

# IDENTIFICATION OF CYSTATHIONINE-B SYNTHASE (CBS) AND METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR) GENES MUTATIONS IN PREMATURE MYOCARD INFARCT ACUTE PATIENTS WITH HIPERHOMOCYSTEINEMIA

## IDENTIFIKASI MUTASI GEN CYSTATHIONINE- $\beta$ SYNTHASE (CBS) DAN GEN METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE (MTHFR) PADA PENDERITA PREMATUR INFARK MIKOKARD AKUT DENGAN HIPERHOMOSISTEINEMI

I Ketut Gede Muliarta\*, Djangan Sargowo\*\*, Abdillah Iskandar\*\*\*

\*Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

\*\* Pascasarjana Universitas Brawijaya

\*\*\* Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman

### ABSTRACT

*Hyperhomocysteinemia appears to be an independent risk factor for coronary heart disease. Elevated levels of plasma total homocysteine (tHcy) was caused by genetic or nutrient-related disturbances in the transsulfuration or remethylation pathways for homocysteine metabolism. This study observed premature myocard infarct acute patients with hyperhomocysteinemia. The aim of the research was to determine Cystathionine- $\beta$  Synthase and Methylenetetrahydrofolate Reductase genes mutations in premature acute myocard infarct patients with hyperhomocysteinemia. This study was a cross sectional study in premature acute myocard infarct patients. Twenty three patients were examined for plasma total homocysteine, vitamin B6, vitamin B12 folic acid and lipid profile. Total DNA isolated from patients with hyperhomocysteinemia and normal folic acid, vitamin B6, vitamin B12 levels and lipid profile. Five patients were assayed for Cystathionine- $\beta$  Synthase and gen Methylenetetrahydrofolate Reductase genes mutations by Polymerase Chain Reactions (PCR). Five from 23 patients ( 21,7% ) plasma total homocysteine were increased ( $15,10 \pm 2,02$  nmol/L) with normal vitamin B6 ( $35,06 \pm 11,80$  nmol), vitamin B12 ( $67,60 \pm 207,18$  pg/ml), folic acid ( $8,28 \pm 2,26$  ng/ml) levels and lipid profile ( $180 \pm 9,80$  mg/dl). After visualitation of PCR product, there were mutations in Cystathionine- $\beta$  Synthase and gen Methylenetetrahydrofolate Reductase genes. It was concluded that Cystathionine- $\beta$  Synthase and gen Methylenetetrahydrofolate Reductase genes mutations occurs in Premature Acute Myocard Infarct patients with hyperhomocysteinemia.*

**Key words** : Hyperhomocysteinemia, Vit. B6, Vit. B12, Folic acid, CBS, MTHFR, Premature Acute Myocard Infarct.

### PENDAHULUAN

Berdasarkan hasil Survey Kesehatan Rumah Tangga ( SKRT ) di Indonesia tahun 1995 penyakit Jantung dan pembuluh darah masih merupakan penyebab kematian yang utama ( $\pm 12\%$ ). Demikian pula di negara-negara maju seperti Amerika dan sebagian besar negara belahan barat, penyakit kardiovaskuler masih merupakan penyebab kematian tertinggi. Penyakit aterosklerosis mempunyai penyebab multi faktor. Pemeriksaan faktor-faktor risiko untuk memprediksi terjadinya penyakit aterosklerosis ini telah banyak dilakukan. Adapun faktor-faktor risiko tersebut adalah faktor risiko tradisional, seperti hiperlipidemia, merokok, usia tua, kegemukan, hipertensi dan diabetes melitus. Akan tetapi dalam perkembangannya didapatkan kenyataan bahwa orang tanpa faktor risiko tersebut,

ternyata juga dapat menderita Penyakit Jantung Koroner (PJK) dan stroke. Dengan perkembangan ilmu dunia kedokteran akhir-akhir ini banyak terdeteksi penderita kardiovaskuler pada usia muda dengan kelainan faktor genetik (1).

Beberapa peneliti mengatakan bahwa peningkatan konsentrasi homosistein plasma mungkin dapat menyebabkan aterosklerosis maka banyak penelitian prospektif maupun retrospektif tentang hubungan homosistein dengan aterosklerosis telah dilakukan selama dasawarsa terakhir ini (2,3). Sebagian besar penelitian ini mendukung pernyataan bahwa, peningkatan homosistein total dalam plasma berkaitan dengan peningkatan risiko penyakit aterosklerosis (2,3). Para ahli memeriksa konsentrasi homosistein setelah pemberian metionin dan ditemukan 28% penderita dengan penyakit pembuluh darah perifer, 30% penderita dengan penyakit arteri koroner dan 42% penderita dengan penyakit serebrovaskuler semuanya disertai dengan hiperhomosisteinemia (2). Homosistein merupakan suatu asam amino yang sangat reaktif dan bersifat

*Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. XXIV, No. 3, Desember 2008; Korespondensi: I Ketut Gede Muliarta, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Telp : 0818380376*

toksik terhadap endotel pembuluh darah, merangsang auto oksidasi – LDL – kolesterol dan mengakibatkan thrombosis. Hampir sebagian besar hiperhomosisteine yang berhubungan dengan penyakit kardiovaskuler ditemukan pada populasi usia lanjut, akan tetapi beberapa penelitian terakhir menemukan pada usia yang lebih dini (3,4,5).

Faktor-faktor yang menentukan kadar homosistein total plasma (tHcy) sangat kompleks, meliputi faktor-faktor demografi, gaya hidup seseorang, nutrisi dan bahkan faktor genetik. Defisiensi enzim *Cystathionine Beta Synthase* (CBS), yaitu enzim yang berperan dalam jalur transulfurasi, dimana homosistein diubah menjadi sitionine, atau enzim *Methyltetrahydrofolat Reductase* (MTHFR) yaitu enzim yang berperan dalam remetilisasi, dimana homosistein diubah menjadi metionin dilaporkan bertanggung jawab terhadap peningkatan konsentrasi homosistein total plasma (1,6,7). Dalam penelitian yang lain juga membuktikan bahwa ada hubungan yang erat antara hiperhomosisteinemia dengan mutasi pada gen CBS dan gen MTHFR (8, 9,10).

Berdasarkan hal-hal tersebut dilakukan penelitian tentang keberadaan mutasi gen CBS dan gen MTHFR pada penderita aterosklerosis. Prematur infark miokard akut (IMA) dengan hiperhomosisteinemia yang tidak menunjukkan adanya faktor risiko konvensional. Digunakan 3 pasang primer (ekson 3, 7 dan 8) untuk mendeteksi defek pada gen CBS sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sebastio pada orang Italia. Pemilihan ini didasarkan pada penelitian Franco et al, 1998, yang meneliti defek gen yang menyebabkan aterosklerosis pada beberapa etnik dan disimpulkan bahwa ada kemiripan sebaran mutasi pada etnik caucasian dan etnik Asia (10). Sedangkan untuk mendeteksi mutasi pada gen MTHFR digunakan pasangan primer untuk mutasi C677T/MTHFR (11).

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan adanya peran genetik pada penderita prematur infark miokard akut oleh karena hiperhomosistein dan sekaligus mengetahui adanya gambaran mutasi pada gen CBS dan gen MTHFR.

## **METODE PENELITIAN**

### **Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian ini merupakan penelitian dengan pendekatan *cross sectional study* pada kasus penderita Prematur Infark Miokard Akut. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Penyakit Tanaman (HPT) Universitas Brawijaya Malang bekerjasama dengan Laboratorium Prodia Malang. Pengambilan sampel darah penderita IMA dilakukan di Rumah Sakit Umum dr. Saiful Anwar Malang.

### **Kriteria Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah penderita Prematur Infark Miokard Akut yang dijaring dengan kriteria sebagai berikut:

Kriteria inklusi :

- Penderita dengan diagnosa pasti infark miokard akut (IMA) berdasarkan pemeriksaan anamnestik dan pemeriksaan fisik EKG dan enzim.
- Usia , Laki-laki < 45 tahun dan perempuan usia masih menstruasi.
- Fungsi ginjal (ureum/kreatinin) dan fungsi liver (alkali phosphat, GOT,GPT) normal.

Kriteria eksklusi :

Memiliki lebih dari satu faktor risiko; Hiperkolesterol, Hiper LDL , Hipo HDL, Diabetes mellitus, Hipertensi, Merokok, Menggunakan kontrasepsi hormonal, serta ada bukti kelainan fungsi ginjal dan fungsi hati.

### **Tahapan penelitian**

Dalam pelaksanaannya penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan, yaitu;

#### **Tahap pertama**

Pada awal penelitian dilakukan seleksi terhadap penderita infark miokard akut rawat inap dan rawat jalan yang didapat dari Rumah Sakit Umum dr. Saiful Anwar Malang, berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah disebutkan diatas. Tahap ini dilaksanakan selama kurun waktu 6 bulan dengan menggunakan lembar Status penderita yang berisikan anamnesa, pemeriksaan fisik, EKG, Foto Rontgen dan pemeriksaan laboratorium rutin. Sebelumnya juga dijelaskan pada penderita maksud dan tujuan penelitian serta segala sesuatu yang berhubungan dengan penelitian.

#### **Tahap kedua**

Dari tahap pertama diharapkan didapatkan populasi penderita premature infark miokard akut sebanyak 23 orang. Darah penderita diambil melalui vena perifer (dipuaskan 12 jam sebelumnya) dan dimasukkan dalam tabung vacuntainer yang telah disediakan. Sebelum dilakukan pengambilan darah. subyek sebelumnya menandatangani lembar *informed consent*. Tahap ini ditujukan untuk pemeriksaan Laboratorium darah khusus, yaitu:

- Pemeriksaan Fraksi lipid (Kolesterol total, LDL, HDL, Trigliserida).
- Pemeriksaan Vitamin B6, Vitamin B12, dan Asam folat.
- Pemeriksaan Homosistein total.

#### **Tahap ketiga**

Pada tahap ini dilakukan seleksi penderita berdasarkan hasil pemeriksaan laboratorium khusus yang dilakukan pada tahap sebelumnya, dengan kriteria sebagai berikut;

- konsentrasi Homosistein total meningkat (Hiperhomosisteinemia), lebih atau sama dengan 13,8 umol/L.
- tidak ada defisiensi Vitamin B6 (Normal 20 – 30 nmol).
- tidak ada defisiensi Vitamin B12 (Normal 179 – 1132 pg/ml)
- tidak ada defisiensi Asam folat (Normal 3,1 - 12,4 ng/ml).
- konsentrasi fraksi lipid normal Kolesterol total < 200 mg/dl, LDL < 130 mg/dl, HDL > 45 mg/dl, Trigliserida < 200 mg/dl).

Setelah didapatkan penderita sesuai dengan kriteria diatas, kemudian dilakukan pemeriksaan khusus berikutnya untuk mengetahui adanya kelainan gen (mutasi) pada gen CBS dan gen MTHFR melalui pemeriksaan;

- Isolasi DNA total dengan teknik Shirakawa
- Amplifikasi gen CBS dan gen MTHFR dengan teknik PCR

#### Analisa data

Hasil penelitian disajikan dalam bentuk statistik deskriptif. Sebagian data isolasi DNA total serta hasil PCR ditampilkan dalam bentuk foto hasil visualisasi elektroforesis.

### PROSEDUR PENELITIAN

#### Pemeriksaan homosistein plasma total

Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan metode FPIA (*Flourescence Polarization Immunoassay*). Diperlukan 0,5 ml serum sampel untuk pemeriksaan kadar homosistein total dengan menggunakan reagen Abbot dan alat IMx Homocysteine assay yang berbasis pada reknologi FPIA.

#### Pemeriksaan Fraksi lipid

Pemeriksaan fraksi lipid dilakukan di Laboratorium Prodia Malang. Pemeriksaan LDL — kolesterol direk dan Pemeriksaan HDL — kolesterol direk menggunakan metode homogenous dan dibutuhkan serum sampel masing-masing sebanyak 0,2 ml untuk diperiksa dengan reagen Daichi dan alat Cobas Mira.

Pemeriksaan Trigliserida menggunakan metode *colorimetric enzymatic test Glycerol-3-phosphate-oxydase* (GPO) PAP, diperlukan 0,2 ml serum sampel dan diperiksa dengan reagen Randox dan alat Cobas Mira. Pemeriksaan visualisasi DNA dengan teknik Shirakawa.

#### Pemeriksaan mutasi gen CBS dan MTHFR dilakukan teknik amplifikasi PCR.

- Bahan-bahan : DNA sampel (template); Taq Polimerase; d NTP mix : 10x; Buffer PCR; MgCl<sub>2</sub>; dd H<sub>2</sub>O; Mineral oil; Primer untuk mendeteksi mutasi gen CBS

- Mutasi G374A:  
Forward:  
5TGAAGTGTGAGCACCACCATCTGTCCGG<sup>3</sup>  
Reverse: 5AGTCGAACCTGGCATTGTT<sup>3</sup>
- Mutasi C770T:  
Forward: 5CCCCTATGGTCAGAATCAACAA<sup>3</sup>  
Reverse: 5CTCTTGAACCACTTGGTCCACC<sup>3</sup>
- Mutasi T833C:  
Forward: 5GAAGCTGGACATGCTGGTGGC<sup>3</sup>  
Reverse: 5CTCTTGAACCACTTGTCCACC<sup>3</sup>
- Dan Primer untuk mutasi gen MTHFR C677T  
Forward: 5GAAGGGGAGAGGTGTCTGCGGGA<sup>3</sup>  
Reverse:  
5AGGACGGTGCGGTGCGGTGAGAGTG<sup>3</sup>

### HASIL PENELITIAN

#### Karakteristik sampel

Dari hasil seleksi terhadap 40 penderita infark miokard akut yang didapat dan pasien rawat inap dan rawat jalan Rumah Sakit Umum Saiful Anwar Malang berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi, ditemukan sebanyak 23 penderita yang memenuhi syarat dan kemudian dijadikan sampel. Adapun karakteristik sampel terdiri dari 15 penderita laki-laki (62,2%) dengan usia rata-rata 38 tahun ( $\pm 2,76$ ) dan sebanyak 8 penderita perempuan (27,8%) dengan usia rata-rata 42 tahun ( $\pm 3,25$ ) seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik Umur Sampel Penderita Prematur Infark Miokard Akut

No	Jenis Kelamin	Rerata $\pm$ SEM (tahun)	Frekuensi
1	Pria	38 $\pm$ 2,76	15 (62,2%)
2	Wanita	42 $\pm$ 3,25	8 (27,8%)

Keterangan:

Dari 23 penderita premature infark miokard akut yang diperiksa terdiri dari 15 orang (62,2%) laki-laki, 8 orang (27,8%) perempuan.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa jenis kelamin juga berpengaruh terhadap konsentrasi homosistein plasma. Penelitian menunjukkan bahwa homosistein plasma puasa pada kelompok laki-laki lebih tinggi dibanding perempuan sehat. Peneliti lain juga menemukan bahwa konsentrasi homositein plasma puasa pada laki-laki meningkat sebanding dengan meningkatnya usia, hal ini dihubungkan dengan penurunan konsentrasi vitamin B6, vitamin B12 dan asam folat (2).

Pada penderita perempuan kriteria usia dibatasi pada kelompok premenopause, oleh karena adanya beberapa penelitian yang menunjukkan pengaruh hormon estrogen terhadap metabolisme homosistein, walaupun mekanismenya masih belum jelas. Ditemukan konsentrasi homosistein plasma postmetionine pada wanita sehat secara signifikan lebih tinggi pada kelompok posmenopause di banding kelompok premenopause (3).

### Karakteristik hasil pemeriksaan laboratorium.

Setelah dilakukan pemeriksaan khusus laboratorium darah dari 23 penderita diatas, didapatkan hasil karakteristik pemeriksaan laboratorium seperti terlihat pada Tabel 2. Gambaran hasil laboratorium menunjukkan bahwa sebanyak 5 penderita (21,7%) dengan hiperhomosistein total ( $1,5 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$ ), 9 penderita (39,1%) dengan hiperkolesterol ( $247,56 \pm 12,27 \text{ mg/dl}$ ), 7 penderita (30,4%) dengan hiperLDL ( $177 \pm 10,68 \text{ mg/dl}$ ) dan 3 penderita (13%) dengan hipoLDL ( $33,67 \pm 5,49$ ). Hal ini menunjukkan bahwa ada beberapa faktor risiko (multifaktorial) aterosklerosis (infark miokard), dan hiperhomosistein merupakan salah satu faktor risiko terjadinya penyakit premature infark miokard akut.

Peningkatan konsentrasi homosistein total plasma dapat terjadi akibat kelainan faktor nutrisi seperti defisiensi vitamin B12 atau defisiensi asam folat yang berperan sebagai kofaktor dalam jalur remetilasi pada metabolisme metionin atau defisiensi vitamin B6 yang berfungsi sebagai kofaktor dalam jalur transsulfurasi ataupun kelainan faktor genetika akibat adanya mutasi gen CBS dan gen MTHFR yang mengakibatkan defisiensi enzim CBS yang berperan dalam jalur transulfurasi dan defisiensi enzim MTHFR yang berperan dalam jalur remetilasi pada metabolisme metionine (12).

Tabel 2. Karakteristik pemeriksaan laboratorium darah penderita

No	Hasil Pemeriksaan	Rerata $\pm$ SEM	Normal	Frekuensi
1	Hiperhomosistein	$15,1 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$	$< 13,8 \mu\text{mol/L}$	5 (21,7%)
2	Hiperkolesterol	$247,56 \pm 12,27 \text{ mg/dl}$	$< 200 \text{ mg/dl}$	9 (39,1%)
3	Hiper LDL	$177 \pm 10,68 \text{ mg/dl}$	$< 130 \text{ mg/dl}$	7 (30,4%)
4	Hipo HDL	$33,67 \pm 5,49 \text{ mg/dl}$	$\geq 45 \text{ mg/dl}$	3 (13%)
5	Def. Vit B6	$33,63 \pm 2,65 \text{ nmol}$	20-30 nmol	0 (0%)
6	Def. Vit B12	$582,83 \pm 68,32 \text{ pg/ml}$	179-1132 pg/ml	0 (0%)
7	Def. Asam Folat	$9,53 \pm 0,53 \text{ ng/ml}$	3,1 – 12,4 ng/ml	0 (0%)

Keterangan: Didapat penderita dengan hiperhomosistein 5 orang (21,7%), hiperkolesterol 9 orang (39,1%), Hiper LDL 7 orang (30,4%), Hipo HDL 3 orang (13%).

Oleh karena penelitian ini bertujuan untuk mencari faktor mutasi gen CBS dan mutasi gen MTHFR pada penderita Prematur Infark Miokard Akut akibat peningkatan konsentrasi homosistein plasma, maka pengaruh faktor kelainan nutrisi harus dikoreksi dalam keadaan normal. Demikian pula faktor risiko konvensional lainnya seperti hiperlipidemi. Dengan demikian tahap berikut dan penelitian ini adalah

memilih sampel/penderita yang memiliki konsentrasi homosistein total plasma tinggi, serta konsentrasi vitamin B6, vitamin B12, asam folat dan fraksi lipid dalam keadaan normal. Dan setelah dilakukan seleksi didapatkan 5 penderita (21,7%) yang memenuhi kriteria tersebut, seperti yang terlihat pada tabel 3.

Tabel 3. Karakteristik pemeriksaan laboratorium darah 5 penderita dengan hiperhomosisteinemi

No	Hasil Pemeriksaan	Rerata $\pm$ SEM	Normal	Frekuensi
1	Homosistein total	$15,1 \pm 0,9 \mu\text{mol/L}$	$< 13,8 \mu\text{mol/L}$	Meningkat
2	Kolesterol total	$180 \pm 4,40 \text{ mg/dl}$	$< 200 \text{ mg/dl}$	Normal
3	Kolesterol LDL	$93,8 \pm 21,61 \text{ mg/dl}$	$< 130 \text{ mg/dl}$	Normal
4	Kolesterol HDL	$48,4 \pm 1,47 \text{ mg/dl}$	$\geq 45 \text{ mg/dl}$	Normal
5	Vitamin B6	$35,06 \pm 5,27 \text{ nmol}$	20-30 nmol	Normal
6	Vitamin B12	$467,6 \pm 92,65 \text{ pg/ml}$	179-1132 pg/ml	Normal
7	Asam Folat	$8,28 \pm 1,01 \text{ ng/ml}$	3,1 – 12,4 ng/ml	Normal

Keterangan : Terdapat peningkatan kadar homosistein total plasma, sedangkan kolesterol total, LDL, HDL, vitamin B6, vitamin B12 dan asam folat dalam keadaan normal

Gambaran karakteristik hasil pemeriksaan laboratorium di atas memperkuat pendapat bahwa peningkatan kadar homosistein plasma merupakan faktor risiko terjadinya penyakit kardiovaskuler. Hal ini sesuai dengan penemuan para penelitian sebelumnya, meta analisis terhadap 27 penelitian homosistein pada penyakit aterosklerosis vaskuler menyimpulkan bahwa peningkatan homosistein merupakan faktor risiko independen untuk

aterosklerosis dimana sekitar 10% dari populasi penyakit arteri koroner memperlihatkan risiko akibat homosistein (5,8).

Hubungan antara homosistein terhadap MI dan stroke dan menemukan bahwa peningkatan risiko MI dan stroke berhubungan secara langsung dengan homosistein total. Korelasi linier menunjukkan bahwa risiko meningkat sebesar 6-7% setiap peningkatan 1  $\mu\text{mol/L}$ , homosistein total (3). Demikian pula

ditunjukkan bahwa 7% dari 271 penderita infark miokard yang diobservasi diakibatkan oleh hiperhomosistenemia. Laki-laki dengan kadar homosistein plasma 12% diatas batas normal mempunyai kemungkinan tiga kali lebih banyak terjadinya risiko infark miokard (13).

#### Isolasi dan elektroforesis DNA total.

Pada tahap berikutnya dilakukan pemeriksaan isolasi DNA total dan sampel darah kelima penderita

dengan hiperhomosistein, menggunakan metode Shirakawa (2000). Dan untuk mengetahui kemurnian/kualitas hasil isolasi DNA total dilakukan pengukuran OD (*Optical Density*) menggunakan spektrofotometri UV *double beam/visual* U-2000 pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Kemudian dilakukan perhitungan kualitas DNA dengan membandingkan hasil OD 260/280, seperti yang terlihat dalam tabel 4.

Tabel 4. Hasil pembacaan OD dan perhitungan kemurnian DNA

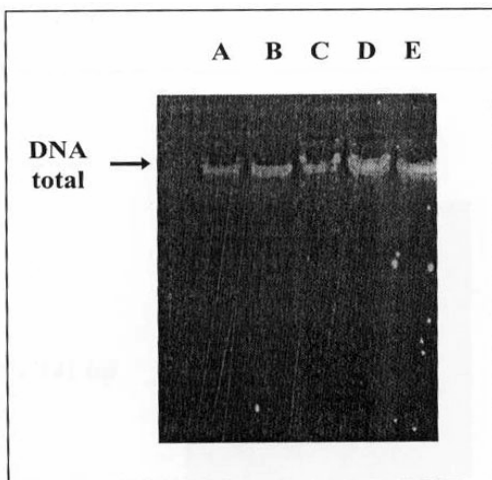
No	Sampel	OD		Kualitas DNA (260/280)
		260	280	
1	A	0,098	0,053	1,85
2	B	0,083	0,044	1,87
3	C	0,099	0,054	1,83
4	D	0,072	0,038	1,89
5	E	0,051	0,026	1,96
Rerata ± SEM				1,88 ± 0,05

Keterangan: Semua sampel DNA total memiliki kemurnian yang baik dengan Rerata 1,88 ± 0,05 (Standar 1,8 – 2).

Dari perhitungan kemurnian/kualitas DNA total pada tabel 4, diperoleh hasil bahwa DNA total ke lima sampel diatas menunjukkan kemurnian/kualitas DNA yang memadai ( $1,88 \pm 0,05$ ), sesuai dengan ketentuan kemurnian DNA yang layak untuk amplifikasi yaitu antara 1,8 — 2,0. Untuk mengetahui apakah hasil isolasi DNA yang dilakukan berhasil atau tidak, maka dilakukan elektroforesis dengan gel agarose untuk melihat fragmen DNA yang kemudian dilakukan visualisasi dengan menggunakan UV-transilluminator dan di foto dengan kamera Polaroid DS-40. Gambar 1 menunjukkan bahwa hasil isolasi DNA total dan kelima sampel tersebut berhasil, dengan ditandai terbentuknya pita pada hasil foto.

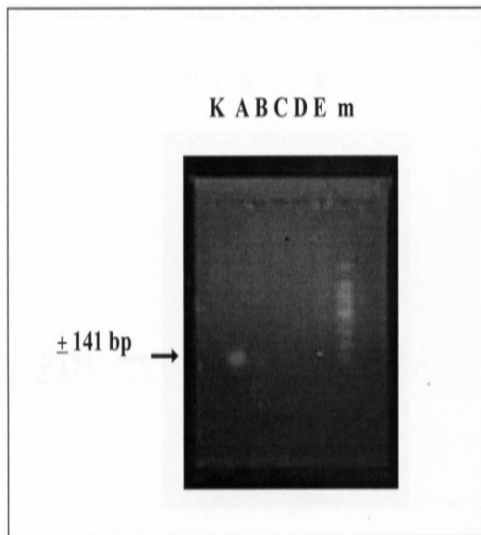
#### Deteksi mutasi gen CBS dan gen MTHFR dengan amplifikasi PCR

Pemeriksaan ini bertujuan untuk mengetahui adanya gambaran mutasi gen CBS dan gen MTHFR pada DNA penderita hiperhomosisteinemi dengan cara melakukan amplifikasi DNA menggunakan alat PCR dan DNA primer sesuai dengan jenis mutasinya. Pada penelitian ini dilakukan deteksi mutasi gen CBS pada ekson 3 (G374A), ekson 7 (C770T), ekson 8 (T833C) dan mutasi gen MTHFR (C677T). Sebelumnya dilakukan optimalisasi metode yang bertujuan untuk menentukan kondisi PCR yang optimal untuk masing-masing jenis mutasi, baru kemudian dilakukan amplifikasi DNA total sampel peridderita (A, B, C, D dan E) serta kontrol sehat dan menggunakan DNA marker 200 bp. Setelah dilakukan visualisasi hasil elektroforesis amplifikasi DNA dengan menggunakan DNA primer sesuai dengan jenis mutasi masing-masing di dapatkan gambaran sebagai berikut:



Gambar 1. Hasil elektroforesis DNA total sampel

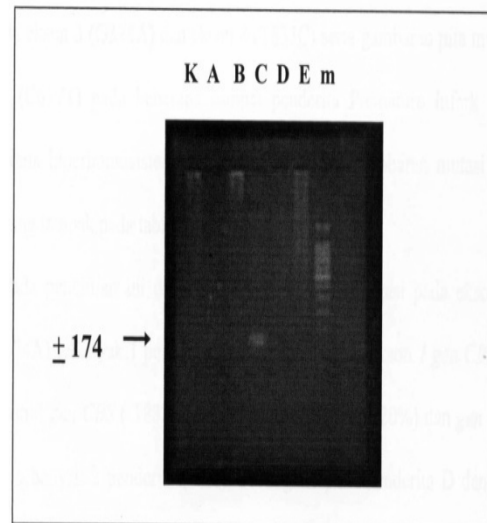
Keterangan : (A, B, C, D dan E) dengan gel agarose 1%. Tampak gambaran pita DNA total pada semua sampel.



**Gambar 2. Hasil elektroforesis dan amplifikasi ekson 3 Gen CBS (G37AA)**

Keterangan : Pada sampel A tampak 1 pita sebesar  $\pm 141$  bp. Sedangkan pada sampel yang lain (K, B, C, D, dan E) tidak ditemukan gambaran pita.

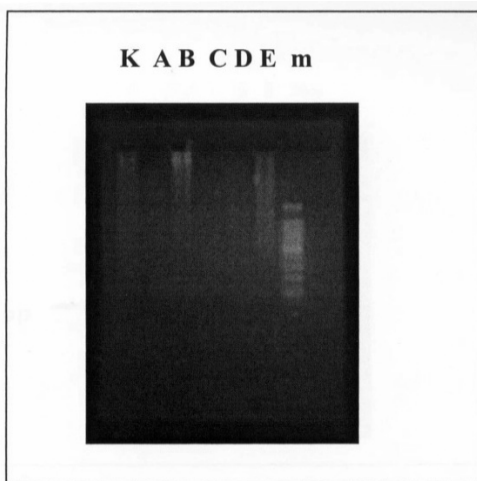
K : kontrol, A, B, C, D, E : sampel, m marker DNA 200 bp.



**Gambar 4. Hasil elektroforesis dan amplifikasi ekson 8 Gen CBS (T833C).**

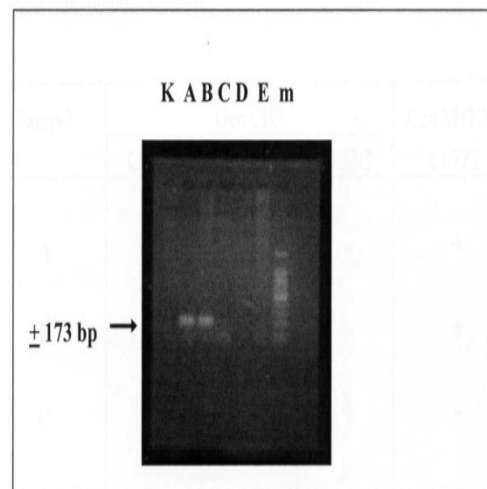
Keterangan : Pada sampel C tampak 1 pita sebesar  $\pm 174$  bp. Sedangkan pada sampel yang lain (K, A, B, D, dan E) tidak ditemukan gambaran pita/band.

K : kontrol, A, B, C, D, E : sampel, m:marker DNA 200 bp.



**Gambar 3. Hasil elektroforesis dan amplifikasi ekson 7 Gen CBS (C770T).**

Keterangan : Tidak ditemukan adanya gambaran pita pada semua sampel (K, A, B, C, D dan E). K: kontrol, A, B, C, D, E: sampel, m: marker DNA 200 bp.



**Gambar 10. Hasil elektroforesis dan amplifikasi Gen MTHFR(C677T)**

Keterangan : Pada sampel A dan B tampak 2 pita sejajar pada  $\pm 173$  bp. Sedangkan pada sampel yang lain (K, C, D, dan E) tidak ditemukan gambaran pita.

K: kontrol, A, B, C, D, E:sampel, m:marker DNA 200 bp.

Dari gambar 2, 3 dan 4 menunjukkan adanya gambaran pita mutasi gen CBS pada ekson 3 (G37AA) dan ekson 8 (T833C) serta gambaran pita mutasi gen MTHFR (C677T) pada beberapa sampel penderita Premature Infark Miokard Akut karena hiperhomosisteinemi. Adapun distribusi gambaran mutasi tersebut seperti yang tampak pada tabel 5.

Pada penelitian ini didapatkan gambaran pita mutasi pada ekson 3 gen CBS (G37AA) sebanyak 1 penderita (20%), mutasi pada ekson 7 gen CBS

mutasi pada ekson 8 gen CBS (T833C) sebanyak 1 penderita C (20%) dan gen MTHFR (C677T) sebanyak 2 penderita (40%). Sedangkan pada penderita D dan E tidak ditemukan gambaran pita mutasi gen, hal ini tidak berarti bahwa tidak ada kelainan mutasi gen pada penderita tersebut, kemungkinan letak mutasi gen terdapat pada tempat yang lain dari gen CBS atau gen MTHFR.

Tabel 5. Distribusi gambaran mutasi gen CBS dan gen MTHFR pada penderita dengan hiperhomosisteinemi

No	Sampel	Gen CBS			Gen MTHFR
		G374A	C770T	T833C	C677T
1	A	+	-	-	+
2	B	-	-	-	+
3	C	-	-	+	-
4	D	-	-	-	-
5	E	-	-	-	-
6	K	-	-	-	-

Keterangan: Hasil (+) ditandai dengan terbentuknya pita, berarti terdapat mutasi gen dan hasil (-) tidak terbentuk pita, berarti tidak terdapat mutasi. A, B, C, D dan E; sampel penderita, K, kontrol sehat

## DISKUSI

Sebelumnya para peneliti telah menemukan 17 mutasi gen CBS yang berhubungan dengan peningkatan homosistein total plasma (14). Defisiensi enzim CBS merupakan kelainan genetik yang sering dijumpai sebagai penyebab hiperhomosisteinemi dan kelainan gen CBS merupakan kelainan autosomal resesif yang diturunkan dan orang tua, dalam bentuk homozygote (homosistinuria) atau heterozygote (hiperhomosistein) carier. Homozygote trait terjadi pada 1 dalam 200000 kelahiran dan berhubungan dengan peningkatan konsentrasi plasma homosistein diatas 400  $\mu\text{mol/L}$ . Pada heterozygote kadar homosistein plasma sekitar 20-40  $\mu\text{mol/L}$ , kira-kira 2-4 kali diatas normal (13).

Beberapa mutasi gen CBS pada orang Italia penderita homosistinuria. Mutasi tersebut ditemukan pada ekson 3 basa ke 374 dimana terjadi perubahan basa G→A (G374A) sehingga menyebabkan perubahan arginin menjadi glutamat, pada posisi 125 (R125Q), dan pada ekson 7 basa ke 770 terjadi perubahan C→T (C770T) sehingga menyebabkan perubahan treonin menjadi metionin pada posisi 257 (T257M) (28). Demikian pula, pada tahun 1993, ditemukan mutasi gen CBS pada ekson 8 basa ke 833 terjadi perubahan basa T→C (T833C) sehingga menyebabkan perubahan isoleusin menjadi treonin pada posisi 278 (I278T) (15).

Defisiensi asam folat dan vitamin B12 yang diperlukan sebagai kofaktor dalam jalur remetilisasi metabolisme metionine, juga dapat menyebabkan konsentrasi homosistein meningkat, demikian pula

defisiensi vitamin B6 yang diperlukan sebagai kofaktor dalam jalur transsulfurasi (16,17).

Dikemukakan bahwa suatu bentuk termolabil MTHFR berhubungan dengan peningkatan konsentrasi homosistein total plasma dan meningkatkan risiko serta tingkatan penyakit jantung koroner. Tidak ada hubungan langsung antara mutasi gen MTHFR dengan risiko infark miokard akan tetapi bila disertai dengan konsentrasi folat plasma yang rendah akan berhubungan dengan peningkatan yang moderat dan risiko infark miokard meskipun secara statistik tidak signifikan. Disimpulkan pula bahwa konsumsi folat yang tinggi dapat menstabilkan enzim MTHFR sehingga hanya mengakibatkan efek yang kecil terhadap tingkat konsentrasi homosistein total plasma (18). Ditemukan bahwa mutasi gen MTHFR (C677T) menyebabkan mild hiperhomosisteinemia akan tetapi tidak meningkatkan risiko penyakit kardiovaskuler karena tidak mempunyai hubungan kausal dengan patogenesis penyakit vaskuler (19). Penelitian lain melaporkan bahwa tidak ada bukti-bukti yang menghubungkan mutasi gen MTHFR (C→T 677), CBS (G→A 919) atau CBS (T→C 833) dengan Infar miokard pada orang Afrika-Amerika (20). Masih belum ada penelitian yang secara spesifik dalam mengidentifikasi hubungan antara kelainan genetik gen CBS maupun gen MTHFR dengan status faktor-faktor nutrisi seperti asam folat, vitamin B6 dan vitamin B12 (18,19).

Mutasi gen CBS Homozygote merupakan mutasi yang sering menyebabkan homosisteinuria. Mutasi gen CBS menyebabkan penurunan afinitas terhadap beberapa substrat seperti pyridoksal fosfat,

serine dan homosistein (18). Diperkirakan bahwa frekuensi poin mutasi gen CBS sebesar 1/20.000 sampai dengan 1/200.000 dan 30-40% individu dengan penyakit premature berupa poin mutasi gen CBS heterozygote. Namun demikian genotype CBS tidak mudah diprediksi berdasarkan aktivitas enzim dan perlu dilakukan penelitian yang menghubungkan mutasi gen CBS dengan konsentrasi homosistein dan risiko penyakit vaskuler (21).

Sepuluh mutasi yang berbeda pada gen MTHFR yang telah diidentifikasi dan isolasi cDNA. Sembilan diantaranya menghasilkan mutasi yang bersifat termostabil dan satu diantaranya yaitu mutasi transisi C677T menghasilkan varian enzim MTHFR yang bersifat termolabil (12). Inaktivasi panas pada suhu 46°C membedakan antara enzim MTHFR mutan dengan yang normal. Dan enzim akan bersifat sangat termolabil ketika aktifitasnya berkurang hingga 20% setelah pemanasan pada suhu 46°C.

Beberapa penelitian menunjukkan sejauhmana hubungan antara MTHFR polymorphism dengan risiko Infark Miokard. Lievers, et al, 2001, melakukan seleksi terhadap 60 pasien kardiovaskuler dan 111 kontrol, menemukan 15% dari penderita dan 5% dari kontrol merupakan homozygote termolabil MTHFR polymorphism (14) melaporkan bahwa homozygote termolabile MTHFR polymorphism berhubungan dengan hiperhomosistein hanya jika konsentrasi folat rendah (18). Dan peneliti lain melaporkan bahwa tidak ditemukan peningkatan risiko Infark Miokard yang hanya disebabkan karena homozygote MTHFR polymorphism. Kajian meta analisis pada penderita penyakit jantung koroner dan disimpulkan bahwa individu dengan genotif MTHFR 677TT secara signifikan memiliki risiko tinggi terhadap penyakit jantung koroner khususnya jika konsentrasi asam folat rendah (7). Hal ini memperkuat hipotesa bahwa gangguan metabolisme asam folat meningkatkan kadar homosistein yang menyebabkan peningkatan risiko CHD. Pada penelitian lain, menunjukkan bahwa adanya homozygote polymorphism tidak

meningkatkan risiko terjadinya thrombosis. Demikian pula Folsom et al, menunjukkan bahwa tidak ada hubungan antara penyakit jantung koroner dengan kelainan mutasi gen MTHFR atau gen CBS (8).

Pada penelitian ini ditemukan 2 penderita (40%) dengan gambaran mutasi MTHFR (C677T) yang menunjukkan adanya kelainan Premature Infark Miokard Akut dengan peningkatan konsentrasi homosistein total tanpa defisiensi asam folat. Hal ini bertentangan dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa hiperhomosistein pada penderita dengan mutasi MTHFR hanya terjadi jika terdapat defisiensi asam folat.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian analisa data dan pembahasan, disimpulkan bahwa:

- Hiperhomosistein merupakan salah satu faktor risiko terjadinya penyakit Prematur Infark Miokard Akut pada sampel orang Indonesia.
- Terdapat gambaran mutasi *gen CBS* (G374A) dan mutasi *gen CBS* (T833C) serta gambaran mutasi *gen MTHFR* (C677T) pada penderita Premature Infark Miokard Akut karena hiperhomosisteinemi pada sampel orang Indonesia.

## SARAN

Dari penelitian ini perlu dikembangkan penelitian lebih lanjut dengan melakukan:

- Analisa susunan DNA dengan menggunakan alat *Automatic DNA Sequencer* untuk melihat letak kelainan mutasi pada basa penyusun *gen CBS* dan *gen MTHFR*.
- Penambahan primer untuk mendeteksi mutasi pada tempat yang lain dari *gen CBS* dan *gen MTHFR*.
- Penelitian pada populasi yang lebih beragam suku dan etnis yang ada di Indonesia untuk melihat sebaran mutasi pada masing-masing suku/ etnis.

## DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Evans RW, Shaten BJ, Hempel JD, Cutler JA, Kuller LH. *Homocysteine and risk of cardiovascular disease in the Multiple Risk factor Interyention Trial*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17:19A7-1953.
2. Chia-Lun Chao, Tsung-Li Kuo, Yuan-The Lee. *Effects of methionine - induced Hyperhomoststeinemia on Endotheliumdependent Vasodilatation and Oxidative Status in healthy adults*. *Circulation*. 2000; 101: 485-490.
3. Christen WG, Ajani UA, Glynn RJ, Hennekens CH. *Blood levels of Homocysteine and increased risk of cardiovascular disease*. *Arch Intern Med*. 2000; 160 : 422-434.
4. Clarke R and Collins R. *Can dietary supplements with folic acid or vitamin B6 reduce cardiovascular risk? Design of clinical trials to test the homocysten hypotesis of vascular disease*. *J of Cardiovascular Risk*. 1998; 5: 249- 255.
5. Michiel LB, Launer LJ, Lindemans J, Hoes AW, Hofman A, Witteman JC, et al. *Homocystein and short-term Risk of Myocardial Infarction an Stroke in the Elderly*. *Arch Intern Med*. 1999; 159 : 38-44.
6. De Jong SC, Stehouwer C, Berg VD, et al. *Determinants of fasting and post methionine homocysteine levels in families predisposed to hyperhomocysteinemia and premature vascular disease*. *arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 1316-1324.



7. Fallest PC, Koch D, Stein JH, McBride PE. *Homocysteine : A New risk factor for atherosclerosis*. American Academy of Family Physician, Vol. 56 : 6; 1997.
8. Folsom AR, Nieto FJ, Mc Govern et al. *Prospective study of coronary heart disease incidence in relation to fasting homocysteine, related genetic polymorphism and B vitamins : the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study*. Circulation. 1997; 98 :204-210.
9. Fonseca V, Guba SC, Fink LM. *Hyperhomocysteinemia and the Endocrine System : Implication for Atherosclerosis and Thrombosis*. Endocrin Rev. 1999; 20(5): 738.
10. Franco RF, Arauo AG, Guerreiro JF, Elton J, Zago MA. *Analysis of the 677 C→T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in different ethnic group*. Thromb Haemost. 1998; 79: 119-121.
11. Frosst RF, Nieto J, Mc Govern PG, Tsa MY, Mallinow MR, Eckfeldt JH, et al. *A candidate genetic risk factor for vascular disease : a common mutation in methyltetrahydrofolate reductase*. Nat. Genet Vol.10; 111-113. 1995
12. Weech GN, Upchurch GR, Loscalzo J. *Hyperhomocystein(e)mia and Atherothrombotic*. Ann NY Acad Sci. 1997; 811: A8-58.
13. Vladisav Stefanovic. *Hyperhomocysteinemia : A risk factor for Cardiovascular Disease*. The Scientific Journ FACTA UNEYERSITATIS. 2000; Vol 7; 1; 7-10.
14. Lievers KJ, Boers GH, Verhoeg P, den Heijer M, Kluijtmans LA, van der Put NM, et al. *A second common variant in the methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene and its relationship to MTHFR enzyme activity, homocysteine, and cardiovascular disease risk*. J Mol Med. 2001; 79(9): 522-528.
15. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, et al. *The 1298A→C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) : in Vitro expression and association with homocysteine*. Atherosclerosis. 2001; 156(2): 409-415.
16. Brouwer DJ, Erik W, Reijngoud D, Van Dormal JJ, Muskiet F. *Plasma folic acid cutoff value, derived from its relationship with homocysteine*. Clinical Chemistry. 1998; 44, 7:1545-1550.
17. Robinson K, Arheart K, Refsum H, et al. *Low circulating folate and vitamin B6 concentrations risk factors for stroke, peripheral vascular disease, and coronary artery disease*. Circulation. 1998; 97: 437-443.
18. Jing Ma, Stampfer MI, Hennekens CH, et al. *Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism, Plasma Folate, Homocysteine and Risk of Myocardial Infarction in US Physicians*. 1996; 94: 2410-2416.
19. Brattstrom L, Willcken D, John Ohrvik, et al. 1998. *Common Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Mutation Leads to Hyperhomocysteinemia but not vascular Disease*. Circulation. 1998; 98: 2520 - 2526.
20. Tsai MY. *Laboratory assessment of mild hyperhomocysteinemia as an independent risk factor for occlusive vascular disease*. Clin Chem. 1996; 42: 492-493.
21. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Howard RK, Haynes WG. *Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans*. Circulation 1999; 100: 1161-1168.