HUBUNGAN POLIMORFISME GEN ANGIOTENSINOGEN M235T DENGAN HIPERTENSI ESENSIAL PADA ETNIS SULAWESI TENGGARA

Sapto Raharjo[*1], Agus Chahyadi[2], Aulia Fadhilah [3], Tien[4], Andi Noor Kholidha[5], Sjarif Subijakto[6]
[*1]Departemen Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA UHO
[2]Fakultas Farmasi UHO
[3]Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran UHO
[4,5]Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran UHO
[6]Bagian Jantung Rumah Sakit Pendidikan Utama Bahteramas
e-mail: [*1]**saprjo@yahoo.com**, [4]tiensyamsuddin@yahoo.com

Abstrak

Patogenesis penyakit hipertensi esensial dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Gen renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) telah dipelajari secara ekstensif untuk perannya dalam mengontrol tekanan darah. Ada berbagai gen yang mengkode komponen di RAAS yang terlibat dalam pengembangan hipertensi. Polimorfisme gen ini sangat diyakini terkait dengan prevalensi hipertensi. Studi Polimorfisme gen angiotensinogen 235M/T menunjukkan bahwa alel 235T pada orang Asia meningkatkan risiko hipertensi dibandingkan pada orang kulit putih. Penelitian ini mengevaluasi frekuensi polimorfisme AGT (M235T) dalam kaitannya dengan hipertensi esensial pada etnis di Sulawesi Tenggara. Desain penelitian ini adalah desain *cross sectional* dengan varian angiotensinogen M235T terhadap Hipertensi Esensial sebagai variabel independen. Penelitian ini menggunakan pendekatan biologi molekuler untuk menginterpretasikan hasil elektroforesis DNA dari sampel yang sebelumnya telah diperiksa menggunakan teknik PCR dan RFLP. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa polimorfisme gen angiotensinogen M235T tidak memiliki hubungan dengan kejadian hipertensi esensial di Etnis Sulawesi Tenggara. Uji *chi-square* menunjukkan bahwa nilai p lebih besar dari nilai alpha (α) (nilai p 0,275> α (0,005)). Hal ini menunjukkan bahwa polimorfisme gen M235T bukan faktor risiko pada pengembangan penyakit jantung hipertensi. Kesimpulan dari penelitian ini adalah polimorfisme gen angiotensinogen M235T tidak memiliki hubungan dengan kejadian hipertensi esensial di etnis Sulawesi Tenggara.

Kata kunci— Hipertensi Esensial, Gen Angiotensinogen, Polimorfisme Gen.

Abstract

The pathogenesis of essential hypertension disease is influenced by genetic and environmental factors. Genes of the renin-angiotensin system (RAAS) has been extensively studied for its role in controlling blood pressure. There are various genes encoding components in RAAS which are involved in the developing of hypertension. Polymorphism of these genes is strongly believed to be related to the prevalence of hypertension. A study of 235M/T angiotensinogen gene polymorphisms indicated that the 235T allele increases the risk of hypertension Asians than in whites. This study evaluated the frequency of AGT (M235T) polymorphism in relation to essential hypertension in the population of Southeast Celebes ethnic.The study design was cross-sectional design with a variant of the angiotensinogen M235T to Essential Hypertension as an independent variable. This research uses molecular biology approaches to interpret the results of electrophoresis of DNA from samples that had previously been checked using PCR and RFLP. Data are analyzed statistically.The results showed that the polymorphism of angiotensinogen gene M235T had no association with the incidences of essential hypertention in Southeast Celebes Ethnic. The chi-square test showed that the p-value was greater than the alpha (α) value (p-value of 0.275 > α (0.005)). It revealed that the M235T gene polymorphism was not a risk factor on the development of hypertensive heart diseases.

The conclusion of this study was the polymorphism of angiotensinogen gene M235T had no association with the incidences of essential hypertension in Southeast Celebes ethnic.

Keywords— *Hypertension, Angiotensinogen Gene,Gene Polymorphism.*

1. PENDAHULUAN

Hipertensi esensial merupakan faktor resiko utama terhadap kejadian penyakit kardiovaskular yang dipengaruhi oleh interaksi antara faktor lingkungan dan genetik. Beberapa gen telah dipelajari sebagai kandidat gen hipertensi. Umumnya gen-gen ini terlibat dalam *renin-angiotensin-aldosterone system* (RAAS). RAAS memainkan peranan penting dalam meregulasi tekanan darah, homeostasis elektrolit, dan tonus vaskular. *Angiotensinogen* (AGT) merupakan komponen utama yang terlibat dalam kaskade aktivasi/efektor RAAS. Polimorfisme genetik pada komponen RAAS termasuk AGT (M235T) diketahui berhubungan dengan patogenesis hipertensi esensial.[1]

Pada RAAS, AGT diubah menjadi angiotensin I oleh renin dan selanjutnya diubah menjadi vasokonstriktor kuat angiotensin II oleh *angiotensin-converting enzyme* (ACE). Polimorfisme gen AGT M235T dilaporkan meningkatkan kadar AGT serum, sehingga menyebabkan peningkatan tekanan darah.[2] Polimorfisme ini merupakan varian homozigot gen AGT yang menyebabkan perubahan asam amino metionin menjadi treonin pada posisi 235. Studi menunjukkan bahwa terjadi peningkatan faktor resiko penyakit jantung koroner yang dipengaruhi oleh varian gen AGT M235T.[3]

Penelitian pada polimorfisme gen AGT M235T telah dilakukan terhadap beberapa negara dan menunjukkan bahwa alel 235T meningkatkan resiko hipertensi pada populasi Asia dibanding populasi kulit putih.[4] Namun, hubungan antara polimorfisme gen AGT dan hipertensi esensial pada populasi Asia masih kurang konsisten. Penelitian yang dilakukan Harvard terhadap 110 populasi menunjukkan sebanyak 53 keluarga hipertensi populasi Cina Han tidak memperlihatkan adanya hubungan antara polimorfisme gen AGT dan hipertensi.[5]

Penelitian yang menganalisis polimorfisme gen reseptor angiotensin II tipe 1 A1166C dan ACE insersi/delesi (I/D) kejadian penyakit jantung hipertensi di Rumah Sakit Umum Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara mengemukakan bahwa genotip AC dan CC bukan merupakan faktor resiko kejadian penyakit jantung. Namun, distribusi genotip AA pada kelompok normotensi relatif tinggi dibanding kasus yakni 82,86% dan 71,42%. Hal ini mengindikasikan bahwa pasien yang bergenotip AA cenderung memiliki tekanan darah yang normal. Pada studi polimorfisme ACE I/D menghasilkan nilai *odds ratio* 2,909. Pasien bergenotip ID dan DD beresiko mengalami penyakit jantung hipertensi 2,909 kali dibanding pasien yang tidak bergenotip ini.[6]

Kejadian hipertensi esensial di Sulawesi Tenggara dilaporkan terus mengalami peningkatan. Data tahun 2012 tercatat kasus hipertensi sebesar 40.001 kasus terdiri dari laki-laki 18.928 kasus (47,31%) dan perempuan 21.073 kasus (52,69%).[7] Mayoritas penduduk Sulawesi Tenggara terdiri atas etnis Tolaki, Muna, dan Buton. Setiap etnis memiliki pola hidup dan pola makan berbeda-beda yang dapat berkontribusi terhadap kejadian hipertensi esensial. Hal ini mendorong dilakukannya penelitian ini untuk melihat hubungan polimorfisme gen AGT M235T terhadap kejadian hipertensi esensial pada 3 etnis mayoritas Sulawesi Tenggara.

2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan biologi molekuler dan desain cross-sectional study. Sampling dilakukan di Rumah Sakit Rumah Sakit Umum Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara, sedangkan isolasi DNA dan PCR-RFLP dilakukan di Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Universitas Halu Oleo. Jumlah subjek penelitian sebanyak 61 orang. Teknik total sampling digunakan terhadap pasien hipertensi usia 45-65 tahun. Sebanyak 53 orang pasien memiliki tekanan darah > 140 mmHg dan 8 orang pasien memiliki tekanan darah normal (normotensi). Hipertensi sekunder dieksklusi dari sampel. Protokol penelitian telah direview dan disetujui oleh Komite Etik Rumah Sakit Umum Bahteramas.

2.1 Pengambilan Darah

Sebanyak 5 mL sampel darah perifer diambil dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi antikoagulan. Spesimen ditutup dan dibawa ke laboratorium dalam *box ice*. Sampel disentrifugasi pada 3500 rpm selama 15 menit

untuk memisahkan sel darah putih (*buffy coat*) dari komponen darah yang lain.

2.2 Penentuan Genotip

DNA genomik diisolasi dari sampel darah berdasarkan protokol ekstraksi DNA *Geneaid*. Untuk menentukan polimorfisme M235T, DNA genomik diamplifikasi menggunakan PCR dengan pasangan primer: AGT - 1 (*reverse*) 5'-GAT AAG GTC CAC CTG GCG-3' dan AGT-2 (*forward*) 5'-CAG GGT GCT GTC GGC CAC ACT TCG C-3'. Proses PCR dilakukan dengan 35 siklus: denaturasi ± 95°C selama 15 detik, annealing ± 61°C selama 15 detik, elongasi ±72 ° C selama 18 detik, dan final ektensi selama ± 7 minutes.

Produk PCR diresktriksi menggunakan enzim Nco1 yang diinkubasi selama 16 jam pada 37°C. Campuran RFLP yaitu 1 ml buffer tango 10x, akuades 9 mL, enzim Nco1, dan produk PCR (DNA) 5 mL. Hasil restriksi divisualisasi menggunakan elektroforesis dengan genotip TT (303 bp), genotip MM (fragmen 211 bp dan 92bp), dan genotip MT (fragmen 303 bp, 211 bp dan 92 bp). [8]

2.3 Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan menggunakan SPSS 16. Hubungan antara polimorfisme gen AGT M235T dengan kejadian hipertensi esensial pada etnis Sulawesi Tenggara diuji chi-square.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Frekuensi genotip AGT M235T subjek hipertensi dan normotensi dapat dilihat pada Tabel 1. Data menunjukkan distribusi genotip homozigot (TT) sebanyak 54 orang (88,5%) dan genotip heterozigot (MT) sebanyak 7 orang (11,5%). Tidak ditemukan adanya subjek homozigot (MM). Jumlah sampel total adalah 61 orang (100%).

Tabel 1.Distribusi frekuensi genotip AGT M235T

Genotipe	Jumlah	Persentase
TT	54	88,5%
MT	7	11,5%
MM	0	0%
Total	**61**	**100%**

Karakteristik distribusi genotip berdasarkan etnis Sulawesi Tenggara sebagaimana ditunjukkan oleh Tabel 2. Data menunjukkan sebaran genotip AGT M235T pada 3 etnis yaitu Tolaki, Muna, dan Buton.

Tabel 2. Distribusi genotip AGT M235T pada etnis Sulawesi Tenggara

Etnis	TT	MT	MM	Total
Tolaki	27 (44,3%)	6 (9,8%)	0 (0%)	33 (54,1%)
Muna	22 (36,1%)	0 (0%)	0 (0%)	22 (36,1%)
Buton	5 (8,2%)	1 (1,6%)	0 (0%)	6 (9,8%)
Total	**54 (88,5%)**	**7 (11,5)**	**0 (0%)**	**61 (100%)**

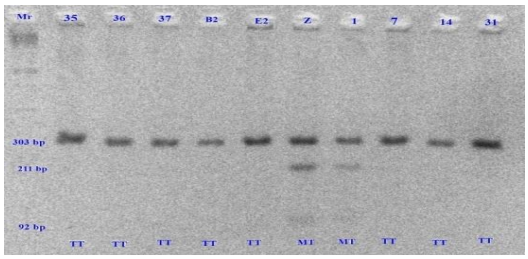
Tabel 2 menunjukkan etnis Tolaki homozigot (TT) sebanyak 27 orang (44,3%) dan heterozigot (MT) sebanyak 6 orang (9,8%). Etnis Muna homozigot (TT) sebanyak 22 orang (36,1%) dan ditemukan heterozigot. Etniz Buton homozigot (TT)sebanyak 5 orang (8,2%) dan heterozigot (MT) sebanyak 1 orang (1,6%).

Distribusi hipertensi berdasarkan etnis Sulawesi Tenggara ditunjukkan oleh Tabel 3. Data menunjukkan etnis Tolaki hipertensi sebanyak 31 orang (54,1%) dan normotensi sebanyak 2 orang (3,3%). Etnis Muna hipertensi sebanyak 19 orang (31,1%) dan normotensi sebanyak 3 orang (4,9%). Etnis Buton hipertensi sebanyak 3 orang (4,9%) dan normotensi sebanyak 3 orang (4,9%).

Tabel 3. Distribusi hipertensi berdasarkan etnis Sulawesi Tenggara

Etnis	Normotensi	Hipertensi	Total
Tolaki	2 (3,3%)	31 (50,8%)	33 (54,1%)
Muna	3 (4,9%)	19 (31,1%)	22 (36,1%)
Buton	3 (4,9%)	3 (4,9%)	6 (9,8%)
Total	**8 (13,1%)**	**53 (86,9%)**	**61 (100%)**

Analisis bivariat menunjukkan polimorfisme AGT M235T tidak ada hubungan dengan kejadian hipertensi esensial pada etnis Sulawesi Tenggara (Tabel 4). Nilai p yaitu 0,275 > α (0,005).



Gambar 1. Analisis polimorfisme DNA AGT M235T secara agarosa gel elektroforesis. Mr : Marker DNA . Kode 35, 36, 37, B2, E2, 7, 14, dan 31: homozigot (genotip TT) posisi band 303 bp. Kode Z dan 1: heterozigot (genotip MT) posisi band 303 bp, 211 bp, dan 92 bp.

Gen renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) merupakan kandidat gen yang tepat untuk mempelajari hipertensi karena sistem ini diketahui berperan dalam mengontrol tekanan darah. Beberapa polimorfisme AGT telah diidentifikasi. Salah satu polimorfisme DNA pada ekson 2 dengan metionin digantikan oleh treonin pada posisi 235 (M235T) ditemukan berhubungan dengan hipertensi secara signifikan. Peningkatan kadar AGT plasma diobservasi terjadi pada pasien dengan varian 235T.[9] Gen AGT manusia berlokasi pada kromosom 1q42-3, terdiri atas 5 ekson dan 4 intron dengan panjang 13 kb pada urutan DNA genomik. Studi menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar AGT plasma dan tekanan darah pada subjek hipertensi.[10]

Penelitian ini menunjukkan genotip TT dan MT tidak berhubungan dengan insidensi hipertensi esensial pada etnis Sulawesi Tenggara. Namun, distribusi genotip TT terlihat pada kelompok normotensi 13,1% dan kelompok hipertensi 75,4%. Pada kelompok normotensi diketahui memiliki riwayat keluarga hipertensi.

Tabel 4. Hubungan genotip gen AGT M235T terhadap kejadian hipertensi esensial pada etnis Sulawesi Tenggara

Genotip	Normotensi	Hipertensi	Total	χ^2	p-value
TT (%)	8 (13,1%)	46 (75,4%)	54 (88,5%)		
MT (%)	0 (0%)	7 (11,5%)	7 (11,5%)	1,94	0,275
MM (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
Total	**8 (13,1%)**	**53(86,9%)**	**61 (100 %)**		

4. KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah tidak terdapat hubungan antara polimorfisme AGT M235T dengan kejadian hipertensi esensial pada etnis Sulawesi Tenggara. Genotip TT dan MT lebih banyak ditemukan pada etnis Tolaki daripada Muna dan Buton.

5. SARAN

Saran pada penelitian ini :

1. Cakupan populasi hipertensi lebih diperluas lagi, tidak hanya di RSU Bahteramas, namun juga dibeberapa rumah sakit di Sulawesi Tenggara, sehingga subjek penelitian bisa mewakili beberapa etnis di Sulawesi Tenggara
2. Design penelitian dikembangkan menjadi case control dengan teknik *matching sample*.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Shamaa, M.M., Fouad, H., Haroun, M., Hassanein, M., Hay, M.A.A., *et al*.,2013,Association between the angiotensinogen (AGT) gene (M235T) polymorphism and essential hypertension in egyptian patiens, *The Egyptian Heart Journal.*

[2] Nakase, T., Mizuno, T., Harada, S., Yamada, K., Nishimura, T., Ozasa K., *et al*, 2007, Angiotensinogen gene polymorphism as a risk factor for ischemic stroke,*Journal of Clinical Neurosciences*, vol 14, hal 943-7.

[3] Liang, X., Qiu, J., Liu, X., Li, X., Zhao, S., Wang, J., *et al*, 2013, Polymorphism of angiotensinogen gene M235T in myocardial infarction snd brain infarction: a meta analysis, *Gene*, vol 529, hal 73-9.

[4] Sethi, A.A., Nordestgaard, B.G., dan Tybjaerg, A., 2003, Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease; a meta analysis, *Journal of American Heart Association*,vol 23, hal 1269-75.

[5] Niu, T,*et al.*, 1999,Angiotensinogen gene polymorphisms M235T/T174M: no excess transmission to hypertensive Chinese. *Journal of American Heart Associatino,* vol 33, hal: 698-702.

[6] Ramu, P.,*et al.*, 2011, Candidate gene polymorphism of renin angiotensin system and essential hypertension in a south indian tamilian population. *Journal Hum.Gene,* vol 1, hal 31-40.

[7] Kumalasari, A. S., Raharjo, S., Sujakto, S., 2013, Analisis polimorfisme gen reseptor angiotensin II tipe A1166C dan angiotensin converting enzyme (ACE) insersi/delesi dengan penyakit jantung hipertensi di Rumah Sakit Umum Bahteramas Provinsi Sulawesi Tenggara, *Skripsi*, Program Studi Pendidikan Dokter, Universitas Halu Oleo, Kendari.

[8] Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Tenggara, 2012, *Profil Kesehatan Sulawesi Tahun 2012*, Dinas Kesehatan Provinsi Sulawesi Tenggara, Kendari.

[9] Procopciuc, L., *et al.*, 2002, Essential arterial hypertension and polymorphism of angiotensinogen M235T gene,*J.Cell. Mol. Med,* vol 2, hal 245-250.

[10] Rahma, S.F., *et al*., 2013, Analisis Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-217 Gen Human Angiotensinogen (hAGT) pada penderita hipertensi di rumah sakit Syaiful Anwar secara PCR-Sekuensing. Jurnal Biotropika, vol 2, hal 71-4.