengan primer spesifik dan visualisasi gel agarosa. Hasil yang diperoleh menunjukkan tidak ada mutasi delesi 619 bp yang terdeteksi pada semua

sampel yang digunakan. Visualisasi elektroforesis menunjukkan pita DNA berukuran 1.457 bp dan 2.291 bp dari PCR I serta ukuran 1.212 bp dari PCR II. Hal tersebut menunjukkan bahwa semua sampel berhasil diamplifikasi pada keseluruhan daerah gen beta-globin, yang memiliki 3 ekson yang diselingi 2 intron (Gambar 1). Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa kesemua primer amplifikasi dapat mengamplifikasi daerah gen beta-globin.

Hasil sekuensing pada ketiga sampel juga memastikan bahwa amplifikasi gen beta-globin berhasil dilakukan. Hal tersebut diketahui dengan melakukan analisis blast dari hasil sekuensing tiga sampel yang digunakan. Hasil blast menunjukkan bahwa terdapat similaritas 98% antara produk sekuensing dengan human HBB gene region on chromosome 11 (No. Akses U01317.1) dari database NCBI.

Penelitian ini juga tidak mengesampingkan kemungkinan sampel untuk membawa mutasi lain dalam daerah gen beta-globin. Metode lanjut dengan sekuensing pada semua sampel harus dilakukan untuk mengetahui adanya mutasi lainnya seperti mutasi titik, insersi dan delesi dalam skala kecil yang tidak dapat diamati dengan elektroforesis gel. Padahal, kebanyakan beta-talasemia disebabkan oleh mutasi titik yang telah dilaporkan terdapat lebih dari 200 mutasi (Rund & Rachmilewitz, 2005).

Metode yang dilakukan dalam penelitian ini dapat diaplikasikan sebagai *screening* awal kasar mutasi di daerah gen beta-globin, terutama untuk mendeteksi delesi langka 619 bp. Namun demikian, studi lebih lanjut harus dilakukan untuk mencari semua

mutasi dalam daerah gen beta-globin pada semua sampel yang dikumpulkan.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa tidak terdapat mutasi langka delesi 619 bp pada sampel mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas YARSI etnis melayu. Primer spesifik yang digunakan berhasil mengamplifikasi daerah gen beta-globin dan memiliki similaritas 98% dengan antara produk sekuensing dengan human HBB gene region on chromosome 11 (No. Akses U01317.1) dari database NCBI berdasarkan hasil analisis blast.

Saran

Perlu dilakukan sekuensing pada semua sampel untuk menemukan semua mutasi yang terdapat pada gen beta-globin, terutama mutasi titik yang tidak dapat diketahui dari hasil visualisasi gel agarosa.

Ucapan Terima Kasih

Teimakasih kami ucapkan kepada DIKTI yang telah memberikan dana penelitian melalui skema dana desentralisasi.

KEPUSTAKAAN

- Baysal E, Sharma S, Wong SC, Jogessar VB, & Huisman TH 1994. Distribution of beta-thalassemia mutations in three Asian Indian populations with distant geographical locations. *Hemoglobin*, 18:201-209.
- Chan OTM, Westover KD, Dietz L, Zehnder JL and Schrijver I 2010. Comprehensive and Efficient HBB Mutation Analysis for Detection of β

- Hemoglobinopathies in a Pan Ethnic Population. *American Journal of Clinical Pathology*, 133: 700-707.
- Fucharoen S & Winichagoon P 2007. Prevention and control of thalassemia in Asia. *Asian Biomedicine*, 1(1):1-6.
- Galanello R and Origa R 2010. Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Disease*, 21: 11.
- Hassan S, Ahmad R, Zakaria Z, Zulkafli Z and Abdullah WZ 2013. Detection of β -globin Gene Mutations Among β -thalassaemia Carriers and Patients in Malaysia: Application of Multiplex Amplification Refractory Mutation System-Polymerase Chain Reaction. *Malays Journal Medical Science*, 20(1): 13-20
- Lin M, Jiao JW, Zhan XH, Zhan XF, Pan MC, Wang JL et al. 2014. High Resolution Melting Analysis: A Rapid Screening and Typing Tool for Common β -Thalassemia Mutation in Chinese Population. *Plos One*, 9: 1-7.
- Munshi A, Anandraj MP, Joseph J, Shafi G, Anila AN & Jyothy A 2009. Inherited hemoglobin disorders in Andhra Pradesh, India: a population study. *Clin Chim Acta*, 400:117-119.
- Orkin SH, Old JM, Weatherall DJ, & Nathan DG 1979. Partial deletion of beta-globin gene DNA in certain patients with beta 0-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76:2400-2404.
- Orkin SH, Kolodner R, Michelson A, & Husson R 1980. Cloning and direct examination of a structurally abnormal human beta 0-thalassemia globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:3558-3562.
- Rund D, & Rachmilewitz E 2005. Beta-thalassemia. *The New England Journal of Medicine*, 15: 1135-1146.
- Sheth JJ, Sheth FJ, Pandya P, Priya R, Dayla S, Thakur C et al. 2008. Beta-thalassemia mutations in western India. *Indian J Pediatr*, 75:567-570.
- Shih HC, Er TK, Chang TJ, Chang TS, Li TC, & Chang JG 2009. Rapid identification of HBB gene mutation by high-resolution melting analysis. *Clinical Biochemistry* 42: 1667-1676.
- Thein SL, Old JM, Wainscoat JS, Petrou M, Modell B, & Weatherall DJ 1984. Population and genetic studies suggest a single origin for the Indian deletion beta thalassaemia. *Br J Haematol*, 57:271-278.
- Thein SL 2005. Genetic modifiers of β -thalassemia. *Haematologica*, 90(5): 649-660.
- Wang W, Kham SK, Yeo GH, Quah TC, & Chong SS 2003. Multiplex minisequencing screen for common Southeast Asian and Indian beta-thalassemia mutations. *Clinical Chemistry*, 49:209-218.