POLA MUTAN GEN GLUKOSA 6 FOSFAT DEHIDROGENASE DI SURABAYA

Suhartati *)

ABSTRACT

Glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency was studied in open Surabaya region. Seventy-six blood samples were collected from Surabaya The samples were screened using Randox Kit to determine the activity of G6PD, taking a cut-off value of less than 60% as indicating G6PD deficiency. Thirty one of cases tested positive with the Randox Kit test, 26 of which tested positive with MPTP. In this study, genomic DNA from blood samples were extracted using simple rapid genomic DNA method. The extracted DNA was then used to amplify exon 5, 6, 9, 11, and 12 of the G6PD genes to detect mutants using Multiplex PCR with Multiple Tandem forward Primers and a common reverse primer (MPTP) technique according to Shirakawa. Seven different G6PD mutants were found in Surabaya: 4 cases of Vanua Lava, a single G6PD Viangchan cases, 5 cases of G6PD Chatham, 2 cases of G6PD Union, 7 cases of Canton , 6 cases of Kaiping and 2 cases of Silent mutation. Double mutants were also found, all involving silent mutations: Canton + Silent, Vanua Lava + Silent, and Viangchan + Silent, one case each. Nine cases of G6PD deficiency were found in women with a history of miscarriages : 3 cases of Canton, 3 cases of Kaiping, one single case of Vanua Lava and 2 tested negative with MPTP. G6PD deficiency is usually asymptomatic. Symptoms will only appear if those persons ingest oxidants such as certain drugs or foodstuffs. The disorders manifest itself as hemolytic anemia, repeated hepatitis, repeated miscarriages etc. Since G6PD deficiency is more or less prevalent in Indonesia, an early diagnosis would be of advantage, so that people with G6PD deficiency could avoid ingesting oxidants

Keywords: G6PD deficiency, MPTP, history of miscarriages, oxidants.

PENDAHULUAN

Defisiensi G6PD adalah cacat enzimatik akibat mutasi gen G6PD, yang mengakibatkan penurunan aktivitas enzim G6PD. Diperkirakan 400 juta manusia di dunia menderita defisiensi G6PD, frekuensi yang tinggi tersebar di belahan dunia timur. Di Asia Tenggara didapatkan prevalensi penderita defisiensi G6PD antara 0%-10% (Iwai *et al.,* 2001). Di Indonesia, frekuensi G6PD yang pernah dipublikasikan antara 3,9% -18,4% (Matsuoka *et al.,* 1986, Soemantri *et al.,* 1995,Damanik, 2001, Sofro, 1984 dan Iwai *et al.,* 2001).

Selama ini pengamatan gejala klinik yang terjadi sebagai akibat defisiensi G6PD hanya tertuju pada anemia hemolitik. Ahkir-akhir ini dibuktikan bahwa periode krisis pada organogenesis jaringan embrio melibatkan beberapa enzim yang penting bagi pertahanan terhadap dampak buruk oksidan, salah satu di antaranya adalah enzim G6PD. Peneliti Nicol (2000) membuktikan pada hewan coba dengan defisiensi

*) **Departemen Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

G6PD terjadi peningkatan kematian janin dalam kandungan dan kelahiran cacat. Pendapat ini didukung oleh peneliti Longo (2002), yang membuktikan bahwa defisiensi G6PD dapat mengganggu perkembangan plasenta dan mengakibatkan kematian janin. Menurut Jalan Anil, gen yang terletak pada kromosom X regio q 28 (Xq28), dikaitkan dengan terjadinya abortus berulang dan gen penyandi G6PD terletak pada region telomerik lengan panjang kromosom X (Xq28) (Jalan Anil, 2004).

Sebagian besar defisiensi G6PD tidak menunjukkan gejala klinis, sehingga pemahaman mengenai akibat yang mungkin timbul pada penderita defisiensi G6PD yang terpapar bahan oksidan masih belum sepenuhnya dipahami. Kepentingan diagnosis dini belum sepenuhnya disadari. Sangat disayangkan jika defisiensi G6PD yang mengakibatkan kekurangan enzim anti oksidan endogen dapat menimbulkan keguguran, karena kekurangan antioksidan endogen dapat diatasi dengan pemberian antioksidan eksogen melalui makanan. Jadi seandainya diagnosis dini defisiensi G6PD telah ditegakkan secara awal, kemungkinan keguguran dapat dihindarkan (Chan, 2006).

Populasi Indonesia memiliki variasi genetik beraneka ragam, daerah pesisir merupakan daerah terbuka dengan penduduk yang mempunyai mobilitas tinggi, terdapat percampuran berbagai variasi genetik. Di daerah tersebut besar kemungkinan terjadi berbagai jenis mutan gen, karena adanya pembauran (perkawinan) antar satu populasi dengan populasi lain yang dikenal dengan aliran gen (*genetic flow*), sehingga memungkinkan terciptanya kombinasi genetik. Dalam hal ini Surabaya tampaknya merupakan kawasan yang cukup penting untuk diamati, mengingat sifatnya sebagai kota besar nomer dua di Indonesia dan sebagai kota pesisir yang sangat terbuka bagi percampuran berbagai variasi genetik. Maka keberadaan enzim G6PD cukup penting diamati keterkaitannya dengan defisiensi G6PD di Surabaya khususnya bagi ibu dengan riwayat kehamilan yang buruk. Oleh karena itu masih perlu dilakukan penelitian defisiensi G6PD lebih lanjut dengan pendekatan paradigma bidang molekuler untuk mengungkapkan mutan gen G6PD, yang dapat menentukan berat ringannya gejala klinis. Pada penelitian ini dilakukan analisis mutan gen G6PD di Surabaya. Penggunaan analisis mutasi gen G6PD untuk menentukan mutan gen G6PD tersebut diharapkan dapat menentukan pola mutan gen G6PD, selanjutnya berguna untuk menentukan pencegahan terhadap dampak buruk akibat pemaparan oksidan pada penderita defisiensi G6PD yang sering cukup serius dan mengancam kehidupan antara lain keguguran.

Masalah penelitian ini adalah menentukan jenis mutan gen G6PD apa saja yang didapatkan di Surabaya? Adakah keterkaitan

keguguran yang tak diketahui sebabnya dengan defisiensi G6PD.

Tujuan penelitian mendapatkan pola penyebaran mutan gen G6PD di Surabaya dan keterkaitan antara keguguran yang tak diketahui penyebabnya dengan defisiensi G6PD.

Manfaat penelitian ini diharapkan akan mengungkapkan sebagian dari kelainan gen G6PD dengan keguguran. Dari hasil penelitian ini dapat dilakukan diagnosis pra natal pada suami isteri penderita defisiensi G6PD, dalam upaya pengurangan jumlah kasus defisiensi G6PD khususnya keguguran.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif dengan jenis penelitian observasional laboratorik dan bertujuan untuk menganalisis mutasi genetik gen G6PD.

Populasi penelitian dipilih untuk menjawab mutasi gen G6PD, berdasarkan penduduk di Surabaya karena selain etnis Jawa, juga terdapat etnis lain diantaranya Tionghwa. Di Rumah Sakit Ramelan TNI AL sekitar 4.8% (23 dari 478 neonatus) yang hampir seluruhnya adalah etnis Jawa (Unpublish. 2002). Oleh karena itu penelitian ini dipilih rumah sakit yang kunjungan penderita selain etnis Jawa juga etnis Tionghwa, serta rumah sakit yang banyak rujukan pemeriksaan enzim G6PD, antara lain adalah Rumah Sakit Katolik St. Vincentius A Paulo.

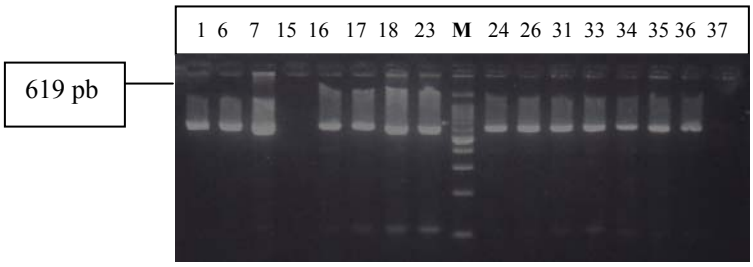
Sampel penelitian adalah darah yang diambil dari vena kubiti dan teknik sampling yang digunakan adalah *purposive* pada lokasi penelitian di Surabaya. Penderita defisiensi G6PD yang dimaksud dalam penelitian ini adalah penderita dengan berbagai keluhan (seperti mudah lelah, nyeri otot, anemia, hepatitis kronis, febris, riwayat kehamilan yang terganggu misalnya keguguran, perdarahan yang tidak diketahui penyebabnya, infertilitas, pusing, panas, batuk dll.) Ekstraksi DNA dengan ***methode simple and rapid genomic DNA*.** Untuk menentukan jenis mutan gen G6PD mengacu mutan gen yang banyak didapat di Asia Tenggara (Shirakawa, 1997).

HASIL PENELITIAN.

Definisi defisiensi G6PD menurut WHO adalah penderita dengan aktivitas enzim G6PD kurang dari 60% yang dapat menimbulkan gejala klinis. Dari 76 sampel didapatkan 31 kasus dengan aktivitas enzim kurang dari 60%, berarti 31 kasus pada penelitian ini adalah penderita defisiensi G6PD. Nilai kadar hemoglobin, jumlah eritrosit, jumlah retikulosit, dan bilirubin langsung (*direct*) maupun bilirubin total pada 31 kasus hampir seluruhnya dalam batas normal, jadi dapat disimpulkan bahwa aktivitas enzim G6PD yang rendah dari 31 kasus benar-benar

disebabkan oleh penurunan aktivitas enzim G6PD.

Analisis molekuler untuk mendeteksi jenis mutan gen G6PD pada 31 kasus defisiensi G6PD menggunakan metode MPTP. Untuk menentukan mutan gen G6PD, dipilih mutan gen G6PD yang umum tersebar di Asia Tenggara yaitu mutasi gen pada ekson 5, ekson 6, ekson 9, ekson 11 dan ekson 12 (Shirakawa, 1997). PCR dilakukan 2 tahap, yaitu PCR pertama untuk mendapatkan DNA sasaran, dan PCR kedua menggunakan metode MPTP untuk menentukan jenis mutan gen G6PD.



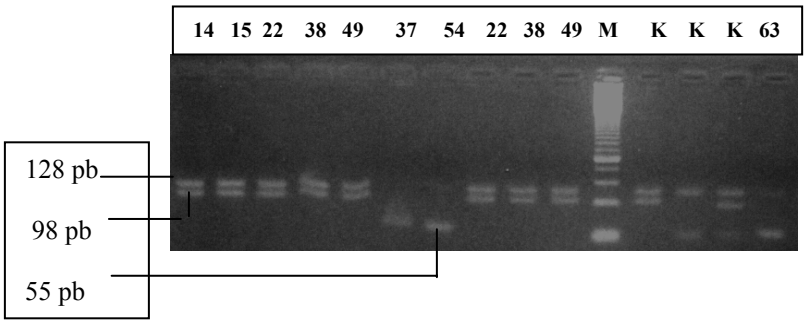
Gambar 1 Produk PCR pertama ekson 11 menunjukkan 1 pita DNA sebesar 619 bp, kecuali sampel no. 15 dan 37 tidak terbentuk pita DNA

Keterangan

Lane 1,2,3,5,6,7,8,10,11,12,13,14,15, dan 16	: sampel no.1,6,7,15,16,17,18, 23,24, 26, 31,33,34, 35, 36 dan 37 adalah produk PCR pertama sebesar 619 pb
Lane 4 dan 17	: sampel no 15 dan 37 tidak menunjukkan pita DNA
Lane 9	: *ladder 100 pb*

Berdasarkan data yang diperoleh dari 31 kasus defisiensi G6PD sebagai berikut : 1) Jenis kelamin kelompok perempuan terdapat 25 (83.3%) kasus dan kelompok laki2 sebanyak 6 (16.4%) kasus. 2) Etnis Tionghwa berjumlah 18 (58%) kasus, etnis Jawa 10 (32.3%) kasus dan 3 (9.7%) etnis campuran yaitu Jawa-Tionghwa, Jawa-Menado dan Jawa-Banjar. 3) Anamnesa dengan gangguan otot misalnya mudah capai, kram pada otot sebanyak 12 (38.7%) kasus, anamnesa dengan riwayat kehamilan yang buruk antara lain keguguran, perdarahan waktu hamil, lahir anak cacat terdapat 11 (35.5%) kasus, konseling pra nikah sebanyak 2 (6.4%) kasus , anamnesa penderita tanpa keluhan,namun isterinya punya riwayat kehamilan yang buruk adalah 2 (6.4%) kasus,

anamnesa belum pernah hamil semenjak 17 tahun pernikahan 1 (3.2%) kasus dan penderita dengan *recurrent anemia* sebanyak 3 (9.8%) kasus.



Gambar 2. PCR tahap kedua yaitu produk MPTP ekson 11

Keterangan gambar

Lane 1,2,3,4, dan 5	: sampel no 14,15,22,38 dan 49 adalah G6PD Silent
Lane 6 dan 7	: sampel no. 37 dan 54 adalah G6PD Union
Lane 8,9 dan 10	: sampel no. 22, 38 dan 49 adalah G6PD normal
Lane 11	: *ladder 50 pb*
Lane 12 (K)	: kontrol mutan G6PD Silent dengan menggunakan *primer* mutan
Lane 13 (K)	: kontrol mutan G6PD Union dengan menggunakan *primer* mutan
Lane 14 (K)	: kontrol mutan G6PD Silent dengan menggunakan *primer* mutan
Lane 15	: sampel no. 63 adalah G6PD Union

Tabel 5 Genotip penderita defisiensi G6PD di daerah penelitian

Genotip	Jumlah	persentase
ekson 5 :		
nt. 383 T→C, kd. 128 Leusin→Prolin (G6PD Vanua Lava)	3	9.7%
ekson 6:	-	-
nt.487 G→A, kd. 163 Glisin → Sern	-	-
(G6PD Mahidol)	-	-
nt. 563 C→T, kd.188 Serin → Fenilalanin (G6PD Mediterranean)	-	-
nt.C→T, Kd. 198 Arginin → Sistein (G6PDCoimbra)	5	16.1%
ekson 9	3	9.7%
nt.871 G→A, kd.291 Valin→ Metionin(G6PD Viangchan)	3	9.7%
nt.1003 G→A, kd.335 Alanin →Treonin (mutan G6PD Chatham)	1, 1, 1	3.2%,3.2%,3.2%
ekson 11	6	19.4%
nt.1360 C→T, kd. 454 Arginin→Sistein (G6PD Union)	4	12.9%
nt.1311 C→T	5	16.1%
kd. Tidak ada perubahan (G6PD Silent)	31	100%
Silent+ Vanua Lava, Silent + Viangchan, Silent + Canton		
Ekson 12		
nt.1376 G→T, Kd. 459 Arginin → Leusin, (G6PD Canton)		
nt.1388 G→A, kd.463 Arginin → Histidin (G6PD Kaiping)		
Normal*		
TOTAL		

PEMBAHASAN

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis jenis mutan gen G6PD di Surabaya untuk mendapatkan pola penyebaran mutan gen defisiensi G6PD dan keterkaitan antara keguguran yang tak diketahui

penyebabnya dengan defisiensi G6PD

Pada penelitian ini didapatkan etnis Tionghwa berjumlah 18 (58%) kasus, etnis Jawa 10 (32.3%) kasus dan 3 (9.7%) kasus dengan etnis campuran antara lain Jawa-Tionghwa, Jawa-Menado dan Jawa-Banjar. Penduduk Surabaya etnis Jawa didapatkan paling banyak, selain itu ada etnis Madura, Tionghwa, dan Arab. Populasi Tionghwa cukup banyak di Surabaya, maka penelitian ini dilakukan di Rumah Sakit yang sering mendapat kunjungan etnis Tionghwa, salah satunya adalah Rumah Sakit Katolik St. Vincentius A Paulo.

Mutan gen G6PD pada etnis Tionghwa dikategorikan heterogenesis, karena sejauh ini di Asia Tenggara telah didapatkan 10 jenis mutan gen G6PD. Pada penelitian Iwai mendapatkan 5 jenis mutan gen G6PD pada etnis Tionghwa yaitu: G6PD Gaohe, G6PD Canton, G6PD Kaiping, G6PD Novel dan G6PD Chatham (Iwai *et al.*, 2001). Soemantri (1995) di Semarang mendapatkan 4 jenis mutan gen G6PD pada etnis Tionghwa : G6PD Gaohe, G6PD Chatham, G6PD Canton dan G6PD Kaiping

Di Surabaya mutan gen G6PD pada etnis Tionghwa dikategorikan heterogenesis, karena ada 7 jenis mutan gen G6PD yaitu G6PD Vanua Lava, G6PD Viangchan, G6PD Chatam, G6PD Union, G6PD Silent, G6PD Canton dan G6PD Kaiping.

Dari 31 kasus defisiensi G6PD di Surabaya pada anamnesa didapatkan 12 kasus (38.7%) dengan keluhan gangguan otot, 11 kasus (35.5%) dengan riwayat kehamilan buruk, 3 kasus (9.8%) *recurrent anemia*, 2 kasus (6.45%) tanpa keluhan tetapi dilakukan pemeriksaan enzim G6PD karena pasangannya (isterinya) mempunyai riwayat kehamilan buruk, 2 kasus (6.45%) konseling pra nikah, dan 1 kasus (3.2%) belum pernah hamil setelah nikah selama 17 tahun.

Pada penelitian ini didapatkan 11 kasus (35.5%) dari 31 defisiensi G6PD dengan anamnesa mempunyai riwayat kehamilan buruk yang tidak diketahui penyebabnya. Sampel no 1, 6 dan 7 pernah mengalami keguguran 2 kali, pada analisis molekuler didapatkan sebagai G6PD Canton. Sampel no. 14 mengalami keguguran 2 kali dan 1 kali anak lahir cacat (anencephalus) pada analisis molekuler didapatkan sebagai G6PD Canton disertai G6PD Silent. Sampel no. 15 mempunyai bayi dengan divertikel usus pada analisis molekuler didapatkan sebagai G6PD Silent. Sampel no 16 mengalami perdarahan waktu hamil, pada analisis molekuler didapatkan sebagai G6PD Kaiping. Sampel no.17 keguguran 1 kali, pada analisis molekuler didapatkan sebagai mutan gen G6PD Kaiping. Sampel no 27 mengalami keguguran 8 kali dan sekarang hamil mengalami perdarahan, pada analisis molekuler didapatkan sebagai G6PD Kaiping. Sampel no. 50

mengalami keguguran 1 kali pada analisis molekuler didapatkan sebagai G6PD Vanua Lava. Sampel no.70 melahirkan bayi dengan hidrocepalus meninggal umur 2 minggu, pada analisis molekuler tidak didapatkan mutan G6PD dengan metode Shirakawa. Menurut Jalan Anil (2005) bahwa ibu yang pernah keguguran satu kali mempunyai faktor risiko keguguran berikutnya sebesar 24%, sedang yang pernah keguguran 2 kali faktor risiko berikutnya adalah 26% dan bila 3 kali pernah keguguran, faktor risiko keguguran berikutnya meningkat hingga 32%.

G6PD Canton, G6PD Kaiping dan G6PD Vanua Lava pada penelitian ini berperan dalam kasus defisiensi G6PD dengan riwayat kehamilan buruk yang tidak diketahui penyebabnya, maka harus diwaspadai untuk menghindari faktor risiko keguguran berikutnya (Poston *et al.,* 2004; Chan, 2006)

Pada wanita hamil dengan genotip sebagai mutan gen G6PD, apabila kapasitas oksidan melebihi jumlah senyawa antioksidan, menyebabkan peristiwa stres oksidatif kronis yang berakibat pada sel sinsitiotrofoblas akan mengalami hal sebagai berikut: 1) Sinsitiotrofoblas mengalami degenerasi dan mengakibatkan kegagalan kehamilan karena terjadi gangguan perkembangan plasenta. 2) Sinsitiotrofoblas dapat melangsungkan kehamilan yang normal karena kekurangan senyawa antioksidan (antioksidan endogen) dapat dipenuhi dari masukan senyawa antioksidan eksogen, sehingga sistem antioksidan dapat menetralisir aktivitas senyawa radikal (SOR) (Jauniaux *et al.,* 2000; Poston *et al.,* 2004; Chan 2006):

Defisiensi enzim G6PD yang dapat menyebabkan anemia hemolitik, ikterus maupun manifestasi non hemolitik antara lain keguguran. Mutan gen G6PD merupakan kelainan genetik yang diwariskan secara X-linked resesif. Tata laksana utama kelainan enzim G6PD berupa upaya pencegahan. Upaya pencegahan hanya dapat dilakukan bila telah diketahui masalah yang harus dihadapi. Untuk itu merupakan hal penting untuk mendapatkan karakteristik gen G6PD dan pola variasi gen G6PD sehingga membantu untuk diagnosis dini dan mempelajari sejauh mana permasalahan defisiensi G6PD ini sebagai etiologi penyebab anemia hemolitik atau gejala klinis yang lain (Connor M and Smith MF 1997).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini pola mutan gen G6PD di Surabaya khususnya Rumah Sakit Katolik St. Vincentius A Paulo dapat disimpulkan beberapa hal yaitu: dari 76 sampel didapatkan 31 kasus defisiensi G6PD. Dari 31 kasus defisiensi G6PD ada 26 (83.9%) mutan gen G6PD merupakan mutasi titik dan 5 (16.1%) kasus dinyatakan

normal tidak didapatkan mutasi perlu pemeriksaan dengan metoda lain misalnya sekuensing pada penelitian akan datang. Tujuh jenis mutan gen G6PD pada penelitian ini dapat disebabkan oleh letak kawasan yang terbuka dengan mobilitas yang tinggi, penduduk yang heterogenik dan adanya proses *genetic flow*. Etnis Tionghwa menunjukkan mutasi gen yang heterogen, karena didapatkan 7 jenis mutan gen G6PD, demikian juga etnis Jawa didapatkan 5 jenis. Ada 11(35.48%) kasus defisiensi G6PD dengan riwayat kehamilan buruk yang tidak diketahui penyebabnya. Saat ini penyebab keguguran yang tidak diketahui penyebabnya lebih 50%, berdasarkan penelitian ini maka 11 kasus defisiensi G6PD tersebut dapat dikategorikan sebagai salah satu penyebab keguguran yang tidak diketahui penyebabnya. Pada analisis molekuler dari 11 kasus tersebut didapatkan sebagai G6PD Vanua Lava, G6PD Canton dan G6PD Kaiping

DAFTAR PUSTAKA

Chan TK, 2006. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Deficiency: A Review.
Terdapat di http://www.cchi.com.hk/specialtopic/case1/case1.htm. Diakses pada 17/1/2006.

Connor M, Smith MF. 1997. Essential medical genetics: Prevention and treatment. Edisi ke 5.Victoria; Blackwell Science 1997: 210-4.

Damanik SM, Ugrasena IDG, Harianto A, Indarso F, Sarwono E, Matsuo M, 2001. Mass
Screening of G6PD in Dr Soetomo General Hospital,F Medica Indonesiana, 37:.2, 63-65.

Iwai K, Hirono A, Matsuoka H, Kawamoto F, Horie T, Khin Lin, Tantular IS, Dachlan YP,
Notopuro H, Hidayah NI, Salim AMA, Fujii H, Miwa S, Ishii A, 2001. Distribution of
G6PD mutations in Southeast Asia. Hum. Genet. 108: 445- 449.

Jalan Anil B, 2005. Recurrent Spontaneous Abotions (RSA). Httw: // jalananil. tripod. Com /NIRMAN / id12.htm.Accessed 30/06/2005.

Jauniaux E, Watson AL, Hemstock J, Yi Ping Bao, Skepper JN, Burton GJ, 2000. Onset of
Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress. Am J Pathol, 157 (6): 2111

Matsuoka H, Ishii A, Panjaitan W, Sudiranto R, 1986. Malaria and G6PD deficiency in North Sumatra, Indonesia, Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 17 (4): 530-535.

Poston L, dan Raijmakers MTM, 2004. Trophoblast Oxidative Stress, Antioxidants and Pregnancy. Placenta. 25, Supplement A. Trophoblast Reasearch, vol 18,S72-S78.

Shirakawa T, Nishiyama K, Lai Poh San, Matsuo M, 1997. Comprehensive method to scan for point mutations of the glucose 6 phosphate dehydrogenase gene. (Jpn) J Human Genet. 42: 417-423.

Soemantri AG, Saha S, Saha N, Tay JSH, 1995. Molecular Variants of red cell G6PD deficiency in Central Java, Indonesia. Hum Hered 45:346-350.