

# Analisis Polimorfisme Gen Reseptor Bradykinin B2 pada Pasien Hipertensi di Rumah Sakit Dr. Saiful, Anwar Malang

Johan Aloysius <sup>1)\*</sup>, Widodo <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

Johan Aloysius: aloysius.johan@gmail.com

## ABSTRAK

Hipertensi masih menjadi masalah kesehatan utama di dunia. Ketika volume darah rendah, sel-sel juxtaglomerular pada ginjal mengaktifkan prorenin dan mengeluarkan renin ke dalam sirkulasi darah. Plasma renin mengkonversi angiotensinogen yang dirilis oleh hati menjadi Angiotensin I, yang kemudian diubah menjadi Angiotensin II oleh enzim *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE) yang terdapat di endothelium pembuluh paru. Angiotensin II menyebabkan pembuluh darah menyempit, sehingga tekanan darah meningkat. ACEi bekerja menghambat terbentuknya Angiotensin I menjadi Angiotensin II, dan mengaktifkan kembali Bradykinin (BK), yang menyebabkan pembuluh darah melebar, sehingga tekanan darah menurun. Namun, pemberian ACEi secara berkala menyebabkan akumulasi jumlah BK di pembuluh paru yang menyebabkan terjadinya inflamasi (batuk) pada sebagian orang yang diduga dimediasi oleh gen reseptor Bradykinin B2 (BK2R). Subyek penelitian berjumlah 11 pasien, DNA diekstraksi dari sel darah putih (leukosit) sebanyak 200 µL dari volume darah total dengan menggunakan QIAamp Mini kit (QiaGen). Gen BK2R diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan primer F (5-GCAGAGCTCAGCTGGAGGCG-3), dan R (5-CCTCCTCGGAGCCCAGAAG-3). Diidentifikasi dengan metode *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP). Hasil penelitian menunjukkan 3 genotipe berbeda yaitu CC, CT, dan TT.

Kata Kunci: ACE inhibitors, Batuk, B2 Receptor, SSCP

## ABSTRACT

Hypertension is a major health problem in the world. When blood volume is low, juxtaglomerular cells in the kidneys secrete renin and prorenin activates the blood circulation. Plasma renin converts angiotensinogen released by the liver into angiotensin I, which is then converted to angiotensin II by the enzyme angiotensin converting enzyme (ACE) located in the pulmonary vascular endothelium. Angiotensin II causes blood vessels to constrict, resulting in increased blood pressure. ACEi inhibit the formation of angiotensin I into angiotensin II, and activate Bradykinin (BK), which causes blood vessels to dilate, thereby reducing blood pressure. However, administration of ACEi periodically cause the accumulation of BK in pulmonary vessels that cause inflammation (cough) in some people who suspected mediated by Bradykinin B2 receptor (BK2R) gene. Total of the subjects in this study is 11 subjects, DNA extracted from white blood cells (leukocytes) as much as 200 mL from whole blood by using the QIAamp kit (Qiagen). Gene BK2R in humans amplified by the method of *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method using the following primers F (5-GCAGAGCTCAGCTGGAGGCG-3), and R (5-CCTCCTCGGAGCCCAGAAG-3) and identified by the method of *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP). Results of this study shows three different genotypes there are CC, CT, and TT.

Keywords : ACE inhibitors, B2 Receptor, Cough, SSCP

## PENDAHULUAN

*Angiotensin Converting Enzyme inhibitors* (ACEi) telah banyak digunakan dalam terapi untuk hipertensi dan penyakit jantung secara luas, dan beberapa uji klinis telah menunjukkan bahwa ACEi mampu mengurangi mortalitas dan morbiditas pada pasien dengan gagal jantung [1]. ACEi menghambat terbentuknya Angiotensin I menjadi Angiotensin II, yang berperan sebagai Vasokonstriktor dalam meningkatkan tekanan darah [2], dan mengaktifkan kembali peran BK sebagai Vasodilator, sehingga tekanan darah menurun. Namun, ACEi juga memiliki efek samping yaitu batuk kering [3].

Bradykinin (BK) adalah neuropeptida alami (protein plasma), yang merupakan kinin aktif secara farmakologi, berperan dalam kardioprotektif atau agen proinflamasi. Didalam tubuh, BK berperan sebagai Vasodilator yang menyebabkan pembuluh darah melebar, sehingga tekanan darah menurun. Terdapat dua jenis reseptor BK, yaitu B1 dan B2. Reseptor B1 berperan penting dalam peradangan dan hiperalgesia, aktivasi dan akumulasi sel darah putih, dan mengendalikan tekanan darah. Reseptor B2 berperan dalam penyempitan batang tenggorokan, regulasi aliran darah lokal, hipotensi, reaksi inflamasi akut, nyeri, dan hiperalgesia [4].

Efek samping batuk dari penggunaan ACEi ini bervariasi dari 0.7% sampai dengan 53% di seluruh dunia dan dilaporkan lebih tinggi pada populasi Asia dibandingkan populasi Kaukasia [5]. Polimorfisme gen reseptor Bradykinin B2 (BK2R) diduga memiliki hubungan yang signifikan dengan efek samping batuk pada pasien hipertensi dengan terapi ACEi [6].

Hingga saat ini, masih belum ada data di Indonesia mengenai polimorfisme gen BK2R ini. Oleh karena itu penelitian ini diadakan untuk meneliti distribusi polimorfisme dari gen BK2R dengan subyek pasien di Rumah Sakit dr Saiful Anwar (RSSA), Malang.

## METODE PENELITIAN

**Populasi Penelitian.** Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2013 – April 2014. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Jurusan Biologi, Universitas Brawijaya, Malang. Seluruh prosedur pengambilan

darah dan pengujian yang dilakukan pada penelitian ini sudah disetujui oleh Komisi Etik dari RSSA. Populasi dalam penelitian ini adalah pasien hipertensi primer dengan terapi ACEi yang datang ke Poliklinik Jantung RSSA, Malang dan masuk dalam kriteria inklusi. Kriteria Inklusi pada penelitian ini sebagai berikut: pasien hipertensi yang telah menggunakan terapi ACEi setidaknya selama 8 minggu. Setelah 8 minggu pasca terapi ACEi, subyek diberi kuisioner untuk mengetahui efek samping batuk yang terjadi. Teknik *sampling* yang digunakan adalah *random sampling*. Jumlah subyek hipertensi pada penelitian ini adalah 11 subyek.

### Amplifikasi Daerah Promotor gen BK2R.

DNA diekstraksi dari sel darah putih (leukosit) sebanyak 200  $\mu$ L dari volume darah total dengan menggunakan QIAamp kit [7]. Primer untuk amplifikasi *polymerase chain reaction* (PCR) pada penelitian ini adalah sebagai berikut F (5-GCAGAGCTCAGCTGGAGGCG-3), dan R (5-CCTCCTCGGAGCCCAGAAG-3), yang terletak di daerah promotor [8]. Total volume reaksi adalah 20  $\mu$ L dalam campuran terkandung 8  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ L PCR *mix* (Qiagen kit) dengan konsentrasi tiap primer 10 pmol, 1  $\mu$ L primer (0.5  $\mu$ L *forward* dan 0.5  $\mu$ L *reverse*), dan 1  $\mu$ L DNA murni. Kondisi siklus PCR sebagai berikut pre denaturasi 95°C selama 5 menit, denaturasi 95°C selama 1 menit, annealing 63°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 1 menit, dan post-ekstensi 72°C selama 10 menit, untuk 35 siklus.

### Deteksi Polimorfisme Promotor Gen

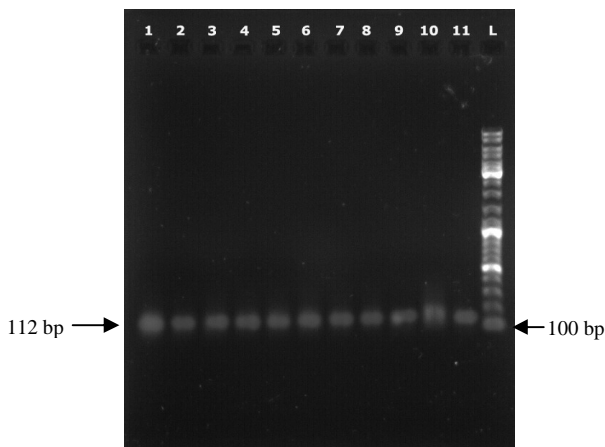
**BK2R.** Produk PCR di elektroforesis dengan metode *single strand conformation polymorphism* (SSCP). Prosedur SSCP dilaksanakan dengan langkah sebagai berikut: 5  $\mu$ L aliquot dari produk PCR diencerkan dengan 5  $\mu$ L formamide, didenaturasi pada 95°C selama 10 menit, dan *dirunning* pada gel poliakrilamid 18.5% dengan komposisi gel sebagai berikut: ddH<sub>2</sub>O 1 ml, 10X TBE 1ml, 80% gliserol 1ml, 30% poliakrilamid 5 ml, APS 100  $\mu$ L, dan TEMED 5  $\mu$ L. Elektroforesis dilakukan di 2X TBE *buffer* pada suhu ruang dengan tegangan 150 V selama  $\pm$  210 menit, dan pewarnaan gel yang digunakan adalah *silver-staining* [9]. Hasil SSCP dianalisis secara deskriptif.

### Identifikasi Polimorfisme Gen BK2R.

Untuk menginterpretasi pita-pita yang muncul pada gel hasil SSCP dan mengetahui titik mutasi yang terjadi pada fragmen DNA maka dilakukan analisa *DNA Sequencing*. Produk PCR yang menunjukkan pita-pita berbeda pada SSCP dikirim beserta primer F, sebanyak 20 µL tiap *tube*, ke PT Genetika Science Indonesia untuk kemudian disekuensing di 1st BASE, Malaysia.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

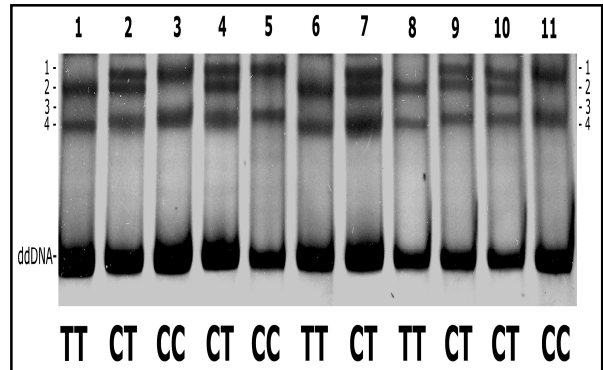
**Amplifikasi Gen BK2R.** Pasangan primer yang telah didesain sesuai dengan daerah promotornya dapat mengamplifikasi secara spesifik Gen BK2R pada pasien hipertensi (Gambar 1.) dengan panjang pasangan basa (bp) sekitar 112 bp. Hasil yang didapatkan sama halnya dengan penelitian di Jepang [6].



Gambar 1. Amplifikasi Gen BK2R pasien hipertensi pada gel agarosa 1,5%. No. 1-2: subyek tidak batuk, No. 3-11: subyek batuk. L: DNA Ladder. Hasil amplifikasi Gen BK2R berada pada 112 panjang basa.

### Deteksi Polimorfisme dari Gen BK2R.

Terdapat polimorfisme pada Gen BK2R dengan adanya tiga genotipe yang berbeda yaitu: CC, TT, dan CT (Gambar 2.). Menurut penelitian serupa pada populasi Jepang [6], pita pertama dan ketiga dari atas adalah *cytosine*. Pita kedua dan keempat dari atas adalah *thymine*.

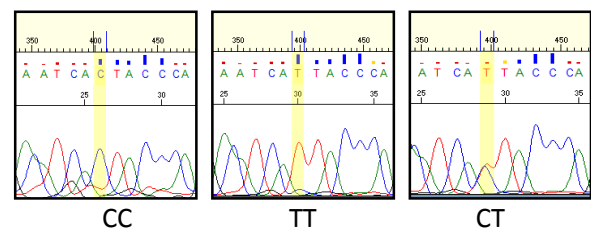


Gambar 2. SSCP Gen BK2R pada pasien hipertensi dalam gel poliakrilamid 18,5%. No. 1-10: subyek batuk. Nomor 11: subyek tidak batuk. ddDNA mengindikasikan *double-stranded* DNA.

Dasar metode analisis SSCP adalah bahwa perubahan yang terjadi pada nukleotida meskipun terjadi hanya pada satu basa, akan mempengaruhi bentuk (*conformation*) dari fragmen DNA pada kondisi untai tunggal. Namun, dalam metode ini juga terdapat, yaitu kurangnya landasan teori untuk mendukung terjadinya mutasi yang dideteksi, kesulitan interpretasi pita-pita DNA yang muncul pada gel akrilamid, tidak dapat memberikan informasi yang jelas terhadap posisi mutasi yang terjadi pada fragmen DNA, dan pola migrasi SSCP tidak dapat dikonversi atau dinotasikan menjadi alel yang definitif sampai posisi mutasinya dapat ditemukan [10]. Untuk memastikan dan mengetahui basa mana yang berubah pada metode SSCP maka dilakukan metode *DNA sequencing*.

### Identifikasi Polimorfisme Gen BK2R.

Hasil DNA sekuensing dianalisis dengan menggunakan *Sequence Scanner* dan *BioEdit*, untuk mengetahui letak daerah promoter dan perubahan basa yang terjadi pada subyek penelitian.



Gambar 3. Promoter -58 T/C Gen BK2R pada pasien hipertensi dengan *Sequence Scanner*.

*Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) pada daerah promoter Gen BK2R pada manusia terletak dititik -58 T/C (Gambar 3). Hasil yang didapatkan

sama halnya dengan penelitian di Jepang [6] dan Korea Selatan [8].

Populasi yang digunakan pada penelitian ini jumlahnya terbatas, sehingga diharapkan kedepannya untuk menggunakan jumlah populasi yang lebih banyak lagi. Penelitian ini diduga adanya keterkaitan genotipe pasien hipertensi yang menjalani terapi ACEi dengan efek samping batuk.

### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dari 11 subyek penelitian, diperoleh tiga genotipe pada Gen BK2R, yaitu CC, CT, dan TT, yang daerah promoternya terletak pada titik -58T/C.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh Tim Kardiovaskular dan Hipertensi Universitas Brawijaya dan didanai oleh Dokumen Pelaksanaan Anggaran Rumah Sakit dr Saiful Anwar (RSSA), Malang.

### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PT, Kokkonen JO (2000) Inactivation of Bradykinin by Angiotensin-Converting Enzyme and by Carboxypeptidase N in human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: 1069-1074.
- [2] Sweitzer, Nancy K. 2003. What Is an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor? *Journal of The American Heart Association. Circulation*.
- [3] Norman MK and Burton DR (2000) Major Side Effects of ACE Inhibitors. *Diabetes Care* 14: 34-39.
- [4] Yousef, G.M. and Diamandis E.P. 2007. The New Human Tissue Kallikrein Gene Family: Structure, Function and Association to Disease. *Endocri Rev* 22: 184-204.
- [5] Zintzaras E, Raman G, Kitsios G, Lau J. 2008. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphic variant as a marker of coronary artery disease: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1077-1089.
- [6] Mukae, S., Aoki, S., Itoh, S., Iwata, T., Ueda, H., and Katagiri, T. 2000. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Related Cough Receptor Gene Polymorphism Is Associated With Bradykinin B2 Receptor. *Hypertension*. 36:127-131.
- [7] Qiagen. 2012. DNA Mini and Blood Mini Handbook. Page:26-28. <http://www.qiagen.com/> Diakses tanggal 15 November 2013.
- [8] Woo, S.W., Bang, S., Chung, M.W., Jin, S.K., Kim, Y.S., Lee, S.H. 2009. Lack of association between ACE and bradykinin B2 receptor gene polymorphisms and ACE inhibitor-induced coughing in hypertensive Koreans. *Blackwell Publishing Ltd, Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 34, 561–567.
- [9] Benbouza, H., Jacquemin, J.M., Baudoin, J.P., Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2006 10 (2), 77 – 81.
- [10] Zhu, X. Niu, N., Liu, Y., Du, Te., Chen, D., Wang, X., Gu, H.G. 2006. Improvement of the sensitivity and resolution of PCR-SSCP analysis with optimized primer concentrations in PCR products. *Journal of Genetics*, Vol. 85, No. 3.