

Identifikasi Gen Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Insersi/Delesi (I/D) pada Penderita Hipertensi di Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang.

Identification Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Gene Insertion/Deletion (I/D) in Patients with Hypertension at dr. Saiful Anwar Hospital Malang

Maulidiyatun Nuril Faizah (NIM. 09620070)

Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maliki Malang

ABSTRAK

Hipertensi merupakan salah satu masalah kesehatan di dunia. Gen *angiotensin converting enzyme* (ACE) berhubungan erat dengan patogenesis hipertensi dan terletak pada kromosom 17 (17q23.3), terdiri dari 26 ekson dan 25 intron. Identifikasi gen ACE dilakukan dengan melihat kehadiran (insersi, I) atau ketidakhadiran (delesi, D) alu *elements* sepanjang 287 bp pada intron 16 dari gen tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi gen ACE insersi / delesi serta mengetahui persentase genotip dan alel pada penderita hipertensi. Penelitian ini menggunakan sampel darah dari 100 pasien hipertensi yang berobat di poli jantung rumah sakit dr. Saiful Anwar Malang. Sampel darah diidentifikasi dengan PCR konvensional. Hasil PCR divisualisasikan menggunakan elektroforesis pada 2,5% gel agarose berupa Pita DNA, dengan ukuran pita untuk alel I yaitu 597 pb dan untuk alel D yaitu 319 pb. Genotipe diklasifikasikan menjadi insersi- insersi (II), insersi – delesi (ID), dan delesi - delesi (DD) berdasarkan positif atau negatif alel insersi/delesi. Hasil identifikasi genotip dihitung persentasenya dan dilanjutkan perhitungan menggunakan hukum Hardy – Weinberg untuk mengetahui persentase alel. Hasil penelitian menunjukkan persentase genotip II adalah 48%, genotip ID 30%, dan genotip DD adalah 22%. Sedangkan persentase alel I adalah 69% dan alel D adalah 31%.

Kata Kunci: Alu *element*, ACE, Intron 16, Hipertensi

ABSTRACT

Hypertension is one of major health problems in the world. Angiotensin - converting enzyme (ACE) gene has been implicated in the pathogenesis of hypertension. The ACE gene is located on chromosome 17 (17q23.3) and comprises 26 exons and 25 introns. Identified a ACE gene involving the presence (insertion, I) or the absence (deletion, D) of an Alu sequence of 287 bp in the intron 16 of the gene. The objective of this study was to identification and detection genotype and allele ACE gene insertion/ deletion in patients with hypertension. Method of this study is descriptive and use 100 hypertensive subjects from dr. Saiful Anwar Hospital Malang. ACE gene identified I/D was examined by conventional PCR. Fragment identification of intron 16 from ACE gene produced PCR 597 bp for insertion allele or 319bp for deletion allele. Genotype was classified as II, ID, or DD based on positive or negative insertion/deletion allele. Result of this study showed frequency of genotype II was higher compared to genotype ID and DD they are 48%, 30%, 22%.

Keyword : Alu *element*, ACE, Intron 16, Hypertension

PENDAHULUAN

HIPERTENSI merupakan salah satu masalah kesehatan di dunia yang sering menimbulkan kematian mendadak. *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment on High Blood Pressure VII (JNC-VII)* melaporkan, hampir 1 milyar orang menderita hipertensi di dunia (Bawazier *et al.*, 2010). Tingginya kasus penyakit hipertensi disebabkan karena penyakit ini dapat memicu terjadinya gangguan jantung. Selain mengakibatkan gagal jantung, hipertensi dapat berakibat terjadinya gagal ginjal maupun penyakit serebrovaskular (Siddharth, 2012).

Berdasarkan penyebabnya hipertensi di dibedakan menjadi dua golongan berdasarkan penyebabnya yaitu, hipertensi primer atau esensial dan hipertensi sekunder. Persentase hipertensi primer yaitu sebesar 95% sedangkan, hipertensi sekunder yang sebagian besar disebabkan oleh kelainan ginjal (hipertensi renal) lebih jarang terjadi. Hipertensi primer disebabkan oleh berbagai faktor diantaranya yaitu faktor genetik dan lingkungan atau interaksi antara keduanya (Davey, 2005).

Faktor genetik yang menyebabkan hipertensi primer tidak dapat diobati, tetapi dapat diberikan pengobatan untuk mencegah terjadinya komplikasi (Lim, 2009). Cara untuk mencegah

perkembangan hipertensi salah satunya yaitu dengan mengidentifikasi gen yang memiliki kecenderungan untuk terjadinya hipertensi. Gen tersebut adalah gen *angiotensin converting enzyme (ACE)*. Gen ACE berperan dalam mengkonversi angiotensin I (peptida inaktif) menjadi angiotensin II (peptida aktif) (Narne *et al.*, 2012).

Ekspresi gen ACE dipengaruhi oleh kehadiran (insersi, I) atau ketidakhadiran (delesi, D) *Alu sequence* sepanjang 287 pb pada intron 16 yang menyebabkan polimorfisme (Tatabaei *et al.*, 2006). Adanya polimorfisme akan menghasilkan tiga genotip yang berbeda yaitu insersi-insersi (II), insersi – delesi (ID), dan delesi - delesi (DD) (Tronvik *et al.*, 2008). Kadar ACE paling tinggi ditemukan pada individu dengan genotip DD, kemudian ID dan paling rendah adalah II (Eisenmann, dkk : 2009).

Alel D dari gen ACE dihubungkan dengan peningkatan konversi Angiotensin I menjadi Angiotensin II yang bersifat vasokonstriktor (Huang *et al.*, 2013). Sedangkan, adanya alel I dari gen ACE dihubungkan dengan peningkatan resiko untuk batuk pada pasien hipertensi yang diberi terapi ACE inhibitor (ACEi) (Nishio *et al.*, 2011 dan Feng Li *et al.*, 2012). Keberadaan genotip II, ID, dan DD penting untuk diidentifikasi karena akan berhubungan dengan pemberian terapi

yang tepat pada pasien hipertensi. Pemberian ACEi pada beberapa pasien hipertensi akan menimbulkan efek batuk (Nishio *et al*, 2011). Hal ini terjadi karena ACE menyebabkan degradasi bradikinin menjadi peptida inaktif, sehingga dengan adanya ACEi bradikinin tetap aktif dan menyebabkan batuk. Oleh karena itu, penting adanya identifikasi gen ACE I/D pada penderita hipertensi di Malang, sehingga dapat memberikan terapi yang tepat pada penderita hipertensi.

KAJIAN TEORI

1. Kandungan Kimia Air Limbah Cucian Beras

METODE PENELITIAN

1. Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah deskriptif yang bertujuan untuk mengidentifikasi gen *angiotensin converting enzyme* (ACE) insersi/ delesi (I/D) pada penderita hipertensi di rumah sakit dr. Saiful Anwar Malang.

2. Subyek Penelitian

Subyek penelitian merupakan pasien hipertensi yang berobat di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang yang didiagnosis menderita hipertensi oleh dokter spesialis jantung dan tidak dibedakan jenis kelamin maupun usia. Penelitian dilakukan setelah mendapat persetujuan dari komite etik Fakultas Kedokteran Universitas

Brawijaya dan Rumah Sakit Saiful Anwar Malang. Pasien hipertensi diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (*informed concern*)

3. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dari subyek penelitian ini yaitu, pasien hipertensi yang berobat di poli jantung rumah sakit dr.Saiful Anwar Malang dengan tekanan darah sistol ≥ 140 mmHg dan diastol ≥ 90 mmHg.

4. Jumlah Sampel

Sampel berupa darah pasien hipertensi sebanyak 100 sampel. Kemudian diekstraksi DNA-nya untuk keperluan penelitian. Pada semua sampel DNA yang didapat, dilakukan genotyping untuk menemukan 3 macam genotipe yaitu II, ID dan DD.

5. Diagnosis Hipertensi

Penentuan kondisi hipertensi dilakukan sesuai dengan rekomendasi *American Heart Disease* (1981) yaitu dengan menggunakan alat pengukur tekanan darah *mercury sphygmomanometer*. Pengukuran dilakukan pada lengan kanan dengan posisi duduk tenang dan santai. Tidak ada pakaian sempit yang melingkari lengan yang akan diperiksa. Lengan yang akan diperiksa diletakkan pada tempat yang setinggi dada. Stetoskop diletakkan pada fosa antekubiti di atas arteri brakialis, 10-15 menit kemudian tekanan diukur.

Tekanan dinaikkan sampai ± 20 mmHg dari tekanan sistolik dugaan sambil dilakukan palpasi pada arteri radialis. Bunyi nada Korotkoff terdengar pada waktu tekanan dalam manset perlahan-lahan diturunkan (dengan kecepatan 2-3 mm untuk tiap satu denyut nadi). Tekanan sistolik adalah bunyi yang pertama kali terdengar (Korotkoff I). Tekanan diastolik adalah saat bunyi hilang (Korotkoff). Seseorang dikategorikan penderita hipertensi apabila tekanan darah sistolik ≥ 140 mmHg dan diiringi tekanan darah diastolik ≥ 120 mmHg.

6. Pengambilan Sampel Darah

Sampel darah didapatkan dari penderita hipertensi di Rumah Sakit dr. Saiful Anwar Malang sebanyak 5 μ l masing-masing subyek yang diambil dari vena jugularis menggunakan venojack dan vacuntainer yang telah diisi EDTA 20% kemudian diberi label sesuai identitas sampel yang diperoleh. Selanjutnya sampel darah disimpan dan ditransportasikan ke laboratorium dengan suhu -20° C untuk diproses ketahap penelitian selanjutnya.

7. Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan *Mini Kit QIAGEN*. Sampel darah yang sebelumnya disimpan, diambil sebanyak 200 μ l dan diisolasi dengan prosedur yang sesuai dengan protokol QIAamp® DNA Blood mini Kit QIAGEN. Selanjutnya DNA

disimpan pada suhu -4° C di dalam microtube eppendorf.

8. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan dengan reaksi berantai polymerase (PCR = *polymerase chain reaction*). Hasil isolasi DNA genom dari sampel darah pasien hipertensi diamplifikasikan menggunakan teknik PCR dengan primer ACE *Applied Biosystems* 111, 112. forward 5'- CCC ATC CTT TCT CCC ATT TCT C -3' dan primer ACE reverse 5'- AGC TGG AAT AAA ATT GGC GAA AC -3'. Komposisi larutan PCR yaitu 8 μ l ddH₂O *Otsuka*, 10 μ l *Master Mix Kit Intron*, 1 μ l DNA whole Genom, dan primer F dan R (20 pmol) masing-masing 0,5 μ l, sehingga volume total 20 μ l.

Kondisi PCR yang digunakan diawali dengan *predenaturation* 95° C selama 15 menit, kemudian *denaturation* selama 45 detik dengan suhu 95° C. *Annealing* $62,3^{\circ}$ C selama 45 detik, *extension* 72° C selama 45 detik, dari tahap *denaturation* sampai *extension* dilakukan pengulangan sebanyak 34 siklus. Kemudian dilanjutkan dengan *post-extension* 72° C selama 10 menit, dan disimpan pada suhu 4° C.

9. Visualisasi Hasil PCR

Visualisasi hasil PCR dilakukan menggunakan elektroforesis horizontal dengan gel agarosa dalam larutan buffer TBE 1X. Sampel yang akan dirunning

elektroforesis, Selanjutnya dilihat dengan *trasiluminator UV (gel doc)*.

10. Uji Konfirmasi Genotip ID

Hasil amplifikasi yang memunculkan satu pita berukuran 319bp dilakukan reamplifikasi (diampifikasi kembali) menggunakan primer spesifik insersi dengan *sequence* primer forward 5'-TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC -3' dan reverse 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA -3'.

11. Analisis Data

Hasil visualisasi PCR dengan gel agarose akan menunjukkan genotip dari setiap sampel. Genotip tersebut antara lain II, ID, dan DD. Ukuran band untuk alel I yaitu 597 pb dan untuk alel D yaitu 319 pb. Apabila hanya muncul satu band dan berukuran 597pb maka genotipnya II atau muncul satu band dan berukuran 319pb maka genotipnya DD. Sedangkan, apabila muncul dua band berukuran 597pb dan pasien hipertensi yang memiliki genotipe II, ID dan DD. Hasil persentase genotip dapat digunakan untuk mencari frekuensi alel dengan menggunakan hukum Hardy – Weinberg yaitu (Salem *and* Batzer, 2009) :

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \text{ dan } p + q = 1$$

p^2 merupakan fraksi dari genotip dominan heterozigot dalam penelitian ini mewakili II (insersi – insersi). $2pq$ merupakan fraksi dari genotip heterozigot ID (insersi – delesi). q^2 merupakan fraksi

genotip homozigot resesif dalam penelitian ini mewakili DD (delesi – delesi) (Elrod *and* Stansfield, 2007).

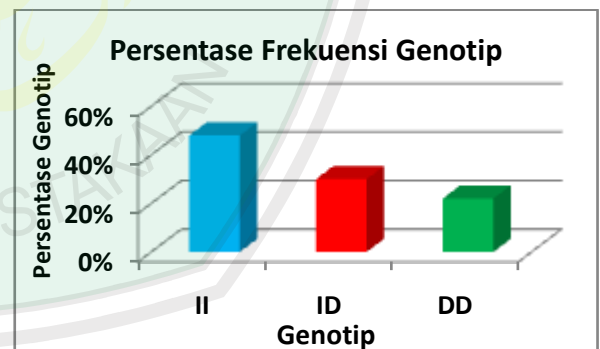
p dan q dalam perhitungan diatas melambangkan alel, dimana p dianggap sebagai alel I (insersi) dan q dianggap sebagai alel D (delesi) (Salem *and* Batzer, 2009). Sehingga, rumus menghitung frekuensi alel menjadi :

$$II + 2ID + DD = 1 \text{ dan } I + D = 1$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Frekuensi Genotip

Hasil isolasi DNA dari sampel darah pasien hipertensi setelah diampifikasi menunjukkan persentase frekuensi genotip yang berbeda- beda, adapun hasil persentase genotip tersaji pada grafik di bawah ini :



Grafik di atas menunjukkan persentase frekuensi genotip tampak diagram batang yang berwarna biru merupakan genotip II (insersi – insersi), diagram batang berwarna merah muda merupakan genotip ID (insersi – delesi), dan diagram batang berwarna hijau bergenotip DD (delesi – delesi). Frekuensi genotip II sebanyak 48%, genotip ID

sebanyak 30%, dan genotip DD sebanyak 22% sehingga, frekuensi genotip terbanyak pada pasien hipertensi di rumah sakit dr.Saiful Anwar Malang yaitu genotip II. Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Bawazier *et al* (2010) pada penderita hipertensi di Yogyakarta, dimana genotip II merupakan genotip terbanyak yaitu sebesar 68%, sedangkan ID sebanyak 31,2% dan genotip DD hanya 0,8%.

Hasil perhitungan frekuensi genotip menunjukkan frekuensi genotip II lebih tinggi dibandingkan frekuensi genotip ID maupun DD. Tingginya frekuensi genotip II berpengaruh terhadap kadar ACE serum. Smithies *et al.*, (2000) menjelaskan bahwa kadar ACE serum pada genotip II 300µg/L, genotip ID 400 µg/L, dan genotip DD 500 µg/L. Genotip II memiliki kadar ACE serum yang cenderung stabil. Apabila kadar ACE serum stabil seharusnya tekanan darah juga cenderung stabil. Akan tetapi, pada penelitian ini justru penderita hipertensi yang tekanan darahnya tinggi (di atas batas normal) lebih banyak didominasi oleh genotip II.

2. Frekuensi Alel

Frekuensi alel didapatkan dari data frekuensi genotip yang dihitung menggunakan hukum Hardy - Weinberg. Adapun hasil frekuensi alel I (insersi) dan D (delesi) pada pasien hipertensi di rumah

sakit dr.Saiful Anwar Malang tersaji pada diagram di bawah ini.

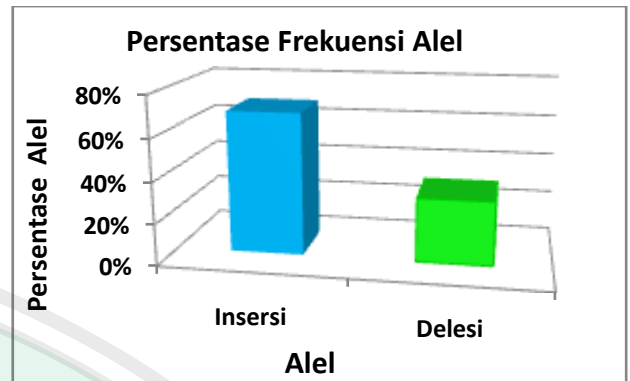


diagram batang berwarna biru menunjukkan alel I dan diagram batang berwarna hijau menunjukkan alel D. Frekuensi alel I sebanyak 69% sedangkan frekuensi alel D sebanyak 31%.

Pada penelitian ini frekuensi alel I menunjukkan nilai persentasi yang lebih tinggi dibandingkan frekuensi alel D. Tingginya frekuensi alel I dari gen ACE erat kaitannya dengan peningkatan resiko untuk batuk pada pasien hipertensi yang diberi terapi ACE inhibitor (ACEi) (Nishio *et al*, 2011 dan Feng Li *et al*, 2012). Hal ini terjadi karena ACE menyebabkan degradasi bradikinin menjadi peptida inaktif, sehingga dengan adanya ACEi bradikinin tetap aktif dan menyebabkan batuk (Nishio *et al*, 2011).

Selain efek batuk yang ditimbulkan akibat pemberian ACEi pada penderita hipertensi yang memiliki alel I, adanya alel I pada intron 16 mengakibatkan kadar ACE serum cenderung stabil (Smithies *et al.*, 2000). Hal ini terjadi karena adanya

splicing pattern pada *alu elements* yang menyisip dalam alel I. *Splicing pattern* membawa *stop codon* sehingga mengakibatkan *premature termination* pada transkrip gen ACE dan menghasilkan protein yang lebih pendek serta kadar ACE serum level cenderung stabil. Oleh karena itu, pada penderita hipertensi yang memiliki alel I kurang cocok apabila diberi terapi ACEi, dan dapat digantikan dengan pemberian terapi obat lainnya, karena sesungguhnya setiap penyakit itu ada obatnya. Allah SWT berfirman dalam Q.S Yunus (10) 57 :

يَا أَيُّهَا النَّاسُ قَدْ جَاءَكُمْ مَوْعِظَةٌ مِنْ رَبِّكُمْ وَشِفَاءٌ لِمَا فِي الصُّدُورِ وَهُدًى وَرَحْمَةٌ لِّلْمُؤْمِنِينَ

Artinya: “Hai manusia, sesungguhnya telah datang kepadamu pelajaran dari Tuhanmu dan penyembuh bagi penyakit-penyakit (yang berada) dalam dada dan petunjuk serta rahmat bagi orang-orang yang beriman”.

Pada ayat di atas kata **الصُّدُور** yang artinya dada memiliki persamaan kata **مابين العنق والبطن** yang artinya sesuatu antara leher dan perut. Antara leher dan perut terdapat organ – organ dalam tubuh manusia, diantaranya yaitu jantung, paru-paru, dan lain-lain. Jantung dan paru-paru merupakan organ yang berperan penting dalam sirkulasi darah. Apabila sirkulasi darah tidak normal dapat menyebabkan

terjadinya hipertensi. Hipertensi merupakan penyakit yang dapat menyebabkan kematian mendadak dan bahkan diderita hampir 1 milyar orang di dunia (Bawazier *et al.*, 2010). Di propinsi Jawa Timur kasus hipertensi menempati peringkat pertama untuk jenis penyakit tidak menular dan peringkat ketiga untuk keseluruhan penyakit (Dinkes Propinsi Jawa Timur, 2011). Oleh karena itu, diketahui bahwa penyakit hipertensi belum ditemukan penyembuhnya dan belum tertangani dengan baik.

Akan tetapi Allah SWT telah menjelaskan pada ayat di atas kata **شِفَاءٌ لِمَا فِي الصُّدُورِ** yang artinya penyembuh penyakit – penyakit (yang berada) dalam dada. Makna penyembuh penyakit - penyakit yaitu ada cara untuk menyembuhkan penyakit. Penjelasan ayat ini juga diperkuat oleh hadits riwayat Bukhari, bahwa rasulullah bersabda :

مَا أُنْزِلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أُنْزِلَ لَهُ شِفَاءٌ

Artinya : “Allah tidak akan menurunkan suatu penyakit, melainkan Dia menurunkan juga obat untuk penyakit itu”.(H.R. Bukhari, 10/134 no. 5678).

Dari penjelasan ayat dan hadits di atas telah jelas diterangkan bahwa setiap penyakit ada obatnya. Makna setiap penyakit ada obatnya dapat bersifat umum sehingga termasuk di dalamnya penyakit - penyakit yang mematikan dan tidak dapat

disembuhkan seperti hipertensi. Perkembangan ilmu penyembuhan untuk penyakit hipertensi hingga saat ini belum ditemukan obat yang benar-benar dapat menyembuhkan secara 100% tetapi, dapat diberikan pengobatan untuk mencegah terjadinya komplikasi (Lim, 2009).

Penyakit hipertensi tidak dapat disembuhkan karena belum ditemukan obatnya. Padahal Allah SWT telah menurunkan obat untuk penyakit tersebut, akan tetapi manusia belum dapat menemukan ilmu-Nya, atau Allah SWT belum memberikan petunjuk kepada manusia untuk menemukan obat penyakit itu.

PENUTUP

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Frekuensi genotip II pasien hipertensi di rumah sakit dr.Saiful Anwar Malang sebesar 48%, genotip ID 30%, dan genotip DD 22%.
2. Frekuensi alel pada pasien hipertensi di rumah sakit dr.Saiful Anwar Malang yaitu 69 % untuk alel I dan 31% untuk alel D

DAFTAR PUSTAKA

Bawazier LA, Sja'bani M, Haryana SM, Soesatyo MHNE, Sadewa AH. 2010. Relationship of Angiotensin Converting Enzyme Gene

Polymorphism and Hypertension in Yogyakarta, Indonesia. *Acta Med Indones-Indones J Intern Med.* Vol 42 : 4.

Davey, Patrick. 2005. *At a Glance Medicine.* Jakarta : Erlangga.

Departemen Kesehatan RI. *Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar 2010.* Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2011.

Eisenmann, Joey C., Sarzynski, M.A., Glenn, K., Rothschild, M., Heelan, K.A. 2009. ACE I/D genotype, adiposity, and blood pressure in children. *BioMed Central*.8 (14) : 1-8.

Elrod and Stansfield. 2007. *Genetika.* Erlangga : Jakarta

Feng Li, Y., Zhu, X.M., Liu, F., Xiao, C.S., Bian, Y.F., Li, H., Cai, J., Li, R.S., Yang, X.C. 2012. Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Gene Insertion/Deletion Polymorphism and ACE Inhibitor-Related Cough: A Meta-Analysis. *PlosOne*. 7(6) : 1 – 10.

Huang ,Yi., Li, G., Lan,H., Zhao, G.Y., Huang, C.Z. 2013. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphisms and risk of intracerebral hemorrhage: A meta-analysis of epidemiologic studies. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* 1-7.

Narne, Parimala., Ponnaluri, K.C., Singh, S., Siraj, M., Ishaq, M. 2012. Relationship between angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism, angiographically defined coronary artery disease and myocardial infarction in patients with type 2

diabetes mellitus. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 13(4) :478–486

Nishio, K., Kashiki, S., Tachibana, H., Kobayashi, Y. 2011. Angiotensin-converting enzyme and bradykinin gene polymorphisms and cough: A meta-analysis. *World Journal of Cardiology*. 3(10) : 329 – 336.

Salem, Abdel Halim., Batzer, Mark A.2009. High frequency of the D allele of the angiotensin-converting enzyme gene in Arabic populations. *BioMed Central Research Notes*. 2 (99).

Siddharth KM, Kapur Suman, Ram CVS. 2012. Angiotensin Converting Enzyme Gene Polymorphism and Hypertension: No Ace Yet in the Pack of Cards. *Journal Association of Physicians India*.vol.60 : 9-10.

Smithies, O., H.S. Kim., N. Takashi., M.H.Edgell. 2000. Importance Of Quantitative Genetic Variation in the Etiology of Hypertension. *Kidney International*. 58 : 2265 – 2280.

Tatabaei F.A. Sayed., B.A. Oostra., A. Isaacs., C.M. Van Duijin., J.C.M Witteman. 2006. ACE Polymorphisms. *Circ Res*.98 : 1123-1133