

Identifikasi Penyebab Retardasi Mental Siswa SLB Melalui Analisis Sitogenetik dan PCR

Identification of Mental Retardation Causes of Special School Students Based on Cytogenetic and PCR Analyses

Retno Dwi W, Eva Diah S, Putu Oky AT

Bagian Biomedik Penelitian Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

ABSTRAK

Retardasi mental dapat disebabkan oleh faktor genetik yaitu kelainan kromosom atau gen tunggal. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penyebab kelainan genetik pada anak-anak dengan retardasi mental. Sampel penelitian adalah 18 siswa SLB Pelita Hati diambil 14 yang memenuhi kriteria inklusi. Sampel diambil dari darah tepi untuk dilakukan analisis kromosom dan PCR untuk melihat pemanjangan pengulangan CGG pada gen FMR1. Dari 14 siswa yang terlibat di dalam penelitian, 10 siswa menjalani analisis kromosom dan dilanjutkan dengan analisis PCR, 2 siswa hanya menjalani analisis kromosom dan 2 siswa hanya menjalani analisis PCR. Hasil analisis kromosom pada 12 siswa, didapatkan satu siswa dengan trisomi 21 (47,XX,+21), satu siswa dengan trisomi X (47,XXX) dan yang lain memiliki karyotip normal (46,XY atau 46,XX). Pada pemeriksaan PCR, tidak ditemukan siswa dengan pemanjangan pengulangan CGG.

Kata Kunci: *Gen FMR1, kromosom, retardasi mental*

ABSTRACT

Mental retardation can be caused by genetic factors, namely chromosome or single gene disorders. This study aimed to determine the causes of genetic abnormalities in children with mental retardation. The sample was 18 students of Pelita Hati special school in which 14 were taken as they met the inclusion criteria. Samples were taken from the peripheral blood for chromosome analysis and PCR to look at the lengthening repetition of CGG in FMR1 gene. Of the 14 students involved in the study, 10 students underwent chromosomal analysis followed by PCR analysis, 2 students only underwent chromosomal analysis and 2 students only undergo PCR analysis. Results of the analysis of chromosomes in 12 students, obtained a student with trisomy 21 (47,XX,+21), a student with trisomy X (47,XXX) and the other have normal karyotip (46,XY or 46,XX). In the PCR, there were no students with CGG repetition elongation.

Keywords: *Chromosome, FMR1 gene, mental retardation*

Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. 29, No. 1, Februari 2016; Korespondensi: Retno Dwi W. Bagian Biomedik Penelitian Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, Jl. Dukuh Kupang XXV No.54, Dukuh Pakis, Surabaya, Jawa Timur 60225 Tel. (031) 5677577 Email: retno_dwi_w@yahoo.com

PENDAHULUAN

Retardasi mental dikenal dengan istilah disabilitas intelektual (*intellectual disability*), *mental deficit*, *mental subnormality* atau *mental handicap* (keterlambatan dalam perkembangan mental), yaitu adanya ketidakseimbangan proses intelektual yang menyebabkan individu sulit untuk menghadapi lingkungan di mana dia berada (1). Prevalensi penyandang retardasi mental secara keseluruhan belum diketahui dengan pasti, tetapi angkanya diperkirakan sebesar 1-3% dari seluruh populasi manusia (2). Di India, retardasi mental diperkirakan sebesar 2-3% dari populasi (1). Di Australia, Leonard, *et al* pada tahun 2003 melaporkan prevalensi retardasi mental sebanyak 14,3 per 1000 orang (3). Di China, prevalensi retardasi mental sebesar 9,3 per 1000 orang, seperti dilaporkan oleh Xie, *et al* pada tahun 2008 (4), sedangkan di Irlandia angkanya mencapai 6,3 per 1000 dalam populasi (5). Jumlah penduduk Indonesia pada tahun 2010 menurut Biro Pusat Statistik (BPS), sebesar 238,5 juta. Apabila diasumsikan angka kejadian retardasi mental di Indonesia kurang lebih 3% dari populasi, maka diperkirakan jumlah penderita retardasi mental di Indonesia sebanyak 7,15 juta (6).

Penyebab retardasi mental sangat heterogen, dapat disebabkan faktor genetik dan non genetik. Termasuk di dalam faktor genetik adalah kelainan kromosom dan kelainan gen tunggal. Penyebab pasti retardasi mental hanya diketahui pada 50% kasus retardasi mental sedang hingga berat, sedangkan pada retardasi mental ringan angka ini lebih kecil lagi (7). Penyebab terbanyak retardasi mental karena kelainan kromosom adalah trisomi 21 pada sindroma Down (8), sedangkan sindroma Fragile X yang disebabkan mutasi gen *FMR1* merupakan penyebab terbanyak retardasi mental yang diwariskan (9).

Di Desa Padangan Kecamatan Kayenkidul Kabupaten Kediri, banyak dijumpai anak-anak dengan retardasi mental yang merupakan penduduk asli. Rata-rata kasus diketemukan ketika anak memasuki usia sekolah, ketika anak-anak tersebut mengalami kesulitan bahkan tidak mampu sama sekali mengikuti pelajaran sesuai dengan usianya. Sebagian dari anak-anak tersebut bersekolah di SLB satu-satunya di desa Padangan, yaitu SLB Pelita Hati. Hingga saat ini belum diketahui penyebab pasti kelainan genetik yang menyebabkan retardasi mental di desa Padangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kelainan genetik penyebab retardasi mental pada anak-anak yang bersekolah di SLB Pelita Hati Desa Padangan Kecamatan Kayenkidul Kabupaten Kediri.

METODE

Penelitian ini melibatkan subjek siswa SLB yang memenuhi kriteria dugaan fenotip sindroma Down atau Sindroma fragil X, analisis pedigree memiliki riwayat keluarga penyandang retardasi mental serta bersedia berpartisipasi dalam penelitian. Dari sebanyak 18 siswa yang terlibat dalam penelitian: 4 siswa menjalani pemeriksaan fisik saja (menolak untuk diambil darahnya), 2 siswa dilanjutkan dengan analisis kromosom dan 2 siswa dilanjutkan dengan analisis DNA, sedangkan 10 siswa menjalani pemeriksaan fisik, analisis kromosom dan DNA. Tiap sampel diambil darah dari vena *mediana cubiti* sebanyak 10ml yang kemudian dimasukkan ke dalam tabung *venoject* berisi sodium heparin (untuk analisis sitogenetik) dan sisanya pada *venoject* yang berisi EDTA (untuk analisis gen *FMR1*).

Analisis Sitogenetik

Sebanyak 0,4ml darah dimasukkan dalam media kultur TC 199 (Gibco) dan 5% *fetal bovine serum* (Gibco), kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 72 jam. Tiga puluh menit sebelum panen (*harvesting*), ditambahkan *colcemid*. Setelah 30 menit ditambahkan larutan hipotonik dan larutan Carnoys (metanol: acetic aci= 3 : 1). Tabung disentrifus sampai endapan (*pellet*) di dasar tabung berwarna putih. *Pellet* kemudian diteteskan di atas slide, diberi pewarna giemsa. Kromosom dapat dilihat di bawah mikroskop pada pembesaran 1500 kali dengan bantuan minyak emersi.

Isolasi DNA dan Analisis *FMR1*

DNA diisolasi dengan menggunakan kit *High Pure PCR* (Roche), kemudian diamplifikasi untuk mendeteksi pemanjangan pengulangan nukleotida CGG dengan metode PCR. Campuran 20uL PCR terdiri dari 100ng DNA, 2uL bufer pfx, 50mM MgSO₄ sebanyak 0,6ml, 0,5ml dNTPs, 8uL *enhancer*, 0,6uL masing-masing primer c dan f, 0,3uL Taq dan H₂O. Protocol PCR sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 95°C selama 3 menit, diikuti oleh 31 siklus PCR, terdiri dari: denaturasi 95°C selama 3 detik, annealing 64°C selama 2 menit, elongasi pada 75°C selama 2 menit dan ekstensi akhir pada suhu 75°C selama 10 menit. Sekuen primer c adalah GCTTAGCTCCGTTTCgGTTTCACTTCCGGT dan primer f adalah AGCCCCGCACTTCCACCACAGCTCCTCCA (10).

Produk hasil PCR dilarikan pada gel elektroforesis untuk melihat pita-pitanya (*bands*). Gel dibuat dari bubuk agar dan bufer TBE, kemudian dipanaskan sebelum dimasukkan dalam cetakan agar. Setelah gel mengeras, produk PCR dan pewarna (*loading dye*) dimasukkan ke dalam tiap-tiap sumur (*well*) pada gel, dilarikan pada mesin elektroforesis dan pita dilihat melalui mesin *gel doc*.

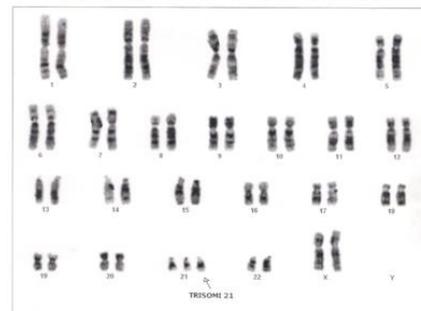
HASIL

Pada 18 siswa SLB sebagai populasi kajian sebagian besar adalah laki-laki (72,22%). Dari 18 siswa didapatkan 12 subjek penelitian dimana 83,33% berjenis kelamin laki-laki.

Hasil analisis kromosom pada 12 sampel, didapatkan satu sampel dengan trisomi 21 (47,XX,+21), satu sampel dengan trisomi X (47,XXX), sedangkan 10 sampel (83,33%) mempunyai gambaran kromosom laki-laki normal (46,XY).

Hasil analisis sitogenetika berupa karyotip siswa dengan trisomi 21 dan trisomi X dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2.

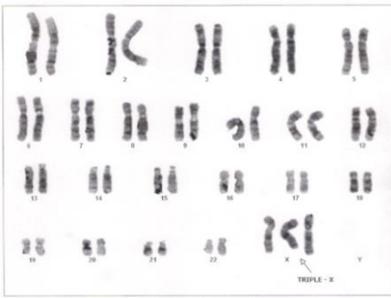
HASIL PEMERIKSAAN ANALISA KROMOSOM



Gambar 1. Karyotip siswa dengan trisomi murni

Keterangan: Tampak adanya tiga kromosom nomer 21. Kromosom ekstra 21 di tunjukkan oleh tanda panah

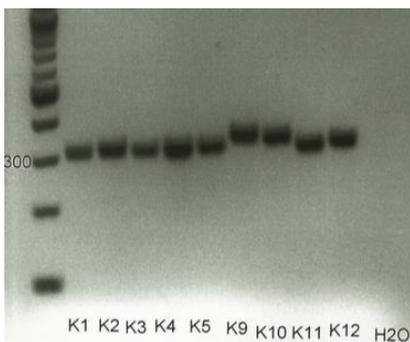
HASIL PEMERIKSAAN ANALISA KROMOSOM



Gambar 2. Karyotip siswa dengan trisomi X

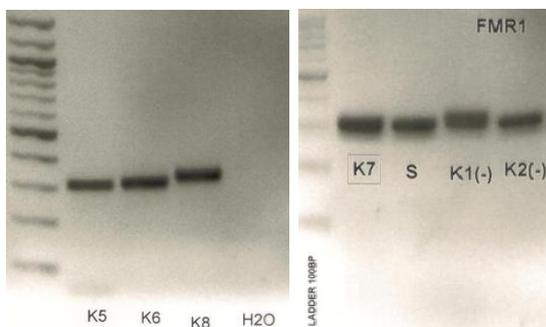
Keterangan: Tampak adanya 3 buah kromosom X (pada individu perempuan, secara normal terdapat dua kromosom X, tambahan ekstra kromosom X ditunjukkan oleh tanda panah)

Sebanyak 10 siswa dilakukan analisis kromosom dan dilanjutkan dengan analisis PCR untuk melihat ada tidaknya pemanjangan pengulangan CGG dan 2 siswa yang hanya menjalani analisis DNA tanpa pemeriksaan kromosom. Dari total 12 sampel yang dilakukan analisis PCR, tidak didapatkan pemanjangan pengulangan CGG, dengan kata lain, pengulangan CGG berada dalam kisaran normal, yaitu ~ 30 (ditunjukkan dengan panjang *band* 300 bp), seperti tampak pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Hasil gel electrophoresis pada amplifikasi PCR gen FMR1

Keterangan: Lajur paling kiri (lajur 1) merupakan marker DNA (100 bp), diikuti oleh sampel (K1, K2, K3, K4, K5, K9, K10, K11, dan K12) yang menunjukkan panjang *band* normal (~300bp)



Gambar 4. Hasil gel electrophoresis pada amplifikasi PCR gen FMR1

Keterangan: Lajur paling kiri pada gbr A dan B menunjukkan marker DNA (100 bp). Sampel (K5, K6, K8) pada gb. A dan K7 pada gb B menunjukkan panjang *band* normal (~300bp). Pada gb. B sampel S dan K2(-) adalah kontrol normal pria, sedangkan K1(-) adalah kontrol normal perempuan

DISKUSI

Dari 12 sampel yang dilakukan analisis kromosom, seluruh sampel laki-laki (10 sampel) memiliki karyotip normal, artinya retardasi mental tidak disebabkan adanya kelainan jumlah atau struktur kromosom. Dari 2 sampel perempuan, seorang sampel memiliki karyotip trisomi 21 (47,XX,+21), dan yang lain *triple X* atau trisomi X (47,XXX).

Pemeriksaan fisik siswi dengan trisomi 21 menunjukkan fenotip sindroma Down yang jelas. Hasil anamnesa pada siswi dengan sindroma Down ini menunjukkan adanya anggota keluarga yang juga menderita retardasi mental, sehingga terdapat dugaan sindroma Down translokasi. Hasil analisis kromosom menunjukkan sindroma Down pada siswi tersebut merupakan trisomi murni, sehingga dugaan adanya sindroma Down translokasi dapat disingkirkan. Sindroma Down trisomi murni dikaitkan dengan *advanced maternal age*. Semakin tua usia ibu hamil, semakin besar resiko untuk melahirkan bayi dengan kelainan kromosom. Pada sampel, usia ibu ketika hamil adalah 35 tahun, dimana pada usia 35 tahun resiko untuk melahirkan bayi dengan trisomi 21 adalah sebesar 1 : 380 (11). Sebanyak 90% sindroma Down memiliki karyotip trisomi murni dan sekitar 4-5% disebabkan adanya translokasi yang melibatkan kromosom 21 dan kromosom akrosentris yang lain (13-15 atau 21) (*Robertsonian translocation*), sedangkan siswanya merupakan sindroma Down mosaik (11,12).

Risiko terjadinya trisomi pada kehamilan meningkat seiring dengan *advanced maternal age*, termasuk trisomi X (13). Trisomi X merupakan kelainan jumlah kromosom yang disebabkan *non disjunction* pada meiosis I maternal. Sekitar 1: 1000 dari perempuan dengan fenotip normal membawa tiga kromosom X pada sel berinti tubuhnya (13,14). Pada siswi dengan trisomi X ini, tidak ada data mengenai usia ibu ketika melahirkan. Perempuan dengan *triple X* mempunyai fenotip tinggi badan diatas rata-rata. Tinggi badan berkisar dari 1 SD sampai 3 SD dari populasi pada umumnya. Hal ini dapat disebabkan oleh gen *SHOX* (*short-stature homeobox containing gene*) pada region pseudoautosomal kromosom X dan Y (15). Penambahan copy dari gen *SHOX* akan memperpanjang periode pertumbuhan tinggi badan seseorang. Fenotip ini sesuai dengan yang ditunjukkan oleh sampel yang memiliki *head circumference* 10th percentile. Dengan membandingkan *normal physical measurement* untuk perempuan Eropa, sampel memiliki tinggi badan 25th persentile, sedangkan apabila dibandingkan dengan tinggi rata-rata perempuan Indonesia, sampel (15 tahun) memiliki tubuh tinggi (156 cm).

Penelitian sebelumnya menunjukkan perempuan dengan trisomi X memiliki intelegensia yang normal tetapi cenderung lebih rendah dibandingkan saudara kandungnya dan mengalami kesulitan belajar serta mengalami keterlambatan pada kemampuan motorik tertentu (14). Kenyataan bahwa sampel bersekolah di SLB menunjukkan tingkat intelegensi berada di bawah level normal.

Pada pemeriksaan PCR untuk mendeteksi pemanjangan pengulangan CGG, tidak ditemukan adanya sampel dengan pemanjangan pengulangan CGG melebihi normal. Sampel perempuan (K5) menunjukkan hanya ada satu pita. Ada dua kemungkinan mengenai perempuan yang hanya menunjukkan satu pita pertama, ke dua kromosom

X memiliki pengulangan CGG yang sama banyak atau kemungkinan lainnya adalah salah satu X memiliki pengulangan CGG di atas normal, sehingga tidak teramplifikasi pada PCR. Dibutuhkan penelitian lanjutan, dalam hal ini pemeriksaan untuk melihat ada tidaknya pemanjangan pengulangan CGG pada orang tua dan saudara (*sibling*) sampel.

Dari penelitian ini teridentifikasi adanya kelainan kromosom pada 2 subjek (16,7%) yaitu trisomi 21 (47,XX,+21) dan 47,XXX. Analisis DNA dengan metode PCR tidak ditemukan mutasi gen FMR1 (pemanjangan CGG repeat) pada 12 siswa. Diperlukan metode analisis molekuler lain (*Multiple Ligand Probe Amplification* atau *Array*) dalam mendeteksi penyebab retardasi mental.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dave U and Sheety D. *Chromosomal Abnormalities in Mental Retardation: Indian Experience*. International Journal of Human Genetics. 2010;10(1-3):21-32.
2. Bhagya B and Ramakrishna A. *Prevalence of Mental Retardation among Children in Mangalore*. Nitte University Journal of Health Science. 2013; 3(4): 63-66.
3. Leonard H, Petterson B, Bower C, and Sanders R. *Prevalence of Intellectual Disability in Western Australia*. Paediatric and Perinatal Epidemiology. 2003;17(1):58-67.
4. Xie ZH, Bo SY, Zhang XT, et al. *Sampling Survey on Intellectual Disability in 0 Approximately 6-Year-Old Children in China*. Journal of Intellectual Disability Research. 2008;52(12): 1029-1038.
5. McConkey R, Mulvany F, and Barron S. *Adult Persons with Intellectual Disabilities on the Island of Ireland*. Journal of Intellectual Disability Research. 2006; 50(3): 227-236.
6. Badan Pusat Statistik. *Proyeksi Penduduk Indonesia 2010-2035*. Jakarta: Badan Pusat Statistik; 2013; p. 1-472.
7. Chelly J, Khelfaoui M, Francis F, Cherif B, and Bienvenu T. *Genetics and Pathophysiology of Mental Retardation*. European Journal of Human Genetics. 2006; 14: 701-13.
8. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, and White RL. *Medical Genetics*. 3rd edition. Philadelphia: Mosby; 2006; p. 112-116.
9. de Vries BB, van den Ouweland AM, Mohkamsing S, et al. *Screening and Diagnosis for the Fragile X Syndrome among the Mentally Retarded: An Epidemiological and Psychological Survey*. Collaborative Fragile X Study Group. American Journal of Human Genetics. 1997; 61(3): 660-667.
10. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. *Variation of the CGG Repeat at the Fragile X Site Results in Genetic Instability: Resolution of the Sherman Paradox*. Cell. 1991;67(6): 1047-1058.
11. M Connor and Fergusson-Smith M. *Essential Medical Genetics*. 5th edition. Oxford, London: Blackwell Science; 1999; p. 118-120.
12. Gomez-Valencia L, Rivera-Angles MM, Morales-Hernandez A, and Briceno-Gonzales MR. *Down's Syndrome Associated with a Balanced Robertsonian Translocation 13;14 Maternally Transmitted in the Product of a Twin Diamniotic Pregnancy*. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 2011; 68(3): 225-229.
13. Sheth HJ, Munoz A, Sergi C, et al. *Triple X Syndrome in Trisomic Down Syndrome Child: Both Aneuploidies Originated from Mother*. International Journal of Human Genetics's. 2011; 11(1): 51-53.
14. Afshan A. *Triple X Syndrome*. Journal of the Pakistan Medical Association. 2012; 62(4): 392-394.
15. Li M, Zou C, and Zhao Z. *Triple X Syndrome with Short Stature: Case Report and Literature Review*. Iranian Journal of Pediatrics. 2012; 22(2): 269-273.