

Identifikasi Kelainan Gen Protein Pita 3 pada Membran Sel Darah Merah Penderita Talasemia β

Anna Maria Dewajanti

Staf Pengajar Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran UKRIDA
Alamat Korespondensi Jl.Arjuna Utara No.6 Jakarta Barat 11510

Abstrak : Talasemia merupakan kelainan genetik yang diturunkan secara resesif autosom. Terjadi ketidakseimbangan jumlah antara rantai globin α dan rantai globin β , sehingga ada rantai globin yang tidak berpasangan. Presipitasi rantai globin yang tidak berpasangan pada membran dapat mengakibatkan ootoksidasi membran sehingga dapat menyebabkan membran sel menjadi rigid. Selain protein skeleton membran, stabilitas sel darah merah juga sangat dipengaruhi oleh protein pita 3, suatu protein integral transmembran sel darah merah. Kelainan protein pita 3 dapat mempengaruhi fungsinya baik sebagai penukar ion maupun dalam mempertahankan stabilitas membran sel darah merah. Protein pita 3 yang abnormal dijumpai pada ovalositosis, suatu penyakit kelainan darah yang disebabkan oleh hilangnya 9 asam amino protein pita 3 akibat delesi kodon 400-408 pada ekson 11 gen protein pita 3. Hilangnya 9 asam amino protein pita 3 pada ovalositosis menyebabkan membran sel darah merah menjadi rigid sehingga menurunkan deformabilitas membran. Adanya rigiditas disertai penurunan kemampuan deformabilitas membran sel darah merah talasemia yang menyerupai membran sel darah merah ovalositosis, menimbulkan pemikiran bahwa kerusakan protein membran sel darah merah talasemia juga disebabkan oleh adanya kelainan gen penyandi protein pita 3. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi adanya kelainan gen protein pita 3 pada penderita talasemia. DNA genom diperoleh dari darah orang sehat dan pasien talasemia. Kemudian gen yang akan diperiksa diperbanyak dengan teknik PCR dan visualisasinya menggunakan elektroforesis gel agarosa 2%. Hasil PCR gen protein pita 3 pada orang sehat (normal) berukuran 175 ± 25 pb, sedangkan pada pasien talasemia dijumpai 2 produk PCR yang berukuran 175 ± 25 pb dan 110 ± 15 pb. Adanya produk PCR yang berukuran 110 ± 15 pb menunjukkan adanya kelainan gen protein pita 3 pada pasien talasemia berupa delesi gen sebesar 65 ± 10 pb. Kelainan genetik protein pita 3 pada talasemia tidak sama dengan kelainan genetik pada ovalositosis.

Kata kunci : talasemia, gen protein pita 3, kelainan genetik

Identification of Band 3 Protein Gene Abnormalities Red Blood Cell Membrane in Patients with β thalassemia

Abstract : *Thalassemia is a genetic disorder inherited as autosomal recessive. There is an imbalance between the number of globin chains α and β globin chains, so that there is an unpaired globin chains. Precipitation of unpaired globin chains in the membrane can lead to autooxidation the membrane so that it can cause the cell membranes become rigid. Stability of red blood cell is very influenced by protein sitoskeleton function. Others the stability of red blood cell is also greatly influenced by the band 3 protein, an integral transmembrane protein of red blood cells. Band 3 protein abnormalities may influence its function both as an ion exchange membrane and in maintaining the stability of red blood cells. Abnormal band 3 protein found in ovalositosis, a blood disorder caused by the loss of nine amino acids of protein band 3 due to a deletion of codons 400-408 in exon 11 band 3 protein gene. The loss of nine amino acids in the protein band 3 ovalositosis causes red blood cell membranes become rigid, thus reducing the membrane deformability. The existence of rigidity accompanied by a decreased ability of red blood cell membrane deformability thalassemia-like red blood cell membrane ovalositosis, raises the idea that the destruction of red blood cell membrane protein also thalassemia is caused by abnormalities band 3 protein-coding genes. This study aims to identify any abnormalities of band 3 protein gene in patients with thalassemia. Genomic DNA obtained from blood of healthy individuals and patients with thalassemia. Genes will be examined later propagated by PCR and visualization techniques using 2% agarose gel electrophoresis. PCR results of band 3 protein gene in healthy individuals (normal) size of 175 ± 25 bp, whereas in patients with thalassemia found two PCR product size 175 bp and $110 \pm 25 \pm 15$ bp. Presence of PCR product size 110 ± 15 bp showed a protein band 3 gene defects in patients with thalassemia in the form of gene deletions by 65 ± 10 bp. Genetic disorder of protein band 3 in thalassemia is not the same as genetic abnormalities in ovalositosis.*

Key words : *thalassemia, protein band 3 gene, genetic disorders.*

Pendahuluan

Prevalensi talasemia cukup tinggi pada populasi di dunia termasuk Indonesia, kelainan ini disebabkan oleh kira-kira 200 mutasi pada gen globin.¹ Cacat molekul (mutasi) pada gen globin α atau β mengakibatkan tidak terjadinya atau berkurangnya sintesis rantai globin. Keseimbangan ekspresi gen globin α dan β dibutuhkan untuk fungsi hemoglobin yang normal. Jumlah rantai globin α dan β yang tidak seimbang pada penderita talasemia mengakibatkan adanya rantai globin yang tidak berpasangan. Rantai globin yang tidak berpasangan ini akan mengalami presipitasi, yang melekat pada membran sel darah merah dan mengakibatkan otooksidasi membran.^{2,3} Membran sel darah merah menjadi lebih rigid sehingga menurunkan kemampuan deformabilitas membran sel darah merah. Selain rigid, sel darah merah talasemia menjadi lebih

kecil (mikrositik). Perubahan-perubahan ini akan ditanggapi sebagai suatu sinyal oleh sistem makrofag berupa isyarat untuk merusak sel dan mengakibatkan destruksi dini sel darah merah.^{3,4}

Stabilitas sel darah merah sangat dipengaruhi oleh keadaan dan fungsi protein sitoskeleton, yang pada dasarnya terdiri atas aktin, spektrin, pita 4.1, pita 4.2 dan ankirin.⁵ Selain itu stabilitas sel darah merah juga sangat dipengaruhi oleh protein pita 3, suatu protein integral / transmembran sel darah merah. Kelainan pada protein pita 3 membran sel darah merah juga berkaitan dengan meningkatnya destruksi dini sel darah merah dan terjadinya anemia.⁶⁻⁸

Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi adanya kelainan gen protein pita 3 pada pasien talasemia β . Penelitian ini merupakan usaha awal dalam menganalisis kelainan gen tersebut pada pasien talasemia dengan cara mengidentifikasi kelainan gen penyandi protein

pita 3. Manfaat penelitian ini, dengan mengetahui adanya kelainan gen penyandi protein pita 3, maka penerapan terapi gen pada pasien talasemia tidak hanya pada gen globin saja tapi juga pada gen protein pita 3.

Talasemia β .

Talasemia β diturunkan secara autosom resesif dan timbul karena adanya cacat molekul (mutasi) pada gen globin β yang terletak pada kromosom 11.^{1,9,10} Gen globin β terdiri dari tiga ekson yang dipisahkan oleh dua intron (IVS, *intervening sequence*), yaitu intron yang pendek dan yang panjang. Intron yang pendek (IVS1) terletak di antara kodon 30 dan 31, sedangkan intron yang panjang (IVS2) terletak diantara kodon 104 dan 105.⁹

Gen talasemia β umum disebut β^T . Karena tiap kromosom hanya mengandung satu gen β , maka haplotipe yang mungkin adalah $\beta/$ dan $\beta^T/$ dengan genotip: β/β normal, β/β^T talasemia β heterozigot, β^T/β^T talasemia β homozigot.¹¹ Oleh karena itu talasemia β dikategorikan ke dalam tiga golongan: talasemia β minor (*carrier*), talasemia β intermedia, dan talasemia β mayor.¹²

Berdasarkan jumlah rantai β fungsional yang terbentuk, talasemia β dapat dibedakan menjadi 2 yaitu: talasemia β^o (tak ada rantai β fungsional) dan talasemia β^+ (ada rantai β fungsional walaupun sedikit).¹¹ Berat atau ringannya gejala penyakit talasemia tergantung pada dua faktor yaitu: fenotip gen β^T (β^o atau β^+) dan heterozigot atau homozigot. Hubungan antara bentuk kelainan genetik dengan gejala-gejala klinis dapat dilihat pada Tabel 1.¹¹

Tabel 1. Klasifikasi Klinis Talasemia β ¹¹

Klasifikasi klinis	Genotip	Fenotip
Talasemia minor	β / β^T dengan variasi: β / β^+	- Anemia ringan - heterozigot
Talasemia intermedia	β^T / β^T dengan variasi: β / β^o β^+ / β^+ β^+ / β^o	Anemia lebih berat dari pada talasemia minor tetapi tidak separah mayor Anemia berat harus transfusi darah
Talasemia mayor	β^T / β^T dengan: β^o / β^o	

Dasar Molekuler Talasemia β

Cacat molekul pada talasemia β sangat heterogen. Tidak seperti pada talasemia α yang kebanyakan disebabkan oleh delesi gen, cacat molekul pada talasemia β lebih banyak disebabkan oleh substitusi nukleotida tunggal atau mutasi titik yang mempengaruhi daerah-daerah kritis untuk berfungsinya gen globin β . Lebih dari 200 jenis mutasi titik telah ditemukan di dalam gen globin β .¹

Sebagian besar mutan menyebabkan penurunan sintesis mRNA globin β yang normal. Penurunan produksi rantai globin β bervariasi mulai penurunan yang ringan hingga tidak ada produksi sama sekali tergantung pada pengaruh

mutasi tersebut terhadap tingkat fungsi gen globin β , seperti pada tahap transkripsi, proses RNA, atau pada translasi mRNA.¹

Dikenal 4 jenis mutan utama pada talasemia β yaitu 1) mutan promotor, 2) mutan RNA *splicing*, 3) mutan RNA *capping/tailing* dan 4) mutan translasi. Bentuk cacat molekul talasemia β lainnya adalah kerusakan pada daerah penyandi, mutasi *frameshift* yang dapat merubah reading frame sehingga mengakibatkan polipeptida yang pendek dan tidak stabil serta terbentuknya kodon stop yang mengakibatkan terminasi prematur proses translasi.¹

Membran Sel Darah Merah pada Penderita Talasemia

Otoksidasi pada membran sel darah merah dapat mengakibatkan perubahan struktur protein membran, antara lain terjadinya ikatan lintas silang antara protein membran disertai berkurangnya gugus sulfhidril.^{3,13} Hasil elektroforesis protein membran sel darah merah talasemia menunjukkan adanya pita protein tambahan dengan BM sekitar 30.000 yang mungkin dihasilkan dari ikatan lintas silang beberapa protein membran.¹³

Ditemukan pula bahwa protein sitoskeleton saling berinteraksi, juga berinteraksi dengan protein membran lain dan dengan dwilapis lipid.¹³ Misalnya protein spektrin berinteraksi dengan rantai globin α yang mengalami peroksidasi, protein 4.1 berinteraksi dengan protein spektrin dan aktin. Kelainan struktural spektrin tidak mengakibatkan gangguan fungsi karena ikatan spektrin dengan komponen membran lainnya tidak terpengaruh. Sedangkan interaksi protein 4.1 dengan protein lain mengakibatkan penurunan kemampuan protein 4.1 untuk mengikat spektrin.^{2,13}

Telah dilaporkan ada pula protein lain yang mengalami perubahan, yaitu protein pita 3.¹⁴ Protein pita 3 merupakan protein transmembran sel darah merah yang berfungsi sebagai penukar anion. Perubahan yang terjadi pada protein pita 3 akibat adanya otoksidasi membran, berupa tidak bisa diamatinya protein tersebut (tampak tipis) pada hasil elektroforesis protein dengan menggunakan SDS PAGE 10% dan disertai dengan munculnya pita tambahan (penebalan pita) yang berat molekulnya lebih kecil (\pm 80 kD). Disimpulkan protein tersebut telah mengalami degradasi menjadi molekul yang lebih kecil.¹⁴

Bahan dan Cara Kerja

A. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan untuk isolasi DNA adalah tabung darah-EDTA, tabung mikro 1,5 mL steril, tabung mikro berfilter dan *collecting tube*, mikropipet (Finnpipette Digital) ukuran 5 – 40 μ L dan 40 – 200 μ L + tip steril, mikropipet (Socorex) ukuran 200 – 1000 μ L + tip steril, autoklaf, alat pemusing mikro (Eppendorf Centrifuge 5415 C), spektrofotometer *double beam* (Shimadzu), penangas air (waterbath GFL 1083), sarung tangan karet.

Bahan-bahan yang digunakan untuk isolasi DNA adalah sampel (darah pasien talasemia dengan kriteria menderita talasemia β mayor berdasarkan status klinik di Pusat talasemia RSCM/FKUI dan darah orang sehat/normal dengan kriteria tidak mempunyai keturunan penderita talasemia dan ovalositosis, tidak menunjukkan gejala anemia dan nilai Hb dalam batasan normal), isopropanol absolut, RNase-DNase-free (Boehringer *Cat.No.1119915*), kit isolasi DNA - *High pure PCR Template Preparation Kit* dari Roche *Cat.No. 1796828* – berisi: proteinase K, *binding buffer* (20 mL larutan yang mengandung: 6 M guanidin-HCl, 10 mM urea, 10 mM tris-HCl, 20% triton X-100 v/v pH 4,4), *wash buffer* (100 mL larutan yang mengandung: 20 mM NaCl, 2 mM tris-HCl, pH 7,5, 80mL etanol absolut), *elution buffer* (40 mL larutan 10 mM tris pH 8,5), *inhibitor removal buffer* (55 mL larutan yang mengandung: 5 M guanidin-HCl, 20 mM tris-HCl, pH 6,6, 20 mL etanol absolut)

Alat-alat yang digunakan untuk **Polymerase Chain Reaction (PCR)** adalah tabung mikro 200 μ L, mikropipet (Eppendorf) ukuran 0.5–10 μ L + tip steril, pipet mikro (Finnpipette Digital) ukuran 5 – 40 μ L dan 40 – 200 μ L + tip steril, vorteks, autoklaf, alat pemusing mikro (Eppendorf Centrifuge 5415 C), spektrofotometer *double beam* (Shimadzu), Mesin PCR / Eppendorf Mastercycler Personal, sarung tangan karet.

Bahan-bahan yang digunakan untuk **Polymerase Chain Reaction (PCR)** adalah : hasil isolasi DNA darah, akuabidestilata steril, *Taq DNA Polymerase* (Promega *catalog #M1661*), Primer DNA (GENSET Singapore Biotech.), Kit untuk reaksi PCR (*PCR Core Kit* dari Roche *Cat.No.1578553*) berisi : dNTP *mix* (200 μ L larutan mengandung 10 mM dATP, dCTP, dGTP,dTTP pH7,0), bufer reaksi PCR 10X (1 mL mengandung 100 mM tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,3), larutan MgCl₂ (1 mL 25 mM MgCl₂).

Alat-alat yang digunakan untuk elektroforesis adalah: tabung mikro 200 μ L, mikropipet (Eppendorf) ukuran 0.5 – 10 μ L + tip steril, Pipet mikro (Finnpipette Digital) ukuran 5 – 40 μ L dan 40 – 200 μ L + tip steril, timbangan analitik (Sartorius), vorteks, alat pemusing mikro (Eppendorf Centrifuge 5415 C), alat elektroforesis horizontal, UV- transiluminator (Vilber Lourmat TCX-15.M), sarung tangan

karet, sistem dokumentasi polaroid dan Film Polaroid Fuji 3000B.

Bahan-bahan yang digunakan untuk elektroforesis gel agarosa 2 % adalah: hasil PCR, agarosa, akuabidestilata, bufer TAE 10X (pH 8,4), etidium bromida (BIO-RAD), *loading dye* (terdiri dari : zat pewarna bromphenol blue (BPB (Merck) dan xylene cyanol (XC) (Merck), petanda ukuran DNA (X174 DNA, cleaved with *HaeIII* (Roche))

B. Cara Kerja :

1. Isolasi DNA

DNA genom diperoleh dari darah orang sehat dan pasien talasemia sebelum transfusi menggunakan *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche). Sampel darah di simpan dalam tabung yang berisi EDTA. Isolasi DNA dilakukan segera setelah mendapatkan sampel darah.

Teknik isolasi DNA adalah ke dalam tabung mikro 1,5 mL dimasukkan 200 μ L sampel darah kemudian ditambahkan 200 μ L *binding buffer* dan 40 μ L proteinase K. Setelah dicampur, kemudian dilakukan inkubasi selama 10 menit pada suhu 72°C. Setelah diinkubasi kemudian ditambahkan 100 μ L isopropanol, dicampur dengan baik untuk presipitasi DNA. Lalu campuran tersebut dipindahkan ke dalam tabung berfilter (*glass-fibers*) yang dirangkai dengan *collecting tube* (*High Pure Purification Filter*). Kemudian campuran tersebut disentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm. Setelah dilakukan sentrifugasi larutan yang ada di *collecting tube* dibuang, kemudian *tube* dirangkai kembali. Kedalam tabung berfilter yang berisi DNA tersebut dimasukkan 500 μ L *inhibitor removal buffer*, lalu disentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm. Setelah disentrifugasi kemudian larutan yang ada di *collecting tube* dibuang dan *tube* dirangkai kembali. Untuk mencuci DNA, ke dalam tabung berfilter tersebut dimasukkan 500 μ L *wash buffer* kemudian disentrifugasi selama 1 menit, pada 8000 rpm. Setelah itu larutan yang ada di *collecting tube* dibuang. Pencucian pelet DNA dilakukan 2 kali. Setelah larutan yang ada di *collecting tube* dibuang dilakukan sentrifugasi kembali selama 10 detik pada 8000 rpm. Kemudian *collecting tube* diganti dengan tabung mikro berukuran 1,5 mL. Ke dalam tabung

berfilter tersebut ditambahkan 200 μ L *elution buffer* yang telah dipanaskan 70°C. Kemudian disentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm. Larutan yang ada dalam tabung mikro 1,5 mL tersebut adalah DNA murni. Larutan DNA disimpan di dalam ruang -4°C.

1.1. Penghitungan Jumlah DNA yang diperoleh

Ke dalam kuvet berukuran 1 mL dimasukkan 1 mL akuabidest, kemudian ditambahkan 1 μ L DNA yang akan dihitung ke dalam kuvet tersebut dan dicampur dengan membalik-balikkan kuvet 5X. Setelah itu serapan DNA diukur pada panjang gelombang 260 nm (A_{260}). Pada $A_{260} = 1$, konsentrasi DNA adalah 50 μ g/mL. Konsentrasi DNA (μ g/mL) dihitung dengan cara = $A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL}$: pengenceran (1 / 1000), sedangkan jumlah DNA yang diisolasi dihitung dengan cara:

$$\text{Jumlah DNA yang diisolasi} = \frac{\text{konsentrasi DNA} \times \text{vol larutan DNA}}{\text{pengenceran}}$$

$\frac{(\mu\text{g/mL}) \times (\mu\text{L})}{(\mu\text{g/mL})}$

1.2. Penentuan Kemurnian DNA

Ke dalam kuvet berukuran 1 mL dimasukkan 1 mL akuabidest, kemudian ditambahkan 1 μ L DNA yang akan dihitung ke dalam kuvet tersebut dan dicampur dengan membalik-balikkan kuvet 5X. Setelah itu serapan cahaya protein diukur pada panjang gelombang 280 nm (A_{280}). Kemurnian DNA ditentukan dengan indeks kemurnian (IK). Rumus Indeks kemurnian = A_{260} / A_{280} . DNA dikatakan murni apabila $1.8 \leq \text{IK} \leq 2.00$ (Roche Molecular Biochemicals). Bila nilai $\text{IK} < 1.8$ artinya DNA yang dihasilkan masih terkontaminasi protein, sedangkan nilai $\text{IK} > 2.00$ menunjukkan kontaminasi RNA di dalam larutan DNA hasil isolasi.^{15,16}

2. Amplifikasi DNA Menggunakan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Pada penelitian ini, untuk amplifikasi DNA digunakan sepasang primer oligo-nukleotida, P1 (5'- GGGCCCAGATGACCCTCTGC - 3' ; basa 1098-1117) dan P2 (5'- GCCGAAGGTGATGGCGGGTG-3' ; basa

1272-1253).¹⁶ Reaksi PCR dilakukan dengan cara mencampur 2.5 mL bufer PCR 10X, 1 μ L primer P1 dan P2 (masing-masing 20 pmol), 1 μ L dNTP mix (dATP, dGTP, dCTP, ddTTP masing-masing 200 μ M), 0.25 μ L DNA polimerase AmpliTag (1.25 U), DNA cetakan 60 μ g (DNA genom hasil isolasi) dan kemudian ditambahkan akuabides steril sampai volume total 25 μ L dalam tabung PCR (tabung mikro 200 μ L). Setelah itu campuran tersebut disentrifugasi 15000 rpm selama beberapa detik agar homogen. Kemudian tabung PCR tersebut dimasukkan ke dalam mesin PCR yang telah diprogram: 95°C,5menit-(95°C,30detik-70°C,30detik-70°C,30 detik)x30 - 4°C stored. Setelah selesai tabung mikro diangkat dari mesin PCR. Produk PCR yang diperoleh berukuran 175 pb (normal).

3. Elektroforesis Gel Agarosa 2%

Pembuatan gel agarosa 2% dilakukan dengan cara menimbang 0.6 g agarosa, kemudian dilarutkan dengan cara dididihkan dalam 30 mL TAE 1X. Setelah itu gel dituang ke dalam cetakan yang telah dipasang *comb*. Gel dibiarkan selama kurang lebih 10-15 menit. Kemudian *comb* diangkat. Setelah itu ke dalam *electrophoresis tank* dituang buffer TAE 1x (pH 8.4). Kemudian disiapkan 5 μ L sampel hasil PCR dalam tabung 200 μ L dan ditambahkan 2 μ L larutan *loading dye*. Kemudian campuran tersebut divorteks dan disentrifugasi selama beberapa detik hingga larutan tercampur rata. Kemudian disiapkan pula 2 μ L larutan penanda ukuran DNA (*DNA marker*) dalam tabung 200 μ L kemudian ditambahkan 2 μ L larutan *loading dye* dan 3 μ L akuabides steril. Kemudian campuran tersebut divorteks dan disentrifugasi selama beberapa detik hingga larutan tercampur rata. Setelah itu sampel hasil PCR yang telah diberi *loading dye* tadi dan juga petanda ukuran DNA dipipetkan ke dalam sumur-sumur kosong gel. Kemudian alat elektroferesis dihubungkan dengan *power supply*. Sumur harus terletak pada kutub negatif alat tersebut. Elektroforesis dijalankan pada 95 Volt untuk sekitar 20 menit. Kemudian gel diwarnai dengan 0,02% etidium bromida selama 2 menit dan dicuci 2x dengan akuades. Hasilnya divisualisasikan menggunakan UV-

Transiluminator dan didokumentasikan menggunakan foto polaroid.

Hasil dan Pembahasan

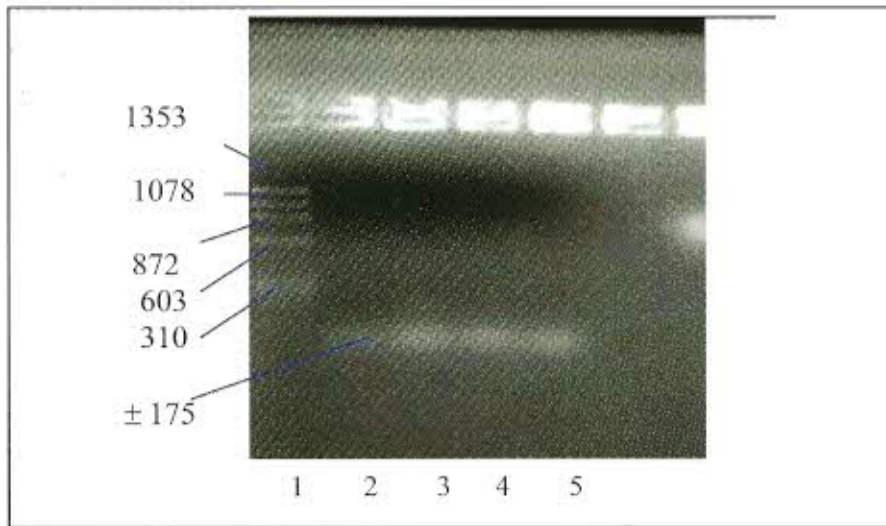
Hasil isolasi DNA diperbanyak menggunakan teknik PCR yang memerlukan waktu \pm 2 jam. DNA cetakan yang digunakan dalam proses PCR ini diperoleh dari hasil isolasi DNA genom dari darah.

Dengan jumlah DNA hasil isolasi 40 μ g, pita hasil elektroforesis produk PCR-nya tampak tipis (lajur 2). Sementara dengan jumlah DNA hasil isolasi 60 μ g atau lebih (lajur 3,4,5), pita hasil elektroforesis produk PCR-nya sudah cukup jelas, sehingga untuk selanjutnya digunakan DNA dengan jumlah 60 μ g sebagai cetakan.

Untuk mengetahui adanya delesi gen penyandi protein pita 3 yang menyebabkan ovalositosis digunakan primer yang sama seperti yang digunakan Jarolim *et al.* (1991)¹⁶ Primer ini (P1 dan P2) digunakan untuk memperoleh produk PCR berupa gen protein pita 3, yang terletak pada ekson 11, dari basa 1098 sampai basa ke-1272, sehingga panjang gen yang diperoleh 175 pasang basa (pb) (Gambar 1).

Hasil elektroforesis produk PCR menggunakan primer tersebut, pada pasien ovalositosis memperlihatkan 2 pita yaitu dengan ukuran 175 pb dan 148 pb. Adanya pita ke-2 berukuran 148 pb tersebut menunjukkan terdapat delesi 27 pb.²⁰ Delesi tersebut terjadi pada ekson 11, basa ke-1197 sampai basa ke-1225. Akibat delesi 27 pb / hilangnya 9 asam amino yang menyusun protein pita 3 pada ovalositosis menyebabkan gangguan keseimbangan struktur dan gerak protein sitoskeleton sel darah merah karena mobilitas protein pita 3 menurun dan kekuatan ikatan antara protein pita 3 dengan protein sitoskeleton meningkat, sehingga membran menjadi kaku (rigid).

Pada penelitian ini digunakan primer yang sama dengan yang dipakai untuk identifikasi ovalositosis, dengan tujuan untuk menganalisis adanya kelainan gen berupa delesi seperti yang terjadi pada ovalositosis, yang mungkin menyebabkan rigiditas membran disertai kemampuan deformabilitas membran sel darah merah. Dari hasil elektroforesis produk PCR DNA protein pita 3 ditemukan perbedaan pola pita DNA antara orang normal (sehat) dan pasien talasemia.



Gambar 1. Hasil Elektroforesis Gel Agarosa 2%: DNA Marker (Lajur 1), DNA Protein Pita 3 Pasien Talasemia dengan 1 Pita (175 Pb) Jumlah DNA 40(2), 60(3), 80(4) dan 100 µg(5).

Besarnya molekul (BM) DNA hasil PCR pada penelitian ini dihitung dengan cara membuat kurva standar BM DNA di mana sumbu X adalah jarak tempuh setiap DNA petanda dari sumur gel dan sumbu Y adalah besarnya BM setiap DNA petanda (Gambar 2). Kurva standar tersebut linear dengan $r = -0.9799$ dan persamaan garis $Y = -592.3597 X + 1648.4120$. Berdasarkan persamaan garis tersebut besarnya molekul DNA hasil PCR ditentukan.

Dari hasil elektroforesis produk PCR DNA pasien talasemia terdapat 2 pita dengan besar molekul yang berbeda. Dengan penghitungan berdasarkan persamaan garis di atas diketahui besar molekul dari masing-masing DNA produk PCR tersebut. Pita DNA bagian atas (pertama) berukuran 175 ± 25 pb dan pita DNA bagian bawah (kedua) berukuran 110 ± 15 pb. Sementara hasil elektroforesis produk PCR DNA normal (orang sehat) hanya terdapat 1 pita (pita bagian atas saja) yang berukuran 175 ± 25 pb (Gambar 3).

Walaupun hasil elektroforesis produk PCR DNA pasien talasemia dan ovalositosis sama-sama memperlihatkan 2 pita DNA, namun besar molekul pita bagian bawahnya (kedua) berbeda. Pita bagian bawah (kedua) hasil elektroforesis produk PCR DNA pasien talasemia mempunyai

besar molekul 110 ± 15 pb, sementara pada ovalositosis pita bagian bawahnya memiliki besar molekul 148 pb. Berbeda dengan pasien ovalositosis yang mengalami delesi gen protein pita 3 sebesar 27 pb, pada pasien talasemia yang diamati terjadi delesi gen yang lebih besar yaitu 65 ± 10 pb.

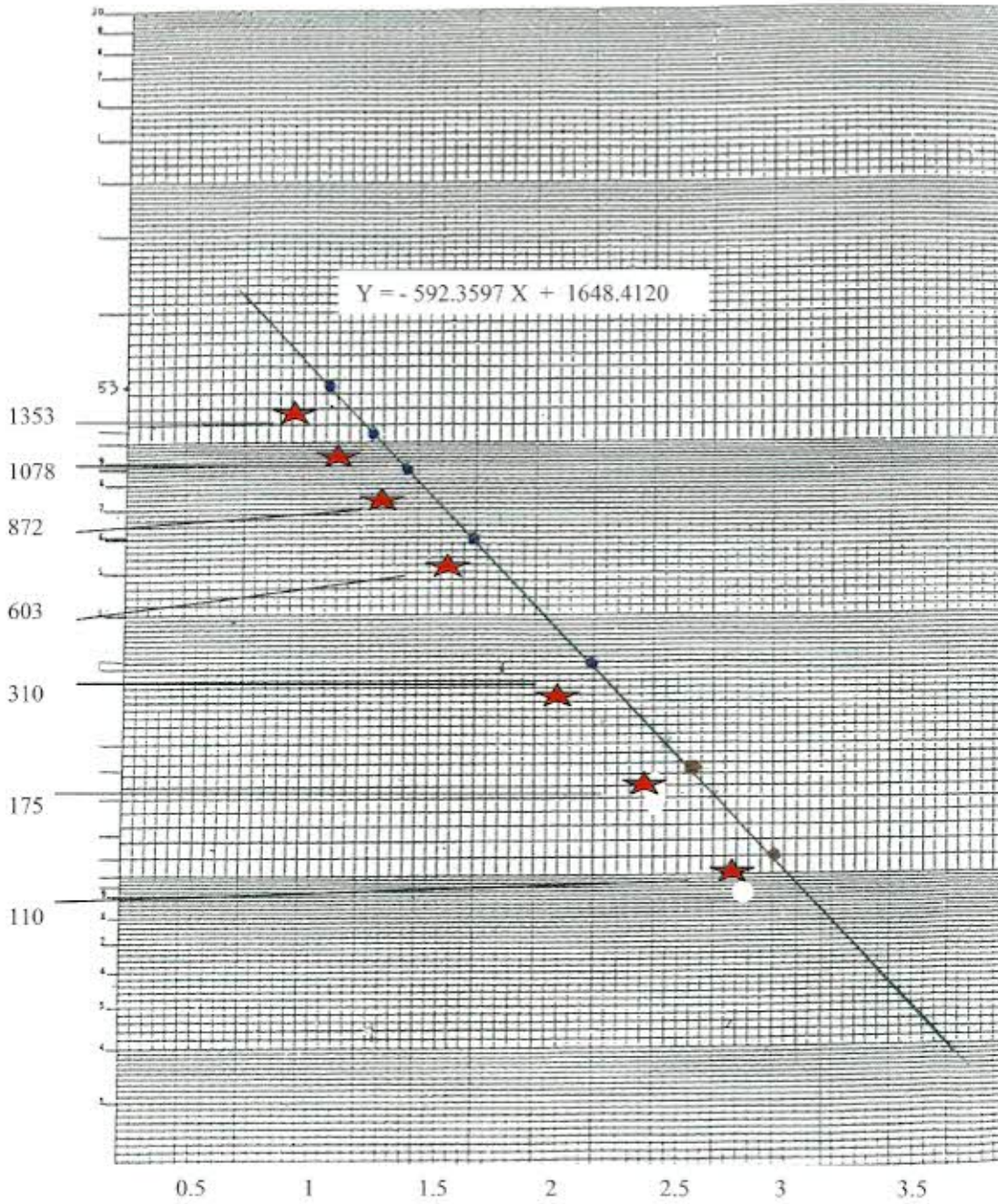
Letak delesi gen protein pita 3 pada pasien talasemia tersebut belum dapat diketahui, karena berdasarkan sekuensing yang telah dilakukan terhadap pita bagian bawah hasil elektroforesis produk PCR DNA protein pita 3 pada penelitian ini, urutan nukleotida pita DNA bagian bawah tersebut tidak dapat terbaca. Hal ini dikarenakan jumlah nukleotida yang menyusun pita DNA bagian bawah tersebut terlalu sedikit/kecil. Sekuensing terhadap pita bagian bawah hasil elektroforesis produk PCR DNA pasien talasemia dilakukan di lembaga Eijkman menggunakan *Automatic Sequencing* dengan prinsip metode Sanger, yaitu cara pengurutan nukleotida dengan melibatkan sintesis enzimatik untai DNA kedua yang komplementer terhadap cetaknya yang diakhiri secara selektif pada tempat spesifik.¹⁶

Adanya kelainan gen penyandi protein pita 3 pada pasien talasemia ini dapat menyebabkan kerusakan membran sel darah merah yang terjadi

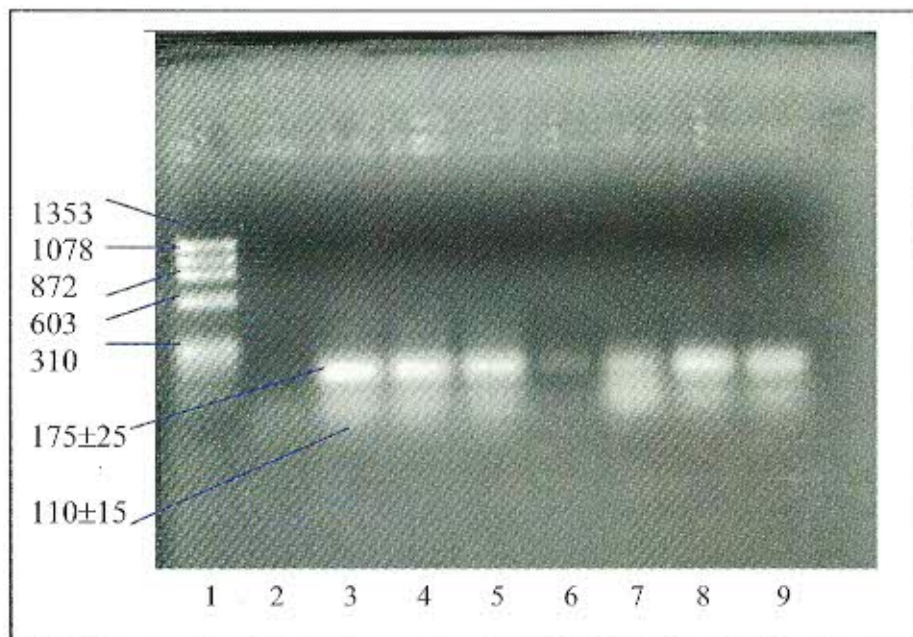
semakin sulit diperbaiki atau dikurangi hanya dengan cara pemberian antioksidan. Dengan pemberian antioksidan, otooksidasi terhadap membran sel darah merah dapat dikurangi sehingga dapat memperbesar interval pemberian transfusi darah, tetapi hanya dengan pemberian antioksidan saja tidak dapat memperbaiki kerusakan protein pita 3 akibat adanya kelainan gen protein pita 3. Tindakan penyembuhan yang paling efektif adalah melalui transplantasi sumsum tulang di mana akan diperoleh sel darah merah normal yang baru. Terapi gen juga dapat dilakukan, dengan memperhatikan adanya 2 gen yang perlu diperbaiki yaitu gen globin dan gen protein pita 3.

Kesimpulan dan Saran

Telah berhasil diidentifikasi adanya kelainan gen protein pita 3 pada penderita talasemia β dengan ditemukannya produk PCR berukuran 110 ± 15 pb, berupa delesi gen sebesar 65 ± 10 pb. Kelainan genetik protein pita 3 pada pasien talasemia ini tidak sama dengan kelainan genetik yang ditemukan pada ovalositosis. Perlu dilakukan strategi sekuensing yang lebih baik agar dapat diketahui posisi delesi gen penyandi protein pita 3 pada pasien talasemia.



Gambar 2. Grafik kurva standar BM DNA petanda: sumbu Y = besarnya BM setiap DNA petanda dan sumbu X = jarak tempuh setiap DNA petanda dari sumur gel.



Gambar 3. Hasil Elektroforesis Gel Agarosa 2%: DNA Marker (lajur 1), DNA Protein Pita 3 Pasien Talasemia (3,4,5,7,8,9) dan DNA Protein Pita 3 Normal (6).

Daftar Pustaka

- Olivieri NF. The β -thalassemias. *N Engl J Med* 1999;341:99-109.
- Shinar E, Shalev O, Rachmilewitz EA, Schrier SL. Erythrocyte membrane skeleton abnormalities in severe β -thalassemia. *Blood* 1987;70:158-64.
- Rachmilewitz EA. Pathologic changes of red blood cell membranes in thalassemia. *Birth Defects: Original Article Series* 1982;18:219-22.
- Rachmilewitz EA, Shinar R, Shalev O, Galili U, Schrier SL. Erythrocyte membrane alterations in β -thalassemia. *Clin Haematol* 1985;14:163-182
- Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. Ed2. New York: John Wiley & Sons, Inc.,1995.
- Tanner MJA. Molecular and cellular biology of the erythrocyte anion exchanger (AE1). *Semin in Hematol* 1993;30(1): 34-57.
- Mannu F, Arese P, Cappellini MD, Fiorelli G, Cappadoro M, Giribaldi G, Turrini F. Role of hemichrome binding to erythrocyte membrane in the generation of band 3 alterations in β -thalassemia intermedia erythrocytes. *Blood* 1995;86(5):2014-2020.
- Jarolim P, Hillard LR, Vaclay B, Ladislav C, Alexander S, Zolotarev S, Alper L, Carlo B, Hynek W, Jiri P. Mutation of conserved arginines in the membrane domain of erythroid band 3 lead to a decrease in membrane associated band 3 and to the phenotype of hereditary spherocytosis. *Blood* 1995;85(3):634-640.
- Lukens JN, Lee GR. The abnormal hemoglobins: general principles. Dalam: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, ed. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Ed.9. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993: 1023-1053.
- Weatherall DJ, Provan AB. Red Cells I: Inherited anaemias. *The Lancet* 2000;355:1169-75.
- Suryohudoyo P. Kapita selekta: ilmu kedokteran molekuler. 2000 : vi+129hlm.
- Lukens JN. The thalassemias and related disorders: quantitative disorders of hemoglobin synthesis. Dalam: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, ed. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Ed.9. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993: 1102-1145
- Shinar E, Rachmilewitz EA. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. *Semin Hematol* 1990;27:70-82.
- Kurniati MMV. Analisis pola protein membran sel darah merah normal dan talasemia secara elektroforesis. Tesis Magister Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2000.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning, laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
- Holme DJ, H Peck. *Analytical biochemistry*. 2nd ed. Longman Scientific & Technical, New York 1993.