

# Ovalosytosis herediter - analisis molekular ovalosytosis herediter Asia Tenggara (SAO) di Bangka, Sumatra Selatan

Suryono Yudha Patria<sup>1</sup>, Purnomo Suryantoro<sup>1</sup>, Abdul Salam Sofro<sup>2</sup>,  
Fransiska Lani<sup>2</sup>, Masafumi Matsuo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bagian Ilmu Kesehatan Anak Fakultas Kedokteran/RS. Dr. Sardjito, Yogyakarta

<sup>2</sup>Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,

<sup>3</sup>Genetics Division, ICMR, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan

## ABSTRACT

Suryono Yudha Patria, Purnomo Suryantoro, Abdul Salam Sofro, Fransiska Lani, Masafumi Matsuo - *Hereditary ovalocytosis - molecular analysis of hereditary Southeast Asian Ovalocytosis (SAO) in Bangka, South Sumatra.*

**Background:** Southeast Asian Ovalocytosis (SAO) is a hereditary asymptomatic hemolytic disease characterized by oval form erythrocytes. This morphology is rigid and related with resistency to several strains of malaria parasites. The underlying molecular genetic abnormalities include heterozygous state for mutant band 3 protein, a membrane anion transporters protein.

**Objectives:** To characterize the SAO in Bangka, South Sumatra in molecular level, by analyzing the DNA genome of three generation family with polymerase chain reaction (PCR).

**Methods:** The DNA genome extracted from dried blood filter paper was used as template PCR. A pair of primers was synthesized in accordance with exon 11 of band 3 gene. The PCR product was studied under UV after electrophoresis on EtBr stained 3% agarose gel.

**Results:** Both mutant alleles showed as smaller band compared to normal allele in all 6 heterozygote SAO persons, but not in the normal 8 cases. Deletions were predicted removing nine amino acids of band 3 protein. The mutant protein was possibly carried by the ancestor from China.

**Conclusions:** Hereditary ovalocytosis in Bangka, Sumatra Selatan was caused by specific mutation on band 3 gene which is common mutation occurred in SAO patients.

**Key words:** Bangka ovalocytosis - SAO - Band 3 protein - EPB3 gene deletion - PCR

## ABSTRAK

Suryono Yudha Patria, Purnomo Suryantoro, Abdul Salam Sofro, Fransiska Lani, Masafumi Matsuo - *Ovalosytosis herediter - analisis molekular ovalosytosis herediter Asia Tenggara di Bangka, Sumatra Selatan.*

**Latar belakang:** Ovalosytosis Asia Tenggara (SAO) adalah penyakit hemolisis herediter asimtomatik yang ditandai oleh eritrosit berbentuk oval, kaku, dan resisten terhadap parasit malaria. Penyebab dasar secara molekular adalah mutan protein band 3, suatu protein pengangkut dalam pertukaran anion.

**Tujuan:** Untuk membuktikan pada tingkat molekular penyebab SAO di Bangka, Sumatra Selatan dilakukan analisis DNA genom dengan PCR pada satu keluarga yang terdiri dari tiga generasi.

**Bahan dan cara:** Genom DNA yang diekstraksi dari darah kering dilakukan PCR dengan sepasang primer dari exon 11 gena band 3. Hasil PCR dilihat dengan sinar ultraviolet setelah dilakukan elektroforesis pada agarosa 3% yang telah dicat dengan EtBr.

Suryono Yudha Patria, Purnomo Suryantoro, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Gadjah Mada University/Dr. Sardjito Hospital, Yogyakarta, Indonesia, Abdul Salam Sofro, Centre Inter University Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia, Masafumi Matsuo, Genetics Division, ICMR, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan.

**Hasil:** Keadaan heterozigot terjadi pada 6 penderita SAO dengan terlihatnya pita ganda pada elektroforesis hasil PCR, satu pita normal, dan satu pita lebih pendek, sedangkan pada 8 anggota keluarga yang normal hanya terlihat satu pita normal. Asal protein mutan pada keluarga ini kemungkinan besar dari Cina, sehingga ini membuktikan distribusi SAO tidak hanya di Asia Tenggara dan Melanesia.

**Simpulan:** Mutasi pada ovalositosis herediter di Bangka, Sumatra Selatan disebabkan oleh mutasi gena band 3 yang sering terjadi pada pasien SAO.

(B.I.Ked. Vol. 34, No. 1: 15-20, 2002)

## PENGANTAR

Ovalositosis Asia Tenggara (SAO) adalah penyakit hereditas asimtomatik yang ditandai oleh terdapatnya lebih dari dua puluh persen eritrosit berbentuk oval di dalam tubuh penderita<sup>1</sup>. Pada pemeriksaan darah tepi penderita ovalosit herediter, persentase ovalosit bisa mencapai 90%. Frekuensi penderita ovalositosis herediter lebih tinggi di daerah endemis malaria oleh karena *survival* penderita tersebut untuk tinggal di daerah endemis malaria lebih tinggi daripada orang dengan eritrosit normal. Di daerah endemis malaria frekuensi penderita ovalosit herediter mencapai 30%<sup>2</sup>.

SAO diturunkan menurut pola autosomal dominan. Bentuk klinis terdapat pada penderita heterozigot, sedangkan keadaan homozigot adalah letal. Ovalosit sangat kaku (*rigid*) dibandingkan eritrosit normal, tidak fleksibel saat melewati kapiler yang lebih kecil dari diameter eritrosit sehingga mudah ruptur. Di pihak lain, ovalosit resisten terhadap beberapa galur parasit malaria. Gejala klinis anemia hemolitik sangat minimal bahkan sebagian besar penderita asimtomatik. Keadaan asimtomatik ini terjadi oleh karena mekanisme kompensasi dengan bukti tingginya retikulosit pada sebagian besar penderita SAO. Riwayat hiperbilirubinemia berat waktu neonatus juga sering terjadi pada penderita SAO<sup>3</sup>. Keadaan homozigot adalah letal dengan didapatkan fakta seringnya abortus pada pasangan penderita SAO.

SAO sangat menarik oleh karena khusus terdapat di daerah Asia Tenggara (Malaysia, Thailand, Filipina, Indonesia) dan Melanesia. Secara molekular penyebab SAO juga khusus dan tidak terdapat pada bentuk ovalositosis/ eliptositosis herediter lain. Penyebab SAO adalah delesi pada gena protein band 3. Protein band 3 adalah salah satu protein sitoskeletal pembentuk jaring rangka

membran eritrosit. Selain sebagai protein struktural protein band 3 mempunyai banyak fungsi lain (multifungsi). Protein band 3 berperan pada pertukaran anion melalui membran eritrosit, dan oleh karena fungsinya ini protein band 3 juga disebut protein *anion exchanger 1* (AE1). Proses ini memungkinkan eritrosit membawa karbondioksida (CO<sub>2</sub>). Diduga AE1 juga mempunyai fungsi khusus di ginjal oleh karena mutasi SAO juga berperan pada asidosis tubular renal distal<sup>4</sup>. Band 3 juga merupakan protein penanda golongan darah non ABO, yaitu antigen golongan darah *Wra* dan *Dia*<sup>5</sup>.

SAO disebabkan oleh delesi gena protein band 3 (EPB3). Gena ini terdapat pada lengan panjang kromosom 17 terdiri dari 20 ekson yang tersebar sepanjang sekitar 18–20 kb. Delesi sebesar 27 bp terletak pada ekson 11, sehingga 9 asam amino hilang pada posisi 400–408 dari protein band 3 normal<sup>6</sup>. Posisi 400–408 adalah bagian transmembran pertama protein band 3. Delesi 9 asam amino pada posisi 400–408 akan meningkatkan rigiditas membran dan mengakibatkan deformitas membran<sup>7</sup>.

Penelitian ovalositosis herediter di Indonesia masih sangat sedikit. Pengenalan kasus ovalositosis secara klinis juga sangat jarang terlihat. Dengan besarnya daerah endemis malaria di Indonesia kemungkinan kejadian SAO di Indonesia adalah sangat tinggi. Dalam keadaan heterozigot secara klinis asimtomatis tetapi dengan tingginya frekuensi heterozigot kemungkinan besar sangat berpengaruh terutama terhadap angka mortalitas dan reproduksi di daerah endemis malaria.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan SAO dengan delesi gena EPB3 dan keberlangsungan pola penurunan SAO di Bangka, Sumatra Selatan. Untuk menyelidiki hubungan ini, diteliti satu keluarga yang meliputi tiga generasi. Penemuan kasus berawal dari satu anggota keluarga yang secara kebetulan pada pemeriksaan

darah tepi untuk penapisan talasemia terlihat mempunyai eritrosit berbentuk oval.

## BAHAN DAN CARA

Penelitian ini dilakukan berdasarkan ditemukannya satu penderita ovalositosis saat dilakukan penapisan talasemia di Bangka, Sumatra Selatan. Dari satu penderita tersebut kemudian diperiksa anggota keluarga yang lain, yang meliputi tiga generasi. Subyek penelitian adalah semua anggota keluarga dari satu penderita ovalositosis herediter. Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah: 1) anggota keluarga penderita ovalositosis; 2) bersedia mengikuti penelitian.

Kepada semua anggota keluarga yang bersedia mengikuti penelitian kemudian dilakukan anamnesis identitas pasien, riwayat penyakit, pemeriksaan fisik, dan usapan tipis darah tepi. Seratus uL darah ditetaskan pada kertas saring untuk dikeringkan dan digunakan untuk sumber ekstraksi DNA.

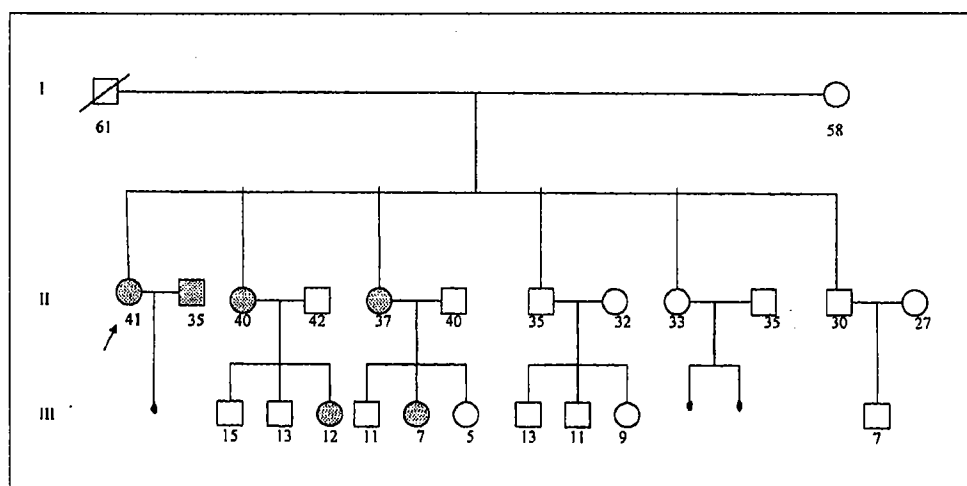
DNA genom diekstraksi dari darah kering pada kertas saring. DNA genom ini kemudian dilakukan PCR dengan sepasang primer dari ekson 11 gena EPB3. Hasil PCR akan menghasilkan band normal sekitar 175 bp. Sekuens primer yang digunakan untuk PCR adalah <sup>6</sup> :

- Primer *forward* P198: 5'- GGGCCAGATGACCCTCTGC-3' (basa 1098-1117)
- Primer *reverse* P199: 5'- GCCGAAGGTGATGGCGGGTG -3' (basa 1272-1253)

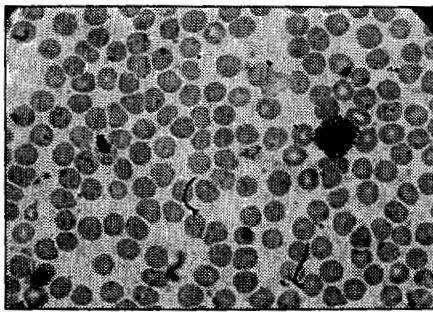
Hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa 3% yang tercat etidium bromide dan dilihat pada transiluminator sinar ultraviolet.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

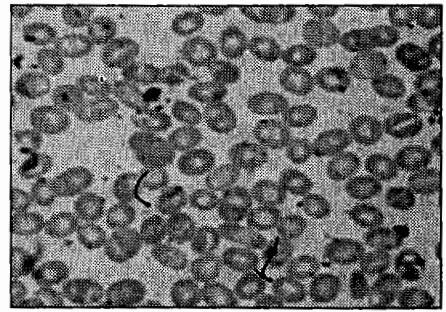
Kasus pertama yang teridentifikasi menderita ovalositosis adalah II.1 (GAMBAR 1) saat dilakukan penapisan talasemia  $\beta$  mayor di Bangka. Berdasar satu kasus tersebut kemudian dilakukan pelacakan terhadap anggota keluarga yang lain. Anggota keluarga yang bersedia menjadi subyek penelitian 14 dari seluruhnya 23 orang meliputi tiga generasi. Satu orang (I.1) sudah meninggal oleh karena tidak diketahui sebabnya adalah pendatang dari Republik Rakyat Cina (RRC) yang menikah dengan penduduk asli Bangka (I.2). Tiga orang anggota keluarga tidak diteliti oleh karena alasan geografis, dan lima anggota keluarga yang lain memang tidak bersedia. Secara klinis hampir semua subyek tidak didapatkan keluhan klinis anemia ataupun riwayat ikterus pada masa neonatus. Sebagian besar kasus pada penelitian ini terutama pada anak anak (kasus III.3, dan III.5) adalah asimtomatis. Riwayat abortus ditemukan pada 2 anggota keluarga. Satu anggota keluarga tersebut penderita SAO dan mempunyai pasangan juga penderita SAO, kemungkinan abortus terjadi oleh karena homozigot letal. Satu anggota keluarga tidak diketahui penyebab abortus oleh karena tidak menderita SAO. Gambaran darah tepi penderita ovalo-



GAMBAR 1. Silsilah keluarga ovalositosis di Bangka, Sumatra Selatan

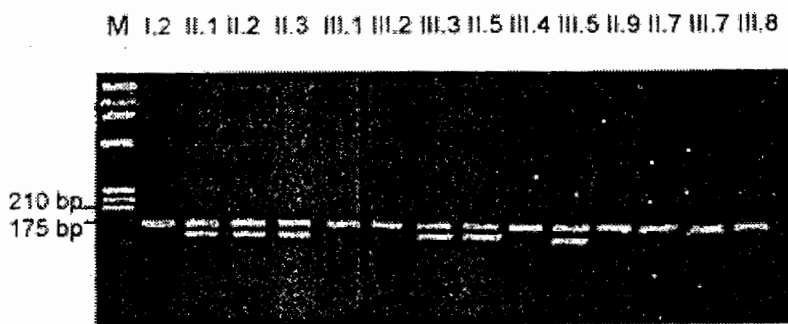


Normal



Ovalositosis herediter

GAMBAR 2. Gambaran mikroskopis usapan darah tepi normal dan penderita ovalositosis herediter yang memperlihatkan ovalosit lebih dari 50 persen. (Pengecatan Giemsa, pembesaran obyektif 100x)



M: marker DNA Ox174 dipotong dg. Ensim Hinc II

GAMBAR 3. Hasil PCR ekson 11 gena EPB3 pada keluarga ovalositosis herediter Bangka, Sumatera Selatan. M: marker DNA Ox174 dipotong dengan ensim HincII. I-, II-, III-, anggota keluarga yang diperiksa PCR sesuai silsilah keluarga

sitosis sebagian besar memperlihatkan persentase ovalosit lebih dari 50 persen (GAMBAR 2).

Analisis molekular dengan PCR pada ekson 11 gena EPB3 terhadap DNA genom yang diekstraksi dari darah kering memastikan kesesuaian dengan hasil darah tepi. Hasil elektroforesis PCR penderita ovalositosis herediter menunjukkan pita ganda, pita yang atas adalah alel normal (175 bp) sedangkan yang bawah adalah alel mutan (kira-kira 148 bp). Hal ini menerangkan bahwa penderita ovalositosis tersebut adalah heterozigot. Anggota keluarga yang normal menunjukkan pita tunggal, yang menjelaskan bahwa kedua alel adalah normal (GAMBAR 3).

Secara umum kejadian ovalositosis adalah 1 per 4000 – 5000 populasi. Penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa ovalositosis herediter ini sangat resisten terhadap *P. falciparum*, *P. vivax*, dan *P. malariae* sampai dengan kadar parasitemia yang tinggi. Pada populasi Melanesia di Papua New

Guinea (dan suku Aborigin) dan beberapa daerah di Asia Tenggara (Malaysia, Filipina, Thailand, Indonesia) frekuensi penderita ovalositosis herediter kira-kira 5–30 persen. Di daerah endemis malaria frekuensi kejadian SAO bisa mencapai 40 persen dari populasi setempat<sup>8</sup>.

Penelitian-penelitian sebelumnya di Malaysia, Filipina, Papua New Guinea mendapatkan bahwa SAO disebabkan oleh delesi kodon 400 – 408 yang terletak pada ekson 11 gena EPB3<sup>6</sup>. Hasil penelitian SAO di Bangka, Sumatra Selatan ini menunjukkan hasil sama dengan penelitian sebelumnya. Penelitian lain di Indonesia juga pernah dilaporkan dengan hasil sama dengan penelitian di Bangka ini<sup>9,10</sup>. Peneliti lain meneliti SAO di Thailand dan Indonesia (Bugis, Dayak, Jawa, Madura, dan Toraja) mendapatkan frekuensi gena delesi 27 bp sangat rendah di Dayak dan Bugis. Mereka mempunyai simpulan bahwa terdapat variasi lokal prevalensi delesi SAO pada etnik tertentu dan hal

ini menunjukkan adanya heterogenitas molekular SAO<sup>11</sup>.

Keseluruhan jumlah penderita SAO pada keluarga ini adalah 5 dari 13 anggota keluarga yang diteliti (38,5%) dan secara konstan diturunkan pada generasi kedua dan ketiga. Secara teoretis risiko genetik pada penyakit herediter dengan pola penurunan otosom dominan adalah 50%. Artinya setiap anak yang lahir dari pasangan penderita mempunyai kemungkinan menderita penyakit yang sama adalah 50%. Hasil ini diperoleh dengan syarat pada populasi yang besar.

Keanekaragaman ekspresi gena (*variable expressivity*) sering terjadi pada autosomal dominan<sup>12</sup>. Pada SAO selain ovalositosis juga sering dihubungkan dengan asidosis tubular ginjal bagian distal<sup>4,13,14</sup>. Pada penelitian ini peneliti tidak memeriksa ada tidaknya asidosis ini, oleh karena keterbatasan tenaga dan biaya sehingga tidak diketahui keanekaragaman ekspresi gena EPB3 pada SAO di Bangka ini.

SAO banyak terjadi di Asia Tenggara dan Melanesia. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada nenek moyang keluarga ini yang asli penduduk Bangka (I.2) tidak ditemukan delesi khas SAO. Maka kemungkinan besar SAO dalam keluarga dibawa oleh I.1 yang asli berasal dari RRC. Namun sayang I.1 sudah meninggal dunia sehingga tidak bisa dibuktikan apakah menderita SAO atau tidak. Bila hal tersebut benar, secara spekulatif mungkin SAO tidak hanya tersebar di Asia Tenggara dan Melanesia, tetapi juga di Cina.

## SIMPULAN DAN SARAN

SAO di Bangka, Sumatra Selatan disebabkan oleh delesi 27 bp gena EPB3. Delesi ini akan menghilangkan sembilan asam amino pada posisi 400-408 protein band 3 yang membentuk jaring sitoskeleton membran eritrosit. Delesi ini akan meningkatkan rigiditas eritrosit bentuk oval.

Mutasi gena EPB3 pada keluarga SAO diturunkan secara bersinambungan dari generasi ke generasi berikutnya. Hal ini menunjukkan konsistensi pola pewarisan autosomal dominan. Konsistensi pewarisan sifat juga didukung keadaan lingkungan endemis malaria yang akan meningkatkan angka *survival* penderita SAO.

Kemungkinan besar asal mula SAO pada keluarga dalam penelitian ini tidak berasal dari Bangka, Sumatra Selatan, tetapi berasal RRC. Hal ini menunjukkan bahwa distribusi SAO tidak hanya Asia Tenggara dan Melanesia, tetapi juga sampai negeri Cina.

Penelitian lebih lanjut yang lebih menjelaskan secara rinci perkembangan klinis pada setiap anggota keluarga pada penelitian sangat diperlukan. Apakah asidosis tubular ginjal bagian distal terjadi pada penderita SAO, analisis lebih lanjut material aborsi pada pasangan SAO perlu lebih dipelajari.

## KEPUSTAKAAN

1. Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. Wintrobe's clinical hematology. 10<sup>th</sup> ed. Tokyo: William-Wilkins, 1999.
2. Nagel RL Protection against malaria by abnormalities in red cell surface antigens and cytoskeletal proteins. UpToDate CD-ROM 2002; 10(1).
3. Laosombat V, Dissaneevate S, Peerapittayamongkol C, Matsuo M. Neonatal hyperbilirubinemia associated with Southeast Asian ovalocytosis. Am J Hematol 1999; 60: 136-9.
4. Bruce LJ, Cope DL, Jones GK, Schofield AE, Burley M, Povey S, et al. Familial renal tubular acidosis is associated with mutations in the red cell anion exchanger (band 3; AE1) gene. J Clin Invest 1997; 100: 1693-707.
5. Anstee DJ, Hemming NJ, Tanner MJ. Functional factors in the red cell membrane: interactions between the membrane and its underlying skeleton. Immunol Invest 1995; 24: 187-98.
6. Jarolim P, Palek J, Amato D, Hassan K, Sapak P, Nurse GT, et al. Deletion in erythrocyte band 3 gene in malaria-resistant Southeast Asian ovalocytosis. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 11022-6.
7. Liu SC, Zhai S, Palek J, Golan DE, Amato D, Hassan K, et al. Molecular defect of the band 3 protein in Southeast Asian ovalocytosis. N Engl J Med 1990; 323: 1558-60.
8. Serjeantson S, Bryson K, Amato D, Bobona D. Malaria and hereditary ovalocytosis. Hum Genet 1977; 37: 161-8.
9. Takeshima Y, Sofro AS, Suryantoro P, Naria N, Matsuo M. Twenty seven nucleotide deletion within exon 11 of the erythrocyte band 3 gene in Indonesian ovalocytosis. Jpn J Hum Genet 1994; 39: 181-5.
10. Alimsardjono H, Mukono IS, Dachlan YP, Matsuo M. Deletion of twenty seven nucleotides within exon 11 of the band 3 gene identified in ovalocytosis in Lombok Island, Indonesia. Jpn J Hum Genet 1997; 42: 233-6.
11. Kimura M, Shimizu Y, Settheetham-Ishida W, Soemantri A, Tiwawech D, Romphruk A, et al. Twenty-seven base pair deletion in erythrocyte band 3 protein gene respon-

- sible for Southeast Asian ovalocytosis is not common among Southeast Asians. *Hum Biol* 1998; 70: 993-1000.
12. Mueller RF, Young ID. Emery's element of medical genetics. 9<sup>th</sup> Ed. 1, Tokyo: Churchill Livingstone, 1995.
  13. Vasuvattakul S, Yenchitsomanus PT, Vachuanichsanong P, Thuwajit P, Kaitwatcharachai C, Laosombat V. Autosomal recessive distal renal tubular acidosis associated with Southeast Asian ovalocytosis. *Kidney Int* 1999; 56: 1674-82.
  14. Bruce LJ, Wrong O, Teye AM, Young MT, Ogle G, Ismail Z, et al. Band 3 mutations, renal tubular acidosis and South-East Asian ovalocytosis in Malaysia and Papua New guinea: loss of up to 95% band 3 transport in red cells. *Biochem J* 2000; 350: 41-51.