

**NILAI DIAGNOSTIK PEMERIKSAAN IMUNOSITOKIMIA
LIMFOSIT SEDIAAN APUS DARAH TEPI DIBANDINGKAN
ANALISIS KROMOSOM PADA PENDERITA DENGAN
DUGAAN SINDROMA FRAGILE X**

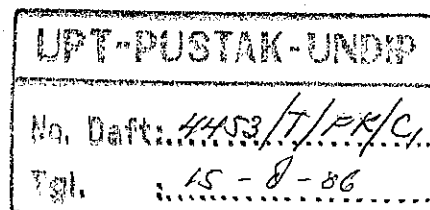
*DIAGNOSTIC VALUE OF IMMUNOCYTOCHEMICAL TEST OF LYMPHOCYTES
AT PERIPHERAL BLOOD SMEAR COMPARED TO CHROMOSOMAL ANALYSIS
TO DETECT FRAGILE X SYNDROME*



Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2 dan PPDS I Patologi Klinik

Wahyu Siswandari
G4A002081

**PROGRAM PASCA SARJANA MAGISTER ILMU BIOMEDIK DAN
PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER SPESIALIS I PATOLOGI KLINIK
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2005**



Tesis

**NILAI DIAGNOSTIK PEMERIKSAAN IMUNOSITOKIMIA LIMFOSIT
SEDIAAN APUS DARAH TEPI DIBANDINGKAN ANALISIS KROMOSOM
PADA PENDERITA DENGAN DUGAAN SINDROMA FRAGILE X**

disusun oleh :
Wahyu Siswandari
G4A002081

telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 14 Desember 2005
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

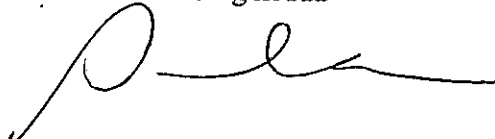
Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing utama



dr. Lisyani Suromo, SpPK(K)
NIP. 130 354 869

Pembimbing kedua




Prof. dr. Sultana M.H. Faradz, PhD
NIP. 130 701 415

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Biomedik
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro




Prof. dr. H. Soebowo, SpPA(K)
NIP. 130 352 549

Ketua Program Studi
PPDS I Patologi Klinik



dr. Purwanto AP, SpPK
NIP. 131 252 963

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Desember 2005

Penulis

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : dr. Wahyu Siswandari
NIM Magister Biomedik : G4A002081
NIM PPDS I Patologi Klinik : G3R002112
Tempat / tanggal lahir : Pati, 22 Januari 1971
Agama : Islam
Jenis kelamin : perempuan

B. Riwayat pendidikan

1. SD Virgo Maria Ambarawa : Lulus tahun 1983
2. SMP Pangudi Luhur Ambarawa : Lulus tahun 1986
3. SMA Negri 3 Semarang : Lulus tahun 1989
4. Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang : Lulus tahun 1996
5. PPDS I Patologi Klinik UNDIP Semarang
6. Program Pasca Sarjana Magister Ilmu Biomedik UNDIP Semarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Dokter PTT Puskesmas Wergu - Kudus : 1997 -1999
2. Dokter PTT Puskesmas Karanglewas - Banyumas : 1999
3. Staf pengajar Fakultas Biologi UNSOED Purwokerto : 1999 – 2002
4. Staf pengajar Program Pendidikan Dokter UNSOED Purwokerto : 2002 –
sekarang

D. Riwayat keluarga

1. Nama orang tua : ayah : G. Kasmani
ibu : Sri Muryati
2. Nama suami : dr. Noegroho Harbani
3. Nama anak : Nurpratama Budi Nugroho

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah Subhannahuwataala atas limpahan rahmat dan anugrahNya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis dengan judul "Nilai diagnostik pemeriksaan imunositokimia limfosit sediaan apus darah tepi dibandingkan analisis kromosom pada penderita dengan dugaan sindroma Fragile X". Tesis ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana S2 dan PPDS I Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

Fragile X merupakan penyebab utama retardasi mental pada laki-laki. Penegakan diagnosis Fragile X selama ini dilakukan dengan analisis molekuler maupun kromosom yang membutuhkan alat canggih, keahlian khusus, mahal dan membutuhkan waktu yang lama. Akhir-akhir ini dikembangkan pemeriksaan imunositokimia terhadap protein FMRP untuk penegakan diagnosis Fragile X. Pemeriksaan ini memberikan hasil lebih cepat, lebih mudah, dan relatif lebih murah. Sejauh ini belum ada penelitian yang menyebutkan nilai diagnostik pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi dibandingkan dengan analisis kromosom, oleh karena itu peneliti tertarik untuk menelitinya.

Penulis menyadari tugas ini tidak dapat terselesaikan dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada **dr. Lisyani Suromo, SpPK(K)** selaku pembimbing utama dan Ketua Bagian Patologi Klinik atas semua bimbingan, dorongan dan semangat yang telah diberikan. Penulis menghaturkan terimakasih kepada **Prof.dr. Sultana MH Faradz, PhD**

selaku pembimbing kedua atas semua bimbingan dan dorongan untuk mengerjakan dan menyelesaikan penelitian ini. Dalam kesempatan ini penulis juga menghaturkan terimakasih kepada :

1. Prof.dr. Kaburachman, SpKK(K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
2. Prof.dr. H. Soebowo, SpPA(K), Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pasca Sarjana Universitas Diponegoro Semarang
3. dr. Purwanto AP, SpPK, Ketua Program Studi Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.
4. Seluruh tim penguji yang telah berkenan memberikan masukan dalam penelitian dan penulisan tesis ini.
5. Rob Willemsen, PhD, untuk sumbangan antibodi monoklonal.
6. Seluruh staf pengajar Bagian Patologi Klinik, dr. Affandi, SpPK(K), dr. Imam Budiwiyono, SpPK, dr. MI Tjahjati, SpPK, dr. Banundari RH, SpPK, dr. Indranila KS, SpPK, dr. Herniah SpPK, dr. Ria TW, SpPK, dr. Nyoman Suci, M Kes, SpPK.
7. Staf Unit Sitogenetika dan Molekuler Laboratorium Bioteknologi : mbak Wiwik, mbak Nanik, mbak Lusi, dan mbak Rita, yang telah membantu penelitian ini.
8. Saudara seangkatanku, dr Junaedi Wibawa yang telah memberi dorongan dan semangat selama studi, juga seluruh rekan-rekan residen di bagian Patologi Klinik
9. Bapak ibu guru SLB Darma Putra Semin Gunung Kidul

10. Bapak dan ibu di Yogyakarta untuk doanya. Bapak dan ibu di Purwokerto untuk doa dan kesediaan merawat keluarga selama saya sekolah. Serta adik-adikku dan seluruh keluarga.
11. Suamiku dr. H. Noegroho Harbani dan anakku tercinta Nurpratama Budi Nugroho untuk semua cinta, pengorbanan, pengertian, doa, semangat dan dukungan.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharap kritik, saran dan masukan. Penulis berharap penelitian ini dapat berguna bagi masyarakat dan memberikan sumbangan bagi perkembangan ilmu dan teknologi.

Semarang, Desember 2005

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR SINGKATAN	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRACT	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Sindroma Fragile X	6
2.1.1 Gambaran Klinik	6
2.1.2 Defek Genetik	7
2.1.3 Pewarisan	9
2.1.4 Protein FMRP	10
2.2 Pemeriksaan Sindroma Fragile X	11
2.2.1 Analisis kromosom/Sitogenetik	11
2.2.2 Analisis molekuler	15
2.2.3 Analisis protein dengan pemeriksaan imunositokimia sediaan apus darah tepi	16
2.3 Kerangka teori	21
2.4 Kerangka konsep	21
BAB 3 METODE PENELITIAN	22
3.1 Desain Penelitian	22
3.2 Ruang lingkup penelitian	22
3.3 Tempat dan waktu penelitian	22
3.4 Populasi dan sampel	22
3.5 Variabel penelitian dan definisi operasional variabel	24
3.6 Alur penelitian	26
3.7 Baku emas	26
3.8 Cara kerja	27
3.9 Analisis data	30
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Hasil penelitian	32
4.1.1 Seleksi sampel	32

4.1.2 Hasil analisis kromosom	32
4.1.3 Hasil analisis protein FMRP	35
4.1.4 Uji diagnostik	38
4.2 Pembahasan	40
4.2.1 Data umum	40
4.2.2 Hasil analisis kromosom	40
4.2.3 Hasil analisis protein FMRP	41
4.2.4 Hasil uji diagnostik	42
BAB 5 SIMPULAN DAN SARAN	46
5.1 Simpulan	46
5.2 Saran	46
DAFTAR PUSTAKA	47

DAFTAR SINGKATAN

BrdC	: bromodeoxycytidine
BrdU	: bromodeoxyuridine
DAB	: diamino benzidine
dCDP	: deoxycytidine diphosphate
dCTP	: deoxycytidine triphosphate
DHF	: dihydrofolate
DHFR	: dihydrofolate reductase
DistA	: distamycin A
dTMP	: deoxy thymidylate
dTTP	: deoxythymidine triphosphate
dUMP	: deoxy uridylate
FMR 1	: Fragile X Mental Retardation-1
FMRP	: Fragile X Mental Retardation-1 Protein
FRAXA	: Fragile XA
FUdR	: fluorodeoxyuridine
kDa	: kilo Dalton
KH	: K homology domains
KO	: knock out
MEM	: minimum essential medium
MTX	: methotrexate
NTM	: normal transmitting males
PBS	: phosphat buffer saline

PCR	: polimerse chain reaction
RFLP	: restriction fragment length polymorphism
SADT	: sediaan apus darah tepi
TC	: tissue culture
THF	: tetrahydrofolate
TS	: thymidilate synthetase
UTR	: untranlated region

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil pemeriksaan analisis kromosom	33
Tabel 2. Data hasil pemeriksaan protein FMRP	36
Tabel 3. Tabel 2x2 hasil pemeriksaan analisis protein FMRP dibandingkan analisis kromosom	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Fragile site pada kromosom X wanita dan pria	10
Gambar 2. Metabolisme folat	11
Gambar 3. Pembuatan SADT dengan metoda two slides	17
Gambar 4. Alur penghitungan limfosit pada SADT	19
Gambar 5. <i>Fragile site</i> pada pengecatan solid	34
Gambar 6. <i>Fragile site</i> pada pengecatan <i>banding</i>	34
Gambar 7. Distribusi protein FMRP pada seluruh sampel yang diperiksa	35
Gambar 8. Protein FMRP positif	37
Gambar 9. Protein FMRP positif dan negatif	37
Gambar 10. Protein FMRP positif	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data hasil penelitian	55
Lampiran 2. Hasil analisis statistik	56
Lampiran 3. Poster penelitian	57

ABSTRAK

NILAI DIAGNOSTIK PEMERIKSAAN IMUNOSITOKIMIA LIMFOSIT SEDIAAN APUS DARAH TEPI DIBANDINGKAN ANALISIS KROMOSOM PADA PENDERITA DENGAN DUGAAN SINDROMA FRAGILE X

Latar belakang : Sindroma Fragile X merupakan penyebab utama retardasi mental. Diagnosis Fragile X dapat ditegakkan dengan analisis kromosom dan molekuler. *Fragile X Mental Retardation Protein* (protein FMRP) adalah molekul yang berperan dalam metabolisme mRNA. Protein ini terletak di sitoplasma dan terekspresikan secara luas pada banyak sel. Pemeriksaan imunositokimia dapat mendeteksi adanya protein FMRP di sitoplasma limfosit.

Tujuan : Untuk mengetahui sensitivitas, spesifisitas, nilai ramal positif dan negatif, serta rasio *likelihood* dari tes imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi (SADT).

Bahan dan metoda : Sebanyak 20 sampel diambil secara konsekutif dari siswa SLB di Semin Gunung Kidul. Kriteria inklusi adalah siswa pria berumur > 7 tahun, penderita retardasi mental ringan sampai sedang, bukan penderita sindroma Down, tidak menderita malformasi multipel, dan bukan penderita bisu tuli. Darah vena berheparin dikultur di media rendah folat TC 199 dan MEM + thymidine untuk melihat ekspresi fragile site. Protein FMRP di sitoplasma limfosit diperiksa dengan imunositokimia menggunakan antibodi monoklonal terhadap FMRP. Hasil pemeriksaan protein FMRP limfosit pada SADT dibandingkan dengan analisis kromosom yang digunakan sebagai baku emas. Selanjutnya data dimasukkan dalam tabel 2 x 2 dan dihitung sensitivitas, spesifisitas, nilai ramal positif dan negatif, serta rasio *likelihood*.

Hasil : Pemeriksaan imunositokimia limfosit di SADT mempunyai sensitivitas 93,33%, spesifisitas 40%, nilai ramal positif 83,25% dan nilai ramal negatif 66,66% dalam mendeteksi sindroma Fragile X. Rasio *likelihood* positif dari pemeriksaan imunositokimia adalah 1,55 sedangkan rasio *likelihood* negatifnya adalah 0,16

Simpulan : Pemeriksaan imunositokimia limfosit di SADT mempunyai sensitivitas dan nilai ramal positif tinggi, namun mempunyai spesifisitas, nilai ramal negatif dan rasio *likelihood* positif yang rendah. Pemeriksaan imunositokimia limfosit di SADT dapat digunakan untuk uji saring penderita sindroma Fragile X.

Kata kunci : fragile X, pemeriksaan imunositokimia, nilai diagnostik

ABSTRACT**DIAGNOSTIC VALUE OF IMMUNOCYTOCHEMICAL TEST OF
LYMPHOCYTES AT PERIPHERAL BLOOD SMEAR
COMPARED TO CHROMOSOMAL ANALYSIS
TO DETECT FRAGILE X SYNDROME**

Background: The Fragile X syndrome is the most common heritable form of mental retardation. The diagnosis of Fragile X syndrome can be supported by chromosomal and molecular analysis. Fragile X Mental retardation Protein (FMRP) is a protein that involved in mRNA metabolism and found in several tissues with predominant location in cytoplasm. Immunocytochemical study can detect the presence of FMRP in cytoplasm of lymphocytes.

Objective: To investigate the sensitivity, specificity, positive and negative predictive value, and likelihood ratio of immunocytochemical test of lymphocytes at peripheral blood smear compared to chromosomal analysis.

Material and method : Twenty consecutive samples were obtained from students of special school (SLB) at Semin Gunung Kidul. The inclusions criteria were male >7 years old, mild to moderate mental retardation, no Down syndrome, no multiple malformation, and no dumbness and deafness. Heparinized peripheral blood samples were cultured in low folate TC 199 and MEM + thymidine media to analyze the expression of fragile sites. The presence of FMRP protein in lymphocyte was analyzed by immunocytochemical techniques using monoclonal antibody against FMRP. Result of immunocytochemical test for detecting FMRP expression from lymphocyte in blood smear was tabulated and compared to chromosomal analysis that used as the gold standard. Then, the data was summarized into table 2 x 2 and calculated for sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and likelihood ratio.

Result : The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value of immunocytochemical test were 93,33%, 40%, 83,25% and 66,66% respectively. The positive likelihood ratio of immunocytochemical test was 1,55 and the negative likelihood ratio of immunocytochemical test was 0,16

Conclusion : Immunocytochemical test had high value in the sensitivity and positive predictive value but had poor value in specificity, negative predictive value and positive likelihood ratio. Immunocytochemical test of lymphocytes at peripheral blood smear can be used for patients screening of the Fragile X syndrome.

Key word : fragile X, immunocytochemical test, diagnostic value

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Sindroma Fragile X adalah penyebab utama kelainan retardasi mental dan penyebab kedua, setelah sindroma Down, dari semua kasus retardasi mental pada laki-laki.¹ Angka kejadian sindroma Fragile X adalah 1/1100 sampai 1/1500 pada laki-laki dan 1/2000 sampai 1/3000 pada wanita yang memperlihatkan gejala klinik.¹ Kepustakaan lain menyebutkan prevalensi Fragile X pada bangsa Kaukasia antara 0,4/1000 - 0,8/1000 pada laki-laki dan 0,2/1000 sampai 0,6/1000 pada wanita. Dengan penemuan teknik-teknik molekuler yang dapat membedakan jenis-jenis *fragile site*, prevalensi Fragile X di negara barat bervariasi antara 0,08% (1/1250) sampai 0,025% (1/4000). Turner menyebutkan bahwa prevalensi sindroma ini 1/4000 pada pria dan 1/6000 pada wanita.² Sementara itu penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa frekuensi Fragile X pada populasi retardasi mental di SLB Darma Putra yang terletak di sebuah desa di Kecamatan Semin, Kabupaten Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta adalah sebesar 54%.³

Sindroma Fragile X diwariskan secara X-linked namun tidak dapat digolongkan sebagai dominan atau resesif.^{1,2} Penyakit ini pada pria ditandai dengan gejala retardasi mental, pembesaran testis, telinga menggantung dan menonjol, serta dagu dan dahi yang panjang, sedangkan pada wanita pembawa sifat dapat menderita kelainan retardasi mental (pada 1/3 kasus) ataupun tanpa gejala, dengan atau tanpa menunjukkan kelainan kromosom.^{4,5}

Secara sitogenetik, sindroma Fragile X ditandai dengan kerapuhan (*fragile*) pada band Xq27.3 yang tampak sebagai patahan di ujung lengan panjang kromosom X.^{1,5,6,7} Secara molekuler, pada sebagian besar penyakit ini dihubungkan dengan pemanjangan dari CGG *repeat*, yang terletak di regio 5'UTR dari gen Fragile X yaitu gen Fragile X Mental Retardation-1 (*FMRI*). Pemanjangan CGG *repeat* di atas 200 unit mengakibatkan hipermetilasi CpG *island* dan CGG *repeat* di gen *FMRI* yang menyebabkan terhentinya produksi protein FMRP (Fragile X Mental Retardation-1 Protein).^{5,8,9}

Penegakan diagnosis sindroma Fragile X dapat dilakukan dengan analisis kromosom, analisis molekuler dan pemeriksaan imunositokimia untuk analisis protein FMRP. Pemeriksaan dengan analisis kromosom akan didapatkan kerapuhan berupa patahan di ujung lengan panjang kromosom X.^{1,5,6,7} Sampai saat ini analisis kromosom masih banyak dilakukan di laboratorium-laboratorium karena relatif lebih murah dan waktu pengerjaan yang lebih cepat dibanding analisis DNA, serta dapat mendeteksi individu pria dengan mutasi penuh.⁷ Analisis molekuler yang ditujukan untuk mendeteksi banyaknya CGG *repeat* dapat dilakukan dengan metoda PCR dan Southern Blot Hybridization yaitu *restriction fragment length polymorphism* (RFLP).^{5,8,10} Keuntungan analisis molekuler adalah dapat mendeteksi jumlah CGG *repeat*, namun pemeriksaan dengan metode molekuler membutuhkan waktu lama (kurang lebih 10 hari), lebih mahal, dan pemeriksaan dengan PCR tidak dapat mendeteksi individu mutasi penuh karena amplifikasi lebih dari 100 – 200 CGG *repeat* sulit dilakukan.¹¹

Akhir-akhir ini telah dikembangkan pemeriksaan imunositokimia untuk memeriksa protein FMRP yang terdapat di sitoplasma limfosit dengan menggunakan antibodi monoklonal dan gambaran kompleks antigen-antibodi dengan enzim alkaline phosphatase.^{11,12} Pemeriksaan imunositokimia sediaan apus darah tepi memberikan hasil yang lebih cepat (kurang lebih 24 jam) dibanding pemeriksaan analisis kromosom maupun analisis molekuler.¹¹ Pemeriksaan ini lebih mudah dilakukan karena tidak membutuhkan alat yang canggih dan keahlian khusus. Disamping itu pemeriksaan terhadap protein FMRP juga merupakan indikator prognostik yang potensial terhadap derajat beratnya penyakit.¹³

Sejauh ini belum ada kepustakaan yang menyebutkan sensitivitas dan spesifisitas, nilai ramal positif dan negatif, serta rasio likelihood pemeriksaan imunositokimia limfosit sediaan apus darah tepi dibandingkan dengan analisis kromosom, maka hendak dilakukan penelitian untuk mencari nilai diagnostik pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi.

1.2 Perumusan masalah

Dengan memperhatikan masalah tersebut di atas, dapat dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut: berapakah nilai diagnostik pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi dibandingkan dengan analisis kromosom pada penderita dengan dugaan sindroma Fragile X ?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui nilai diagnostik pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi untuk membantu penegakan diagnosis sindroma Fragile X.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Mengukur sensitivitas pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi dibandingkan dengan analisis kromosom.
2. Mengukur spesifisitas pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi dibandingkan dengan analisis kromosom.
3. Menentukan nilai ramal positif pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi dibandingkan dengan analisis kromosom.
4. Menentukan nilai ramal negatif pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi dibandingkan dengan analisis kromosom.
5. Menentukan rasio likelihood pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi dibandingkan dengan analisis kromosom.

1.4 Manfaat penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut :

1. Memberikan alternatif pemeriksaan untuk penegakan diagnosis Sindroma Fragile-X yang relatif lebih murah dan lebih cepat dikerjakan
2. Memberikan informasi yang dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya

3. Memberikan sumbangan untuk perkembangan ilmu dan teknologi khususnya dalam metoda pemeriksaan Fragile X

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sindroma Fragile X

2.1.1 Gambaran klinik

Nama sindroma Fragile X didasarkan pada adanya patahan / *fragile* pada ujung lengan panjang kromosom X.^{1,2,14} Secara klinik, sindroma ini ditandai dengan karakteristik fisik yang khas, kelainan perkembangan dan tingkah laku. Kelainan fisik yang timbul dapat bermacam-macam, meskipun kadang tidak muncul. Secara fisik, sindroma Fragile X ditandai dengan wajah yang memanjang dan dagu yang menonjol, telinga menggantung dan memanjang serta pembesaran testis yang biasanya terlihat setelah masa pubertas. Penderita mempunyai lengkung palatum yang tinggi. Infeksi telinga berulang dan kelainan mata seperti strabismus sering didapatkan. Kelainan jaringan ikat yang sering didapatkan adalah telapak kaki rata (*flat feet*), *loose joint*, dislokasi pinggul kongenital dan skoliosis. Kelainan lain yang mungkin terjadi adalah prolaps katub mitral atau serangan tiba-tiba petit inal.^{4,5,15,16}

Kelainan perkembangan yang menyertai sindroma Fragile X adalah kemunduran intelektual dengan IQ < 70 yang terjadi pada kurang lebih 80% penderita laki-laki dan 50% wanita. Kelambatan bicara, kelainan motorik halus dan kasar, serta kesulitan belajar dan koordinasi merupakan kelainan perkembangan lain pada sindroma Fragile X.^{3,4,14-17}

Sindroma Fragile X juga ditandai dengan kelainan tingkah laku yaitu kurangnya perhatian dan gambaran autisme. Tingkah laku lain yang sering didapatkan adalah tidak stabilnya *mood*, rasa malu dan gelisah. Penderita sering mengulang-ulang kata dalam berbicara, tidak suka terhadap suara keras, sentuhan dan bau yang keras maupun kontak mata.^{4,5,15,16,18,19}

2.1.2 Defek genetik

Secara sitogenetik, pada sindroma Fragile X didapatkan kerapuhan / *fragile* pada band Xq27.3 yang tampak sebagai patahan di ujung lengan panjang kromosom X.^{1,5,6,7} Lokasi ini dikenal dengan simbol gen FRAXA (Fragile XA) yang merupakan gen tunggal yang dikenal sebagai gen Fragile X Mental Retardation-1 (*FMR 1*).^{5,9} Gen *FMR 1* berukuran 38 kb dan mengandung 17 exon. Gen ini mengekspresikan 4,8 kb mRNA yang mentranslasi 614 asam amino polipeptida.²⁰

Pada sindroma Fragile X terjadi perluasan jumlah trinukleotida CGG *repeat*. Perluasan CGG akan menyebabkan hipermetilasi yang akan menekan gen *FMR 1*. Represi gen *FMR 1*, mutasi noktah dan delesi pada Xq27.3 akan menyebabkan terhentinya produksi protein FMRP (Fragile X Mental Retardation-1 Protein).^{21,22}

Repeat trinukleotida CGG bersifat polimorfik. Pada keadaan normal, *repeat* CGG berjumlah antara 5 – 50 unit. Jumlah *repeat* 40 – 55 disebut dengan zona abu-abu atau intermediet atau protomutasi. Pada umumnya protomutasi tidak pernah menjadi mutasi penuh. Protomutasi ini diturunkan ke generasi selanjutnya,

disertai adanya pengurangan atau penambahan jumlah *repeat*, yang pada akhirnya bisa menjadi kelompok premutasi.²²

Jumlah *repeat* 50 – 200 CGG diklasifikasikan sebagai premutasi. Secara fenotip, individu premutasi baik laki-laki atau wanita adalah normal. Greco melaporkan adanya sindroma neurologis yang ditandai tremor progresif, ataksia, penurunan kognitif dan atrofi otak pada penderita premutasi laki-laki dewasa.²²⁻²⁶

Individu dengan mutasi penuh mempunyai *repeat* CGG > 200.^{22,23} Penurunan mutasi penuh hanya dapat melalui wanita premutasi atau mutasi penuh dan tidak pernah melalui laki-laki.²⁷ Mutasi ini menyebabkan metilasi dari regio promotor gen *FMR 1* yang akan memblok transkripsi sehingga tidak bisa menghasilkan protein FMRP.^{22,28,29,30}

Adanya interupsi AGG pada *repeat* CGG gen *FMR 1* menyebabkan gen menjadi stabil. Pada keadaan normal interupsi AGG biasanya didapatkan pada *repeat* 9 atau 10 atau pada *repeat* ke 19 atau 20. Hilangnya interupsi AGG akan menjadikan gen *FMR 1* tidak stabil.^{5,22} Struktur *repeat* CGG berbentuk *hairpin* dan tetrahelik diduga mengubah interupsi AGG. Selain interupsi AGG, penyebab instabilitas gen *FMR 1* adalah arah replikasi, latar belakang genetik, transkripsi dan kondisi pertumbuhan. Mekanisme yang menyebabkan ketidakstabilan *repeat* CGG tidak diketahui secara pasti. Perubahan kecil yang terjadi pada *repeat* CGG terlihat pada keadaan normal. Jika ambang batas tertentu perubahan dilalui dan *repeat* CGG menjadi sangat tidak stabil, maka terjadilah mutasi.^{22,31}

Adanya mutasi penuh berhubungan dengan hipermetilasi residu deoxycytosine dari regio promotor gen *FMR 1* yang akan menghambat proses

transkripsi sehingga menyebabkan tidak diproduksinya protein FMRP.^{21,31} Metilasi akan mencegah ikatan faktor transkripsi dan regio promotor. Inhibisi aksi α -Pal/Nrf-1 dari tempat ikatannya oleh metilasi akan menyebabkan hilangnya aktivitas promotor 70%.²²

2.1.3 Pewarisan

Sindroma Fragile X mempunyai pewarisan yang unik yaitu :^{20,33}

- Sindroma Fragile X diwariskan secara *X-linked* namun tidak bisa digolongkan sebagai dominan atau resesif, karena wanita karier dapat menderita maupun tidak menderita retardasi mental dan dapat dengan atau tanpa menunjukkan kelainan kromosom.
- Hanya kurang lebih 30% wanita *carrier* yang menunjukkan gejala sindroma Fragile X, sedangkan pada pria 100%. Namun lelaki *carrier* (kurang lebih 20%) biasanya tidak menunjukkan gejala, yang disebut sebagai *normal transmitting males* (NTM). Saudara laki-laki dari NTM biasanya kurang menunjukkan gejala dibanding saudara laki-laki penderita sindroma Fragile X (disebut dengan *Sherman paradox*)
- Ibu dari penderita sindroma Fragile X pria adalah wanita *carrier*
- Rasio segregasi (proporsi anaknya menderita) dari wanita *carrier* adalah 0,4 bukan 0,5

2.1.4 Protein FMRP

FMRP terletak di sitoplasma dan terekspresikan secara luas pada banyak sel terutama di jaringan neuron hipokampus dan lapisan serebelum.^{21,22,34} Hal inilah yang mendasari pemikiran bahwa hilangnya atau berkurangnya FMRP akibat hilangnya transkripsi *FMR 1* menyebabkan timbulnya retardasi mental pada penderita sindroma Fragile X.^{21,22}

FMRP mempunyai massa molekul 70 – 80 kDa, mengandung motif RNA-binding yang terdiri dari 2 domain KH (*K homology domains*) dan 2 boks RGG. Fungsi FMRP belum diketahui secara pasti, namun karena protein ini terutama terdapat di sitoplasma, maka diduga berperan dalam transpor dan atau translasi mRNA.^{21,22,30,32,35-38}

Pemeriksaan mikroskopik pada otopsi penderita sindroma Fragile X dan jaringan korteks serebri tikus KO menunjukkan adanya abnormalitas ukuran dan bentuk dendrit yang disebabkan kegagalan maturasi dendrit oleh karena tidak adanya FMRP. Foto dengan label fluoresen pada granula FMRP memperlihatkan bahwa protein berhubungan dengan ribosom pada dendrit dan pergerakan mereka ke neurit tergantung pada mikrotubulus.^{21,22,39}

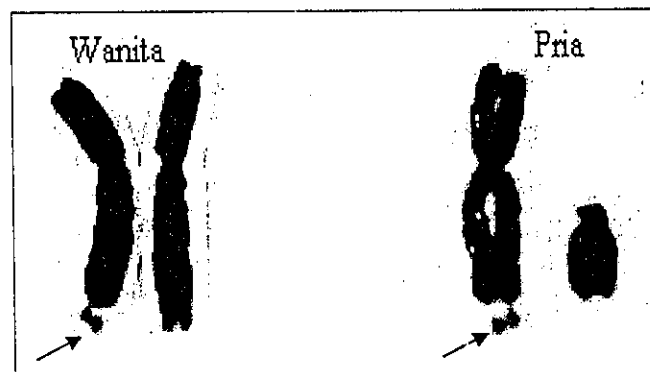
Tidak adanya FMRP pada neuron diduga menyebabkan mis regulasi atau *mis trafficking* mRNAs dan inilah yang menjadi dasar terjadinya retardasi mental pada penderita sindroma Fragile X.^{21,22,32} FMRP juga berperan pada transpor spesifik mRNA inaktif ke area pos sinaps. Sebagai respon terhadap aktivitas sinaps, mRNA menjadi aktif bertranslasi. FMRP berperan penting untuk regulasi *activity-dependent synaptic plasticity* pada otak.^{21,22,36,37,40}

2.2 Pemeriksaan sindroma Fragile X

2.2.1 Analisis kromosom / sitogenetik

Sebagian besar kelainan kromosom adalah abnormalitas jumlah, dan yang lainnya adalah abnormalitas struktural. Sindroma Fragile X yang ditandai adanya *fragile site* pada kromosom X termasuk dalam abnormalitas struktural. *Fragile site* ini tampak sebagai konsiriksi atau *non staining gap* pada ujung lengan panjang kromosom X (Xq 27.3/FRAXA) sehingga ujung lengan panjang tampak patah.^{6,7,33,41,42}

Fragile site muncul pada individu penderita fragile X yang ditandai adanya retardasi mental. Pada penderita *carrier* atau yang tidak menderita, biasanya *fragile site* tidak muncul.^{6,7,41,42}

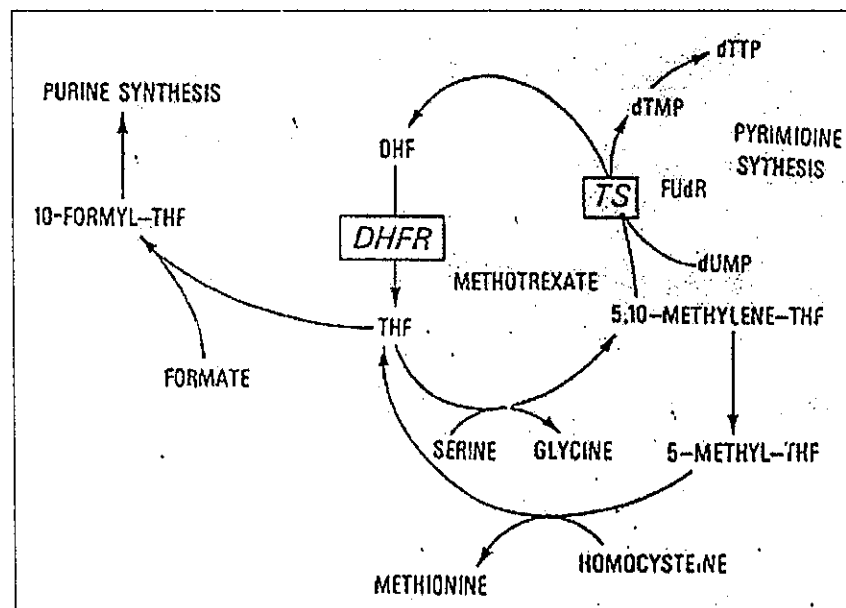


Gambar 1. Fragile site pada kromosom X wanita dan pria⁴¹

Lubs (1969) menemukan adanya *fragile site* di ujung lengan panjang kromosom X pada pria dengan retardasi mental dengan menggunakan kultur TC 199. Tahun 1977 Sutherland juga mendapatkan adanya *fragile site* dengan menggunakan media Tissue Culture 199 (TC 199) yang rendah folat dan

thymidine. Media yang mengandung folat/thymidine dengan kadar normal akan menghambat ekspresi *fragile site*. Berdasar hasil kultur tersebut, Sutherland membuat hipotesis bahwa metabolisme folat dan biosintesis pyrimidine merupakan mekanisme yang mendasari ekspresi *fragile site*.^{6,7,42}

Penemuan lain menyebutkan bahwa zat seperti *fluorodeoxycytidine* dan *trifluorothymidine* yang merupakan inhibitor *thymidilate synthetase* juga mempengaruhi metabolisme folat. Penambahan zat seperti *bromodeoxyuridine* (BrdU), *bromodeoxycytidine* (BrdC) atau *distamycin A* (DistA) ke dalam media kultur sebelum pemanenan kromosom juga akan meningkatkan ekspresi *fragile site*.^{6,7,42}



DHF : dihydrofolate, THF : tetrahydrofolate, dUMP : uridylate, dTMP : thymidylate, DHFR : dihydrofolate reductase, TS : thymidilate synthetase, FUdR : fluorodeoxyuridine, dTTP : deoxythymidine triphosphate

Gambar 2. Metabolisme folat⁴²

Berdasar metabolisme folat dapat disimpulkan bahwa semua bahan yang menghambat pembentukan dTTP baik melalui inhibitor folat seperti *methotrexate* (MTX) atau inhibitor metabolisme *pyrimidine* seperti FUdR akan mengganggu sintesis DNA. Hambatan sintesis DNA adalah suatu kejadian molekuler mendadak dan bertanggungjawab terhadap munculnya *fragile site*.^{6,7,42}

2.2.1.1 Kultur sel untuk memunculkan fragile site

Agar *fragile site* pada kromosom X dapat terekspresikan, ada beberapa kondisi yang harus diperhatikan, yaitu :^{6,7,42}

a. Media

Media yang digunakan adalah media rendah folat seperti TC 199 atau Minimum Essential Medium (MEM-FA), atau menggunakan media dengan kadar folat normal tapi ditambahkan antagonis *thymidilate* sebelum pemanenan kromosom.

Alternatif lain adalah menggunakan media dengan kadar *thymidine* tinggi. Kadar *thymidine* tinggi akan menghambat replikasi DNA dan menghasilkan resolusi tinggi pada banding kromosom.

Juga dapat dilakukan penambahan inhibitor folat ke dalam media kultur seperti *methotrexate* (MTX) atau inhibitor *pyrimidine* / inhibitor *tymidylate synthetase* FUdr (*fluorodeoxyuridine*).

b. pH

pH optimal media untuk memunculkan *fragile site* adalah kurang lebih 7,6. Kadar pH harus terjaga selama kultur sel.

c. Jangka waktu kultur

Pada umumnya kultur sel limfosit dalam waktu 72 – 96 jam sudah dapat memunculkan ekspresi *fragile site*.

2.2.1.2 Pemanenan dan pengecatan

Pada saat pemanenan, penambahan larutan hipotonik merupakan prosedur rutin. Pada umumnya larutan hipotonik yang digunakan adalah KCl 0,075M. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa penambahan larutan hipotonik Na sitrat 1% lebih memunculkan *fragile site* dibandingkan KCl. Na sitrat diduga lebih kuat berikatan dengan kromatin. Ikatan ini akan mempengaruhi konsentrasi kation divalen yang akan menyebabkan kelainan kondensasi.^{7,42}

Pengecatan yang rutin dilakukan di laboratorium untuk analisis kromosom adalah pengecatan solid dan pengecatan *banding*. Pengecatan solid digunakan untuk skrining sel. Aseto-arcein 1-2%, Giemsa atau Wright adalah pewarnaan yang pada umumnya dipakai dalam pengecatan solid.^{7,42}

Konfirmasi lebih lanjut adanya *fragile site* dilakukan dengan pengecatan *G banding*.^{7,42} Pengecatan *G banding* dilakukan dengan cara membiarkan *slide* menjadi tua selama 3-5 hari. Selanjutnya *slide* dicelup dalam larutan Trypsin 0,1% dan dilanjutkan pengecatan dengan Giemsa.^{7,42,43}

2.2.1.3 Analisis

Analisis kasus Fragile-X diawali dengan melihat sidikan 50 sel pada pengecatan solid . Penghitungan diteruskan sampai 100 sel bila didapatkan *fragile*

site.. Slide dengan fragile site positif dicatat koordinatnya, dilunturkan catnya kemudian dicat ulang dengan pengecatan *G banding* dan dianalisis paling sedikit 6 sel untuk konfirmasi.⁴³

2.2.2 Analisis molekuler

Perkembangan ilmu biologi molekuler dan teknologi rekombinan DNA memungkinkan pemeriksaan mutasi yang terjadi pada Fragile X. Beberapa penelitian menunjukkan lokasi dari gen Fragile X dan menemukan bahwa pada pria penderita Fragile X terjadi hipermetilasi DNA di regio tersebut yang tidak ditemukan pada orang normal.^{5,8-11}

Diagnosis molekuler pada Fragile X dilakukan dengan menggunakan dua metode yaitu Southern Blot dan Polimerase Chain Reaction (PCR). Kedua metode ini dapat mendeteksi perluasan CGG *repeat* yang terjadi pada Fragile X.^{5, 8,9,10,11,41}

Metode Southern Blot untuk mendeteksi Fragile X menggunakan probe StB12.3 memakai 2 enzim restriksi.^{8,41} Enzim pertama, EcoRI akan memotong untaian DNA dan menghasilkan band 5,2 kb. Enzim kedua, EagI akan memotong *unmethylated* DNA di daerah CpG dan menghasilkan band 2,8 kb, sehingga pada orang normal didapatkan band 2,8 kb yang merupakan kromosom X yang aktif dan 5,2 kb yang merupakan kromosom X inaktif yang bermetilasi. Pada keadaan premutasi terbentuk band 2,9 – 3,2 kb pada kromosom X yang aktif dan 5,3 – 5,7 kb pada kromosom X inaktif, sedangkan penderita Fragile X mempunyai band 5,9 – 9 kb.⁷ Keuntungan penggunaan Southern Blot dibanding PCR adalah dapat mendeteksi individu dengan mutasi penuh dan status metilasi dari regio CpG.^{5,8}

PCR dapat mendeteksi mutasi fragile X secara cepat dan hanya membutuhkan sedikit DNA dibanding Southern Blot. Dengan PCR dapat diketahui jumlah *repeat* CGG. Prinsip pemeriksaan adalah pemanjangan primer melalui pembentukan pasangan basa dengan nukleotida DNA target. Nukleotida bebas dGTP yang digunakan untuk pemeriksaan fragile X adalah 7 deaza guanosine triphosphate (7-deaza dGTP) dengan penambahan Taq sebagai enzim DNA polimerase. Buffer rendah magnesium digunakan untuk menjaga stabilitas Taq. Setelah terbentuk produk PCR, produk tersebut dideteksi dengan elektroforesis pada gel polyacrylamid. Wanita normal pada umumnya mempunyai CGG *repeat* 30 dan 29. *Repeat* 56 – 200 biasanya terdapat pada premutasi dan individu dengan mutasi penuh menghasilkan *repeat* CGG > 200.^{5,8}

2.2.3 Analisis protein FMRP dengan pemeriksaan imunositokimia sediaan apus darah tepi

Deteksi protein FMRP yang terdapat di sitoplasma dilakukan dengan pemeriksaan imunositokimia.²¹ Metode ini menggunakan prinsip dasar reaksi ikatan antigen (dalam hal ini protein FMRP) dengan antibodi spesifik yang terdapat dalam reagen. Jika didapatkan protein FMRP maka akan terjadi ikatan antigen – antibodi. Ikatan ini dapat dideteksi dengan melihat aktivitas enzim yang dikonjugasikan pada antibodi yang menghasilkan perubahan warna.^{44,45} Keuntungan metode imunositokimia ini adalah waktu pemeriksaan yang cepat (24 jam), mudah, relatif murah, dan dapat digunakan untuk pemeriksaan sampel dalam jumlah banyak.^{11,45}

2.2.3.1 Sediaan apus darah tepi

Sediaan apus darah tepi (SADT) yang baik diperlukan dalam pemeriksaan imunositokimia. Ciri-ciri SADT yang baik adalah : lebar dan panjang tidak memenuhi seluruh kaca obyek, secara gradual penebalannya berangsur-angsur menipis dari kepala ke arah ekor, ujung ekor tidak berbentuk bendera robek, tidak berlubang-lubang, tidak terputus-putus, tidak terlalu tebal atau terlalu tipis.^{46,47}

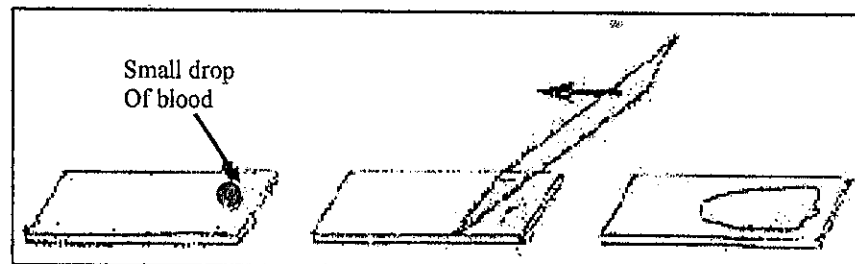
Secara garis besar, SADT dibagi menjadi 6 zona berdasar susunan populasi sel darah merah yaitu : zona I (zona ireguler), zona II (zona tipis), zona III (zona tebal), zona IV (zona tipis), zona V (zona reguler) dan zona VI (zona sangat tipis).⁴⁶ Pemeriksaan imunositokimia limfosit pada SADT tidak diperlukan zona-zona tersebut karena pembacaan berdasarkan penghitungan limfosit sejumlah 100 sel tanpa memperhitungkan letaknya.

Peralatan yang diperlukan untuk pembuatan SADT adalah :^{46,47,48}

- kaca obyek dengan permukaan rata, bersih, kering, bebas debu dan lemak
- *Spreader*/penggeser dari bahan gelas atau bahan lainnya dengan tepi rata dan lebih sempit dari lebar kaca obyek

Cara pembuatan SADT dilakukan dengan metode *two slide* yang menggunakan 2 buah kaca obyek. Satu tetes darah ($\pm 5 \mu\text{L}$) diletakkan pada 1-2 cm dari salah satu ujung kaca obyek, kemudian *spreader* diletakan di depan tetesan darah dengan sudut 30° - 40° terhadap kaca obyek. *Spreader* ditarik ke belakang sampai menyentuh tetes darah, kemudian ditunggu sampai darah menyebar sepanjang *spreader*. *Spreader* didorong dengan gerakan mantap sehingga terbentuk apusan darah sepanjang 3-4 cm. Apusan darah dibiarkan

mengering di udara, diberi identitas penderita dan siap untuk proses pengecatan.^{46,47,48}



Gambar 3. Pembuatan SADT dengan metoda *two slides*⁴⁸

2.2.3.2 Limfosit pada Sediaan Apus Darah Tepi

Limfosit merupakan sel yang dapat mengenali bermacam-macam substansi asing dan memproduksi antibodi. Sel ini diproduksi di sumsum tulang dan berkembang lebih lanjut di organ limfoid primer dan sekunder. Limfosit berdiferensiasi menjadi sel limfosit T dan B di organ limfoid primer. Limfosit T bertanggung jawab terutama pada respon imun seluler, sedangkan sel B berperan pada respon imun humoral.^{49,50,51}

Limfosit yang matang, berdasar ukuran, terbagi menjadi limfosit besar (17 – 20 μm) dan limfosit kecil (6 – 9 μm). Rasio inti : sitoplasma adalah 2 : 1 pada limfosit besar dan 4 : 1 sampai 3 : 1 untuk limfosit kecil. Limfosit matur mempunyai inti berbentuk bulat atau oval, kadang bercelah dengan kromatin inti padat dan tidak mempunyai anak inti. Sitoplasma sedikit dengan warna biru. Kadang didapatkan granula azurofilik di sitoplasma.^{50,51}

Jumlah limfosit di darah tepi tergantung usia. Pada bayi baru lahir, limfosit merupakan 90% dari total leukosit di darah tepi. Pada dewasa, didapatkan 35% limfosit di darah tepi dengan 60% - 80% terdiri dari sel T dan 20% sel B.⁵¹

Willemsen dkk (1995) melaporkan bahwa protein FMRP banyak terdapat pada sitoplasma limfosit. Oleh karena itulah, maka pemeriksaan imunositokimia apusan darah tepi menggunakan persentase didapatkannya protein FMRP di limfosit.²²

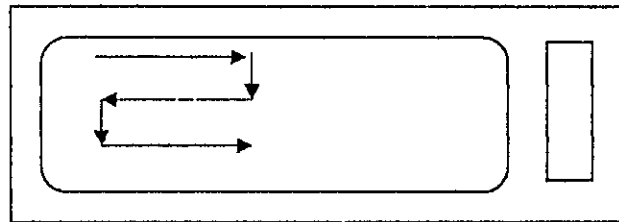
2.2.3.3 Pengecatan

Pengecatan yang digunakan adalah *immunoperoxidase labelling* dengan 3 langkah imunoinkubasi. SADT difiksasi dengan larutan paraformaldehide. Selanjutnya dilakukan permeabilisasi dengan metanol dan dilanjutkan dengan memblok aktivitas peroxidase endogenous menggunakan *PBS block*. Inkubasi pertama dilakukan dengan menambahkan antibodi T1a terhadap protein FMRP. Dilanjutkan inkubasi kedua dengan *goat anti-mouse immunoglobulin* yang dikonjugasi dengan biotin. Inkubasi ketiga menggunakan *streptavidin-biotinylated peroxidase complex*. Setelah dilakukan pencucian ditambahkan larutan DAB dan selanjutnya dicat dengan *Nuclear Fast Red*.^{12,21,45,52}

2.2.3.4 Analisis

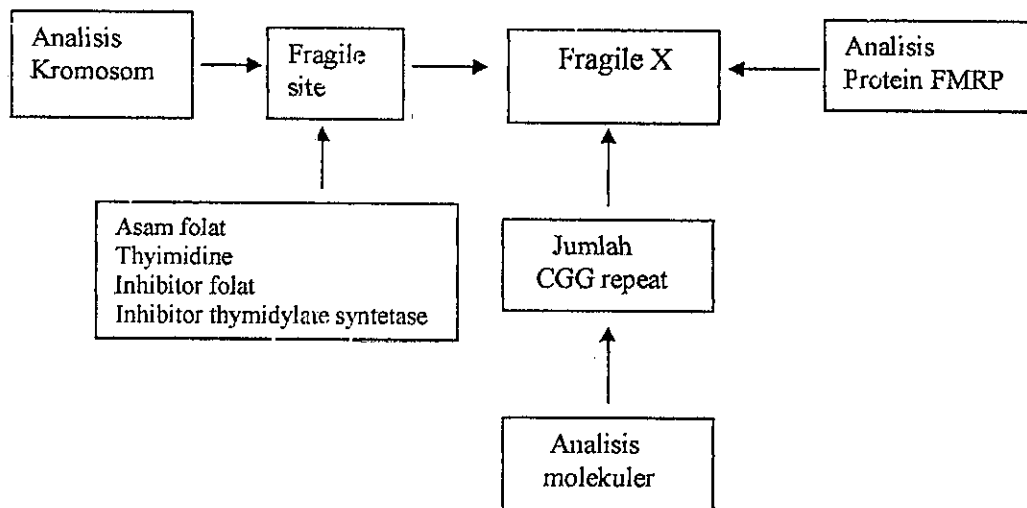
SADT yang telah dicat, dibaca di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000x dengan penambahan minyak emersi. Protein FMRP terekspresikan sebagai warna coklat pada sitoplasma limfosit. Dilakukan penghitungan terhadap limfosit

dengan sitoplasma tercat coklat dalam 100 limfosit. Pembacaan dimulai dari tepi kiri (sesuai dengan posisi ekor preparat) ke arah kepala. Jika belum didapatkan 100 sel limfosit, maka arah pembacaan diturunkan ke bawah, kemudian bergeser ke arah ekor kembali (gerak zigzag). Individu normal mempunyai limfosit dengan protein FMRP > 80%, dan individu dengan mutasi penuh mempunyai protein FMRP < 42%.⁵³

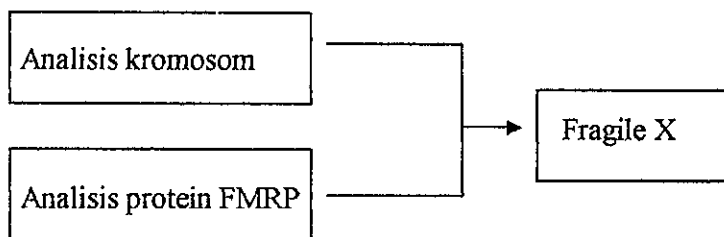


Gambar 4. Alur penghitungan limfosit pada SADT

2.3 Kerangka Teori



2.4 Kerangka Konsep



BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Disain Penelitian

Disain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah uji diagnostik dengan pendekatan belah lintang

3.2 Ruang lingkup penelitian

Ruang lingkup bidang ilmu yang diteliti adalah bidang ilmu Patologi Klinik dengan titik berat pada cabang ilmu imunologi dan genetika.

3.3 Tempat dan waktu penelitian

Tempat penelitian adalah Semin-Gunung Kidul, sedangkan pemeriksaan laboratorium dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran UNDIP.

Waktu penelitian adalah antara bulan Desember 2004 sampai dengan Agustus 2005.

3.4 Populasi dan sampel

3.4.1 Populasi penelitian

Populasi penelitian ini adalah siswa SLB Darma Putra, Semin Gunung Kidul dengan kriteria inklusi sebagai berikut :

- laki-laki, umur > 7 tahun

- penderita retardasi mental ringan – sedang
- tidak bisu tuli
- bukan penderita sindroma Down
- tidak menderita multipel malformasi

3.4.2 Pengambilan sampel

Pengambilan sampel secara konsekutif.

3.4.3 Besar sampel

Untuk uji diagnostik, digunakan rumus besar sampel tunggal untuk estimasi proporsi suatu populasi, sebagai berikut.^{52,53}

$$n = \frac{z_{\alpha}^2 PQ}{d^2}$$

P : proporsi penyakit atau keadaan yang dicari

Karena proporsi sebelumnya tidak diketahui, maka digunakan $P = 0,50$

d : tingkat ketepatan absolut yang dikehendaki (ditetapkan oleh peneliti)

α : tingkat kemaknaan (ditetapkan oleh peneliti)

$P = 0,50$; $d = 20\%$; $Z_{\alpha} = 1,645$ (tingkat kesalahan 0,05)

$$n = \frac{1,645^2 \times 0,50 \times (1 - 0,50)}{(0,20)^2}$$

$$= \frac{2,706025 \times 0,25}{0,04}$$

$$n = 16,9 \approx 17$$

Dengan memperhitungkan faktor drop out sebesar 10%, maka didapatkan besar sampel penelitian adalah $17 \div 1,7 = 18,7$ yang dibulatkan menjadi 20.

3.5 Variabel penelitian dan definisi operasional variabel

3.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas adalah :

- Analisis kromosom

Skala data : skala nominal

- Analisis protein

Skala data : skala rasio

- Sensitivitas

Skala data : skala rasio

- Spesifisitas

Skala data : skala rasio

- Nilai ramal negatif

Skala data : skala rasio

- Nilai ramal positif

Skala data : skala rasio

- Rasio *likelihood* positif

Skala data : skala rasio

- Rasio *likelihood* negatif

Skala data : skala rasio

3.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah Fragile X

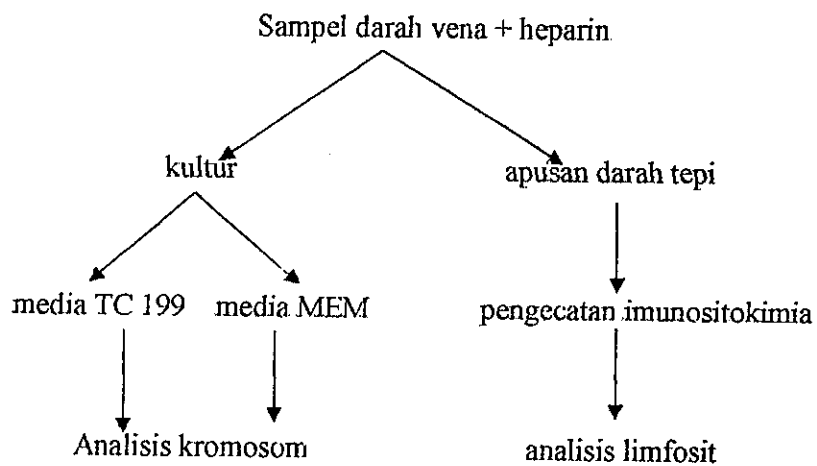
Skala data : nominal

3.5.3 Definisi operasional variabel

Analisis kromosom	pemeriksaan dengan menggunakan kultur limfosit pada media rendah folat TC 199 dan MEM untuk melihat adanya <i>fragile site</i> di ujung lengan panjang kromosom X
Analisis protein FMRP	pemeriksaan protein FMRP dengan menggunakan pengecatan imunositokimia <i>immunoperoxidase labelling</i> terhadap limfosit pada sediaan apus darah tepi, dimana diagnosis penderita Fragile X ditegakkan jika kadar protein FMRP positif < 42%
Sindroma Fragile X	didapatkannya <i>fragile site</i> di Xq27.3 kromosom X pada analisis kromosom
Sensitivitas	proporsi subyek yang sakit dengan hasil uji diagnostik positif (positif benar) dibanding seluruh subyek yang sakit (positif benar + negatif semu)
Spesifisitas	proporsi subyek yang sehat dengan hasil uji diagnostik negatif (negatif benar) dibanding seluruh subyek yang tidak sakit (negatif benar + positif semu)
Nilai ramal positif	probabilitas seseorang menderita penyakit apabila uji diagnostiknya positif
Nilai ramal negatif	probabilitas seseorang tidak menderita penyakit apabila uji diagnostiknya negatif

Rasio <i>likelihood</i> positif	perbandingan antara proporsi subyek yang sakit yang memberi hasil uji positif dengan proporsi subyek yang sehat yang memberi hasil uji positif
Rasio <i>likelihood</i> negatif	perbandingan antara proporsi subyek yang sakit yang memberi hasil uji negatif dengan proporsi subyek yang sehat yang memberi hasil uji negatif

3.6 Alur penelitian



3.7 Baku emas

Standar baku emas yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis kromosom.

3.8 Cara kerja

3.8.1 Analisis kromosom

- Darah diambil dari pembuluh darah vena dengan penambahan antikoagulan heparin
- 10 tetes darah diteteskan ke dalam tabung yang berisi 5 ml media TC 199 dan ke tabung lain yang berisi MEM.
- Tabung diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 72 - 96 jam dengan sudut kemiringan tabung kurang lebih 45⁰ dalam inkubator
- 24 jam sebelum pemanenan, ditambahkan thymidine 100 µL pada tabung dengan media MEM
- Ditambahkan 3 tetes colchicines, inkubasi diteruskan selama 30 menit. Kemudian dipusingkan selama 10 menit pada 1000 rpm
- Supernatan dibuang, endapan diresuspensikan dan ditambahkan larutan hipotonik hangat KCl 0,075M, diresuspensi sampai homogen dan diinkubasi 37⁰ C dalam waterbath selama 15-30 menit
- Dipusingkan selama 10 menit pada 1000 rpm, supernatan dibuang dan ditambahkan 5 ml larutan fiksasi Carnoy's pelan-pelan melalui dinding tabung, kemudian dikocok. Pemberian larutan fiksasi diulangi 3 kali sampai didapatkan presipitat yang jernih
- Residu disuspensikan dengan larutan Carnoy's secukupnya sesuai dengan banyaknya pelet, disebarakan pada gelas obyek dengan meneteskan 2 suspensi pada lokasi yang berbeda

- Dilakukan pengecatan solid dengan giemsa 10% dalam larutan bufer phospat pH 6,8 selama 1 menit
- Dilakukan sidikan 50 sel, bila didapatkan positif fragile X penghitungan diteruskan sampai 100 sel
- *Slide* yang positif fragile X dicatat koordinatnya, di-destaining kemudian dicat *G-banding* yaitu dengan cara : *slide* dibiarkan berumur 3 - 5 hari, dicelup dalam larutan Trypsin 0,1% yang dilarutkan dengan PBS pH 6,8, dicuci segera 2x dengan PBS dan dicat dengan Giemsa 10% dalam bufer phospat
- Dilakukan konfirmasi untuk fragile X positif dan dianalisis paling sedikitnya 6 sel
- Semua metafase yang sudah dianalisis difoto hitam putih

3.8.2 Pemeriksaan imunositokimia

- Dibuat apusan darah tepi
- Difiksasi dengan paraformaldehyde dan larutan bufer Sorrensen selama 10 menit
- Dipermeabilisasi dengan metanol 100% selama 20 menit
- Aktivitas endogenous peroxidase diblok dengan PBS BLOCK selama 30 menit
- Dicuci 3x dengan PBS masing-masing selama 5 menit
- Slide diinkubasi dengan antibodi monoklonal T1a dengan pengenceran 1 : 1500 selama 1 jam pada suhu ruangan

- Dicuci dengan PBS+ 3 x 5 menit
- Diinkubasi dengan antibodi kedua biotinylated selama 10 menit
- Dicuci dengan PBS+ 3 x 5 menit
- Diinkubasi dengan peroxidase-conjugated Streptavidin
- Dicuci dengan PBS+ 4 x 5 menit
- Dicuci dengan 0,1M PBS selama 5 menit
- Diinkubasi dengan DAB substrate selama 15-20 menit
- Dicuci dengan aqua destilata selama 5 menit
- Diwarnai dengan Nuclear Fast Red selama 2 menit
- Dichelupkan dalam etanol 80%, 96%, 100% masing-masing selama 2 detik, kemudian diletakkan dalam larutan xylene DEH 1 selama beberapa detik dan xylene DEH 2
- Dikeringkan semalam dalam inkubator 37 ° C
- Dilakukan analisis dengan menghitung persentase sitoplasma limfosit yang terwarnai coklat dalam 100 limfosit

3.9 Analisis data

Data yang telah terkumpul ditabulasi dan dianalisis menggunakan uji statistik sebagai berikut :

- Analisis hasil pemeriksaan kromosom oleh pemeriksa dikonfirmasi kepada ahli sitogenetika
- Analisis hasil pemeriksaan analisis protein FMRP antara pemeriksa I (peneliti) dan II (analisis laboratorium) dengan uji beda t berpasangan.

jika distribusi data normal, atau dengan uji Wilcoxon Signed Ranks

Test jika distribusi data tidak normal

- Uji diagnostik : data yang didapat dimasukan ke tabel 2 x 2, kemudian dilakukan penghitungan untuk mencari sensitivitas, spesifisitas, nilai ramal positif dan nilai ramal negatif, serta rasio *likelihood*

Tabel 2 x 2 diagnosis Fragile X antara hasil pemeriksaan analisis kromosom dan hasil pemeriksaan analisis protein FMRP

		Fragile X dengan Analisis kromosom	
		(+)	(-)
Fragile X dengan Analisis protein FMRP	(+)	a	b
	(-)	c	d

Fragile X dengan analisis protein FMRP, sesuai kriteia Willemsen dengan *cut off point* 42% adalah :

(+) : jika didapatkan limfosit dengan sitoplasma terwarnai coklat < 42%

(-) : jika didapatkan limfosit dengan sitoplasma terwarnai coklat > 42%

Fragile X dengan analisis kromosom :

(+) : jika didapatkan *fragile site* $\geq 15\%$

(-) : jika tidak didapatkan *fragile site* < 15%

Rumus penghitungan :

$$\text{Sensitivitas} = a / a + c$$

$$\text{Spesifisitas} = d / b + d$$

$$\text{Nilai ramal positif} = a / a + b$$

$$\text{Nilai ramal negatif} = d / c + d$$

$$\text{Rasio Likelihood positif} = \text{sensitivitas} / (1 - \text{spesifisitas})$$

$$\text{Rasio Likelihood negatif} = (1 - \text{sensitivitas}) / \text{spesifisitas}$$

- a : jumlah penderita Fragile X dengan analisis kromosom dan analisis protein FMRP
- b : jumlah penderita Fragile X dengan analisis protein FMRP dan bukan Fragile X dengan analisis kromosom
- c : jumlah penderita Fragile X dengan analisis kromosom dan bukan Fragile X dengan analisis protein FMRP
- d : jumlah bukan penderita Fragile X dengan analisis kromosom dan analisis protein FMRP

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.1 Seleksi sampel

SLB Darma Putra Semin Gunung Kidul mempunyai 61 siswa yang terdiri dari 23 siswa perempuan dan 38 siswa laki-laki. Enam belas siswa merupakan penderita bisu tuli dan 45 siswa adalah penderita tuna grahita. Sebanyak 20 siswa yang memenuhi kriteria inklusi yaitu laki-laki berumur > 7 tahun, penderita retardasi mental ringan – sedang, tidak bisu tuli, bukan penderita sindroma Down, dan tidak terdapat multipel malformasi, diambil sebagai sampel penelitian. Pengambilan sampel dilakukan secara konsekutif.

4.1.2 Hasil analisis kromosom

Hasil pembacaan sediaan kromosom oleh peneliti yang telah dikonfirmasi kepada ahli sitogenetika tercantum dalam tabel 1.

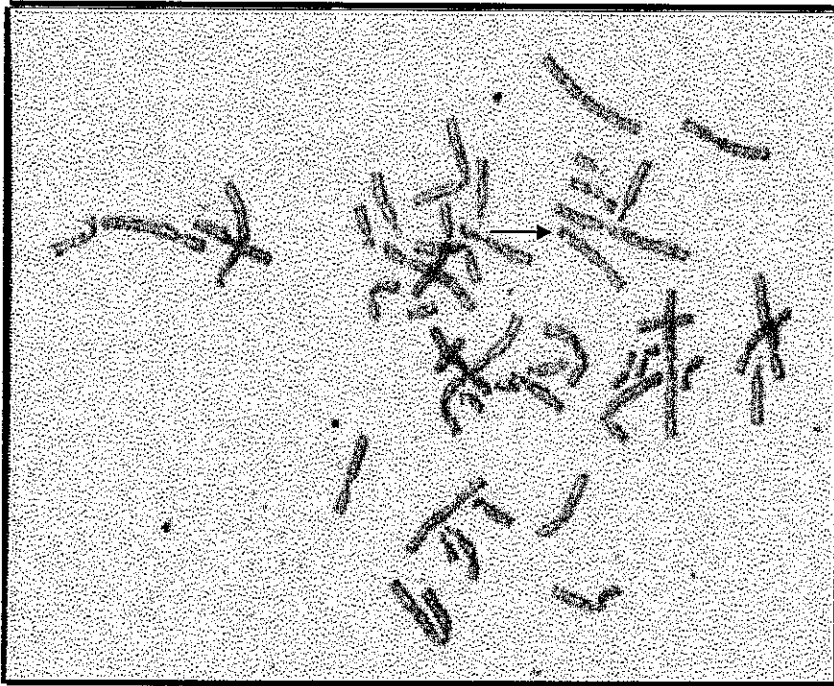
Pemeriksaan kromosom bertujuan untuk melihat ekspresi *fragile site*, digunakan sebagai *gold standar*. *Fragile site* didapatkan pada 16 (80%) sampel dengan frekuensi rata-rata *fragile site* sebesar 22,81%. Empat sampel (20%) tidak didapatkan *fragile site*. Satu sampel hanya ditemukan *fragile site* sebanyak 10% dimana hasil pemeriksaan protein FMRP adalah 44%. Pengecatan *banding* dilakukan untuk konfirmasi adanya *fragile site* pada kromosom X (bukan pada kromosom lain). Diagnosis Fragile X ditegakkan jika didapatkan *fragile site* \geq

15%. Berdasarkan kriteria ini, sampel yang menderita Fragile X sebanyak 15 orang (75%). Pemeriksaan kelainan struktur dan jumlah kromosom lain pada pengecatan *banding* sementara belum dilakukan.

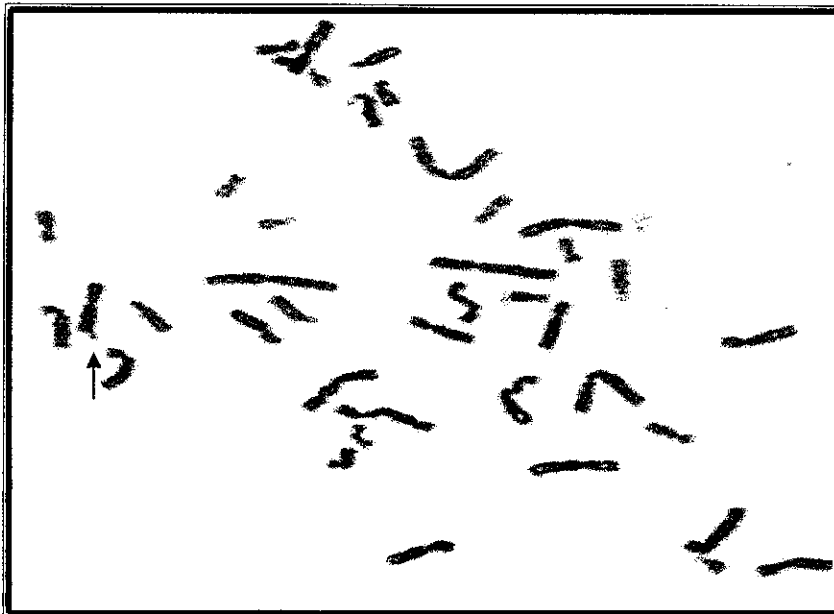
Tabel 1. Hasil pemeriksaan analisis kromosom

No sampel	Hasil	
	Fragile site (%)	Fragile X
1	25	+
2	30	+
3	25	+
4	15	+
5	0	-
6	30	+
7	20	+
8	0	-
9	10	-
10	20	+
11	15	+
12	50	+
13	20	+
14	30	+
15	0	-
16	0	-
17	15	+
18	15	+
19	20	+
20	25	+

Keterangan : Diagnosis Fragile X ditegakkan jika didapatkan fragile site \geq 15%



Gambar 5. *Fragile site* pada pengecatan solid (tanda panah)

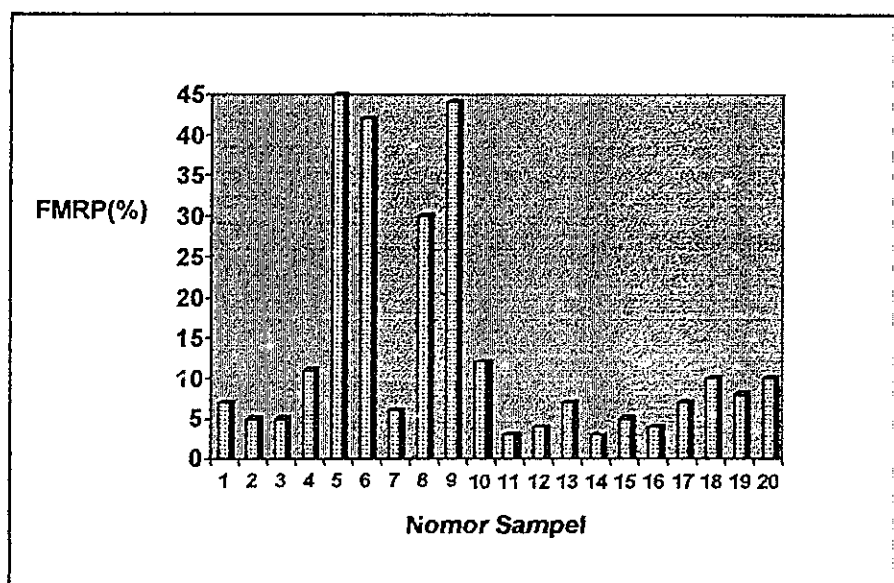


Gambar 6. *Fragile site* pada pengecatan *banding* (tanda panah)

4.1.3 Hasil analisis protein FMRP

Analisis protein FMRP dilakukan dengan pengecatan imunositokimia pada sediaan apus darah tepi. Pembacaan dilakukan oleh 2 orang pemeriksa (pemeriksa I adalah peneliti, dan pemeriksa II adalah analis laboratorium yang kompeten) dengan prosedur yang sama. Hasil pembacaan protein FMRP pada limfosit tercantum pada tabel 2 dan gambar 7 .

Persentase minimum protein FMRP adalah 3% dan persentase maksimum 45% dengan mean 13,4%. Grafik histogram memperlihatkan bahwa distribusi data tidak normal.

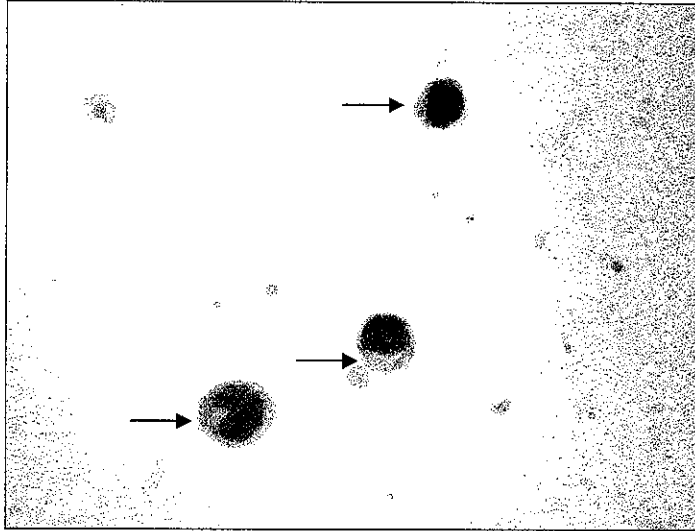


Gambar 7. Distribusi protein FMRP pada seluruh sampel yang diperiksa

Tabel 2. Data hasil pemeriksaan protein FMRP

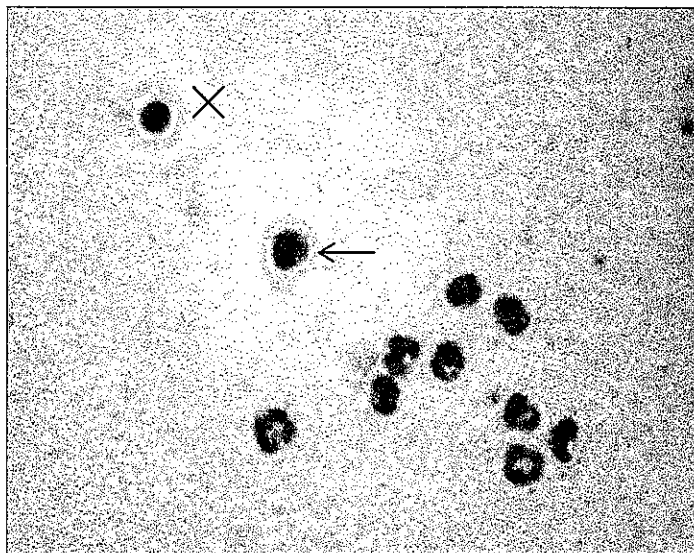
No sampel	Protein FMRP (%)
1	7
2	5
3	5
4	11
5	45
6	42
7	6
8	30
9	44
10	12
11	3
12	4
13	7
14	3
15	5
16	4
17	7
18	10
19	8
20	10

Hasil pembacaan protein FMRP oleh kedua pemeriksa dianalisis dengan Wilcoxon Signed Ranks Test karena distribusi data tidak normal. Didapatkan hasil $p > 0,05$ ($p = 0,775$) sehingga tidak didapatkan perbedaan bermakna hasil pemeriksaan protein FMRP antara pemeriksa I dan II.



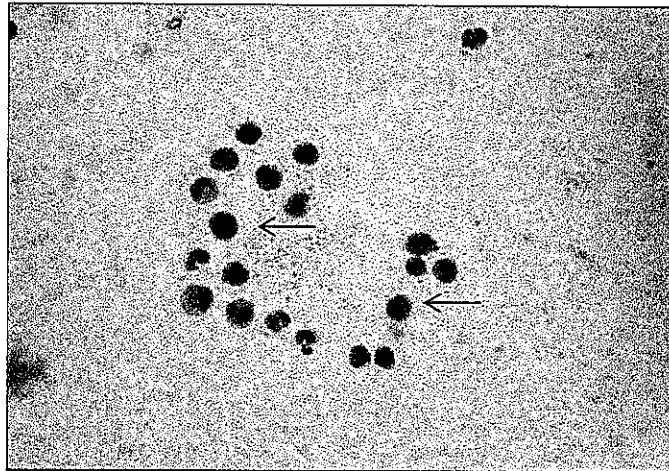
Gambar 8. Protein FMRP positif

Protein FMRP positif, tampak sitoplasma limfosit berwarna coklat di (tanda panah)



Gambar 9. Protein FMRP positif dan negatif

Protein FMRP positif, tampak sitoplasma limfosit berwarna coklat di (tanda panah), sitoplasma limfosit yang tidak mengandung FMRP tampak jernih (tanda X)



Gambar 10. Protein FMRP positif
Protein FMRP positif tampak berwarna coklat di sitoplasma limfosit (tanda panah)

4.1.4 Uji diagnostik

Hasil pemeriksaan protein FMRP dengan pengecatan imunositokimia pada SADT dimasukkan dalam tabulasi data dan dibandingkan dengan hasil analisis kromosom. Dugaan penderita Fragile X ditegakkan jika pada analisis protein FMRP ditemukan jumlah limfosit dengan sitoplasma tercat coklat $< 42\%$.⁵³ Analisis kromosom dinyatakan positif penderita jika ditemukan *fragile site* $\geq 15\%$.⁴³

Hasil analisis protein FMRP dan kromosom dimasukkan dalam tabulasi data. Tabulasi data tersebut kemudian dimasukkan ke dalam tabel 2 x 2, dan dilakukan penghitungan nilai diagnostik meliputi nilai sensitivitas, spesifisitas, nilai ramal positif dan negatif, serta rasio likelihood.

Tabel 3. Tabel 2 x 2 hasil pemeriksaan analisis protein FMRP dibandingkan analisis kromosom

		Fragile X dengan Analisis kromosom	
		+	-
Fragile X dengan	+	14 (a)	3 (b)
Analisis FMRP	-	1 (c)	2 (d)

Dari tabel 2 x 2 di atas dilakukan penghitungan sebagai berikut :

- ♦ Sensitivitas = $(a / a+c) \times 100\% = (14 / 14+1) \times 100\%$
= **93,33 %**
- ♦ Spesifisitas = $(d / b+d) \times 100\% = (2 / 3+2) \times 100\%$
= **40 %**
- ♦ Nilai ramal positif = $(a / a+b) \times 100\% = (14 / 14+3) \times 100\%$
= **82,35 %**
- ♦ Nilai ramal negatif = $(d / c+d) \times 100\% = (2 / 1+2) \times 100\%$
= **66,66 %**
- ♦ Rasio *likelihood* positif = sensitivitas / (1 – spesifisitas)
= $0,9333 / (1 - 0,4)$
= **1,55**
- ♦ Rasio *likelihood* negatif = (1- sensitivitas) / spesifisitas
= $(1 - 0,9333) / 0,4$
= **0,16**

4.2 Pembahasan

4.2.1 Data umum

Sampel yang diambil adalah pria dengan umur penderita berkisar antara 13 sampai 36 tahun. Sebanyak 16 orang (80%) di antaranya berusia produktif (20 -59 tahun). Keadaan ini dapat menimbulkan kerugian di bidang sosial ekonomi baik bagi keluarga maupun negara karena penduduk usia produktif diharapkan dapat bekerja secara optimal. Diagnosis dini Fragile X diperlukan untuk penanganan dan pencegahan gejala Fragile X.

4.2.2 Hasil analisis kromosom

Hasil penelitian menunjukkan bahwa 75% sampel menderita Fragile X berdasarkan analisis kromosom. Penelitian ini memperlihatkan bahwa kedua media baik media rendah folat TC 199 maupun media MEM yang ditambah dengan thymidine dapat menampilkan ekspresi *fragile site*. Media TC 199 merupakan media dengan kadar folat rendah . Kadar folat yang rendah akan menghambat pembentukan dTTP melalui penghambatan pada *thymidylate syntetase*. Deplesi kadar dTTP yang dibutuhkan untuk sintesis DNA akan menyebabkan gangguan kondensasi kromatin yang tampak sebagai *non staining gap* atau patahan di ujung lengan panjang kromosom X. Media MEM dengan penambahan thymidine akan memunculkan *fragile site* melalui mekanisme peningkatan jumlah dTTP. Tingginya kadar dTTP akan menghambat kerja ribonucleotide reduktase dalam mereduksi *cytidine diphosphate* menjadi *deoxycytidine diphosphate* (dCDP). Jumlah dCDP yang berkurang akan

menyebabkan turunnya kadar *deoxycytidine triphosphate* (dCTP) yang diperlukan dalam sintesis DNA sehingga menyebabkan gangguan kondensasi kromatin.^{6,7,42} Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Sutherland yang menyatakan bahwa media dengan kadar rendah folat atau konsentrasi thymidine tinggi dapat memunculkan *fragile site*.⁷

Sampel no 8, tidak didapatkan *fragile site* pada kultur dengan media TC 199, sedangkan kultur dengan media MEM tidak berhasil. Kegagalan kultur ini kemungkinan karena pengerjaan yang tidak steril sehingga menyebabkan terjadi kontaminasi bakteri (sampel tampak berwarna hitam setelah diinkubasi 72 jam, dan sediaan kromosom penuh dengan bakteri tanpa didapatkan adanya sel).

4.2.3 Hasil analisis protein FMRP

Hasil penelitian menunjukkan 17 (85%) penderita Fragile X dengan pemeriksaan analisis protein FMRP pada SADT, berdasarkan kriteria Willemsen dengan cut off point 42%. Berdasar kriteria tersebut, seseorang dengan jumlah limfosit di SADT yang mengandung protein FMRP < 42% adalah penderita sindroma Fragile X.⁵³

Penelitian ini menunjukkan bahwa pemeriksaan protein FMRP di sitoplasma limfosit dengan pengecatan imunositokimia pada SADT memungkinkan penegakan diagnosis sindroma Fragile X dilakukan lebih cepat dan relatif lebih murah dibanding dengan analisis kromosom. Oostra (1999) menyatakan bahwa teknik imunositokimia mempunyai kelebihan yaitu : (1) waktu pemeriksaan yang cepat, hasil bisa didapatkan dalam 24 jam, (2) tidak

membutuhkan peralatan laboratorium untuk kultur kromosom, dan (3) harganya lebih murah daripada analisis kromosom.¹¹ Willemsen dalam penelitiannya juga menyebutkan bahwa analisis protein FMRP dapat meningkatkan diagnosis prenatal karena dapat mendeteksi sindroma Fragile X mulai minggu ke 16.⁵⁶

Teknik imunositokimia didasarkan pada reaksi antigen-antibodi terhadap protein yang dihasilkan oleh gen *FMR 1* yang terletak di Xq27.3 (FRAXA). Protein FMRP akan didapatkan pada individu normal. Ketiadaan atau menurunnya jumlah protein ini menunjukkan indikasi adanya kelainan pada gen *FMR 1*. Berdasarkan hal tersebut, analisis protein FMRP dapat dijadikan dasar diagnosis FRAXA yang lebih kuat dibandingkan analisis kromosom. *Fragile site* yang ditemukan pada ujung lengan panjang kromosom X dengan analisis kromosom belum tentu terjadi pada regio q27.3.²¹

Kelemahan metode ini adalah subyektivitas pemeriksa. Warna coklat pada sitoplasma limfosit dapat terlihat oleh pemeriksa satu namun tidak terlihat oleh pemeriksa lain. Ketidaksesuaian pemeriksaan terutama terjadi pada limfosit dengan sitoplasma sempit. Standarisasi cara pemeriksaan dan pembacaan (standar warna coklat sitoplasma limfosit seperti yang terdapat pada kontrol normal) dapat dilakukan sebagai upaya mengurangi kelemahan metode ini.

4.2.4 Hasil uji diagnostik

Pemeriksaan protein FMRP dengan pengecatan imunositokimia mempunyai nilai sensitivitas 93,33 %, spesifisitas 40 %, nilai ramal positif 82,35% dan nilai ramal negatif 66,66 % dibandingkan dengan analisis kromosom.

Pemeriksaan protein FMRP dengan pengecatan imunositokimia mempunyai sensitivitas tinggi (93,33%). Nilai sensitivitas tinggi menunjukkan bahwa pengecatan imunositokimia pada preparat SADT mempunyai kemampuan tinggi dalam menemukan kasus sindroma Fragile X. Sebaliknya, metoda ini mempunyai spesifisitas rendah (40 %) yang menunjukkan bahwa kemampuan pemeriksaan imunositokimia pada SADT dalam menyingkirkan subyek yang tidak menderita sindroma Fragile X adalah rendah. Spesifisitas pemeriksaan imunositokimia rendah kemungkinan karena jumlah sampel yang tidak menderita sindroma Fragile X berdasar pemeriksaan analisis kromosom hanya sedikit (5 dari 20 penderita). Sedikitnya jumlah sampel yang bukan penderita Fragile X mungkin disebabkan karena pengambilan sampel dilakukan di daerah Semin dimana frekuensi Fragile X cukup tinggi. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa frekuensi Fragile X di SLB di Semin sebesar 54 %.³

Nilai ramal positif menunjukkan besar peluang subyek menderita sindroma Fragile X apabila hasil pemeriksaan protein FMRP dengan pengecatan imunositokimia pada SADT hasilnya positif. Nilai ramal positif pemeriksaan imunositokimia cukup tinggi, sehingga memberikan peluang subyek menderita sindroma Fragile X sebesar 82,35% bila hasil pemeriksaannya positif. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Tassone (1999) dimana didapatkan nilai ramal positif sangat tinggi (100%) pada pemeriksaan protein FMRP.¹³

Nilai ramal negatif menggambarkan besar peluang subyek tidak menderita sindroma Fragile X apabila hasil pemeriksaan protein FMRP dengan pengecatan imunositokimia pada SADT hasilnya negatif. Hasil penelitian ini menunjukkan

nilai ramal negatif pemeriksaan imunositokimia sebesar 66,66%. Artinya bahwa peluang subyek tidak menderita Fragile X hanya 66,66% jika hasil pemeriksaan protein FMRP dengan imunositokimia negatif.

Rasio *likelihood* positif menggambarkan probabilitas hasil tes positif pada orang dengan penyakit yang diamati dibagi dengan probabilitas hasil tes positif pada orang tanpa penyakit. Penelitian ini menunjukkan rasio *likelihood* positif pemeriksaan imunositokimia rendah (1,55). Rasio *likelihood* negatif penelitian ini adalah 0,16 yang menunjukkan probabilitas hasil tes negatif pada orang dengan penyakit yang diamati dibagi dengan probabilitas hasil tes negatif pada orang tanpa penyakit.⁵⁷

Berdasar hasil penelitian ini, dimana nilai sensitivitas dan nilai ramal positif cukup tinggi, sementara spesifisitas dan nilai ramal negatif rendah, maka pemeriksaan imunositokimia dapat digunakan untuk menunjang penegakan diagnosis sindroma Fragile X, tetapi kurang baik jika digunakan untuk menyingkirkan dugaan bukan penderita Fragile X. Sehingga pemeriksaan imunositokimia SADT hanya dapat digunakan untuk uji saring sindroma Fragile X. Hal ini didukung dengan rasio *likelihood* positif yang rendah. Suatu tes dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis jika rasio *likelihood* positif > 10 dan rasio *likelihood* negatif $< 0,1$. Dengan demikian pemeriksaan imunositokimia tidak dapat digunakan untuk menegakkan diagnosis namun dapat digunakan sebagai uji saring. Hal ini sesuai dengan pernyataan Oostra bahwa pemeriksaan imunositokimia potensial untuk skrining sampel dalam jumlah besar untuk mengidentifikasi penderita fragile X pria pada penderita retardasi mental.¹¹

Skrining dalam jumlah besar dengan pemeriksaan imunositokimia juga dilakukan oleh de Vries (1998) pada 412 penderita retardasi mental.¹¹

BAB 5

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

1. Sensitivitas pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi adalah 93,33 %
2. Spesifisitas pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi adalah 40 %
3. Nilai ramal positif pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi adalah 82,35%
4. Nilai ramal negatif pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi adalah 66,66 %
5. Rasio *likelihood* positif pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi adalah 1,55
6. Rasio *likelihood* negatif pemeriksaan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi adalah 0,16

5.2 Saran

1. Analisis protein FMRP dengan pengecatan imunositokimia limfosit pada sediaan apus darah tepi dapat digunakan untuk uji saring penderita dengan dugaan sindroma Fragile X.
2. Pelatihan bagi pemeriksa agar pemeriksaan dan pembacaan limfosit dengan pengecatan imunositokimia dapat sesuai dengan standar.

DAFTAR PUSTAKA

1. Thompson MW, Mc Innes RR, Willard HF, Genetic in Medicine. 5th ed. Philadelphia. WB Saunders, 1991 : p 53 – 95.
2. Faradz SMH. Tinjauan molekular dan sitogenetik Sindrom Fragile X. Dalam : Recent Advances in The Diagnostic of Genetic, Infectious and Malignancy. Semarang, 16 – 19 Juni 2003.
3. Faradz SMH, Armalina D, Ngestiningsih D, Juniarto AZ. Frekuensi fragile X pada anak-anak retardasi mental di Kec Semin, Kab Gunung Kidul, DI Yogyakarta. Media Medika Indonesia, 2003; 38(4) : 185 – 91.
4. Hagerman RJ. Physical and behavioral phenotype. In : Hagerman RJ, Cronister A eds. Frafle X syndrome, Diagnosis, Treatment, and Research. 2nd ed. Baltimore. The Johns Hopkins University Press, 1996 : p 3 – 64.
5. Nelson DL. The Fragile X mental retardation syndrome. In : Shaw DJ ed. Molecular Genetics of Human Inherited Diseases. Chichester. John Wiley & Sons Ltd, 1995 : p 91 – 116.
6. Tommerup N. Cytogenetics of the fragile site at Xq27. In : Davies ed. The Fragile X Syndrome. Oxford. Oxford VP, 1989 : p 102 -23.
7. Jacky P. Cytogenetics. In : Hagerman RJ, Cronister A eds. Frafle X Syndrome, Diagnosis, Treatment, and Research. 2nd ed. Baltimore. The Johns Hopkins University Press, 1996 : p 114 – 51.
8. Brown WT. The molecular biology of the Fragile X mutation. In : Hagerman RJ, Cronister A eds. Frafle X syndrome, Diagnosis, Treatment,

and Research. 2nd ed. Baltimore. The Johns Hopkins University Press, 1996 : p 88 – 108.

9. Saul RA, Tarleton JA. Fragile X syndrome. Available at :
<http://www.geneclitics.org/servlet/access?1d+8888892&key=9hy8M1fGQki&gry=INSE>
10. Brown WT. DNA studies of the fragile X mutation. In : Davies ed. The Fragile X Syndrome. Oxford. Oxford University Press, 1989 : 76 – 101.
11. Oostra BA, Willemsen R. The diagnosis of the Fragile X syndrome.
Available at :
<http://www.appliedbiosystem.com/molecularbiology/md/fraxa.pdf>
12. Oostra BA, Willemsen R. Diagnostic test for fragile X syndrome. Expert Rev Mol Diagn , 2001; 1 : 226 – 32.
13. Tassone F, Hagerman RJ, Ikle DN, et al. FMFP expression as potential prognostic indicator in Fragile X syndrome. Am J Med Genet, 1999 ; 84 : 250 – 61.
14. Park V, Peebles PH, Sherman S, et al. Fragile X syndrome : diagnostic and carrier testing. Available at : <http://www.fragileXsyndrome.htm>
15. Gane L. Fragile X syndrome. Management of Common Genetic Disorders, 1998;16.
16. Fragile X syndrome. Available at :
<http://www.ccdyouthandfamilyfragileXsyndrome.htm>.
17. de Vries BB, Wieggers Am, Smits AP, et al. Mental status of female with an FMR 1 gene full mutation. Am J Hum Genet, 1996 ; 58 : 1025 – 32.

18. Kaufmann WE, Cortel R, Kau AS, Bukelis I, Tierney E, Gray RM, Cox C, Capone GT, Stanard P. Autism spectrum disorder in Fragile X syndrome : communication, social interaction, and specific behaviors. *American Journal of Medical Genetics*, 2004 ; 129A : 225 – 34.
19. Bailey DB, Skinner D, Sparkman KL. Discovering Fragile X syndrome : family experiences and perceptions. *Pediatrics*, 2003 ; 111 : 407 – 16.
20. Fragile X syndrome. Available at : <http://www.CMGSMRCPath>.
21. Oostra BA. FMR 1 protein studies and animal model for Fragile X syndrome. In : Hagerman RJ, Cronister A eds. *Fragile X syndrome, Diagnosis, Treatment, and Research*. 2nd ed. Baltimore. The Johns Hopkins University Press, 1996 : p 193 – 205.
22. Oostra BA, Willemsen R. The X chromosome and Fragile X mental retardation. *Cytogenet Genome Res*, 2002; 99 ; 257 – 64.
23. Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, et al. Elevated levels of FMR 1 mRNA in carrier males : a new mechanism of involvement in the Fragile X syndrome. *Am J Hum Genet*, 2000; 66 : 6 – 15.
24. Welt CK, Smith PC, Taylor AE. Evidence of early ovarian aging in Fragile X premutation carriers. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2004 ; 89 : 4569 – 74.
25. Tassone F, Hagerman RJ, Arocena DG, Khandjian EW, Greco CM, Hagerman PJ. Intranuclear inclusions in neural cells with premutation alleles in Fragile X associated tremor/ataxia syndrome. *J Med Genet*, 2004 ; 41 : 43 – 5.

26. Greco CM, Hagerman RJ, Tassone F, Chudley AE, Del Bigio MR, Jacquemont S, Leehey M, Hagerman PJ. Neuronal intranuclear inclusions in a new cerebellar tremor/ataxia syndrome among Fragile X carriers. *Brain*, 2002 ; 125 : 1760 – 71.
27. Rousseau, Heitz D, Biancalana, et al. Direct diagnosis by DNA analysis of the Fragile X syndrome of mental retardation. *N Engl J med*, 1991 ; 325 : 1673 – 81.
28. de Vries BB, Jansen CC, Diuts AA, et al. Variable FMR 1 gene methylation of large expansions leads to variabel phenotype in three males from one Fragile X family. *J Med Genet*, 1996 ; 33 : 1007 – 10.
29. Hagerman RJ, Hull CE, Safanda JF, et al. High functioning Fragile X males : demonstration of an unmethylated fully expanded FMR 1 mutation associated with protein expression. *Am J Med Genet*, 1994 ; 51 : 298 – 308.
30. Primerano B, Tassone F, Hagerman RJ, Hagerman P, Amaldi F, Bagni C. Reduced FMR1 mRNA translation efficiency in Fragile X patients with premutations. *RNA*, 2002 ; 8 : 1482 – 8.
31. Usdin K, Woodford KJ. CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis in vitro. *Nucl Acids Res*, 1995 ; 23 : 4202 – 9.
32. Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, et al. Evidence that Fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Human Molecular Genet*, 2001 ; 10 : 329 – 38.

33. Hussein SM. Fragile X mental retardation and Fragile X chromosomes in the Indonesian population (PhD Thesis). Faculty of Medicine, University of New South Wales, Sidney, 1998.
34. Willemsen R, Oosterwijk JC, Los FJ, et al. A new approach for prenatal diagnosis of Fragile X syndrome. *The Lancet*, 1996 ; 348 : 967 – 8.
35. Tassone F, Hagerman RJ, Taylor AK, Hagerman PJ, A majority of Fragile X males with methylated, full mutation alleles have significant levels of FMR 1 messenger RNA. *J Med Genet*, 2001 ; 38 : 453 – 6.
36. Aschrafi A, Cunningham BA, Edelman GM, Vanderklish PW. The fragile X mental retardation protein and group I metabotropic glutamate receptors regulate levels of mRNA granules in brain. *PNAS*, 2005 ; 102 : 2180 – 5.
37. Sung YJ, Dolzhanskaya N, Nolin SL, Brown T, Currie JR, Denman RB. The Fragile X Mental Retardation Protein. FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003 ; 278 : 15669 – 78.
38. Podznyakova I, Regan L. New insights into Fragile X syndrome relating genotype to phenotype at the molecular level. *The FEBS Journal*, 2005 ; 272 : 872 – 8.
39. Lu R, Wang H, Liang Z, Ku L, O'Donnell WT, Warren ST, Feng Y. The Fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *PANS*, 2004 ; 101 : 15201 – 6.

40. Weiler IJ, Irwin SA, Klintsova AY, Spencer CM, Brazelton AD, Miyashiro K, Comery TA, Patel B, Eberwine J, Greenough WT. Fragile X mental retardation protein is translated near synaps in response to neurotransmitter activation. *Proc natl Acad Sci*, 1997 ; 94 : 5395 - 400.
41. Sutherland, Mulley. Fragile X syndrome and other causes of X-linked mental handicap. In : Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz eds. *Emery and Rimoin's Principle and Practice of Medical Genetics*. 3rd ed. New York. Churchill Livingstone, 1996 ; p1746 -- 66.
42. Jacy P. Fragile X and other heritable fragile sites on human chromosomes. In : Barch MJ, Knutsen T, Spurbeck eds. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*. 3rd ed. Philadelphia. Lippincott-Raven Publishers. 1997.
43. Faradz SMH. Pengantar sitogenetika, genetika molekuler dan alat bantu konseling genetika. UNDIP, 2000.
44. Abbas AK, Lichtman AH. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th ed. Philadelphia. Saunders, 2003 : p 522 – 34.
45. Stites DP, Rodgers RP, Folds JD, Schmitz J. Clinical laboratory methods for detection of antigen and antibodies. In : Stites DP, Terr AI, Parslow TG eds. *Medical Immunology*. 9th ed. Ney Jersey. Prentice Hall, 1997 : p 211 – 53.
46. Budiwiyono I. Prinsip pemeriksaan preparat apus darah tepi. Dalam : *Workshop Hematologi III*. Semarang. Bagian Patologi Klinik FK UNDIP, 1995 : 19 - 26.

47. Bain BJ, Bates I. Basis Haematological Techniques. In : Lewis SM, Bain BJ, Bates I eds. Dacie and Lewis practical Haematology. 9th ed. London. Churchill Livingstone, 2001 : p 25 – 7.
48. Dalimoenthe NZ. Penilaian sediaan hapus darah tepi dan sumsum tulang. Dalam : Kursus Penyegar Pemeriksaan Morfologi Sediaan Hapus Darah Tepi dan Sumsum Tulang. Bandung. Bagian Patologi Klinik FK UNPAD, 2002.
49. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia. Saunders, 2000 : p 129 – 62.
50. Paraskevas F, Foerster J. The lymphatic system. In : Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM eds. Wintrobe's Clinical Hematology. 10th ed. Baltimore. William & Wilkins, 1999 : p 430 – 63.
51. Turgeon ML. Clinical Hematology Theory and Procedure. 2nd ed. Boston. Little, Brown and Company, 1993: p 153 – 66.
52. Willemsen R, Anar B, de Diego OI, et al. Non invasive test for Fragile X syndrome, using hair root analysis. Am J Hum Genet, 1999 ; 65 : 98 – 103.
53. Willemsen R, Oostra BA. FMRP detection assay for the diagnosis of the fragile X syndrome. Am J Med Genet, 2000; 97: 183-8.
54. Madiyono B, Moeslichan S, Sastroasmoro S, Budiman I, Purwanto SH. Dalam : Sastroasmoro S, Ismael S ed. Dasar-dasar Metodologi Penelitian Klinis. Jakarta. Sagung Seto, 2002 : 259 – 86.

55. Pusponegoro HD, Wirya IW, Pudjiadi AH, Bisanto J, Zulkarnain SZ. Uji dianostik. Dalam : Satroasmoro S, Ismael S ed. Dasar-dasar Metologi Penelitian Klinis. Jakarta. Sagung Seto, 2002 : 166 – 185.
56. Willemsen R, Oostra BA, Cobet G, et al. Rapid FMR1 protein analysis of fetal blood : an enhancement of prenatal diagnostics. Human Genet, DOI 10.1007/S004399900127. Published online : 3 August 1999.
57. Greenberg RS, Daniels SR, Flanders WD, Eley JW, Boring JR. Medical epidemiology. 4th ed.. New York, Lange Medical Books/Mc Graw Hill,. 2005 : 92 – 106.