

METODE DRIED BLOOD SPOT (DBS) SEBAGAI SOLUSI SAMPLING DARAH DAERAH TERPENCIL



SRI SWASTHIKAWATI

Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI
Kompleks Cibinong Science Center
Jl. Raya Jakarta Bogor KM 46, Cibinong, Kab. Bogor, Jawa Barat 16911
Tel. 021 – 8754587/ Fax. 021 8754588
Email: swasthika.widodo@gmail.com



Dalam penelitian dan pengujian klinis yang menggunakan sampel darah, pengambilan sampel darah melalui intravena (venipuncture) sejauh ini merupakan metode gold standard yang umum digunakan (Ostler *et al.*, 2014). Namun demikian, teknik sampling tersebut hanya dapat dilakukan oleh tenaga medis terampil sehingga menjadi kendala jika dilakukan di daerah terpencil yang jauh dari fasilitas kesehatan. Sampel darah yang diperoleh melalui venipuncture, selain membutuhkan peralatan yang lebih banyak, seperti syringe, alcohol swab dan tabung vakutainer, juga memerlukan prosedur penyimpanan, transportasi maupun pengiriman yang spesifik. Untuk menjaga kestabilan molekul target dalam sampel, sampel darah harus disimpan di dalam suhu 4°C selama maksimal atau suhu -20°C dan -80°C untuk penyimpanan yang lebih lama, termasuk selama

proses transportasi atau pengiriman. Hal tersebut berdampak pada biaya yang diperlukan dalam proses sampling. Oleh karena itu, metode sampling Dried Blood Spot (DBS) diperkenalkan sebagai alternatif yang menawarkan solusi dari kelemahan metode sampling darah konvensional, venipuncture.

Pengertian, Sejarah dan Penggunaan DBS dalam Paktek Klinis

Dried Blood Spot (DBS) adalah darah (whole blood) yang dikumpulkan pada kertas filter dan dikeringkan. Penggunaan matriks kering sebagai metode sampling darah sebenarnya telah dikenalkan sejak lebih dari satu abad yang lalu oleh Ivar Bang (Lehmann *et al.*, 2013). Teknik tersebut terus berkembang hingga Dr. Robert Guthrie dan Susi berhasil mengembangkan teknik DBS tersebut pada 1963 untuk analisis asam amino fenilalanin untuk

mendeteksi fenilketonuria pada bayi baru lahir (Guthrie and Susi, 1963; Choi, *et al.*, 2014). Keberhasilan tersebut selanjutnya diadaptasi dalam program skrining penyakit kelainan metabolisme pada bayi (newborn screening); diagnosis penyakit; monitoring imunitas populasi pada studi vaksin dan eradikasi virus; serta dalam penelitian-penelitian drug discovery, uji toksikologi-farmakologi hingga analisis genetik terutama pada penelitian yang melibatkan populasi besar di banyak negara lain (Parker and Cubitt, 1999; Choi, *et al.*, 2014).

Di sejumlah negara maju, DBS telah rutin digunakan pada program newborn screening, seperti Perancis yang memulainya sejak 1978, Denmark sejak 1982 (Joo *et al.*, 2013; Guthrie and Susi, 1963), dan Italia melalui Italian Joint Group CNB – CNBBSV (National Committee of Bioethics – National Committee for Biosecurity Biotechnologies

and Life Science) pada 2010 (Lang *et al.*, 2012). Selain itu, DBS juga banyak digunakan pada studi epidemiologi yang menggunakan sampel skala populasi, seperti di Melbourne Collaborative Cohort Study (Giles and English, 2002) dan Breast Cancer Family Registry (John *et al.*, 2004); serta diaplikasikan dalam biobank materi genetik, seperti di Danish National Biobank (Lehmann *et al.*, 2013) dan IARC Biobank (Joo *et al.*, 2013). Di Indonesia sendiri, penggunaan DBS dalam riset masih belum populer. Namun demikian, terdapat satu penelitian epidemiologi di Indonesia yang telah menggunakan teknik DBS, yaitu Indonesian Family Life Survey (IFLS) oleh lembaga SurveyMeter dan Rand Corporation (Herningtyas *et al.*, 2017; <https://surveymeter.org>; <https://www.rand.org/well-being/social-and-behavioral-policy/data/FLS/IFLS.html>).

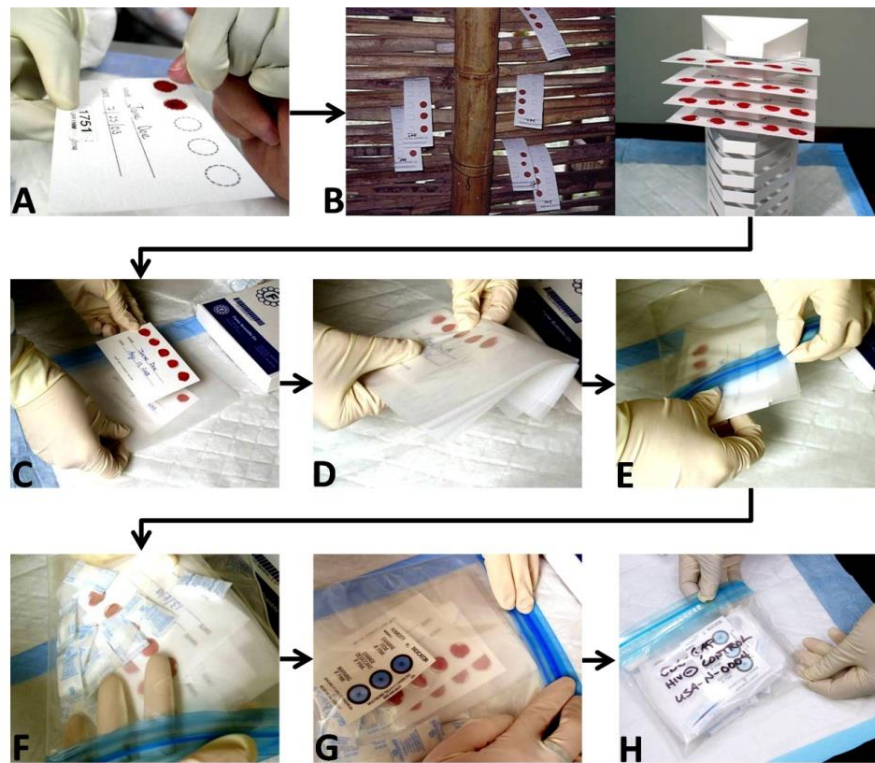
Penelitian telah banyak dilakukan untuk mengembangkan teknik analisis berbasis sampel DBS. Hingga saat ini berbagai macam molekul dapat dideteksi dari sampel DBS, seperti asam nukleat (DNA dan RNA) cytomegalovirus,

herpes simplex virus, virus hepatitis A dan C, serta HIV melalui teknik PCR, q-PCR dan RT-PCR untuk skrining penyakit viral. Selain itu, protein serum seperti hemoglobin terglisosilasi dan antibodi dari beberapa jenis patogen juga dapat dianalisis dari sampel DBS menggunakan teknik ELISA. Sampel DBS juga dapat digunakan untuk analisis molekul lain, seperti vitamin D, asam amino, lipid, hingga narkotik (opiat, kokain, dan amfetamin) (Lehmann *et al.*, 2013). Lebih lanjut, DBS juga mempunyai potensi dalam penelitian genomik, seperti whole-genome amplification, microarray, genotyping SNP (Hollegaard *et al.*, 2011; Hollegaard *et al.*, 2009) dan deteksi mutasi yang berkaitan dengan penyakit genetik seperti kanker (Klotz *et al.*, 2006) dan thalasemia (Karthipan *et al.*, 2011).

Prosedur Sampling DBS

Dalam teknik sampling DBS, sampel darah dikumpulkan dari pembuluh darah perifer dengan cara menusuk permukaan kulit di bagian ujung jari atau tumit kaki menggunakan jarum steril. Selanjutnya darah

yang keluar dari ujung jari tersebut diteteskan di atas kertas filter (Whatmann 903 Protein Saver Card Whatmann, Springfield Mill, UK; Perkin Elmer 226 Spot Saver Card, Perkin Elmer, Waltham, USA) membentuk spot darah, lalu dikeringanginkan selama beberapa jam di suhu ruang. Sampel darah yang telah mengering dapat segera dianalisis atau disimpan dalam plastik kedap udara yang berisi desikan untuk menyempurnakan proses pengeringan dan mengurangi kelembaban (Gambar 1). Jika proses sampling berlangsung di lapangan, sampel DBS yang telah dikemas dalam plastik kedap udara selanjutnya dapat langsung dibawa menuju laboratorium tanpa memerlukan kondisi suhu dingin selama proses transportasi atau dapat dikirimkan melalui pos. Untuk penyimpanan, sampel DBS dapat di simpan di suhu ruang, 4°C, -20°C atau -80°C tergantung pada target molekul yang ingin dideteksi dan jangka waktu penyimpanan (Lehmann *et al.*, 2013).














Gambar 1. Prosedur sampling DBS. Ujung jari diusap dengan kapas alkohol (disinfektan), ditusuk dengan jarum/lanset steril, lalu ditekan perlahan untuk mengeluarkan darah di bagian bekas tusukan. Darah diteteskan di atas kertas filter (jangan sampai ujung jari bersentuhan dengan kertas filter) di bagian tengah lingkaran dan dibiarkan menyebar secara otomatis membentuk spot darah (A). DBS dikeringanginkan pada suhu ruang selama 3-4 jam atau hingga benar-benar kering (B). Sampel DBS yang telah kering ditumpuk dan diberi kertas glisin sebagai pembatas untuk menghindari kontaminasi antarsampel (C). Kertas pembatas dilipat supaya dan dirapikan (D). Dimasukkan ke dalam plastik klip yang kedap udara (E). Diberi desikan untuk mengurangi kelembaban dan mencegah tumbuhnya jamur (F). Diberi indikator kelembaban udara (G). Plastik klip diberi keterangan menggunakan spidol permanen (H) (Sumber : WHO, 2005)

Sebelum dianalisis, spot yang berkualitas bagus (Tabel 1) dilubangi untuk membentuk lingkaran kecil (disc) berdiameter 3 – 5,5 mm (setara dengan 1-4 μ l serum). Disc tersebut lalu dimasukkan ke dalam flat-bottomed microtitre plate dan diekstraksi (dielusi) menggunakan buffer (Parker and Cubitt, 1999). Buffer yang paling umum digunakan dalam proses elusi adalah salin/phosphate

buffer, dan seringkali diberi tambahan larutan deterjen berupa Tween atau Triton, protein carrier, dan chelator agents (EDTA). Selain itu, buffer organik dengan methanol, acetonitril atau etanol juga dapat digunakan dalam proses elusi (Lehmann *et al.*, 2013). Elusi dapat dilakukan di suhu ruang atau 4°C selama beberapa jam hingga overnight dengan atau tanpa shaker (Parker and Cubitt, 1999; Grüner *et*

al., 2015). Hasil elusi selanjutnya dapat dianalisis sesuai dengan molekul target yang ingin dideteksi menggunakan prosedur yang dikembangkan sendiri atau yang telah dikembangkan pada riset-riset sebelumnya. Sejumlah kit komersial khusus untuk analisis sampel DBS juga telah tersedia di pasar sehingga memudahkan peneliti dalam melakukan penelitian yang berbasis DBS.

Tabel 1. Contoh kualitas hasil spot pada sampel DBS (Sumber : Ostler *et al.*, 2014; WHO, 2005)

TIDAK BAGUS	BAGUS
 <p>Keluar dari area spot, masih valid untuk digunakan</p>	
 <p>Spot terlalu kecil</p>	
 <p><i>Overlapping</i></p>	 <p>Sampel darah penderita anemia, valid untuk digunakan</p>
 <p>Terlalu kecil dan <i>overlapping</i></p>	
 <p>Spot tidak kering sebelum dikemas dan dikirim</p>	
 <p>Darah pada spot menggumpal dan bertumpuk</p>	
 <p>Sampel mengalami hemolisis, perubahan warna, atau terkontaminasi</p>	
 <p>Terbentuk cincin serum, yaitu serum terpisah dari sel</p>	

Kelebihan dan Kekurangan DBS

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) melaporkan bahwa metode sampling darah menggunakan kertas filter mempunyai tingkat presisi dan reproduksibilitas yang

sama dengan metode sampling darah standar (Mei *et al.*, 2001). Lebih lanjut, dibandingkan dengan metode konvensional venipuncture, teknik sampling DBS mempunyai sejumlah keunggulan, baik dari segi teknik, keamanan

maupun ekonomi. Dari sudut pandang teknis, prosedur pengumpulan sampel DBS mudah untuk dilakukan dan tidak memerlukan tenaga ahli dalam proses pengambilan darah sehingga dapat mengatasi kendala keterbatasan fasilitas dan

tenaga kesehatan di daerah-daerah terpencil. Prosedur DBS bersifat invasif dan menimbulkan efek rasa sakit yang lebih ringan dibandingkan pengambilan darah melalui intravena. Keunggulan tersebut membuat DBS sangat tepat digunakan pada subjek bayi pada newborn screening, orang tua atau pasien yang rutin menjalani sampling darah seperti pasien kanker (Parker and Cubitt, 1999; Lehmann *et al.*, 2013).

Dari segi keamanan, proses pengeringan pada prosedur sampel DBS dapat mengurangi resiko kontaminasi dan infeksi (biohazard) dari sampel kepada personel yang menangani sampel DBS tersebut. Sejumlah riset menunjukkan bahwa proses pengeringan dapat merusak kapsid atau bagian envelope

beberapa jenis virus, seperti HIV, cytomegalovirus (CMV), virus hepatitis C (HCV), T-lymphotropic virus (HTLV) yang diketahui bersirkulasi dalam serum/plasma darah sehingga virus menjadi inaktif dan mengurangi resiko infeksi/kontaminasi (Resnick *et al.*, 1986).

Prosedur sampling DBS membutuhkan peralatan yang lebih sederhana dibandingkan metode sampling darah konvensional (Gambar 2). Selain itu, berbeda dengan sampel darah segar (whole blood) dalam tube dengan atau tanpa antikoagulan, sampel DBS tidak memerlukan kondisi suhu dingin (dry ice, ice pack, atau nitrogen cair) selama proses transportasi/pengiriman, bahkan sampel DBS dapat dikirmkan melalui pos (Parker and Cubitt, 1999).

Kedua hal tersebut membuat metode DBS lebih efektif dari segi biaya. Ukuran dan bentuk sampel DBS yang dapat ditata bertumpuk dengan ringkas juga merupakan kelebihan sampel DBS dalam hal penyimpanan selama transportasi maupun di fasilitas penyimpanan laboratorium, seperti di dalam kotak di suhu ruang, di lemari pendingin maupun freezer. Keunggulan sampel DBS tersebut sangat tepat jika diaplikasikan dalam studi epidemiologi yang melibatkan populasi besar, terutama di daerah tropis seperti Indonesia. Kendala pada jangkauan wilayah sampling yang luas dan mencakup daerah-daerah terpencil juga dapat teratasi dengan menggunakan teknik sampling DBS.



Gambar 2. Perbandingan peralatan yang dibutuhkan dalam prosedur sampling venipuncture dan DBS (Sumber : WHO, 2005; <https://phlebotomytraininggroup.com/>)

Komposisi sampel DBS merupakan keseluruhan darah (whole blood) tidak hanya berupa serum atau plasma saja, sehingga mungkin terjadi interferensi komponen sel darah lain seperti hemoglobin dan molekul intraseluler pada analisis. Selain itu, proses pengeringan dapat menimbulkan perubahan pada sel-sel darah sehingga uji hematologi sel tidak mungkin dilakukan pada sampel DBS. Protein dalam darah juga dapat terdenaturasi dan mengalami perubahan aktivitas enzimatis selama proses pengeringan tersebut. Kekurangan lain dari sampel DBS adalah volume sampel DBS yang sedikit sehingga dapat mengurangi sensitivitas pengujian dan menjadi kendala dalam pengujian yang dilakukan berulang (Parker and Cubitt, 1999; Lehmann *et al.*, 2013).

Kesimpulan

Metode sampling dried blood spot (DBS) merupakan alternatif dari metode sampling darah konvensional yang menawarkan keunggulan dari segi teknis, keamanan dan ekonomi, serta mempunyai potensi yang besar untuk diaplikasikan dan dikembangkan dalam penelitian skala populasi di daerah tropis dengan banyak wilayah terpencil seperti Indonesia.

Daftar Pustaka

- Choi EH, Lee SK, Ihm C, and Sohn YH. (2014) : Rapid DNA Extraction from Dried Blood Spots on Filter Paper: Potential Applications in Biobanking, *Osong Public Health Res. Perspect.*, 5(6),351-7.
- Giles GG and English DR. (2002) : The Melbourne Collaborative Cohort Study, *IARC Sci. Publ.*, 156, 69–70.
- Grüner N, Stambouli O and Ross RS. (2015) : Dried Blood Spots - Preparing and Processing for Use in Immunoassays and in Molecular Techniques, *J. Vis. Exp.*, 97.
- Guthrie R and Susi A. (1963) : A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants, *Pediatrics*, 32, 338-43.
- Hollegaard MV, Grove J, Grauholm J, Kreiner-Møller E, Bonnelykke K, Norgaard M, Benfield TL, Norgaard-Pedersen B, Mortensen PB, Mors O, *et al.* (2011) : Robustness of genome-wide scanning using archived dried blood spots samples as a DNA source, *BMC Genet.*, 12, 58.
- Hollegaard MV, Grove J, Thorsen P, Norgaard-Pedersen B, and Hougaard DM. (2009) : High-throughput genotyping on archived dried blood spot samples, *Genet. Test Mol. Biomarkers*, 13(2), 173–9.
- John EM, Hopper JL, Beck JC, Knight JA, Neuhausen SL, Senie RT, Ziogas A, Andrulis IL, Anton-Culver H, Boyd N, *et al.* (2004) : The breast cancer family registry: an infrastructure for cooperative multinational, interdisciplinary and translational studies of the genetic epidemiology of breast cancer, *Breast Cancer Res.*, 6(4), 375–89.
- Joo JHE, Wong EM, Baglietto L, Jung CH, Tsimiklis H, Park DJ, Wong NC, English DR, Hopper JL, Severi G, Giles GG, and Southey MC. (2013) : The use of DNA from archival dried blood spots with the Infinium Human Methylation 450 array, *BMC Biotechnology*, 13, 23.
- Karthipan SN, George E, Jameela S, Lim WF, Teh LK, Lee TY, *et al.* (2011) : An assessment of three noncommercial DNA extraction methods from dried blood spots for beta-thalassaemia mutation identification, *Int. J. Lab. Hematol.*, 33, 540–4.
- Klotz J, Bryant P, Wilcox HB, Dillon M, Wolf B, and Fagliano J. (2006) : Population-based retrieval of newborn dried blood spots for researching paediatric cancer

- susceptibility genes, Paediatr. Perinat. Epidemiol., 20, 449–52.
- Lang PO, Govind S, Drame M, *et al.* (2012) : Comparison of manual and automated DNA purification for measuring TREC in dried bloodspot (DBS) samples with qPCR, *J. Immunol Methods*;384(1-2), 118-27.
- Lehmann S, Delaby C, Vialaret J, Ducos J, and Hirtz C. (2013) : Current and future use of “dried blood spot” analyses in clinical chemistry, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 51(10), 1897–1909.
- Mei JV, Alexander JR, Adam BW, and Hannon WH. (2001) : Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens, *J. Nutr.*, 131(5), 1631S-6S.
- Ostler MW, Porter JH and Buxton OM. (2014) : Dried Blood Spot Collection of Health Biomarkers to Maximize Participation in Population Studies, *J. Vis. Exp.*, 83.
- Parker SP and Cubitt WD. (1999) : The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies, *J. Clin. Pathol.*, 52, 633-9.
- Resnick L, Veren K, Salahuddin SZ, Tondreau S, and Markham PD. (1986) : Stability and inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments, *J. Am. Med. Assoc.*, 255, 1887–91.
- WHO (2005) : Module 14 Blood Collection and Handling – Dried Blood Spot (DBS), diakses dari https://www.who.int/diagnostics_laboratory/documents/guidance/pm_module14.pdf pada 10 Juni 2019.