

Prevalensi Polimorfisme Gen CYP2C19 dan Pengaruhnya Dalam Metabolisme Omeprazole Sebagai Prediktor Intoksikasi Obat Pada Etnis Melayu Di Sumatera Selatan

Triwani^{1*}, Lusya Hayati¹, Franz Sinatra Yoga²

¹Bagian Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang

²Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang

*Email: tri_wani@yahoo.co.id

Abstrak

Cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) adalah suatu kompleks enzim yang berperan dalam metabolisme beberapa jenis obat dan merupakan bagian dari super family sitokrom P450. Polimorfisme genetik pada enzim tersebut berhubungan dengan munculnya fenotip metabolisme buruk (*poor metabolizer/PM* dan *intermediate metabolizer/IMs*) yang mempunyai kemampuan yang buruk dalam memetabolisme obat-obatan yang menjadi substratnya. Telah dilakukan analisis genotipe dan fenotipe menggunakan PCR-RFLP dan bioanalisis kadar omeprazole pada 30 orang subjek penelitian dari etnis Melayu yang tinggal di Sumatera Selatan. Marker yang digunakan untuk menilai adanya polimorfisme pada gen CYP2C19 adalah dua situspolimorfik yaitu ekson 5 (CYP2C19*2) dan ekson 4 (CYP2C19*3). Pita-pita DNA berukuran 321 bp untuk ekson 5 dan 271 bp untuk ekson 4 akan dihasilkan setelah amplifikasi DNA dengan metode PCR pada kondisi denaturasi selama 5 menit pada suhu 95°C; dilanjutkan dengan 60 detik pada suhu 95°C, 60 detik pada suhu 53°C dan 60 detik pada suhu 72°C sebanyak 30 siklus; serta polimerisasi akhir selama 5 menit pada 72°C. Selanjutnya dilakukan pemotongan DNA menggunakan enzim restriksi endonuklease *SmaI* (CYP2C19*2) pada suhu 30°C dan *BamHI* (CYP2C19*3) dengan inkubasi pada suhu 37°C selama 3jam. Bioanalisis kadar omeprazole dalam darah dengan LC-MS. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya polimorfisme pada kedua situs akan menghilangkan situs pemotongan enzim *SmaI* dan *BamHI*. Hasil penelitian menunjukkan 46,7% populasi Melayu Sumatera Selatan tergolong sebagai PM yang terdiri atas 13,3% homozigot mutandan 33,4% heterozigot mutan. Tingginya fenotip PM enzim CYP2C19 pada etnis Melayu di Sumatera Selatan diprediksi akan mempengaruhi metabolisme obat-obatan yang menjadi substrat. Akan tetapi, berdasarkan analisa korelasi spearman, nilai korelasi 0,035 dengan $p = 0,875$. Hal ini berarti bahwa antara polimorfisme gen CYP2C19 dan kadar omeprazole dalam darah terdapat korelasi lemah dan tidak bermakna. Hasil penelitian ini memberikan gambaran polimorfisme genetik yang tinggi pasien sindrom dispepsia dari populasi Melayu, yaitu hampir setengah dari subjek penelitian (46,7%). Terdapat korelasi yang lemah dan tidak bermakna antara polimorfisme dan kadar omeprazole.

Kata kunci: Polimorfisme, CYP2C19, etnis Melayu

Abstract

Cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) is an enzyme complex that plays a role in the metabolism of several drugs and is part of the super family of cytochrome P450. Genetic polymorphisms in these enzymes are associated with the emergence of poor metabolic phenotypes (*poor metabolizers / PMs* and *intermediate metabolizers / IMs*) that have a poor ability to metabolize the drugs that become substrates. Genotypes and phenotypes were analyzed using PCR-RFLP and bio-analysis of omeprazole levels in 30 subjects from ethnic Malay living in South Sumatra. Markers used to assess the presence of polymorphisms in the CYP2C19 gene are two polymorphic sites of exon 5 (CYP2C19 * 2) and exon 4 (CYP2C19 * 3). 321 bp DNA bands for exon 5 and 271 bp for exon 4 will be produced after DNA amplification by PCR method under denaturation for 5 min at 95oC; followed by 60 seconds at 95oC, 60sec at 53oC and 60sec at 72oC for 30 cycles; as well as the final polymerization for 5 minutes at 72 ° C. Furthermore, DNA cutting was done using the restriction enzyme endonuclease *SmaI* (CYP2C19 * 2) at 30oC and *BamHI* (CYP2C19 * 3) with incubation at 37oC for 3 hours. Bioanalysis of omeprazole levels in the blood with LC-MS. The results of this study indicate the presence of polymorphisms on both sites will eliminate the enzyme sites *SmaI* and *BamHI*. The results showed that 46.7% of South Sumatran Malay populations were classified as PM consisting of 13.3% homozygous mutandan mutant 33.4% heterozygotes. The high phenotype of PM enzyme CYP2C19 in ethnic Malays in South Sumatra predicted to influence metabolism of drugs become substrates. However, based on spearman correlation analysis, the correlation

value was 0.035 with $p = 0.875$. This means that between the CYP2C19 gene polymorphism and the omeprazole levels in the blood there is a weak and meaningless correlation. The results of this study provide an overview of the high genetic polymorphisms of dyspepsia syndrome patients from the Malay population, ie almost half of the study subjects (46.7%). There is a weak and insignificant correlation between polymorphism and omeprazole levels.

Keywords : Polimorfisme, CYP2C19, etnis Melayu

1. Pendahuluan

Salah satu masalah dalam terapi menggunakan obat yang dihadapi dokter di dalam praktek sehari-hari adalah adanya ketidakseragaman respon yang diperlihatkan penderita terhadap pemberian obat. Obat dengan jenis dan dosis yang sama bila diberikan pada sekelompok penderita dengan jenis dan berat penyakit yang sama biasanya hanya memberikan efek terapi pada sebagian penderita saja. Pada penderita lainnya mungkin tidak memperlihatkan efek sama sekali atau dapat mengalami efek toksik sehingga filosofi “*one-dose-fits-all*” tidak tepat lagi digunakan sebagai dasar terapi.

Sebenarnya banyak faktor yang mempengaruhi respon obat dalam suatu tindakan terapeutik. Faktor-faktor yang akan mempengaruhi profil farmakokinetik dan farmakodinamik suatu obat tentu dapat mempengaruhi respon suatu terapi obat. Kemampuan memetabolisme obat adalah salah satu faktor yang dominan dalam mempengaruhi efikasi dan *safety* suatu pengobatan. Adany avariasi respon ini dapat bersifat individu dan cenderung mengelompok dalam suatu populasi. Dalam suatu populasi, kemampuan memetabolisme obat terbagi dalam dua kelompok yaitu *extensive metabolizer* (EM) yang mampu memetabolisme obat dengan baik dan kelompok *poor metabolizer* (PM) yang lambat atau kehilangan kemampuan metabolisme suatu obat. Dewasa ini diketahui bahwa salah satu factor penting yang menyebabkan terjadinya fenomena tersebut adalah adanya perbedaan kemampuan antar-individu dalam memetabolisme obat yang mengakibatkan terjadinya perbedaan yang besar pada kadar obat pada kondisi *steady state* dalam plasma

antar rindividu (Ingelmam-Sundberget *al*, 2007).

Variasi respon obat yang besar antar-individu merupakan paduan pengaruh factor genetik dan lingkungan (penyakit, polusi, nutrisi, dll). Menurut Nebert (1997), factor genetik mempunyai pengaruh lebih besar dibandingkan factor lingkungan. Faktor genetik ini dapat dikendalikan oleh gen tunggal (monogenik) atau beberapa gen (poligenik). Bila kemampuan untuk memetabolisme obat dikendalikan oleh satu gen maka pada populasi penyebaran akan menghasilkan gambaran bimodus atau trimodus, sedangkan pada poligen akan membentuk distribusi satu modus (unimodus).

Suatu *xenobiotic* bila masuk ke dalam tubuh akan dimetabolisme dan ditransformasi menjadi metabolit yang aktif melalui dua fase. Enzim oksidase utama yang terlibat dalam biotransformasi fase pertama ini adalah *cytochrome P450 (CYP) mixed-function monooxygenase*, suatu super family enzim yang paling banyak dijumpai pada sel hati. Salah satu isoform enzim ini adalah CYP2C19 yang dapat mengoksidasi senyawa obat yang bersifat basa, basa, atau netral¹. Beberapa obat yang secara klinik sering digunakan dimetabolisme oleh enzim ini antara lain proguanil, diazepam, omeprazole, propranololdan beberapa antidepressant (Bertilsson, 1995). Enzim CYP2C19 sejauh ini telah banyak diteliti dan beberapa polimorfisme pada gen yang menyandinya telah pula berhasil diidentifikasi.

Polimorfisme genetic didefinisikan sebagai adanya alel varian yang lebih dari satu persen dalam suatu populasi. Polimorfisme pada suatu gen didapatkan selama perkembangan evolusi melalui berbagai

kejadian seperti mutasi titik (*missense*, *nonsense* atau *frameshift*), konversi gen, delesi dan insersi (Nebert, 1997) sebagai respon genetik terhadap pengaruh lingkungan.

Polimorfismegenetik pada gen *CYP2C19* pada populasi telah menyebabkan ditemukannya dua fenotip berbeda terhadap aktivitas enzim *CYP2C19* yaitu kelompok *extensive metabolizer* (EM) yang normal dan *poor metabolizer* (PM) yang mengalami defek pada aktivitas enzim ini. Fenomena ini pertama kali dilaporkan oleh Kupfer dan Preisig (1984) yang menemukan adanya perbedaan kemampuan metabolisme obat antikonvulsan *S-mephenytoin* dalam suatu populasi. Penelitian berbasis populasi memperlihatkan adanya variasi frekwensi PM yang signifikan antar etnis dan antar ras. Pada populasi kaukasia Eropah menunjukkan frekwensi PM 3-6% (Jurima et al, 1985) sedangkan pada Asia Timur ditemukan 13-23% (de Morais et al, 1995).

Fenotip PM disebabkan adanya mutasi basa tunggal pada gen *CYP2C19* yaitu G681A pada ekson 5 (*CYP2C19*2* atau *CYP2C19_{m1}*) and G636A pada ekson 4 (*CYP2C19*3* atau *CYP2C19_{m2}*) (Daly et al, 1996). Kombinasi kedua alel ini akan menyebabkan munculnya fenotip PM (**2/*2*; **2/*3*; and **3/*3*) (Kaneko et al, 1999). Pada populasi, gambaran ketiga alel tersebut dapat dijumpai (Ibeanu et al, 1998a,b), dengan alel *CYP2C19*2* dan *CYP2C19*3* dijumpai lebih dari 99% pada kelompok PM Asia (Goldstein, 1997).

Penelitian sebelumnya menemukan bahwa semua individu dengan paling tidak memiliki satu alel wild type (*CYP2C19*1*) tergolong sebagai *extensive metabolizer* (EM) (de Morraiss 1998a,b). Selanjutnya diketahui bahwa terdapat sedikit perbedaan kemampuan memetabolisme antara kelompok yang hanya memiliki satu jenis alel *CYP2C19*1* saja (homozygous *extensive metabolizer/hmEMs*: **1/*1*) dan kelompok (*heterozygous extensive metabolizer/htEMs*: **1/*2* and **1/*3*) (Kaneko, 1999) walaupun sama-sama tergolong sebagai EM. Walaupun demikian, pada penelitian ini seleksi subyek

penelitian tidak didasari pertimbangan asal suku yang diteliti.

2. Metode

Sampel penelitian diperoleh dari sukarelawan yang terdiri dari pasien sindroma dispepsia RS Muhammadiyah Palembang yang berasal dari suku-suku Melayu yang ada di Sumatera Selatan. Sampel dikumpulkan setelah dilakukan prosedur *informed consent*.

Pasien diminta meminum 20 mg Omeprazole, kemudian 2.3 jam setelahnya dilakukan pengambilan sample darah. Sample dibagi ke dalam 2 tabung EDTA, tabung EDTA pertama sebanyak 1 ml darah perifer diperuntukkan analisis PCR-RFLP dan tabung EDTA sebanyak 5 ml diperuntukkan untuk analisa kadar omeprazole dengan LC-MS. Darah 5 ml di sentrifugasi dengan 5000 Rpm selama 10 menit. Kemudian ambil supernatannya dan dimasukkan di 3 mikrotube untuk dianalisis untuk dapatkan kadar omeprazole tiap pasien.

Genomic DNA diisolasi dari darah perifer dengan menggunakan *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Deteksi adanya suatu polimorfisme dilakukan dengan metode PCR-RFLP berdasarkan Goldstein and Blaisdell (1996) dengan sedikit modifikasi. Amplifikasi DNA dilakukan dengan sepasang oligonucleotide primer 5'-CAGAGCTTGGCATATTGTATC-3' and 5'-GTAAACACACA ACTAGTCAATG-3' sebagai forward dan reverse primer mengamplifikasi ekson-5 (*CYP2C19_{m1}*). Setelah reaksi amplifikasi PCR, fragmen DNA didigesti dengan enzim restriksi *SmaI* pada suhu 30°C selama 3 jam kemudian dielektroforesis pada agarosa konsentrasi 4%.

Prosedur genotyping untuk identifikasi defek *CYP2C19_{m2}* dilakukan amplifikasi PCR daerah antara intron-3 dan intron-4 menggunakan oligonucleotida spesifik 5'-AAATTGTTTCCAATCATTAGCT-3' dan 5'-ACTTCAGGGCTTGGTCAATA-3' sebagai primer forward dan reverse. Amplikon selanjutnya diinkubasi dengan enzim restriksi

*Bam*HI pada suhu 37°C selama 3 jam dan dianalisis dengan elektroforesis gel.

3. Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini didapatkan distribusi genotip CYP2C19*2 wt/wt : wt/m1 : m1/m1

yaitu 56,7% : 30% : 13,3% dan distribusi frekuensi alel wt : m1 adalah 71,7% : 28,3%. Sedangkan distribusi genotip CYP2C19*3 wt/wt : wt/m1 : m1/m1 yaitu 96,7% : 3,3% : 0% dan distribusi frekuensi alel wt : m1 adalah 78,3% : 1,7%.



Gambar 1. Hasil elektroforesis gen CYP2C19*2 setelah direstriksi menggunakan enzim *Sma*I. Marker = DNA penanda, Genotip m1/m1 pada jalur 4 dan 15. Genotip wt/m1 pada jalur 3 dan 6, dan wt/wt pada jalur 1,2,5,7-13.



Gambar 2. Hasil elektroforesis gen CYP2C19*3 setelah direstriksi menggunakan enzim *Bam*HI. Marker = DNA penanda, Genotip wt/m2 pada jalur 7, dan wt/wt pada jalur 1-6 ,8-13.

Sehingga didapatkan genotype keseluruhan (CYP2C19*2 dan *3) untuk prevalensi homozygous *Extensive metabolizers* (EMs), heterozygous *Intermediate metabolizers* (IMs) dan homozygous *Poor metabolizers* (PMs) masing-masing 53,3%, 33,4 % and 13,3%. Yang artinya, hamper setengah dari jumlah subjek penelitian (46,7%) terdapat polimorfisme gen CYP2C19.

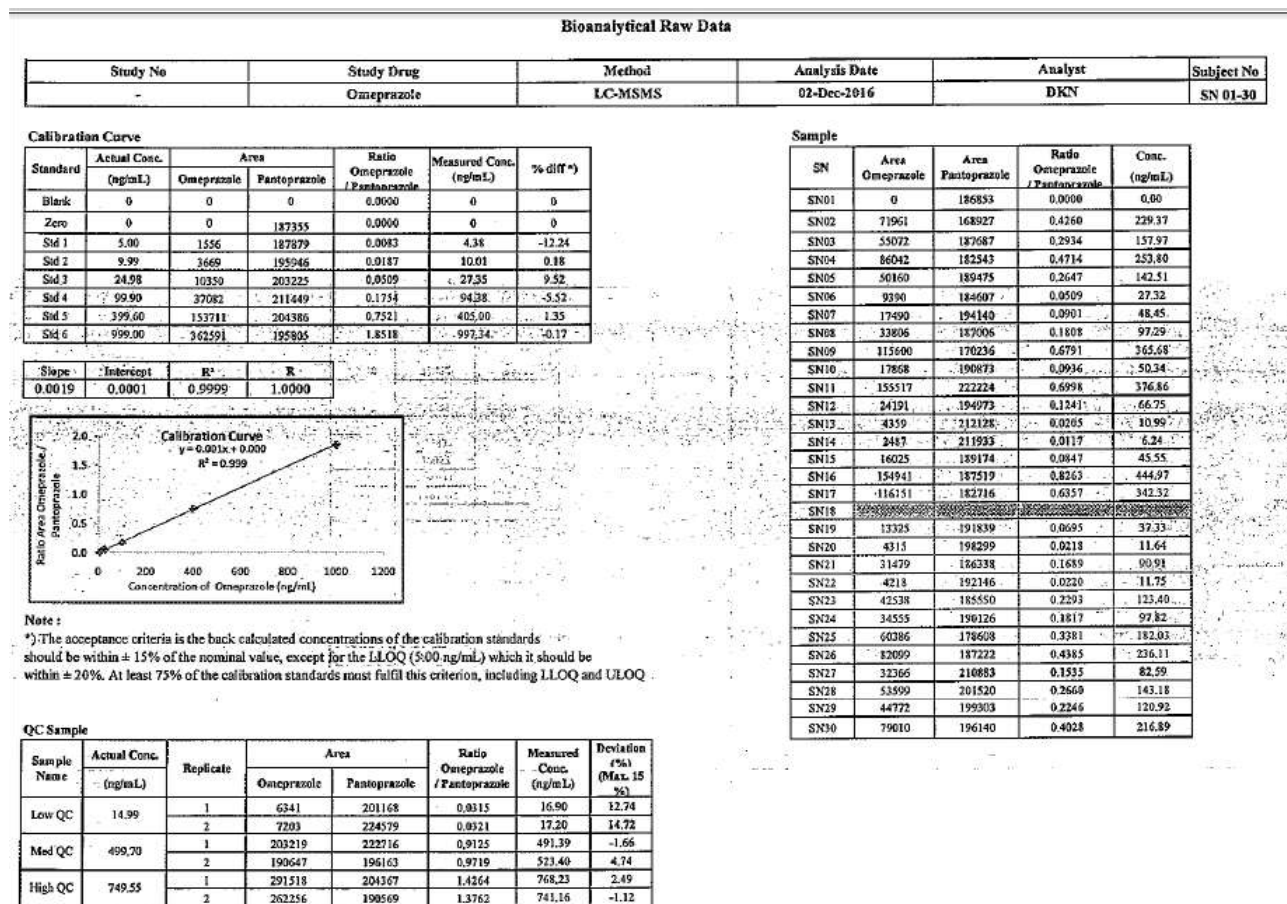
Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda jauh dengan frekwensi PM enzim CYP2C19 pada populasi dan berbeda jauh dengan ras kaukasia (Goldstein et al, 1997). Penelitian

Aljenoobi *et al* 2013 di Saudi Arabia menunjukkan polimorfisme CYP2C19*2 sebesar 8,2% dari populasi penelitian, dan tidak ditemukan polimorfisme CYP2C19*3. Penelitian Chonlapat *et al* 2013 di Thailand menunjukkan Alel m1 (*2) sebesar 27% dan Alel m2 (*3) sebesar 6%. Dengan pasien CYP2C19*2 sebagai IMs sebesar 35,1%, dan 7,32% PMs, pada CYP2C19*3 Ims sebesar 6,85% dan PMs sebesar 1%. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa prevalensi polimorfisme gen CYP2C19*2 lebih besar dari pada CYP2C19*3. Walaupun sejalan dengan

penelitian yang ada mengenai prevalensi yang tinggi dari CYP2C19*2 pada populasi Asia yang diperkirakan 30%, akan tetapi perkiraan 70-80% diantaranya adalah alel PM tidak sejalan dengan penelitian ini. Secara global diyakini genotype CYP2C19 * 2 dan CYP2C19 * 3 alel lebih sering pada orang Asia (30,26% dan 6,89%, masing-masing).

Distribusi frekuensi varian genetic ini bersifat *population-specific* dan hasil penelitian ini hanya spesifik untuk populasi Sumatera Selatan. Hal ini dapat disebabkan oleh lingkungan yang berbeda dan factor

seleksi alam sehingga terjadi adaptasi genetik yang bersifat spesifik untuk populasi tertentu. Hal ini juga diduga akibat dari proses pergeseran genetik di kepulauan pasifik. Mengenai fenotipe metabolisme CYP2C19, metabolisme yang buruk (PMS) lebih sering di antara orang Asia dibandingkan di Eropa. Dengan demikian, dapat disimpulkan salah satu penyebab perbedaan frekuensi pada penelitian ini dengan penelitian terdahulu kemungkinan karena pengaruh perbedaan etnis.



Gambar 3. Bionalisis Omeprazole Pada Subjek Penelitian

Pada penelitian ini, dari hasil HPLC, dimana rerata omeprazole pada penelitian ini antara Ems : Ims : PMs adalah 1,01 ; 1 ; 1,63 (143,26 : 121,89 : 199,06 ng/ml). Berdasarkan nilai tersebut, terdapat pola bahwa kadar omeprazole pada PMs sesuai dengan dugaan fenotipe, lebih besar dibanding Ems dan Ims.

Akan tetapi berdasarkan uji korelasi spearman, nilai korelasi 0,035 dengan p = 0,875. Hal ini berarti bahwa antara polimorfisme gen CYP2C19 dan kadar omeprazole dalam darah terdapat korelasi lemah dan tidak bermakna. Hal ini tidak sejalan dengan penelitian-penelitian sebelumnya, salah satunya Chang *et*

al 2014 yang menyatakan bahwa, terdapat korelasi antara polimorfisme gen CYP2C19 dan kadar omeprazole.

Pada penelitian ini didapatkan beberapa temuan baru, yaitu (1) Frekuensi genotipe CYP2C19 *2 pada pasien sindroma dispepsia dari etnis melayu sumatera selatan lebih tinggi (46,7%) daripada rerata orang Asia (30,26%). (2) Terdapat pasien dengan genotipe PMs, yang seharusnya memiliki kadar omeprazole yang tinggi terdapat satu pasien memiliki kadar yang sangat rendah, yaitu 10,99 ng/ml.

4. Simpulan

Data tentang adanya variasi genotip dan fenotip antar etnik pada enzim yang berperan dalam metabolisme obat sangatlah penting untuk memprediksi manfaat atau efek samping yang dapat terjadi dalam suatu tindakan terapeutik. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa polimorfisme gen CYP2C19 terjadi pada 46,7% subjek penelitian dan terdapat korelasi yang lemah dan tidak bermakna antara polimorfisme dan kadar omeprazole

Oleh karena itu, perlu adanya penelitian lebih lanjut mengapa genotipe polimorfisme CYP2C19 tidak muncul secara fenotipe, terutama pada kasus-kasus pasien dengan PMs tetapi kadar omeprazolanya sangat rendah

Daftar Acuan

1. Sudoyo, Aru W. 2010. *BukuAjarIlmuPenyakitDalamJilid I*. Interna Publishing. Jakarta, Indonesia.
2. Djojodiningrat, Dharmika. 2010. *DispepsiaFungsional*. Dalam :Aru W. Sudoyo, dkk (Editor). *BukuAjarPenyakitDalamJilid I*. Interna Publishing. Jakarta, Indonesia.
3. Talley NJ. 1997. *What Role Does Helicobacter Pylori Play Innon-Ulcer Dyspepsia*. *Gastroenterology*.
4. Tack J. 2004. *Pathophysiology And Treatment Of Functional Dyspepsia*. *Gastroenterology*.
5. Jiande Chen, University Of Texas Medical Branch, Galveston, TX, Genging Song, Veteran Research And Educational Foundation VA Medical Center, Oklahoma City, OK. 2012. *Spinal Cord Electrical Stimulation For Visceral Hypersensitivity In Rats With Functional Dyspepsia*. *North American Neuromodulation Society*; 50.
6. Greydanus MP. 1991. *Neurohormonal Factors In Functional Dyspepsia*. *Gastroenterology*.
7. Cavalho RV, Lorena SL, Almeida JR, Mesquita MA. 2010. *Food Intolerance,DietCompotion, And Eating Patterns In Functional Dyspepsia Patients*. *Dig. Dis. Sci*.
8. Arisawa T. 2012. Tomomitsi T, Fukuyama T *et al*. *Genetic Polymorphism of Pri-microRNA 325, Targeting SLC6A43'-UTR, is Closely Associated with the Risk of Functional Dyspepsia in Japan*. *J Gastroenterol*.
9. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A AND Rodriguez-Antona C. Influence of Cytochrome P450 enzymes polymorphisms on drug therapies pharmacogenetic, pharmadoepigenetic and clinical aspects. *ParmacolTher* 2007, 116:496-526
10. Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist. *Am J Hum Genet* 1997; 60:265-271
11. Katzung B. G., Masters S. B. Trevor A. J. *Basic and Clinical Pharmacology* 12th ed. Lange. Singapore; 2012
12. Lee SJ, Kim WY, Kim H, Shon JH, Lee SS, and Shin JG. Identification of New CYP2C19 Variants Exhibiting Decreased Enzyme Activity in Metabolism of S-Mephenytoin and Omeprazole. *Drug MetabDispos* 2009; 37: 2262-2269
13. Gonzales MH, Romero EM, Peregrina AA, et al. CYP2C19- and CYP3A4-Dependent Omeprazole Metabolism in West Mexicans. *J ClinPharmacol* 2003; 43: 1211-1215

14. Sundberg MI. Pharmacogenetics of Cytochrome P450 and Its Applications In Drug Therapy: The Past, Present, dan Future. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2004; Vol .25: 4
15. Daly AK, Brockmoller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzales FJ, et al. Nomenclature for human CYP2D6. *Pharmacogenetics* 1996; 6:193-201
16. de Morais SMF, Goldstein JA, Xie HG, Huang SL, Lu YQ, Xia H, et al. Genetic analysis of S-mephenytoin polymorphism in a Chinese population. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58:404-411
17. Dai ZL, Chen H, Wu XY. Relationship between cytochrome P450 2C19*17 genotype distribution platelet aggregation and bleeding risk in patients with blood stasis syndrome of coronary artery disease treated with clopidogrel. *J Integr Med* 2012; 10 : 6
18. Kaneko A, Bergqvist Y, Taleo GKaneko O, Kobayakawa T, Ishizaki T, et al. Proguanil disposition and toxicity in malaria patients from Vanuatu with high frequencies of CYP2C19 mutations. *Pharmacogenetics* 1999; 9:317-326.
19. Ibeanu GC, Blaisdell J, Ghanayem BI, Beyeler C, Benhamou S, Bouchardy C, et al. An additional defective allele, CYP2C19*5, contributes to the S-mephenytoin poor metabolizer phenotype in Caucasians. *Pharmacogenetics* 1998a; 8:129-135
20. Ibeanu GC, Goldstein JA, Meyer U, Benhamou S, Bouchardy C, Dayer P, et al. Identification of new human CYP2C19 alleles (CYP2C19*6, CYP2C19*2B) in a Caucasians poor metabolizer of S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998b; 286:1490-1495
21. Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, de Morais SM, Bell D, Krahn PM and Evan DA. Frequencies of defective CYP2C19 alleles respnsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American Black Population. *Pharmacogenetics* 1997; 8:59-64.