

VARIASI GEN METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE PADA PREEKLAMPSIA; SEBUAH STUDI PENDAHULUAN PADA POPULASI JAMBI

Citra Maharani¹, Anggelia Puspasari¹, Herlambang Herlambang^{2,3}

¹Departemen Biologi dan Biokimia, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Jambi

²Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Jambi

³Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Jambi

Email: citra_maharani@unja.ac.id

ABSTRACT

Background: Pre-eclampsia is a major cause of maternal and neonatal mortality and morbidity. The pathogenesis mechanism of pre-eclampsia involves the interaction of genetic and environmental factors. Genetic variation in the gene MTHFR C677T (C> T transition) alter activity of MTHFR enzyme and predictrisk for pre-eclampsia but with conflicting results in worldwide population. This study aimed to investigate the association between gene variation of MTHFR C677T with pre- eclampsia in Jambi malay population.

Method: This study was a case-control design. We compared the two subject groups; 30 pregnant women with pre-eclampsia and 30 normal pregnant women. Pre-eclampsia was diagnosed by elevated blood pressure (systolic bloodpressure ≥ 140 mmHg or diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg) after 20 weeks of gestation. All samples were ethnic malay living in Jambi. The two groups were matched by age, gravida and parity. The Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction was used for genotyping.

Result and Conclusion: Association between the gene variation of MTHFR C667T and preeclampsia was assessed using bivariate analysis with $p < 0,05$. Statistical analysis of the additive model showed that the frequency of TT genotype in thepre-eclamptic group was higher than normal pregnant women but did not show a significant difference (OR = 0,833; 95% CI = 0,170 – 4,088; $p = 0,568$). Our study resultsuggest that the MTHFR C677T gene variation is not a risk factor for pre-eclampsia in theJambi malay population.

Keywords: gene variation, Methylenetetrahydrofolate Reductase gene, MTHFR C677T, preeclampsia

ABSTRAK

Pendahuluan: Mekanisme patogenesis preeklampsia melibatkan interaksi faktorgenetik dan lingkungan. Variasi genetik pada gen *Methylenetetrahydrofolate Reductase* (MTHFR) C677T (C>T transisi) menyebabkan penurunan aktivitasenzim MTHFR yang berpengaruh pada peningkatan homosistein dan berkaitan dengan kejadian preeklampsia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui asosiasi antara variasi gen MTHFR C667T dengan preeklampsia pada populasi melayu Jambi.

Metode: Penelitian ini menggunakan rancangan kasus-kontrol. Kamimembandingkan dua subyek grup; 30 wanita hamil dengan preeklampsia dan 30 wanita hamil normal. Diagnosis preeklampsia ditentukan dengan adanya peningkatan tekanan darah (tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg atau tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg) setelah 20 minggu kehamilan. Seluruh sampel merupakan etnis melayu yang berdomisili di provinsi Jambi. Kedua grup telah dicocokkan berdasarkan usia ibu, gravida dan paritas. Pemeriksaan genotyping menggunakan metode *Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction*.

Hasil: Asosiasiantara variasi gen MTHFR C677T dengan preeklampsia dinilai menggunakan analisis bivariat dengan $p < 0,05$. Analisis statistik model additive menunjukkan frekuensi genotype TT pada kelompok hamil dengan preeklampsia lebih tinggi dibandingkan wanita hamil normal namun tidak menunjukkan perbedaan bermakna (OR=0,833; 95% CI=0,170 – 4,088; $p=0,568$).

Kesimpulan: Hasil penelitian memberikan kesan variasi gen MTHFR C677T bukan sebagai faktor risiko terhadap kejadian preeklampsia pada populasi melayu Jambi.

Kata kunci: variasi genetik, gen *Methylenetetrahydrofolate Reductase*, MTHFR C677T, preeklampsia

PENDAHULUAN

Preeklampsia merupakan suatu penyulit kehamilan yang terjadi pada kehamilan diatas 20 minggu. Preeklampsia merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada ibu dan janin.^{1,2} Kejadian preeklampsia melibatkan interaksi faktor lingkungan dan genetik.³ Perangenetik sebagai faktor risiko terjadinya preeklampsia salah satunya dipengaruhi oleh variasi genetik *Methylenetetrahydrofolate Reductase* (MTHFR). Gen MTHFR pada manusia berada pada kromosom 1 p36.3. Salah satu variasi gen MTHFR yaitu C667T. Pada variasi genetik C677T terjadi transisi Sistein (C) menjadi Timin (T) pada exon 4 menyebabkan peningkatan homosistein darah.^{3,4}

Peningkatan homosistein dalam darah dapat memicu terjadinya stres oksidatif dan menyebabkan disfungsi endotel pada preeklampsia. Stres oksidatif yang diinduksi oleh hiperhomosistein mengaktifasi *matrix metallo-proteinases* (MMPs) vaskular sehingga terjadi kerusakan matriks ekstraselular dan peningkatan deposisi kolagen. Kondisi ini menyebabkan terjadinya fibrosis vaskular dan menginduksi terjadinya hipertensi. Hiperhomosistein juga menyebabkan aktivasi faktor koagulasi V sehingga memicu terjadinya pembekuan darah.^{5,6}

Penelitian terdahulu melaporkan bahwa bahwa ibu hamil dengan preeklampsia memiliki kadar homosistein yang lebih tinggi dibandingkan ibu hamil tanpa preeklampsia.⁷ Beberapa studi epidemiologi telah mengkaji hubungan antara variasi gen MTHFR C667T dengan kejadian preeklampsia pada berbagai populasi di dunia dan didapatkan nilai *odds ratio* yang bervariasi.^{4,8,9} Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui asosiasi asosiasi antara

variasi gen MTHFR C667T dengan preeklampsia pada populasi melayu Jambi.

METODE

Rancangan dan subyek penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan observasional kasus kontrol. Sampel pada penelitian ini adalah ibu hamil etnis melayu yang melakukan pemeriksaan kehamilan (*antenatal care*) dan persalinan di RS wilayah Kota Jambi. Sampel penelitian terbagi menjadi kelompok kasus yang terdiri dari 30 orang ibu hamil dengan preeklampsia dan kelompok kontrol terdiri dari 30 orang ibu hamil tanpa preeklampsia. Diagnosis preeklampsia ditentukan dengan adanya peningkatan tekanan darah (tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg atau tekanan darah diastolik ≥ 90 mmHg) setelah 20 minggu kehamilan. Seluruh sampel penelitian bersedia menjadi subyek penelitian dengan menandatangani lembar *informed consent* dan telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian. Kriteria inklusi sampel penelitian yaitu janin tunggal, anak lahir hidup dan mempunyai data obstetrik lengkap. Kriteria eksklusi yaitu kehamilan ganda, memiliki riwayat hipertensi sebelumnya, diabetes mellitus, kelainan ginjal dan penyakit infeksi pada ibu dan janin. Penelitian ini telah lolos kaji etik dari Komisi Etik FKIK UNJA.

Genotyping variasi genetik

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan sampel darah buffy coat dengan metode adsorpsi silika menggunakan kit ekstraksi DNA FavorPrep™ (Favorgen). Amplifikasi DNA dan identifikasi variasi gen MTHFR C677T dilakukan dengan metode *Amplification Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction* (ARMS-PCR).

Primer yang digunakan yaitu *forward inner primer* (alel T) AAGGAGAAGGTGTCT-GCGGGCGT; *reverse inner primer* (alel C) CAAAGAAAAGCTGCGTGATGATGAAATAG G; *forward outer primer* CTGAG-AGTCATCTCTGGGGTCAGAAGCA; dan *reverse outer primer* GAAGAACTCAGCGA-ACTCAGCACTCCAC. Siklus PCR yaitu 95°C selama 7 menit untuk *initial denaturation*, 56°C selama 1 menit untuk proses *annealing* dan 72°C selama 1 menit untuk proses *extension*. Produk PCR divisualisasikan dengan elektroforesis menggunakan agarose 2%. Produk PCR yang dihasilkan untuk alel T yaitu 246 bp, alel C yaitu 314 bp dan produk diantara dua primer terluar yaitu 507 bp. Genotip *wildtype* CC akan menghasilkan 2 fragmen DNA dengan panjang 314 dan 507 bp. Produk

PCR berupa fragmen DNA dengan panjang 246, 314 dan 507 bp untuk heterozigot CT. Homozigot TT menghasilkan 2 fragmen DNA dengan panjang 246 dan 507 bp.

Analisis statistik

Kolmogorov-Smirnov *test* digunakan untuk menguji normalitas data. Data terdistribusi normal dianalisis menggunakan *independent t-test* dan data disajikan dalam bentuk *mean* (\pm SD). Data terdistribusi tidak normal dianalisis menggunakan Mann-Whitney *test* dan sajian data berupa median (min-maks). Asosiasi antara variasi gen MTHFR C677T dengan preeklampsia dianalisis menggunakan analisis bivariat dengan Pearson Chi - square *test* dan Fisher Exact *test*. Nilai signifikansi yaitu $p < 0,05$.

HASIL

Karakteristik dasar subyek

Usia ibu pada kedua kelompok tidak menunjukkan perbedaan bermakna. Frekuensi usia gestasi <37 minggu pada kelompok preeklampsia lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol dan menunjukkan perbedaan

bermakna secara statistik ($p = 0,012$). Kelompok preeklampsia memiliki tekanan darah sistolik dan diastolik lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,001$). Tidak terdapat perbedaan bermakna gravida dan paritas pada kedua kelompok (Tabel 1).

Tabel 1. Karakteristik dasar subyek penelitian

Karakteristik	Preeklampsia (n=30)	Kontrol (n=30)	Nilai p
Usia ibu (tahun)	29,28 ($\pm 6,65$)	29,03 ($\pm 6,17$)	0,881*
Usia gestasi			
< 37 minggu	14 (46,7%)	5 (16,7%)	0,012[#]
\geq 37 minggu	16 (53,3%)	25 (83,3%)	
Tekanan darah sistolik (mmHg)	170 (150 – 210)	110 (100 – 130)	<0,001**
Tekanan darah diastolik (mmHg)	100 (80 – 150)	70 (60 – 80)	<0,001**
Gravida			
Primigravida	13 (43,3%)	10 (33,3%)	0,426 [#]
Multigravida	17 (56,7%)	20 (66,7%)	
Paritas			
Nullipara	14 (46,7%)	11 (36,7%)	0,432 [#]
Multipara	16 (53,3%)	19 (63,3%)	

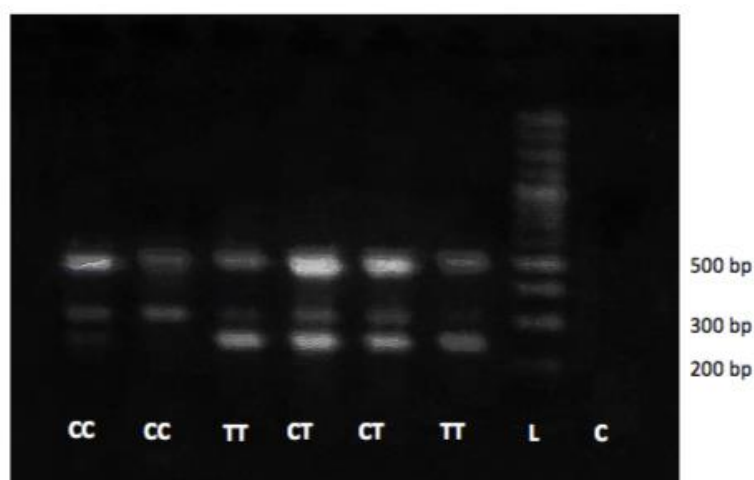
*uji t tidak berpasangan, data disajikan dalam mean (\pm SD); **uji Mann-Whitney (non parametrik), data disajikan dalam median (min-max); [#]uji Chi-square; nilai p signifikan <0,05

Genotyping

Identifikasi variasi gen MTHFR C677T menggunakan metode ARMS-PCR divisualisasi menggunakan elektroforesis dengan agarose 2%. Produk PCR variasi gen MTHFR tampak seperti pada gambar 1.

Distribusi genotip

Nilai signifikansi dari Hardy Weinberg Equilibrium (HWE) penelitian ini seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2 yaitu 0,59 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa distribusi genotip gen MTHFR C677T pada populasi penelitian ini memenuhi HWE.



Gambar 1. Genotyping variasi gen MTHFR C677T dengan metode ARMS-PCR. Genotip CC (homozigot wildtype) tampak sebagai fragmen DNA 507 dan 314 bp; genotip CT menghasilkan fragmen DNA 507, 314 dan 246 bp; genotip TT tampak sebagai fragmen DNA 507 dan 246 bp; L merupakan ladder dan C merupakan kontrol.

Tabel 2. Kesetimbangan Hardy-Weinberg

Genotip	Frekuensi Observasi	Frekuensi Harapan	χ^2 (df)	Nilai p
CC	20	21	0,29	0,59
CT	31	29		
TT	9	10		

Nilai p signifikan < 0,05

Analisis statistik variasi genetik dengan preeklampsia

Analisis bivariat variasi gen MTHFR C677T menunjukkan distribusi genotip CC sebesar 40%, CT sebesar 43,3% dan TT sebesar 16,7% pada kelompok preeklampsia. Genotip TT merupakan genotip risiko pada

penelitian ini. Model aditif seperti yang ditunjukkan dalam Tabel 3 menunjukkan genotip TT tidak menunjukkan risiko terhadap kejadian preeklampsia (OR=0,833; 95% CI=0,170 – 4,088; $p = 0,568$), begitu pula pada model dominan (OR=0,545; 95% CI=0,183 – 1,623; $p = 0,273$). Pada model resesif, genotip

TT memiliki risiko terhadap kejadian preeklampsia namun tidak bermakna secara

statistik (OR=1,300; 95% CI=0,313- 5,404; $p=0,500$).

Tabel 3. Analisis bivariat variasi gen MTHFR C677T dan preeklampsia

Genotip/Alel	Preeklampsian (%)	Kontroln (%)	Nilai p [#]	OR (95% CI)
Genotip				
Model aditif				
CC	12 (40)	8 (26,7)	ref	
CT	13 (43,3)	18 (60)	0,208	0,481 (0,153 – 1,512)
TT	5 (16,7)	4 (13,3)	0,568 ^a	0,833 (0,170 – 4,088)
Model dominan – resesif				
CC	12 (40)	8 (26,7)	ref	
TT+CT	18 (60)	22 (73,3)	0,273	0,545 (0,183 – 1,623)
CC+CT	25 (83,3)	26 (86,7)	ref	
TT	5 (16,7)	4 (13,3)	0,500 ^a	1,300 (0,313-5,404)

#uji Chi-square; ^auji Fisher Exact; nilai p signifikan <0,05; CI= Confidence Interval; OR= OddsRatio; ref= referensi.

DISKUSI

Penelitian ini merupakan studi pendahuluan pada populasi melayu. Karakteristik dasar subyek pada penelitian ini menunjukkan usia ibu antara kelompok preeklampsia dan kontrol tidak berbeda secara signifikan karena telah dilakukan pencocokan pada kedua kelompok untuk menghindari pengaruh usia terhadap kejadian preeklampsia. Faktor lainnya yaitu gravida dan paritas pada subyek penelitian ini juga tidak menunjukkan perbedaan signifikan pada kedua kelompok. Studi terdahulu melaporkan usia ibu hamil ≥ 40 tahun dan nullipara meningkatkan risiko preeklampsia.^{10,11} Risiko preeklampsia juga meningkat pada primigravid. Adanya maladaptasi imun yang terjadi pada primigravida diduga berperan terhadap kejadian preeklampsia.¹² Usia gestasi menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kedua kelompok. Frekuensi usia gestasi <37 minggu lebih tinggi pada kelompok preeklampsia dibandingkan kelompok kontrol dan berbeda

bermakna secara statistik. Kelahiran prematur meningkat pada ibu hamil yang menderita preeklampsia.¹¹

Genotip penelitian ini tidak menyimpang dari kesetimbangan Hardy-Weinberg. Hal ini menunjukkan bahwa genotip pada populasi penelitian ini tidak berbeda dengan populasi lain walaupun jumlah sampel penelitian ini terbatas.

Hasil penelitian ini menunjukkan pada kelompok preeklampsia frekuensi genotip varian TT lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol, namun tidak berbeda bermakna secara statistik. Hasil penelitian tidak menunjukkan asosiasi variasi gen MTHFR C677T dengan preeklampsia. Studi genetik populasi di beberapa negara menunjukkan hasil yang serupa dengan penelitian ini. Studi asosiasi pada populasi Mexico selatan tidak menunjukkan adanya asosiasi genotip variasi gen MTHFR C677T dengan preeklampsia (OR=0,88; 95% CI=0,46 - 1,68; $p=0,6$).⁸ Hasil

serupa juga dilaporkan pada populasi Iran selatan (OR=0,8; 95% CI=0,4 - 2,6; $p=0,6$).¹³ Hasil berbeda dilaporkan pada studi genetik populasi Pakistan. Pada penelitian tersebut melaporkan genotip TT memiliki asosiasi yang signifikan dengan preeklampsia pada model dominan (OR=2,91, 95% CI= 1,29– 6,57; $p=0,0071$).¹⁴

Pada variasi gen MTHFR C677T terjadi transisi Sistein menjadi Timin pada exon 4, menyebabkan substitusi alanin menjadi valin pada asam amino 222 (A222V) pada domain katalitik N-terminal yang menyebabkan ketidakstabilan suhu enzim. Hal ini menyebabkan penurunan aktivitas enzim MTHFR pada suhu 37°C sehingga mengganggu proses remetilasi homosistein menjadi metionin. Variasi genetik MTHFR C677T juga menyebabkan peningkatan homosistein dalam darah (hiperhomosisteinemia).^{3,4}

Hiperhomosisteinemia menyebabkan kerusakan langsung pada sel endotel dan memicu terjadinya stress oksidatif, diketahui berhubungan dengan terjadinya keguguran berulang, hipertensi gestasional dan preeklampsia.^{15,16}

Perbedaan hasil penelitian ini dengan populasi lain kemungkinandisebabkan adanya perbedaan etnis, pengaruh interaksi dengan faktor lingkungan dan perbedaan jumlah subyek penelitian. Jumlah sampel yang sedikit menjadi keterbatasan dalam penelitian ini. Diharapkan pada penelitian selanjutnya menggunakan sampel yang lebih besar dengan melibatkan etnis melayu yangberada pada provinsi lainnya di Indonesia agar dapat menilai besarnya risiko genotip terhadap kejadian preeklampsia pada etnis melayu.

SIMPULAN

Hasil penelitian kami mengesankan bahwa variasi gen MTHFR C677T bukan merupakan faktor risiko terhadap kejadian preeklampsia pada populasi melayu Jambi.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan pada penelitian ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Jambi yang telah membiayai penelitian ini sesuai Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian nomor: 191/UN21.18/PG/SPK/2020. Peneliti juga berterima kasih kepada seluruh subyek yang bersedia menjadi sampel dalam penelitian ini.

REFERENSI

1. Rana, S., Lemoine, E., Granger, J.P., Karumanchi, S.A., 2019. Preeclampsia pathophysiology, challenges, and perspectives. *Circ Res* 124(7):1094-1112
2. Gathiram, P., Moodley, J., 2016. Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology. *Cardiovasc J Afr* 27:71-78.
3. Xia, X.P., Chang, W.W., Cao, Y.X., 2012. Meta-analysis of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and susceptibility to pre-eclampsia. *Hypertens Res* 35(12):1129-1134.
4. Wu, X., Yang, K., Tang, X., Sa, Y., Zhou, R., Liu, J., et al., 2014. Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for preeclampsia: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 32:797–805.
5. Pushpakumar, S., Kundu, S., Sen, U., 2014. Endothelial dysfunction: the link between homocysteine and hydrogen sulphide. *Curr Med Chem* 21(32):3662– 3672.
6. Esse, R., Barroso, M., Almeida, I.T., Castro, R., 2019. The contribution of homocysteine metabolism disruption to endothelial dysfunction: state-of-the-art. *Int J Mol Sci* 20(4):867-891.
7. Hoque, M.M., Bulbul, T., Mahal, M., Islam, N.A., Ferdousi, M., 2008. Serum homocysteine in pre-eclampsia and eclampsia. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 34(1):16-20.
8. Perez-Mutul, J., Gonzalez-Herrera, L., Sosa-Cabrera, T., and Martínez-Olivares, R., 2004. A mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene is not associated with preeclampsia in women of southeast Mexico. *Arch Med Res* 35:231–234.
9. Chedraui, P., Salazar-Pousada, D., Villao, A., Escobar, G. S., Ramirez, C., Hidalgo, L., et al., 2014. Polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T and A1298C) in nulliparous women complicated with preeclampsia. *Gynecol Endocrinol* 30:392–396.
10. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 330(7491):565.
11. Fox, R., Kitt, J., Leeson, P., Aye, C., Lewandowski, A.J., 2019. Preeclampsia: risk factors, diagnosis, management, and the cardiovascular impact on the offspring. *J Clin Med* 8(10):1625-1635
12. Lou, Z., An, N., Xu, H., Larante, A., Audibert, F., Fraser, W.D., 2007. The effects and mechanism of primiparity on the risk of pre-eclampsia; a systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1:36-45.
13. Salimi, S., Saravani, M., Yaghmaei, M., Fazlali, Z., Mokhtari, M., Naghavi A., Mashhadi, F., 2015. The early onset preeclampsia is associated with MTHFR and FVL polymorphisms. *Arch Gynecol Obstet* 291:1303-1312.
14. Khidri, F.F., Waryah, Y.M., Ali, F.K., Shaikh, H., Ujjan, I.D., Waryah, A.M., 2019. MTHFR and F5 genetic variations have association with preeclampsia in Pakistani patients: a case control study. *BMC Med Gen* 20:163-175.
15. Valenzuela, F.J., Sepulveda, A.P., Torres, M.J., Correa, P., Gabriela, M., Illanes, S.E., 2012. Pathogenesis of preeclampsia: the genetic component. *J Pregnancy* 2012:1-8.
16. Mascarenhas, M., Habeebullah, S., Sridhar., M.G., 2014. Revisiting the role of first trimester homocysteine as an index of maternal and fetal outcome. *J Pregnancy* 2014:1-6.