



Hubungan Polimorfisme M235T Gen AGT dengan Inflamasi Pembuluh Darah pada Pasien Hipertensi Esensial

Apriliansi Nur Puspita Sari¹, Tiar M. Pratamawati², Ahmad Fariz Malvi Zamzam Zein²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Swadaya Gunung Jati, ²Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Swadaya Gunung Jati.

aprilianinurps@gmail.com

ABSTRAK

Latar Belakang: Hipertensi menyebabkan 7,5 juta kematian per tahun dan menyumbang sekitar 12,8% dari total seluruh kematian di dunia. Salah satu patogenesis dari penyakit ini adalah gangguan regulasi sistem renin-angiotensin-aldosteron (RAAS) yang diduga diperantarai salah satunya oleh polimorfisme M235T di daerah promoter gen angiotensinogen (AGT). Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa peningkatan tekanan darah dapat terjadi melalui mekanisme inflamasi yang menyebabkan ketidakseimbangan vasokonstriktor dan vasodilator, trombogenesis, dan aktivasi trombosit. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan polimorfisme M235T gen AGT dengan inflamasi pembuluh darah pada pasien hipertensi esensial. **Metode:** Penelitian observasional analitik dengan desain potong lintang yang dilakukan di Puskesmas Plumbon dan melibatkan 50 orang. Data diperoleh dengan cara pemeriksaan menggunakan PCR-RFLP dan pemeriksaan hitung darah lengkap. Analisis data dilakukan dengan metode koefisien kontingensi dan perhitungan rasio prevalensi. **Hasil:** Mayoritas subjek penelitian ini memiliki polimorfisme M235T (94%) dan mengalami inflamasi pembuluh darah (66%). Hasil analisis menunjukkan bahwa secara statistik hubungan antara polimorfisme M235T gen AGT dengan inflamasi pembuluh darah tidak bermakna ($p = 0,218$), tetapi hasil perhitungan rasio prevalensi menunjukkan penderita hipertensi esensial dengan polimorfisme M235T gen AGT berisiko untuk mengalami inflamasi pembuluh darah. (PR = 2,06). **Kesimpulan:** Tidak didapatkan hasil yang bermakna pada hubungan polimorfisme M235T gen AGT dengan inflamasi pembuluh darah pada pasien hipertensi esensial.

Kata Kunci: polimorfisme M235T gen AGT; inflamasi vaskular; PLR, hipertensi.

ABSTRACT

Background: Hypertension causes 7.5 million deaths per year and accounts for around 12.8% of all world deaths. One of the pathogenesis of this disease is the disruption of the regulation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) which is thought to be mediated one of them by the M235T polymorphism in the angiotensinogen gene promoter (AGT) region. Some studies also show that increased blood pressure can occur through inflammatory mechanisms that cause vasoconstrictor and vasodilator imbalances, thrombogenesis, and platelet activation. **Aim:** This study aims to determine the relationship of M235T polymorphism of AGT gene with vascular inflammation in patients with essential hypertension. **Methods:** An analytic observational study with cross sectional design conducted at Puskesmas Plumbon and involved 50 people. Data obtained by PCR-RFLP and complete blood count. Data analysis was performed using the contingency coefficient method and prevalence ratio calculations. **Results:** The majority of study subjects had M235T polymorphisms (94%) and had vascular inflammation (66%). The analysis showed that statistically, the relationship between M235T polymorphism of AGT gene with vascular inflammation was not significant ($p = 0.218$) but the prevalence ratio showed that patients with essential hypertension with M235T polymorphism of AGT gene have a risk of vascular inflammation (PR = 2,06). **Conclusion:** There is no relationship between M235T polymorphism of AGT gene with vascular inflammation.

Keywords: M235T polymorphism of AGT gene; vascular inflammation; PLR; hypertension.

Latar Belakang

Hipertensi merupakan salah satu penyakit tidak menular dengan prevalensi yang cukup tinggi di dunia. Menurut WHO, hipertensi menyebabkan 7,5 juta kematian per tahun dan menyumbang sekitar 12,8% dari total seluruh kematian di dunia dan diperkirakan akan memengaruhi 29% orang dewasa pada tahun 2025.^{1,2} Berdasarkan data Riskesdas 2018, prevalensi hipertensi pada usia lebih dari 18 tahun di Indonesia naik 8,3% dari tahun 2013 yaitu 25,8% menjadi 34,1% dengan Jawa Barat berada di peringkat kedua setelah Kalimantan Selatan.³ Pada tahun 2016, ditemukan 790.382 orang kasus hipertensi dengan jumlah kasus yang diperiksa di Jawa Barat yaitu sebanyak 8.029.245 orang. Penemuan kasus tertinggi di Cirebon yaitu sebanyak 17,18 % dan terendah di Kabupaten Pangandaran yaitu sebanyak 0,05%.⁴

Hipertensi esensial merupakan penyakit yang bukan hanya disebabkan oleh satu macam mekanisme, akan tetapi bersifat multi-faktor, yang timbul akibat dari interaksi dari berbagai macam faktor risiko. Berbagai faktor dan mekanisme tersebut yaitu faktor genetik dan lingkungan, mekanisme neural, renal, hormonal, dan vaskular.⁵

Sistem renin-angiotensin-aldosteron (RAAS) merupakan salah satu regulator utama tekanan darah dan berperan penting dalam patogenesis hipertensi esensial. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa variasi genetik gen penyandi RAAS memiliki hubungan kuat dengan hipertensi esensial. Salah satu gen yang diduga kuat dengan hipertensi esensial adalah gen *angiotensinogen* (*AGT*).^{6,7}

Angiotensinogen adalah protein yang dikeluarkan oleh hati dan ditemukan dalam fraksi α_2 -globulin plasma. Enzim renin memotong *AGT* yang membentuk angiotensin I dan ACE atau kinase II sebagai *dipeptidyl carboxypeptidase* yang dikodekan oleh gen ACE menghasilkan hormon aktif angiotensin II yang menyebabkan vasokonstriksi.⁷ Polimorfisme di daerah promoter gen *angiotensinogen* (*AGT*) dapat mempengaruhi transkripsi *AGT* sehingga dapat meningkatkan tekanan darah.⁸

Terdapat korelasi yang signifikan antara polimorfisme M235T gen *AGT* dengan konsentrasi angiotensinogen plasma dan tekanan darah. Beberapa studi mengatakan bahwa kadar angiotensinogen plasma pada usia dewasa muda yang memiliki orang tua dengan riwayat hipertensi lebih tinggi dibandingkan dengan orang yang tidak memiliki riwayat hipertensi.^{6,9}

Beberapa penelitian menyebutkan terdapat hubungan antara inflamasi dan peningkatan tekanan darah. Peningkatan tekanan darah ini dapat terjadi melalui mekanisme ketidakseimbangan

vasokonstriktor dan vasodilator, trombogenesis dan aktivasi platelet, serta efek langsung dari mediator inflamasi.¹⁰ Penelitian lain mengatakan hipertensi berkontribusi terhadap disfungsi endotel dan inflamasi pada dinding pembuluh darah, dan meningkatkan oksidasi lipoprotein, proliferasi sel otot polos, deposisi matriks ekstraseluler, adhesi sel, dan pembentukan trombus. Dengan demikian, disfungsi endotel mungkin terlibat dalam inisiasi inflamasi vaskular, pengembangan remodeling vaskular, yang merupakan awal dari perkembangan aterosklerosis, dan secara independen terkait dengan peningkatan risiko kardiovaskular.¹¹ Namun, masih tidak jelas apakah inflamasi merupakan penyebab atau efek dari hipertensi.¹² Studi terbaru telah mengatakan bahwa *AGT* terlibat dengan mekanisme peradangan dan penghambatan *in vitro* dari proliferasi sel endotel, migrasi sel dan angiogenesis.¹³ Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk melihat hubungan polimorfisme M235T gen *AGT* dengan inflamasi vaskular pada pasien hipertensi esensial di Indonesia khususnya Cirebon.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain penelitian *cross sectional*. Pengambilan sampel ini dilaksanakan di Puskesmas Plumbon, sedangkan pemeriksaan darah dilaksanakan di Laboratorium Klinik Pramita dan pemeriksaan genetik dilaksanakan di Laboratorium Genetik Fakultas Kedokteran Universitas Swadaya Gunung Jati. Teknik pengambilan sampel menggunakan teknik *purposive sampling* pada pasien hipertensi esensial. Jumlah sampel penelitian sebanyak 50 orang. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Swadaya Gunung Jati.

Pemeriksaan Genetik

Proses ekstraksi DNA sampel dilakukan dengan menggunakan metode spin column. Amplifikasi polimorfisme M235T pada gen *AGT* dilakukan dengan menggunakan primer 5'-CCGTTTGTGC AGGGCCTGGCTCTCT-3' sebagai primer *forward* dan 5'-CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC-3' sebagai primer *reverse*. Reaksi total PCR dilakukan dengan volume akhir 23 µl yang mengandung 5,5 µl ddH₂O, 12,5 µl larutan 2x PCR Master Mix, 1 µl primer *forward*, 1 µl primer *reverse*, dan template DNA sebanyak 3 µl. Larutan PCR ini diamplifikasi dengan menggunakan program *thermal cycler* dengan *initial denaturation* pada 95°C selama 5 menit diikuti dengan 35 siklus *denaturation* pada 95°C selama 60 detik, *annealing* pada 68°C selama 60 detik dan

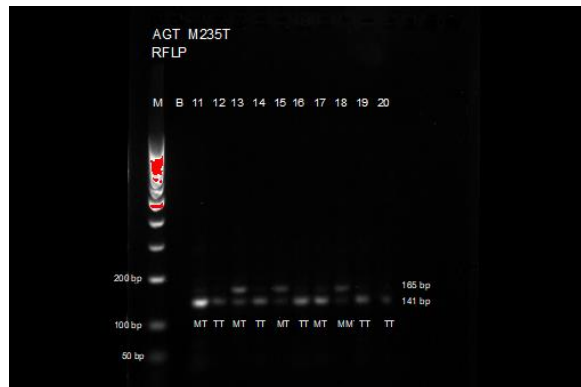
Sari, Hubungan Polimorfisme M235T Gen *AGT*

extension pada 72°C selama 60 detik. *Final extension* dilakukan pada 72°C selama 10 menit. Proses ini akan menghasilkan 165-bp.

Amplikon dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *Thermus thermophilus strain 111* (Tth111I) yang akan memotong di 5'-GACN↓NNGTC-3' dan 3'-CTGNN↑NCAG-5' pada suhu 68°C selama 15 menit. Hasil restriksi akan divisualisasi dengan elektroforesis pada gel agarose 1,5% dengan 1µg/ml gel red. Proses elektroforesis dilaksanakan dalam waktu 90 menit dengan tegangan listrik 80V. Gel hasil elektroforesis kemudian dibaca menggunakan *UV transillumination*.

Hasil yang diharapkan pada *wildtype* tidak akan terpotong sedangkan jika terdapat polimorfisme akan terpotong dengan enzim restriksi, yaitu¹⁴ :

- Normal (genotipe MM) : 165 bp
- Heterozygot (genotipe MT) : 165, 141, 24 bp
- Homozygot (genotipe TT) : 141, 24 bp



Gambar 1. Analisis polimorfisme M235T gen *AGT* dengan agarose gel elektroforesis menunjukkan genotipe MM (165 bp: nomor 18), genotipe MT (165 bp, 141 bp, dan 24 bp (tidak terdeteksi pada gel): nomor 11, 13, 15, dan 17), dan genotipe TT (141 bp dan 24 bp: nomor 12, 14, 16, 19, dan 20). M menunjukkan marker DNA Ladder.

Hasil dan Pembahasan

1. Analisis Univariat

Data penelitian ini diperoleh melalui pemeriksaan langsung pada 50 orang pasien hipertensi esensial yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Analisis deskriptif subjek penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Variabel	Rerata	Standar Deviasi	Median	Min-Maks
Usia	49,06	7,40	48,5	26-60
Awitan hipertensi	37,86	56,259	12,00	1-204
PLR	132,83	37,87	132,42	54 – 209

Tabel 1. Analisis deskriptif subjek penelitian

<http://jurnal.ugj.ac.id/index.php/tumed>

Tabel 1 menunjukkan rerata usia subjek penelitian ini adalah 49,06 tahun, awitan hipertensi rerata adalah 37,86 bulan yang lalu, dan nilai PLR 132,83.

Distribusi frekuensi polimorfisme M235T gen *AGT* diperoleh dari hasil PCR-RFLP, dinyatakan tidak terdapat polimorfisme jika genotipe MM dan terdapat polimorfisme pada genotipe MT dan TT. Pada pemeriksaan penanda inflamasi dinyatakan terdapat inflamasi jika nilai PLR lebih dari 111. Distribusi frekuensi karakteristik subjek penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Variabel	Frekuensi	%
Polimorfisme M235T		
Ada	47	94
Tidak ada	3	6
Inflamasi		
Ada	33	66
Tidak ada	17	34

Tabel 2. Distribusi frekuensi polimorfisme dan inflamasi

Tabel 2 menunjukkan distribusi frekuensi genotipe untuk polimorfisme M235T gen *AGT* diperoleh dari hasil PCR-RFLP, untuk hasil yang diperoleh yaitu MM *wild type* (165 bp), MT heterozigot (165 bp, 141 bp dan 24 bp) dan TT homozigot mutan (141 bp dan 24 bp). Distribusi frekuensi genotipe terlihat pada Tabel 5.

Genotipe	Frekuensi (%)	%
MM	3	6 %
MT	22	44 %
TT	25	50 %

Tabel 3. Distribusi frekuensi genotype

Data pada tabel 3 menunjukkan distribusi frekuensi genotipe pemeriksaan polimorfisme M235T gen *AGT* terdapat genotipe MM sebanyak 3 orang (6%), genotipe MT sebanak 23 sampel (44%), dan genotipe TT sebanyak 25 (50%) sampel.

Distribusi frekuensi alel pada polimorfisme gen *AGT* M235T dapat dilihat pada Tabel 4.

Alel	Frekuensi	%
M	28	28 %
T	72	72 %

Tabel 4. Distribusi frekuensi alel

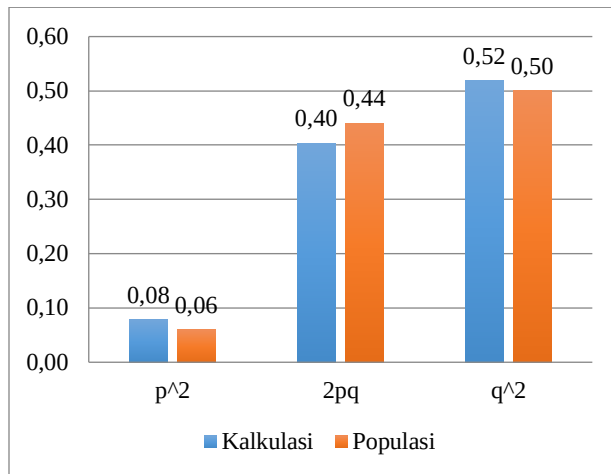
Tabel 4 menunjukkan distribusi frekuensi alel M pada polimorfisme M235T gen *AGT* sebanyak 28 (27%) sedangkan untuk alel T sebanyak 72 (72%).

Berdasarkan distribusi data frekuensi alel, didapatkan frekuensi alel pada populasi adalah sebesar 28 orang (28%) dengan alel M dan subjek yang memiliki alel T sejumlah 72 orang (72%).

Sehingga didapatkan nilai p yaitu 0,28 dan nilai q yaitu 0,72. Distribusi Hardy-Weinberg terlihat pada Tabel 5 dan Gambar 2.

Hardy Weinberg		Kalkulasi				Populasi		
M235T	P	Q	p ²	2pq	q ²	p ²	2pq	q ²
Kasus	0.28	0.72	0.08	0,40	0,52	0.06	0.44	0.50

Tabel 5. Distribusi *Hardy Weinberg*



Gambar 2. Distribusi *Hardy Weinberg* pada polimorfisme M235T gen AGT

Tabel 5 menunjukkan nilai antara distribusi genotype dan distribusi allele untuk polimorfisme M235T gen AGT didapatkan nilai berdasarkan kalkulasi p² sebesar 0.08, 2pq sebesar 0,40 dan q² sebesar 0,52 sedangkan berdasarkan populasi didapatkan nilai p² sebesar 0.06, 2pq sebesar 0,44 dan q² sebesar 0,50.

Gambar 2 menunjukkan distribusi genotype pada polimorfisme M235T gen AGT ini memenuhi *Hardy-Weinberg equilibrium*.

2. Analisis Bivariat

Data polimorfisme M235T dan inflamasi pada pembuluh darah dianalisis menggunakan metode koefisien kontingensi. Metode ini dipilih karena variabel penelitian ini merupakan variabel nominal. Uji hipotesis ini menggunakan aplikasi SPSS versi 22 dan ditunjukkan pada Tabel 6.

		Inflamasi		Total	Nilai p
		Ada	Tidak ada		
Polimorfisme M235T	Ada	N 32	15	47	0,218
	Tidak ada	N 1	2	3	
	Total	N 33	17	50	

Tabel 6. Hasil analisis koefisien kontingensi

Tabel 8 menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan antara polimorfisme M235T gen AGT dengan inflamasi pembuluh darah pada pasien hipertensi esensial pada usia dewasa muda ($p > 0,05$).

Rasio prevalensi polimorfisme M235T gen AGT dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rasio Prevalensi} = \frac{a/(a+b)}{c/(c+d)} = 2,06$$

Dengan demikian, seorang penderita hipertensi esensial yang memiliki polimorfisme M235T lebih berisiko sebesar 2,06 kali lipat untuk mengalami inflamasi pada pembuluh darah,

dibandingkan yang tidak memiliki polimorfisme M235T.

Secara statistik, hubungan antara polimorfisme M235T gen AGT dengan inflamasi pembuluh darah tidak bermakna. Namun, berdasarkan hasil perhitungan *prevalence ratio* menunjukkan penderita hipertensi esensial dengan polimorfisme M235T memiliki risiko sebesar 2,06 kali lipat untuk mengalami inflamasi pada pembuluh darah.

Hubungan antara polimorfisme M235T pada gen AGT dengan hipertensi telah beberapa kali diteliti di berbagai populasi dengan hasil yang berbeda-beda. Pertama, sebuah penelitian di Minnesota, Amerika Serikat, yang dilakukan oleh Fornage (1995).

Penelitian kasus kontrol yang melibatkan 134 orang tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat hubungan antara polimorfisme M235T dengan kejadian hipertensi esensial pada populasi Kaukasian.¹⁵ Hasil ini didukung oleh sebuah penelitian di Perancis yang dilakukan oleh Prat-Larquermin (2012). Penelitian yang melibatkan 61 orang obesitas tersebut mendapati bahwa tidak terdapat hubungan antara polimorfisme M235T dengan kejadian hipertensi esensial pada penderita obesitas.¹⁶ Meskipun penelitian Prat-Larquermin menggunakan populasi orang Kaukasian, namun adanya karakteristik obesitas akan menyebabkan adanya perbedaan hasil dengan dua penelitian sebelumnya.

Hasil berbeda ditunjukkan oleh sebuah penelitian di Romania yang dilakukan oleh Procopciuc (2007). Penelitian dengan desain kasus kontrol yang melibatkan 38 orang tersebut mendapati bahwa terdapat hubungan antara polimorfisme M235T dengan kejadian hipertensi pada populasi Kaukasian yang tinggal di Romania.¹⁷ Sebuah penelitian di Taiwan yang dilakukan oleh Fu-Tien (1997) juga menunjukkan hasil yang berbeda dengan dua penelitian pertama di atas. Penelitian dengan desain kasus kontrol yang melibatkan 151 orang tersebut mendapati bahwa terdapat hubungan antara polimorfisme M235T dengan kejadian hipertensi esensial pada populasi Taiwan.¹⁸

Perbedaan hasil dari jurnal-jurnal sebelumnya dapat disebabkan karena *Minor Allele Frequency*

(MAF) yang berbeda pada tiap ras. Pada penelitian ini, frekuensi alel M didapatkan sebesar 28%, jika dibandingkan dengan data MAF dari dbSNP NCBI, frekuensi alel pada populasi studi ini yaitu 2,8 kali lebih tinggi dibandingkan dengan populasi Vietnam (10%), 1,47 kali lebih tinggi dari populasi Korea (19%), dan 1,4 kali lebih tinggi dari populasi Singapura (20%).¹⁹ Hasil ini dapat menjadi gambaran di Indonesia mengenai prevalensi polimorfisme M235T, inflamasi pembuluh darah, serta frekuensi dari berbagai genotipe dan alel terkait, khususnya untuk masyarakat di Cirebon, Jawa Barat. Belum didapatkan studi yang menilai hubungan polimorfisme M235T dengan inflamasi vaskular.

Simpulan

Mayoritas pasien hipertensi esensial pada penelitian ini memiliki polimorfisme M235T gen *AGT* (94%) dan mengalami inflamasi pembuluh darah (66%) Frekuensi genotipe MM = 6%, genotipe MT = 44%, genotipe TT = 50%, dan frekuensi alel M = 28%, dan alel T = 72%.

Secara statistik, tidak terdapat hubungan antara polimorfisme M235T gen *AGT* dengan inflamasi pembuluh darah pada pasien hipertensi. Secara klinis didapatkan bahwa orang dengan polimorfisme M235T gen *AGT* lebih berisiko mengalami inflamasi pembuluh darah daripada orang tanpa polimorfisme ini.

Daftar Pustaka

1. World Health Organization. Global health observatory data: raised blood pressure [Internet]. WHO raised blood pressure. 2018. Tersedia pada: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/blood_pressure_prevalence_text/en/
2. Munroe PB, Jahangir SNS, Caulfield MJ. Genetics and Genomics of Systemic Hypertension. *Cardiovascular Genetic Genomics*. 2018;723–40.
3. Kementerian Kesehatan RI. Hasil Utama Laporan Riskesdas 2018. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2018.
4. Dinas Kesehatan Jawa Barat. Profil Kesehatan Jawa Barat 2016. Dinas Kesehatan Jawa Barat. 2016.
5. Setiati S, Alwi I, Sudoyo AW, K MS, Setyohadi B, Syam AF. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Vol. 2, Interna Publishing. 2014.
6. Ortlepp JR, Metrikat J, Mevissen V, Schmitz F, Albrecht M, Maya-Pelzer P, et al. Relation between the angiotensinogen (*AGT*) M235T gene polymorphism and blood pressure in a large, homogeneous study population. *Journal of Human Hypertension*. 2003;17(8):555–9.
7. Simonyte S, Kuciene R, Medzioniene J, Dulskiene V, Lesauskaite V. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and high blood pressure in Lithuanian children and adolescents. *BMC Medical Genetics*. 2017;18(1):1–9.
8. Zhang N, Yang L, Cui H, Fu W. Epidemiological Study of *AGT* Gene Polymorphism among Chinese Subjects with Primary Hypertension. *Advances in Pharmacoeconomics & Drug Safety*. 2012;1(2):2–4.
9. Shankarishan P, Borah PK, Mahanta J. Renin-angiotensin system gene polymorphisms and hypertension. *Journal of Association of Physicians of India*. 2018;66(August):79–84.
10. Ghanem FA, Movahed A. Inflammation in high blood pressure: a clinician perspective. *Journal of the American Society of Hypertension*. 2007;1(2):113–9.

11. Savoia C, Sada L, Zezza L, Pucci L, Lauri FM, Befani A, et al. Vascular Inflammation and Endothelial Dysfunction in Experimental Hypertension. *International Journal of Hypertension*. 2011;
12. Dinh QN, Drummond GR, Sobey CG, Chrissobolis S. Roles of Inflammation, Oxidative Stress, and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Biomed Research International*. 2014;
13. Lin J, Chen J, Liu C. AGT M235T variant is not associated with risk of cancer. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2015;16(2):448–52.
14. Shamaa MM, Fouad H, Haroun M, Hassanein M, Hay MAA. Association between the Angiotensinogen (AGT) gene (M235T) polymorphism and Essential Hypertension in Egyptian patients. *Egypt Heart Journal*. 2015;67(1):1–5.
15. Sing CF. Variation at the M235T locus of the angiotensinogen gene and essential hypertension: a population-based case-control study from Rochester, Minnesota. *Human Genetics*. 1995;96:295–300.
16. Prat-larquemin L, Oppert J, Cle K, Hainault I, Basdevant A, Guy-grand B, et al. Adipose Angiotensinogen Secretion, Blood Pressure, and AGT M235T Polymorphism in Obese Patients. *Obesity Research*. 2004;12(3).
17. Procopciuc L, Popescu T, Jebeleanu G, Pop D, Zdrenghea D. Essential arterial hypertension and polymorphism of angiotensinogen M235T gene. *Journal of Cellular Molecular Medicine*. April 2002;6(2):245–50.
18. Fu-Tien C, Kwan-Lih H. Molecular variant M235T of the angiotensinogen gene is associated with Essential Hypertension in Taiwanese. *Journal of Hypertension*. 1997;15(6).
19. National Center of Biotechnology Information. rs699 [Internet]. dbSNP. 2020. Tersedia pada: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs699>