

PERAN POLIMORFISME GEN GAS6 C.834 + 7AA PADA PREEKLAMISIA DAN NORMOTENSIF DI KOTA PALEMBANG

¹ Ariani Susanti, ² Legiran, ³ Yusuf Effendi

^{1,2} Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Indonesia

³ RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang, Indonesia

Email: ariani.plg@gmail.com, legiran@yahoo.com, yusufspog@yahoo.com

Abstrak

Pendahuluan : Preeklamsia (PE) adalah sindrom multi sistemik yang ditandai dengan kerusakan endotel umum, sehingga berdampak negatif pada hampir semua organ wanita preeklamsia, termasuk potensi untuk mempengaruhi terjadinya penyakit kardiovaskular dan ginjal di masa depan bahkan beberapa dekade setelah kejadian penyakit. Polimorfisme GAS6 akan menghasilkan perbedaan dalam tingkat GAS6 yang dapat mempengaruhi regulasi atherogenesis atau aktivasi sel endotel dan sel otot polos pembuluh darah oleh protein ini. Tujuan : Membuktikan peran polimorfisme gen GAS6 c.834 + 7AA pada preeklamsia di kota Palembang dengan mengidentifikasi polimorfisme gen GAS6 c.834 + 7AA pada kehamilan preeklamsia dan normotensif di Kota Palembang dan menganalisis hubungan antara polimorfisme gen GAS6 c.834 + 7AA dengan preeklamsia di Kota Palembang. Metode : Desain penelitian kuantitatif observasional analitik dengan desain *case control study* dengan Teknik *consecutive sampling* (1:2) yang melibatkan 117 sampel yang memenuhi kriteria inklusi (39 sampel sebagai *case group* dan 78 sampel sebagai *control group*). Sampel darah dan data dilakukan di Laboratorium Bioteknologi FK Unsri Palembang. Analisis statistik tes normalitas data menggunakan Uji Shapiro-Wilk pada *case group* (39 sampel), dan Uji Kolmogorov-Smirnov pada *control group* (78 sampel), Uji Chi Square digunakan untuk menganalisis hasil observasi terdapat hubungan yang signifikan atau tidak dengan nilai kemaknaan jika $p < 0,05$ dan menggunakan Uji Kolmogorov- Smirnov (uji alternatif table 2 x K) jika $p > 0,05$ dan dilakukan Analisa *Odds Ratio* (OR) untuk mengukur kekuatan hubungan antara variabel yang diuji. Hasil penelitian : Dari hasil analisa univariat di dapatkan karakteristik responden usia pada PE mean 28,64 + 7,41 (16-43), normotensif median, minimum-maximum 27,00 (16-40); gravida median, minimum-maximum 3,0 (1-7), normotensif 2,00 (1-6); SBP pada PE 150,00 (140-220), normotensif 110,02 (80-130); DBP pada PE 100,00 (90-130), normotensive 70,00 (60-90). Hasil Analisa Bivariat pada genotip gen GAS6 teridentifikasi polimorfisme gen GAS6 c.834+7AA pada PE (9,1%) pada normotensif (2,6%), secara statistik tidak signifikan ($p > 0,05$). Analisa *Odds Ratio* (OR) didapatkan kekuatan hubungan antara variable dengan nilai OR = 0,423 95% CI 0,129-1,381. Kesimpulan : Terdapat hubungan yang tidak signifikan antara polimorfisme gen GAS6 c.834 + 7AA dengan PE di Kota Palembang ($p = 0,149$; OR=0,423, 95% CI =0,129-1,381) artinya alel A merupakan gen kandidat dengan probabilitas untuk PE sebesar 29,7% atau berperan) protektif untuk varian GAS6 pada PE.

Kata Kunci: preeklamsia; GAS6; polimorfisme

Abstract

*Introduction : Preeclampsia (PE) is a multi-systemic syndrome characterized by generalized endothelial damage, so that it has a negative impact on almost all organs of preeclamptic women, including the potential to influence the occurrence of cardiovascular and renal disease in the future even decades after the disease event. GAS6 polymorphisms will result in differences in GAS6 levels that may influence the regulation of atherogenesis or activation of endothelial cells and vascular smooth muscle cells by this protein. Objective: To prove the role of GAS6 c.834 + 7AA gene polymorphisms in preeclampsia in Palembang city by identifying GAS6 c.834 + 7AA gene polymorphisms in preeclampsia and normotensive pregnancies in Palembang City and analyzing the relationship between GAS6 c.834 + 7AA gene polymorphisms with preeclampsia in Palembang City. Methods: Analytical observational quantitative research design with a case control study design with consecutive sampling technique (1:2) involving 117 samples that met the inclusion criteria (39 samples as the case group and 78 samples as the control group). Blood samples and data were carried out at the Biotechnology Laboratory of Medical Faculty Unsri Palembang. Genomic DNA using the blood genomic DNE Extraction Kit and PCR-RFLP was performed to measure SNPs genotype GAS6 c.834+7AA in intron 8, using the restriction enzyme *Acinetobacter lwoffii* N 1 (AlwN 1) following the Alshami' I et.al 2017 method with the PCR protocol. Statistical analysis of the data normality test used the Shapiro-Wilk test in the case group (39 samples), and the Kolmogorov-Smirnov test in the control group (78 samples), Chi Square test was used to analyze the results of observations that there was a significant relationship or not with the significance value if $p < 0.05$ and using the Kolmogorov-Smirnov test (table 2 x K alternative test) if $p > 0.05$ and an Odds Ratio (OR) analysis was carried out to measure the strength of the relationship between the variables tested. Results : From the results of univariate analysis, it was found that the characteristics of the respondents were age at mean PE 28.64 + 7.41 (16-43), normotensive median, minimum-maximum 27.00(16-40); median gravida, minimum-maximum 3.0 (1-7), normotensive 2.00 (1-6); SBP at PE 150.00 (140-220), normotensive 110.02 (80-130); DBP at PE 100.00 (90-130), normotensive 70.00 (60-90). The results of Bivariate Analysis on the GAS6 gene genotype identified the GAS6 gene polymorphism c.834+7AA in PE (9.1%) in normotensive (2.6%), statistically insignificant ($p > 0.05$). Odds Ratio (OR) analysis found the strength of the relationship between variables with OR value = 0.423 95% CI 0.129-1.381. Conclusion : There is an insignificant relationship between GAS6 gene polymorphism c.834 + 7AA with PE in Palembang City ($p = 0.149$; OR = 0.423, 95% CI = 0.129-1.381) meaning that allele A is a candidate gene with a probability for PE of 29,7% or plays a protective role for the GAS6 variant in PE.*

Keywords: preeclampsia; GAS6; polymorphisms

Pendahuluan

Preeklamsia (PE) adalah gangguan yang kompleks dan serius mempengaruhi 5-8% wanita hamil di seluruh dunia (Ye et al., 2017). PE merupakan penyebab mortalitas dan morbiditas ibu dan bayi di seluruh dunia yang mempengaruhi 2-8% dari semua kehamilan di Timur, Barat dan negara berkembang (Pierik et al., 2020) dan Zang, N. et.al 2020). PE adalah salah satu penyebab utama kematian ibu, sekitar 50.000-60.000 kematian setiap tahun di seluruh dunia dan dikaitkan dengan peningkatan risiko ibu dan anaknya mengembangkan komplikasi kardiovaskular dan *Diabetes Mellitus* di kemudian hari (Gathiram & Moodley, 2016). Di Indonesia pada tahun 2019 Angka Kematian Ibu (AKI) masih tinggi, yaitu 305 per 100.000 kelahiran hidup (Susiana, 2019), PE dan eklamsia menjadi penyebab mortalitas paling banyak kedua (CIMSA, 2019). Beberapa faktor demografi, genetik, makanan dan lingkungan, serta biomarker ibu yang bersirkulasi telah dikaitkan dengan PE. Faktor demografis seperti ras dan etnis ibu dapat berperan dalam PE. Polimorfisme genetik spesifik telah diidentifikasi pada PE, usia ibu, paritas, pendidikan dan status sosial ekonomi dapat terlibat dalam PE (Zhang, Tan, Yang, & Khalil, 2020). Selanjutnya, PE adalah sindrom multi-sistemik dengan satu-satunya pengobatan yang diketahui adalah persalinan janin dan plasenta (Gathiram & Moodley, 2016).

Growth Arrest-Specific 6 (GAS6) merupakan salah satu anggota keluarga protein *Vitamin K Dependent* (VKD) yang memainkan banyak peran penting pada patofisiologi autoimun, inflamasi, metabolik disorder dan aterosklerosis serta pada pemeliharaan vaskular dan homeostatis selular. GAS6 disarankan sebagai anti inflamasi, saat *Endothelial Cells* (Ecs) istirahat dan selesai ketika ECs diaktifkan sebagai *pro-inflammatory stimuli*. Kondisi ini memperlihatkan bahwa GAS6 memicu aktivasi ECs sebagai respon terhadap inflamasi in vitro dan in vivo yang meningkatkan interaksi antara platelet, ECs, leukosit selama inflamasi. Studi terbaru memperlihatkan level GAS6 berubah pada pasien preeklamsia, tetapi hasil penelitian tersebut masih menjadi kontroversi (Ozakupinar et al., 2016).

1. Preeklamsia

Preeklamsia merupakan suatu sindroma spesifik pada kehamilan berupa berkurangnya perfusi plasenta akibat vasospasme dan aktivasi endotel yang akhirnya dapat mempengaruhi seluruh sistem organ, ditandai dengan hipertensi dan proteinuria pada pertengahan akhir kehamilan atau diatas 20 minggu kehamilan (Keman, 2014).

Faktor-faktor risiko yang berhubungan dengan preeklamsia antara lain:

- a) Obesitas dan dislipidemia
- b) Terpapar oleh vili korionik untuk pertama kalinya, yaitu pada primigravida dan primipaternitas.
- c) Terpapar vili korionik yang berlebihan atau hiperplasentosis, misalnya pada mola hidatidosa, kehamilan multipel, diabetes mellitus, hidrops fetalis, makrosomia.
- d) Umur yang ekstrim (terlalu tua atau terlalu muda)
- e) Riwayat keluarga pernah preeklamsia / eklamsia maupun hipertensi.

f) Penyakit-penyakit ginjal dan kardiovaskuler termasuk hipertensi yang sudah ada sebelum hamil.

Preeklamsia bukanlah suatu “*one disease*” namun melibatkan seluruh aspek *maternal, plasental* dan *fetal*. Sementara itu, etiologinya dikelompokkan menjadi 4 kelompok utama, yaitu genetik, imunologi, nutrisi dan infeksi, serta interaksinya didukung oleh faktor lingkungan (Keman, 2014).

Beberapa penelitian telah menyarankan untuk memodernisasi definisi PE dengan memasukkan biomarker utama dari asal-usul plasenta atau vaskular, termasuk *Placenta Growth Factor* (PIGF) dan faktor antiangiogenik seperti *soluble fms-like tyrosine kinase-1* (sFLT1) atau *souble endoglin* (sENG) dalam diagnosis PE dan risiko berkembangnya penyakit dan bahkan dalam memprediksi hasilnya (Armaly, Jadaon, Jabbour, & Abassi, 2018).

Ada 2 subtipe preeklamsia yang didasarkan pada waktu onset atau pengenalan penyakit. Umumnya dibagi menjadi 2 jenis utama, onset dini dan onset lambat. Tipe Onset dini (*early onset*) tanda-tanda klinis muncul sebelum kehamilan 33 minggu, ciri patologis utama adalah transformasi yang tidak lengkap dari arteri spiral menghasilkan hipoperfusi plasenta dan mengurangi suplai nutrisi ke janin, sehingga ditemukan tanda-tanda *Fetal Growth Restriction* (FGR) dan terjadi penurunan volume plasma pada 14-17 minggu kehamilan, jika pada kehamilan normal cairan ekstraselular dan volume plasma masing-masing meningkat 30-50% dan 30-40% karena penurunan resistensi vaskuler sistemik dan peningkatan curah jantung. Tipe onset lambat (*late onset*) terjadi setelah kehamilan 34 minggu mayoritas/80% pra eklamsia. Diameter Arteri spiral sedikit berubah dan tidak ada tanda-tanda FGR. Dengan kata lain tidak ada perubahan atau *remodeling* arteri spiralis yang dalam beberapa kasus menyebabkan hiperperfusi plasenta. Oleh karena itu, tampaknya onset dini dan onset lambat memiliki jalur patofisiologi dan etiologi yang berbeda (Gathiram & Moodley, 2016).

Plasenta memiliki peran sentral dalam patogenesis preeklamsia. Preeklamsia hanya terjadi dengan adanya plasenta, bahkan ketika tidak ada janin (seperti pada mola hidatidosa) dan berakhir setelah plasenta dilahirkan. Spesimen patologi telah menunjukkan infark plasenta, kemungkinan karena iskemia dan oklusi arteri spiral. Renovasi vaskular fisiologis arteri spiral oleh trofoblas tidak terjadi pada preeklamsia (Keman, 2014).

Faktor keturunan atau familial dianggap berpengaruh terhadap terjadinya preeklamsia dengan ditemukannya mutasi gen tunggal pada wanita preeklamsia, yang berpengaruh terhadap invasi trofoblas yang abnormal. Genotip ibu lebih menentukan terjadinya hipertensi dalam kehamilan secara familial jika dibandingkan dengan genotip janin (Keman, 2014).

Bukti untuk peran genom janin yang diturunkan secara ayah berasal dari analisis data dari *Norwegian Medical Birth Registry* dari 1967 hingga 1992, yang mengidentifikasi hampir 400.000 wanita yang memiliki setidaknya dua kehamilan, dari catatan tersebut untuk membedakan antara kehamilan dengan orang tua yang

sama dan orang-orang di mana ibu atau ayah berbeda dalam kehamilan kedua. Pada kehamilan pertama risiko preeklamsia di atas 3%, sedikit meningkat dengan usia ibu. Risiko adalah 1,7% di antara kehamilan kedua pada ibu yang memiliki kehamilan kedua dengan pasangan yang sama dan 1,9% di antara kehamilan kedua pada ibu yang telah mengubah pasangannya sejak kehamilan pertama. Pria yang lahir dari kehamilan preeklamsia berisiko mengalami kehamilan preeklamsia. Kerabat perempuan tingkat pertama dari wanita dengan preeklamsia memiliki risiko 5 kali lipat lebih tinggi dan kerabat tingkat kedua memiliki risiko 2 kali lipat lebih tinggi terkena preeklamsia dibandingkan wanita tanpa riwayat keluarga preeklamsia. Studi agregasi keluarga dari preeklamsia menunjukkan bahwa faktor genetik dapat berkontribusi lebih dari 50% dari variabilitas dalam tanggung jawab terhadap preeklamsia (Haram, Mortensen, & Nagy, 2014).

Pemahaman terbaru terhadap preeklamsia adalah merupakan penyakit sistemik yang ditandai dengan kerusakan endotel umum, sehingga berdampak negatif pada hampir semua organ wanita preeklamsia, termasuk potensi untuk mempengaruhi penyakit kardiovaskular dan ginjal di masa depan bahkan beberapa dekade setelah kejadian penyakit (Armaly et al., 2018).

Mengingat pesatnya perkembangan masalah ini dan relevansi klinisnya, tinjauan saat ini berkonsentrasi pada terobosan terbaru dalam mendiagnosis preeklamsia dan pilihan terapi yang diturunkan, yang saat ini telah diuji dalam uji klinis lanjutan.

2. *Growth arrest-specific 6 (GAS6)*

Growth arrest-specific 6 (GAS6) adalah protein *vitamin K-dependent (VKD)* yang disekresikan oleh sel imun, sel endotel, sel otot polos pembuluh darah, dan adiposit (Li, Y.H. et.al. 2018). Gen-nya dinamakan *growth arrest-specific 6 gene (GAS6;MM#14456)* dan ekspresinya ditemukan diatur 30 kali ketika sel memasuki fase G0 dalam siklus sel. Gen ini mengkode protein yang mengandung *gamma-carboxyglutamic (Gla)* yang diduga terlibat dalam stimulasi proliferasi sel. Gen ini sering diekspresikan secara berlebihan pada banyak jenis kanker dan dianggap sebagai penanda prognostik yang merugikan. Kadar protein yang meningkat terkait dengan berbagai keadaan penyakit, termasuk penyakit tromboemboli vena, *systemic lupus eratematosus (SLE)*, gagal ginjal kronis, dan preeklamsia (NCBI, 2021). Lokasi kromosom pada manusia di 13q34 intron 8 (Ye et al., 2017). Gen tersebut diurutkan pada tahun 1993 dan berbagi 44% homologi dengan Protein S (ProS) sebagai VKD lainnya. Walaupun sama secara struktural tetapi ekspresi di jaringan GAS6 jelas berbeda dari protein S. Protein S terutama diekspresikan dalam hati dan sel endotel (Król et al., 2018). GAS6 diekspresikan di paru-paru, endometrium dan 24 jaringan lain (*adrenal, appendix, sumsum tulang, otak, kolon, duodenum, esophagus, fat, kantong empedu, jantung, ginjal, hati, lymph node, ovarium, pankreas, plasenta, prostat, salivary gland, kulit, usus halus, limpa, stomach, testis, thyroid, kandung kemih*) (NCBI, 2021).

Growth arrest-specific 6 (GAS6) dan Protein S (ProS) hadir dalam serum pada konsentrasi 0,2 nM dan 350 nM. Konsentrasi lingkungan mikro GAS6 mungkin lebih

tinggi dari 1 nM, terutama dalam kondisi inflamasi (Cohen & Shao, 2019). GAS6 adalah protein multidomain dengan berat molekul 74,925 Da (75 kDa) yang mampu mengikat dan mengaktifkan semua reseptor TAM, sedangkan ProS hanya dapat mengikat Mer dan Tyro3, tanpa berinteraksi dengan Axl. GAS6 mampu mengikat dan mengaktifkan semua TAM, tetapi efek paling kuat diamati setelah aktivasi Axl. Selain itu, baik murine maupun rekombinan manusia ProS dapat mengikat dan mengaktifkan murine Tyro3 dan Mer (tetapi tidak Axl) secara in vitro (Salmi et al., 2019).

Gen GAS6 berada di dalam siklus sel pada fase G0, fosfolipid anion terlokalisasi dalam *leaflet* membran plasma. Eksposisi fosfolipid anionik pada permukaan sel adalah gambaran cedera sel, aktivasi, dan apoptosis. Dalam kondisi seperti tersebut, lipid ini menyediakan *platform docking* untuk pengikatan protein VKD dan aktivitasnya. Target domain Gla GAS6 ke sel apoptosis atau teraktivasi yang terjadi dalam berbagai patologi. Aktivasi TAM, yang terjadi melalui fosforilasi silang tirosin, dimediasi oleh pengikatan dengan ligannya, GAS6 dan ProS berbagi di bagian C-terminal “domain *Sex Hormone Globulin Binding (SBHG)*”, yang mengikat domain mirip Ig TAM. Pada posisi N-terminal termasuk *γ-carboxylate "domain gamma-carboxyglutamic acid (Gla)"*, yang bertanggung jawab dalam mengikat fosfolipid *phosphatidylserine (PtdSer)* dalam reaksi yang bergantung pada Ca^{++} (Salmi et al., 2019).

GAS6 adalah ligan untuk keluarga reseptor keluarga TAM (disusun oleh Tyro 3, Axl, dan Mer) mewakili subkelompok khusus dengan peran penting dalam banyak kondisi fisiologis dan patologis. Terlepas dari mekanisme aktivasi yang berbeda (misalnya, protein S dan Galaktin-3), aksi TAM terkait erat dengan ligan umum mereka (yaitu GAS6), karena ekspresi TAM dan GAS6 tersebar luas di antara jaringan, setiap perubahan salah satu komponen ini dapat menyebabkan kondisi patologis yang berbeda. Dan pada beberapa tahun terakhir minat meningkat terkait peran GAS6/TAM sangat diperlukan untuk pemeliharaan homeostasis terkait peran pada pengaturan proses inflamasi (Salmi et al., 2019). Reseptor TAM memainkan peran penting dalam mengatur *innate immunity* dan menjaga efisiensi pembersihan sel apoptosis. Pengenalan sel apoptosis yang difasilitasi oleh reseptor TAM membutuhkan pengikatan ligan TAM, sebagai molekul penghubung, ke PtdSer yang terpapar pada permukaan sel apoptosis. Reseptor TAM memiliki signifikansi khusus untuk makrofag dan pengenalan monosit dari sel apoptosis. Fagositosis yang difasilitasi TAM pada sel apoptosis melepaskan sitokin anti-inflamasi oleh fagosit dan menginduksi toleransi kekebalan dengan memasok autoantigen dalam lingkungan non-inflamasi. Keterlibatan reseptor TAM dalam regulasi imunitas telah ditunjukkan dengan jelas pada model hewan. Tikus yang kekurangan Mer saja (*single knockout*) menderita gangguan pembersihan sel apoptosis yang diinfuskan dan terus mengembangkan autoimunitas seperti *moderate lupus*. Tikus yang tidak memiliki reseptor Mer dan Axl mengembangkan patologi mirip lupus yang lebih parah. Ablasi dari ketiga reseptor TAM pada tikus (*TAM triple knockout*)

menghasilkan spektrum yang luas dari penyakit autoimun dengan titer autoantibodi yang tinggi dan patologi yang mempengaruhi banyak organ, termasuk ginjal (Cohen & Shao, 2019). dan, sebaliknya, ekspresi berlebih atau aktivasi menyimpang (yaitu, mutasi fungsi) dikaitkan dengan perkembangan dan perkembangan kanker (Tutusaus et al., 2020).

Jalur PI3K / AKT telah memanifestasikan pengaruhnya yang menarik pada beberapa proses seluler, setelah pengikatan, reaktivasi GAS6/Axl berfungsi sebagai antiapoptosis GAS6 dalam beberapa jenis sel seperti ECs, VSMC, fibroblast, Chondrocytes, Oligodendrocytes, neuro dan beberapa sel kanker. Jalur pensinyalan GAS6 / AXL dikaitkan dengan pertumbuhan sel tumor, metastasis, invasi, transisi epitel-mesenkim (EMT), angiogenesis, resistensi obat, regulasi imun, dan pemeliharaan sel induk (Zhu, Wei, & Wei, 2019).

3. Polimorfisme Gen GAS6

Polimorfisme (definisi biologi) adalah terjadinya lebih dari satu jenis atau bentuk organisme dari spesies yang sama yang ada Bersama-sama dalam satu lokalitas. Secara etimologi : Poli dalam Bahasa Yunani Kuno (banyak); morph (bentuk);-ism, yang berarti banyak bentuk. Sehingga polimorfisme dalam biologi adalah variasi genetik yang tidak bersambung, atau dapat dikatakan bahwa keadaan terputus-putus diakhiri dengan terjadinya beberapa jenis organisme tunggal di antara anggota spesiesnya. Ketidaksamaan genetik yang terputus dapat dibagi di antara individu- individu suatu populasi menjadi dua atau lebih dari dua bentuk yang sangat jelas. Sedangkan yang dimaksud Polimorfisme protein adalah jika lebih dari satu variasi atau alel menempati lokus gen tersebut dalam suatu populasi, yang dapat menyebabkan ekspresi abnormal dari protein nutrisi, dan kemudian dapat menyebabkan banyak penyakit. Polimorfisme DNA adalah perbedaan yang ada dalam urutan DNA dengan frekuensi 1% dalam populasi. Gen penyandi protein menempati 1-2% dari genom manusia, hal ini menyebabkan sejumlah besar variasi polimorfisme tidak akan berdampak langsung pada aktivitas gen, tetapi jika terjadi pada wilayah regulasi gen, dapat menyebabkan implikasi fungsional yang serius (Dictionary, 2021).

Single Nucleotida Polymorphisms (SNPs) adalah variasi genetik yang paling banyak diamati diantara individu. Jika suatu gen memiliki lebih dari satu alel berarti SNPs terjadi pada gen tersebut. SNPs juga bertanggungjawab pada variasi urutan asam amino, namun bersamaan dengan asosiasi mereka dengan gen, polimorfisme juga dapat terjadi di area *non-coding* DNA. Sekitar 90% variasi genetik pada manusia disebabkan karena SNPs, dan Sebagian besar variasi tidak mempengaruhi fungsi seluler pada manusia, namun beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa SNPs bisa menjadi alasan berkembangnya berbagai penyakit seperti kanker, dan dapat juga mempengaruhi respon fisiologis terhadap obat-obatan. Polimorfisme DNA berguna antara lain untuk analisis keterkaitan DNA sebagai teknik untuk mendeteksi penyakit melalui keluarga (Dictionary, 2021).

Ada beberapa penyebab polimorfisme diantaranya adalah sebagai salah satu alasan mempertahankan polimorfisme untuk menciptakan keseimbangan antar variasi yang tercipta karena proses mutase atau karena seleksi alam. Seleksi yang bergantung pada frekuensi menjadi penyebab variasi genetik atau polimorfisme. Migrasi populasi spesies juga menghasilkan polimorfisme. Sebuah sel homozigot memiliki gen tertentu dengan alel identik hadir pada kedua kromosom homolog. Individu yang dominan homozigot membawa salinan ganda dari alel dominan misalnya AA. Sebaliknya, sel heterozigot adalah ketika ia membawa pasangan alel yang tidak mengkode sifat fenotipe yang sama dan salah satunya dominan sedangkan yang lain resesif. Keunggulan heterozigot memiliki kesesuaian relatif yang lebih tinggi daripada genotip lain yang mungkin. Sebuah lokus tunggal (*over dominance*) bertanggung jawab atas kasus spesifik dari keuntungan heterozigot. Ketika gen langka mulai mendapatkan dan mempertahankan keuntungan secara keseluruhan, gen itu akan terus menyebar dan akan mengurangi alel normalnya sebanyak gen tersebut mencapai status mutan. Saat proses ini terjadi, menghasilkan polimorfisme transien karena tekanan selektif lingkungan yang intens sehingga menyebabkan pemilihan arah untuk menghilangkan satu alel. Dua gen yang berbeda dipertahankan (polimorfisme seimbang) dalam populasi satu spesies atau organisme terjadi karena individu membawa kedua versi polimorfisme gen relatif cocok dibandingkan dengan mereka yang memiliki dua salinan dari salah satu versi saja (Dictionary, 2021).

Telah dilaporkan bahwa polimorfisme pada gen GAS6 ditemukan terkait dengan stroke. Reseptor GAS6 terbukti mengatur kalsifikasi pembuluh darah dan jalur kelangsungan hidup Axl-GAS6 telah terlibat dalam patofisiologi aterosklerosis. Penelitian sebelumnya juga melaporkan struktur genetik dan variabilitas alelik gen GAS6 *Human (Mendelian Inheritance in Man#600441)*, menunjukkan bahwa ada hubungan antara stroke dan *single nucleotida polymorphism* (SNP; c834 + 7G> A) dalam intron 8 gen GAS6, ini menunjukkan potensi peran protektif dari genotipe AA (Ye et al., 2017).

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif observasional analitik dengan desain *case control study* dilakukan pada bulan Januari – Oktober 2020 di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya Palembang. Populasi target pada penelitian ini adalah ibu hamil yang didiagnosis PE dan populasi terjangkau adalah ibu hamil dengan PE di Kota Palembang dengan kriteria inklusi pada *case group* yaitu ibu hamil usia kehamilan > 20 minggu dan di diagnose PE menurut NHBPEP, 2000 di Kota Palembang, *control group* yaitu ibu hamil usia kehamilan > 20 minggu normotensif (tanpa tanda-tanda PE), dan kriteria eksklusi adalah Wanita dalam persalinan, kehamilan ganda, selaput pecah, Riwayat medis hipertensi kronis dan diabetes mellitus.

Penentuan besar sampel menggunakan Teknik consecutive sampling dengan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi, dengan uji hipotesis besar sampel 2 populasi dengan k kontrol per kasus (1:2), yaitu 39 sampel *case group*, 78 sampel *control group*.

Isolasi DNA menggunakan *Quick Protocol Wizard® Genomic DNA Purification Kit Products* dari Promega.

Amplifikasi PCR menggunakan enzim *AlwNI S R0514S 500 Units* (ALSHAMI, ALHARBI, & FOUAD, 2017), *Cut Smart 10,000 units/ml* disimpan pada suhu -20°C dari *New England Biolabs*, penggunaan mengikuti *Time-Saver™ Protocol*. Cetakan DNA menggunakan *BenchTop 100bp DNA Ladder REF G8291, CHN* dari Promega mengikuti Primer :

5'-TTC CCT CAA GAA AGA GCC CG-3' 5'-TCT CAT CCC AAA CCT CCA CA-3' *Taq DNA Polimerase* menggunakan *Go Taq® Green Master Mix REF M7122* dari Promega. Program PCR 30-35 siklus, meliputi : 1) Denaturasi / annealing / ekstensi : $95^{\circ}\text{C}/94^{\circ}\text{C}/55,1^{\circ}\text{C}/72^{\circ}\text{C}/72^{\circ}\text{C}/12^{\circ}\text{C}$, selama 3:03:35' untuk sampel 1-88, 2. Denaturasi. 2) Denaturasi / annealing / ekstensi : $95^{\circ}\text{C}/94^{\circ}\text{C}/55,1^{\circ}\text{C}/72^{\circ}\text{C}/72^{\circ}\text{C}/12^{\circ}\text{C}$, selama 3:03:37' untuk sampel 89-120.

Elektroforesis menggunakan agarose 2% (2 gr agarose dalam 100 ml TAE dan 900 ml) untuk cetakan besar, dan agarose 1% (1 gr agarose dalam 50 ml TAE) untuk cetakan kecil.

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) menggunakan agarose 3% (3 gr dalam 100 ml TAE), selanjutnya divisualisasikan menggunakan *Gel Doc, Uvitec* dan aplikasi *Uvitec Cambridge*, 2014.

Parameter keberhasilan penelitian ini jika terdapat polimorfisme gen GAS6 c.834 dan dapat dilakukan Analisa statistik.

Hasil dan Pembahasan

Karakteristik Demografi Subjek Penelitian Hasil penelitian didapatkan karakteristik demografi pada variabel usia, gravida dan tekanan darah sistolik dan diastolik pada PE dan normotensive adalah seperti pada tabel berikut :

Tabel 1
Distribusi Frekuensi Preeklamsia Dan Normotensif
Berdasarkan Karakteristik

Karakteristik subjek penelitian	Preeklamsia (n=39)	Kontrol (n=78)
Usia	28,64 ± 7,41 (16-43)*	27,00 (16-40)**
Gravida	3,0 (1-7)**	2,00 (1-6)**
Tekanan Darah sistolik	150,00(140-220)**	110,02 (80-130)**
Tekanan darah diastolik	100,00 (90-130)**	70,00 (60-90)**

Mean + SD

Median, Minimum - Maximum

Hasil penelitian dari 39 sampel dengan preeklamsia dan 78 kontrol ibu hamil normotensif di dapatkan karakteristik usia pada preeklamsia mean 28,64 dengan standar deviasi 7,411 minimum-maximum usia 16-43 tahun. Sedangkan pada kontrol usia median, minimum-maximum 27,00 (16-40). Gravida pada preeklamsia median, minimum-maximum 3,0, (1-7), pada kontrol median minimum-maximum 2,00 (1-6). Tekanan darah sistolik pada preeklamsia median, minimum-maximum 150,00 (140-220). pada kontrol median, minimum-maximum 10,00 (80-130). Sedangkan tekanan darah diastolik pada preeklamsia median, minimum-maximum 100,00 (90-100), pada kontrol median, minimum-maximum 70,00 (60-90).

Karakteristik subjek penelitian berdasarkan usia lebih banyak pada kelompok usia <35 tahun pada preeklamsia yaitu 79,5% dan normotensif 84,6%. Kehamilan dengan preeklamsia lebih banyak terjadi pada kelompok multigravida (51,3%), sedangkan pada kelompok normotensif pada primigravida (60,3%). Secara statistik tidak ada hubungan antara variabel yang diuji ($p>0,05$), seperti pada tabel berikut :

Tabel 2
Distribusi Frekuensi Responden Dengan Preeklamsia Dan Normotensif Berdasarkan Karakteristik

Variabel	Kategori	Subjek Penelitian						p value
		Preeklamsia		Normotensif		Total		
		n	%	n	%	n	%	
Usia	>35 tahun	8	20,5	12	15,4	20	17,1	0,487*
	<35 tahun	31	79,5	66	84,6	97	82,9	
Gravida	multigravida	20	51,3	31	39,7	51	43,6	0,235*
	primigravida	19	48,7	47	60,3	66	56,4	
SBP**	preeklamsia	39	100	0	0	39	33,3	0,000*
	normotensif	0	0	78	100	78	66,7	
DBP***	preeklamsia	38	97,4	0	0	38	32,5	0,000*
	normotensif	1	2,6	78	100	79	67,5	
Genotip GAS6	Homozigot + Heterozigot mutan (AA+AG)	5	22,7	16	41,0	21	34,4	0,149*
	Homozigot wildtype (GG)	17	77,3	23	59,0	40	65,6	

* Uji Chi Square

** SBP = Sistolik Blood Pressure

*** DBP = Diastolik Blood Pressure

Genotip gen GAS6 terdapat heterozigot mutan dan homozigot lebih sedikit pada preeklamsia yaitu 22,7% dibandingkan dengan normotensif yaitu 41,0%. Tetapi secara statistik memperlihatkan tidak ada hubungan yang signifikan antara hasil nalisa genotip gen GAS6 dengan preeklamsia ($p>0,05$).

1. Hubungan antara Polimorfisme Gen GAS6 dan Preeklamsia

Hasil nalisa genotip polimorfisme gen GAS6 pada posisi c.834+7G>A sebagai berikut :

Tabel 3
Frekuensi Genotipik Dan Alellik Gen GAS6 C.834 +7AA
Antara Subjek Preeklamsia Dan Normotensif

Variabel	Kategori	Subjek Penelitian						p value
		Preeklamsia (n=22)		Normotensif (n=39)		Total (n=61)		
		N	%	N	%	N	%	
Genotip GAS6	AA	3	13,6	15	38,5	18	29,5	0,351**
	AG	2	9,1	1	2,6	3	4,9	
	GG	17	77,3	23	59,0	40	65,6	
Alel GAS6	A	8	18,18	31	39,74	39	31,96	0,149*
	G	36	81,81	47	60,25	83	60,03	

Uji Chi Square
 Uji Kolmogorov-Smirnov

Distribusi frekuensi genotip AA pada preeklamsia (13,6%), pada normotensif (38,5%), genotip AG pada preeklamsia (9,1%), pada normotensif (2,6%), dan genotip GG pada preeklamsia (77,3%), pada normotensif (59,0%).

Alel A pada preeklamsia diekspresikan lebih sedikit pada preeklamsia (18,18%) dibandingkan pada normotensif (39,74%). Alel G lebih banyak pada preeklamsia (81,81%) dibandingkan dengan normotensif (60,25%).

2. Odds Ratio (OR) Polimorfisme Gen GAS6 pada preeklamsia

Hasil analisa statistik didapatkan kekuatan hubungan antara variabel dengan nilai OR, sebagai berikut :

Tabel 4
Nilai OR Polimorfisme Gen GAS6 Pada Preeklamsia

Variabel	Kategori	Subjek Penelitian						OR	95% CI Lower-Upper
		Pre eklamsia		normotensif		Total			
		n	%	n	%	n	%		
Genotip	Homozigot + Heterozigot mutan (AA+AG)	5	22,7	16	41,0	21	34,4	0,423	0,129 – 1,381
	Homozigot wildtype (GG)	17	77,3	17	59,0	40	65,6		

Dari tabel 4 diatas didapatkan OR sebesar 0,423 artinya Alel A pada ibu hamil preeklamsia diekspresikan frekuensi lebih rendah (22,7%) dibandingkan dengan ibu hamil normotensif (34,4%) atau Genotip GAS6 c.834+7AA dikaitkan dengan penurunan risiko preeklamsia sebesar 0,423 kali dengan 95% CI 0,129 – 1,38, artinya alel A Gen GAS6 merupakan gen kandidat kerentanan dengan probabilitas untuk penyakit preeklamsia sebesar 29,7% atau berperan protektif untuk varian GAS6 dalam preeklamsia.

Berbagai penelitian telah banyak dilakukan terkait peran gen GAS6 sebagai pengendali imunitas bawaan dan proses inflamasi, dan target terapi yang menjanjikan untuk agen anti-platelet baru. Jalur ini juga aktif dalam berbagai jenis sel jinak dan ganas dengan fungsi termasuk regulasi inflamasi, fagositosis, sel apoptosis dan puing

seluler, stabilisasi trombosit, pemeliharaan pembuluh darah homeostasis otot polos, spermatogenesis, pemeliharaan retina, dan perkembangan kanker.

Penelitian Al Shami'I, et.al. 2017, memperlihatkan perbedaan yang signifikan antara frekuensi alel G dan alel A pada pasien SLE dan kontrol. GG genotip berhubungan dengan peningkatan resiko pada SLE (GG vs GA OR : 3,4, 95%CI 1,2-9,5, dan GG vs AA OR 3,6, 95% CI 1,1- 11,8).

Penelitian (Erkoc et al., 2015). Polimorfisme GAS6 intron 8 c.834 + 7G>A tidak terkait dengan nefropati diabetik pada diabetes melitus tipe 2. Namun, keadaan heterozigot dari polimorfisme ini dapat menjadi faktor risiko retinopati diabetik pada pasien dengan nefropati diabetik. Genotip GA dan AA serupa pada nefropati diabetik dan kelompok kontrol ($p=0,837$). Genotip GA secara signifikan lebih sering daripada genotip GG pada pasien dengan retinopati diabetik jika dibandingkan dengan tanpa retinopati diabetik ($p=0,10$).

Pada penelitian (Ozakupinar et al., 2016). Secara prevalensi genotip GG > AA. Genotip GG adalah yang mendominasi, dan risiko preeklamsia adalah 3,5 kali lipat lebih tinggi pada wanita hamil dengan GG genotipe dibandingkan dengan wanita dengan AA genotipe ($p <0,01$). Alel A lebih sedikit pada pasien preeklamsia dibanding subyek kontrol (OR = 2,118, 95% CI = 1,330-3,371, $p<0,001$), memperlihatkan polimorfisme GAS6 c.834 + 7G> alel A mungkin memiliki peran penting dalam patogenesis preeklamsia yang menunjukkan bahwa alel A memiliki peran protektif untuk preeklamsia, 5 kali lipat lebih tinggi pada wanita hamil dengan genotip GG dibandingkan wanita dengan genotip AA ($p<0,01$). Alel A lebih jarang pada pasien preeklamsia dibandingkan pada subjek kontrol (OR=2,118, 95% CI = 1,330-3,371, $p<0,001$).

Hasil penelitian ini, memperlihatkan hasil yang serupa dengan penelitian terdahulu terkait dengan polimorfisme gen GAS6 c.834+7AA, yaitu hasil analisa genotip gen GAS6 c.834+7AA, memperlihatkan proporsi homozigot *wildtype* GG lebih banyak pada kelompok preeklamsia (77,3%) dibandingkan dengan kelompok normotensif (59,0%), homozigot AA lebih sedikit pada preeklamsia (13,6%) dibandingkan dengan kelompok normotensif (38,5%), dan di dapatkan heterozigot mutan (AG) pada kelompok preeklamsia dan normotensif, tetapi lebih banyak pada kelompok preeklamsia (9,1%) dibandingkan dengan kelompok normotensif (2,6%). Hasil analisa statistik memperlihatkan tidak ada hubungan yang signifikan antara polimorfisme dengan preeklamsia ($p=0,149$) dengan nilai OR sebesar 0,423, 95% CI = 0,129 – 1,381.

Hasil analisa statistik ini memperlihatkan alel A berperan protektif terhadap preeklamsia atau genotip AA menurunkan resiko preeklamsia.

Kesimpulan

1. Polimorfisme gen GAS6 c. 834 + 7AA teridentifikasi pada kehamilan preeklamsia di Kota Palembang yaitu sebesar 9,1%.
2. Polimorfisme gen GAS6 c. 834 + 7AA teridentifikasi pada kehamilan normotensif di Kota Palembang yaitu sebesar 2,6%.
3. Terdapat hubungan yang tidak signifikan antara polimorfisme gen GAS6 c. 834 + 7AA dengan preeklamsia di Kota Palembang, yaitu $p=0,149$ dan didapatkan nilai $OR = 0,423$, $95\% CI = 0,129-1,381$. Artinya alel A Gen GAS6 merupakan gen kandidat kerentanan dengan probabilitas untuk penyakit preeklamsia sebesar 29,7% atau berperan protektif untuk varian GAS6 dalam preeklamsia, atau hasil tersebut memperlihatkan bahwa alel A berperan protektif terhadap preeklamsia atau genotip AA terkait dengan penurunan resiko preeklamsia.

BIBLIOGRAFI

- (NCBI), National Center for Biotechnology Information. (2021). National Center for Biotechnology Information (NCBI). Retrieved from Www.ncbi.nlm.nih.gov website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gen e/?term=gas6>
- Alshami, Issam, Alharbi, Ahmed E. I. D., & Fouad, Nehad Ahmed. (2017). *The potential role of Serum Level of Growth Arrest–Specific 6 (GAS6) Protein and its Genetic Variations in.*
- Armaly, Zaher, Jadaon, Jimmy E., Jabbour, Adel, & Abassi, Zaid A. (2018). Preeclampsia: novel mechanisms and potential therapeutic approaches. *Frontiers in Physiology*, 9, 973.
- Cohen, Philip L., & Shao, Wen Hai. (2019). Gas6/TAM receptors in systemic lupus erythematosus. *Disease Markers*, 2019.
- Dictionary, Biology Online. (2021). Genetic polymorphism. Retrieved from www.biologyonline.com website: <https://www.biologyonline.com>
- Erkoc, Reha, Cikrikcioglu, Mehmet Ali, Aintab, Emre, Erek Toprak, Aybala, Kilic, Ulkan, Gok, Ozlem, Yasin Cetin, Ayse Irem, Zorlu, Mehmet, Kiskac, Muharrem, & Cakirca, Mustafa. (2015). GAS6 intron 8 c. 834+ 7G> A gene polymorphism in diabetic nephropathy. *Renal Failure*, 37(5), 866–870.
- Gathiram, Pre eclampsia, & Moodley, JJCJOA. (2016). Pre-eclampsia: its pathogenesis and pathophysiology: review articles. *Cardiovascular Journal of Africa*, 27(2), 71–78.
- Haram, Kjell, Mortensen, Jan Helge, & Nagy, Bálint. (2014). Genetic aspects of preeclampsia and the HELLP syndrome. *Journal of Pregnancy*, 2014.
- Keman, Kusnarman. (2014). *Patomekanisme Preeklampsia Terkini: Mengungkapkan Teori-Teori Terbaru tentang Patomekanisme Preeklampsia Dilengkapi dengan Deskripsi Biomolekuler*. Universitas Brawijaya Press.
- Król, Magdalena Beata, Galicki, Michał, Grešner, Peter, Wieczorek, Edyta, Jabłońska, Ewa, Reszka, Edyta, Morawiec, Zbigniew, Wąsowicz, Wojciech, & Gromadzińska, Jolanta. (2018). ESR1 and GPX1 genes expression level in human malignant and non-malignant breast tissues. *Acta Biochimica Polonica*, 65(1), 51–57.
- Li, Yu Huei, Lu, Chieh Hua, Lin, Fu Huang, Su, Sheng Chiang, Liu, Jhih Syuan, Hsieh, Chang Hsun, Hung, Yi Jen, Shieh, Yi Shing, & Lee, Chien Hsing. (2019). Plasma Growth Arrest-Specific 6 Protein and Genetic Variations in the GAS6 Gene in Patients with Metabolic Syndrome. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 17(1), 22–28.

- Ozakpinar, Ozlem Bingol, Sahin, Sadık, Verimli, Nihan, Simsek, Gulhayat Golbasi, Maurer, Anne Marie, Eroglu, Mustafa, Tetik, Sermin, & Uras, Fikriye. (2016). Association between the growth arrest-specific 6 (Gas6) gene polymorphism c. 834+ 7G> A and preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 29(7), 1149–1153.
- Pierik, E., Prins, Jelmer R., van Goor, Harry, Dekker, Gustaaf A., Daha, Mohamed R., Seelen, Marc A. J., & Scherjon, Sicco A. (2020). Dysregulation of complement activation and placental dysfunction: a potential target to treat preeclampsia? *Frontiers in Immunology*, 10, 3098.
- Salmi, Livia, Gavelli, Francesco, Patrucco, Filippo, Caputo, Marina, Avanzi, Gian Carlo, & Castello, Luigi Mario. (2019). Gas6/TAM axis in sepsis: Time to consider its potential role as a therapeutic target. *Disease Markers*, 2019.
- Susiana, S. (2019). Angka kematian ibu: Faktor penyebab dan upaya penanganannya. *Bidang Kesejahteraan Sosial Info Singkat*, 11(24), 13–18.
- Tutusaus, Anna, Marí, Montserrat, Ortiz-Pérez, José T., Nicolaes, Gerry A. F., Morales, Albert, & García de Frutos, Pablo. (2020). Role of vitamin K-dependent factors protein S and GAS6 and TAM receptors in SARS-CoV-2 infection and COVID-19-associated Immunothrombosis. *Cells*, 9(10), 2186.
- Ye, Liyan, Guan, Linbo, Fan, Ping, Liu, Xinghui, Liu, Rui, Chen, Jinxin, Zhu, Yue, Wei, Xing, Liu, Yu, & Bai, Huai. (2017). Association study between GAS6 gene polymorphisms and risk of preeclampsia in Chinese population. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 211, 122–126.
- Zhang, Ning, Tan, Jing, Yang, HaiFeng, & Khalil, Raouf A. (2020). Comparative risks and predictors of preeclamptic pregnancy in the Eastern, Western and developing world. *Biochemical Pharmacology*, 182, 114247.
- Zhu, Chenjing, Wei, Yuquan, & Wei, Xiawei. (2019). AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Molecular Cancer*, 18(1), 1–22.

Copyright holder:

Ariani Susanti, Legiran, Yusuf Effendi (2022)

First publication right:

Syntax Literate: Jurnal Ilmiah Indonesia

This article is licensed under:

