

Polimorfisme V16A Gen MnSOD pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2 dengan Retinopati

Tasmini^{1*}, R. Haryo Yudono², Maliyah Madyan¹

¹Departement of Biochemistry, Faculty of Medicine, Public Health, and Nursing, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Department of Ophthalmology, Faculty of Medicine, Public Health, and Nursing, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

*Corresponding author, email: tasmini@ugm.ac.id

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16/11/2016

Received in revised form 24/08/2018

Accepted 24/08/2018

Keywords:

diabetes mellitus

MnSOD gene

retinopathy

DOI: [10.22146/jtbb.16446](https://doi.org/10.22146/jtbb.16446)

© 2018 JTBB

ABSTRACT

Complications of diabetes mellitus (DM) include diabetic retinopathy (RD) both non-proliferative diabetic retinopathy (NPDR) and proliferative diabetic retinopathy (PDR). The development of RD depends on environmental and genetic factors. MnSOD gene (manganese-superoxid dismutase) is one of the candidate risk factors gene for RD. The presence of V16A MnSOD gene polymorphism results in decrease of mitochondrial MnSOD enzymes expression and triggers the oxidative stress. Hyperglycemia in DM increases oxidative stress in tissues, including the retina resulting in metabolic abnormalities in the retina, which play a role in the development of DM complications, namely diabetic retinopathy. In Indonesia, especially the Javanese tribes in Yogyakarta, there has never been any research on MnSOD gene polymorphism in type 2 diabetes patients with and without retinopathy. Subjects were Poly Endocrine patients and Eye Polyclinic patients of Dr. Sardjito's General Hospital, 121 subjects consisting of 63 type 2 DM patients without retinopathy were group 1 (KI) and 58 type 2 DM patients with retinopathy were group 2 (KII) (20 NPDR subjects and 38 PDR subjects). V16A polymorphism of MnSOD gene from leukocytes DNA was analyzed by PCR-RFLP method. From 121 DM subjects, 70 subjects with VV genotype were found, 50 subjects with VA genotype and 1 subject with AA genotype. From 63 non-RD DM subjects, 22 subjects with VA genotypes and 41 subjects with VV genotype were found, while in DM with retinopathy (non-PDR, n = 20) found 6 subjects with VA genotype and 14 subjects with VV genotype, and in DM with retinopathy (PDR, n = 38) found 1 subject with AA genotype, 22 subjects with VA genotype and 15 subjects with VV genotype. In DM with retinopathy (NPDR and PDR, n = 58), 1 subject was found with AA genotype, 27 subjects with VA genotype and 29 subjects with VV genotype.

1. Pendahuluan

Prevalensi DM di dunia dan Indonesia semakin meningkat terutama DM tipe 2. Bila tidak ditangani secara tepat akan mengalami komplikasi meliputi mikro- dan makrovaskuler (De Vriese *et al.* 2000). Retinopati diabetika (RD) adalah salah satu komplikasi mikrovaskuler yang sering terjadi dan mengakibatkan kebutaan (Abhary & Burdon, 2009; Aiello & Wong, 2000). Hiperglikemia pada DM tipe 2 menginduksi kenaikan produksi radikal superoksida dalam mitokondria jaringan termasuk retina (Fong *et al.* 2003; Kiritoshi *et al.* 2003). Di dalam mitokondria retina terdapat enzim antioksidan yaitu MnSOD yang berperan menyerang radikal superoksida yang bersifat toksik (Kiritoshi *et al.* 2003).

Retinopati diabetika (RD) sebagai penyebab kebutaan adalah penyakit yang multifaktorial (McIntyre *et al.* 1999; Awata *et al.* 2002). Pada DM, kadar superoksida dalam retina meningkat, aktivitas MnSOD menurun dan tidak cukup melawan tingginya oksidan tersebut sehingga terjadi stres oksidatif (Awata *et al.* 2002; Buraczynska *et al.* 2006). Stres oksidatif ini memicu terjadinya RD (Guidot *et al.* 1993).

Protein enzim MnSOD disandi oleh gen MnSOD yang terletak pada kromosom 6q.25.3, terdiri dari 5 ekson (Lee *et al.* 2006). Adanya polimorfisme V16A gen MnSOD pada ekson 2 menyebabkan penurunan ekspresi enzim tersebut, sehingga menimbulkan defisiensi enzim. Defisiensi enzim ini dapat berakibat stres oksidatif. Di Slovenia, individu DM tipe 1

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian berdasar jenis kelamin, umur, berat dan tinggi badan, IMT, tekanan darah, lingk pinggang, dan lingk pinggul

	KI (kontrol) (n=63)	KII (kasus)	
		NPDR (n=20)	PDR (n = 38)
1. Jenis kelamin			
Perempuan (n= 66)	44	11	11
Laki-laki (n = 55)	19	9	27
2. Umur (tahun) (mean ± SD)	56,2 ± 10,2	59,6 ± 6,9	53,9 ± 9,2
3. Berat badan (kg) (mean ± SD)	61,4 ± 11,6	67,5 ± 34,7	53,7 ± 10,4
Tinggi badan (cm) (mean ± SD)	157,5 ± 7,6	147,8 ± 29,2	154,8 ± 8,3
IMT (mean ± SD)	24,7 ± 4,1	22,9 ± 2,2	22,4 ± 3,7
4. Tekanan darah			
Sistolik (mean ± SD)	124,1± 17,8	130,3± 20,2	130,8 ± 18,5
Diastolik (mean ± SD)	80,6 ± 8,6	83,5 ± 15,3	81,1 ± 9,9
5. Nadi	78,5 ± 7,7	80,6 ± 2,6	81,5 ± 6,7
6. Lingk pinggang (cm) (mean ± SD)	87,0 ± 10,1	85,1 ± 11,1	82,5 ± 10,7
Lingk pinggul (cm) (mean ± SD)	95,9 ± 20,1	93,3 ± 10,8	94,4 ± 9,8

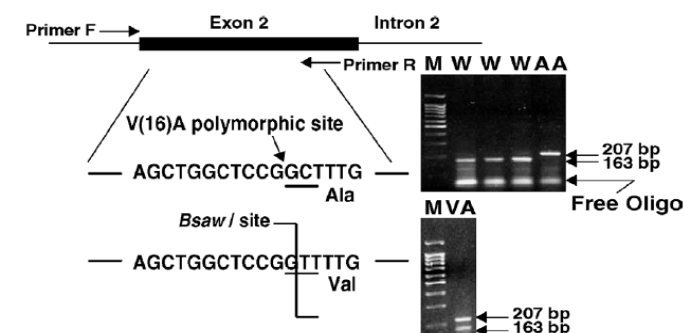
genotip VV (pembawa alel V), kecenderungan untuk berkembang menjadi RD meningkat dibanding genotip AA (pembawa alel A). Penelitian lain di Slovenia, polimorfisme V16A tidak berhubungan dengan kejadian infark miokard. Selain itu individu DM tipe2 genotip VV merupakan faktor risiko nefropati diabetika di Jepang, sedang di Cina berhubungan dengan penurunan risiko nefropati (Adler *et al.* 2000).

Penelitian polimorfisme V16A gen MnSOD sudah banyak dilakukan di luar negeri, namun hasilnya masih kontroversial. Di Indonesia belum pernah dilakukan, padahal polimorfisme tersebut berhubungan dengan etnis. Indonesia terdiri dari bermacam-macam etnis, sehingga memberikan peluang untuk dilakukan penelitian tersebut, terutama Suku Jawa yang tinggal di Yogyakarta.

2. Bahan dan Metode

2.1. Cara Kerja

Desain penelitian ini adalah *cross sectional study* dan *case control study* untuk mengetahui adanya polimorfisme V16A gen MnSOD pada penderita Diabetes Melitus tipe 2 dengan retinopati.



Gambar 1. Penentuan genotype V16A gen MnSOD dengan metode PCR-RFLP (Lee *et al.* 2006).

Populasi penelitian ini adalah penderita DM tipe 2 dengan dan tanpa retinopati di Departemen Penyakit Mata dan di Departemen Endokrinologi Ilmu Penyakit Dalam RSUP Dr Sardjito di Yogyakarta.

Subjek penelitian dibagi menjadi 2 kelompok, kelompok I (KI) adalah kelompok kontrol sebanyak 63 subjek DM tipe 2, tanpa retinopati, tanpa riwayat keluarga retinopati diabetika. Kelompok II (KII) adalah kelompok kasus DM tipe 2 dengan retinopati sebanyak 58 subjek baik laki-laki maupun perempuan, dengan riwayat keluarga retinopati. Dari KII dibagi menjadi dua, yaitu NPDR (Non-Proliferative Diabetic Retinopathy) sebanyak 20 kasus, PDR (Proliferative Diabetic Retinopathy) sebanyak 38 kasus.

Sampel penelitian berupa plasma darah puasa dan 2 jam postprandial (pp) serta *buffy coat* (untuk pemeriksaan polimorfisme gen MnSOD dari DNA).

Tabel 2. Karakteristik Subjek Penelitian bedasar onset dan durasi penyakit

	KI (DM-non RD) (n = 63)	KII (DM + RD)	
		NPDR (n=20)	PDR (n = 38)
Onset (tahun)	48,9 ± 10,3 (31-71)	49,2 ± 9,9 (26-73,5)	42,2 ± 9,7 (14-64)
Durasi (tahun)	7,2 ± 5,9 (0,5-33)	10,1 ± 6,3 (0,4-21)	11,8 ± 7,7 (1-30)

DNA genom diekstraksi dari sel-sel polimorfonuklear perifer dengan menggunakan kit isolasi DNA merk Promega. Genotipe V16A ditentukan dengan metode *polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). Fragmen DNA yang mengandung sisi polimorfik V16A diamplifikasi dengan PCR menggunakan: *primer forward*: F: 5'- GCT GTG CTT CTC GTC TTC AG -3' dan *primer reverse* : R: 5'- TGG TAC TTC TCC TCG GTG ACG -3' pada 38 siklus 94°C

Tabel 3. Karakteristik subjek penelitian berdasar kadar Hb, PCV, kadar glukosa darah puasa dan 2 jam pp, profil lipid

	KI (DM-non-RD) (n = 63)	KII (DM + RD)	
		NPDR (n=20)	PDR (n = 38)
1. Kadar Hb (g%)	12,7 ± 2,5	14,5 ± 2,3	11,9 ± 2,9
Kadar PCV/Hmt (%)	42 ± 5,5	38,7 ± 13,0	37,5 ± 6,3
2. Kadar glukosa plasma (mg%)			
Puasa (mean ± SD)	129,8 ± 60,7	131,5 ± 64,4	190,9 ± 79,5
2 jam pp (mean ± SD)	192,5 ± 82,9	204,4 ± 51,3	249,7 ± 93,9
3. Profil lipid (mg%)			
Kolesterol total (mean ± SD)	183,4 ± 26,0	150,2 ± 38,0	177,9 ± 46,2
Trigliserida	141,5 ± 113,3	124,2 ± 61,5	138,9 ± 61,7
HDL-kolesterol	73,9 ± 18,0	79,3 ± 19,9	78,5 ± 17,6
LDL-kolesterol	110,8 ± 19,0	100,5 ± 22,3	105,4 ± 29,5

selama 30 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Genotiping polimorfisme V16A dilakukan dengan RFLP. Produk PCR didigesti dengan enzim restriksi *BsawI* (New England Biolab, Beverly, Mass) 60°C selama 2 jam. Substitusi C → T pada kodon 16 menghasilkan sisi digesti enzim *BsawI*, dan produk PCR (fragmen 207 bp) didigesti oleh enzim *BsawI* menghasilkan 2 fragmen 163 bp dan 44 bp (Gambar 1). Fragmen-fragmen dipisahkan dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% dan diidentifikasi dengan pengecatan ethidium bromide.

2.2. Analisa Statistik

Data yang terkumpul dianalisis dengan menggunakan SPSS 16,0 for Windows (Sujianto & Eko 2009).

3. Hasil dan Pembahasan

Dari 121 subjek penelitian, terdapat 63 subjek kontrol, penderita DM tipe 2 tanpa retinopati (non-RD) (KI) dan 58 subjek kasus, penderita DM tipe 2 dengan retinopati (RD) (KII) yang terdiri dari 20 penderita NPDR dan 38 penderita PDR. Karakterisasi subjek penelitian tercantum dalam Tabel 1, Tabel 2. dan Tabel 3.

Tabel 4. Polimorfisme Gena MnSOD subjek kontrol (DM-non RD), NPDR dan PDR

Polimorfisme	AA		VA		VV	
	L	P	L	P	L	P
Jenis kelamin						
DM-non RD (KI) (n=63)	0	0	4 (6,3%)	18 (28,6%)	15 (23,8%)	26 (41,3%)
K II (kasus)						
- NPDR (n=20)	0	0	4 (20%)	2 (10%)	7 (35%)	7 (35%)
- PDR (n=38)	1 (2,6%)	0	9 (23,7%)	13 (34,2%)	1 (2,6%)	14 (36,9%)

Dari Tabel 1 terlihat bahwa, umur dan berat badan penderita PDR paling rendah dibanding NPDR maupun kontrol. Untuk tinggi badan subjek NPDR paling rendah dibanding yang lainnya. Tekanan darah sistole untuk kontrol paling rendah dibanding kelompok lain.

Dari Tabel 2 terlihat bahwa onset PDR paling muda dibanding NPDR maupun Kontrol. Selain itu, durasi penyakit untuk PDR > NPDR > kontrol. Hal ini membuktikan bahwa semakin muda onset penyakit maka semakin besar berpeluang mengalami komplikasi RD (Klein *et al.* 1984).

Dari Tabel 3, terlihat bahwa kadar Hb dan PCV untuk kelompok PDR paling kecil dibanding kelompok NPDR maupun kontrol, hal ini membuktikan bahwa anemia sebagai faktor risiko terjadinya PDR. Bila dilihat kadar glukosa darah puasa maupun 2 jam pp, untuk kelompok PDR > NPDR > Kontrol (DM-non RD). Hal ini membuktikan bahwa kadar glukosa darah sangat berperan pada terjadinya komplikasi RD. Profil lipid menunjukkan dalam batas-batas normal, di semua kelompok. Hal ini mungkin disebabkan para subjek mendapatkan obat-obat pengendali profil lipid.

Tabel 5. Perbandingan antar genotip pada subjek kontrol (DM-non-retinopati), NPDR, dan PDR

	VA P/L	VV P/L	VV/VA (L)	VV/VA (P)	VV/VA umum
Kontrol	4,5	1,73	3,75	1,44	1,86
NPDR	0,5	1	1,75	3,5	2,33
PDR	1,44	14	0,11	1,1	0,68

Dari Tabel 4, terlihat bahwa isoform AA terjadi pada PDR sebanyak 1 kasus (2,6%), pada laki-laki. Laki-laki tersebut berusia 66 tahun, menderita DM tipe 2 selama 10 tahun, dan didiagnosis menderita retinopati diabetika proliferasi lanjut (advanced PDR) pada kedua matanya.

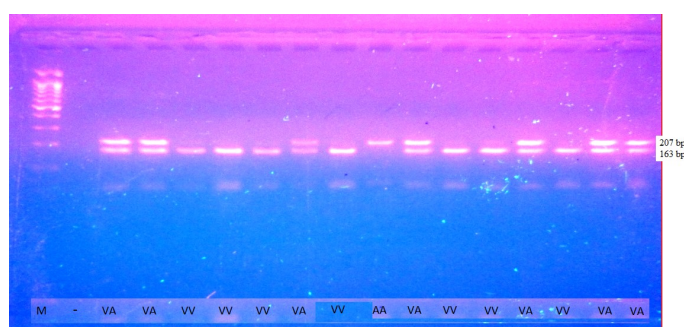
Isoform VA maupun VV baik pada kontrol maupun PDR, lebih banyak pada perempuan dibanding laki-laki. Isoform VA pada kontrol, pada perempuan 4,5 kalinya laki-laki, sedangkan isoform VV pada perempuan 1,7 kalinya laki-laki. Isoform VA pada PDR, pada perempuan 1,4 kalinya laki-laki, sedangkan isoform VV pada perempuan 14 kalinya laki-laki. Untuk NPDR, isoform VA pada laki-laki 2 kalinya perempuan, sedangkan untuk isoform VA pada laki-laki dan perempuan adalah sama.

Dari Tabel 6 terlihat bahwa alel V pada kontrol (DM-

non RD) 4,7 kalinya alel A, pada NPDR alel V 5,7 kalinya alel A, sedangkan untuk PDR, alel V 2,2 kalinya alel A. Hasil pemeriksaan polimorfisme V16A gen MnSOD dengan metode PCR-RFLP dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 6. Persentase alel A dan alel V pada subjek kontrol, NPDR dan PDR.

	Alel A (%)	Alel V (%)	Alel V: A
DM non-RD (KI) (n = 126)	22 (17,5%)	104 (82,5%)	4,7
KII (kasus)			
- NPDR	6 (15%)	34 (85%)	5,7
- PDR	24 (31,6%)	52 (68,4%)	2,2



Gambar 2. Hasil PCR-RFLP gen MnSOD dari sampel KI dan KII. M= Marker

4. Kesimpulan

Dari penelitian ini diambil kesimpulan bahwa:

1. Ditemukan satu kasus genotip AA pada penderita retinopati diabetika proliferasif lanjut (*advanced PDR*) kedua matanya.
2. Genotip VV pada kontrol (DM-non-retinopati), pada laki-laki 3,75 kalinya genotipe VA, pada perempuan 1,4 kalinya genotipe VA. Kalau keseluruhan, 1,9 kalinya VA. Genotipe VA pada perempuan, 4,5 kalinya laki-laki, sedangkan genotipe VV pada perempuan 1,73 kalinya laki-laki.
3. Genotipe VV pada NPDR, pada laki-laki 1,75 kalinya genotipe VA, pada perempuan 3,5 kalinya genotipe VA. Kalau keseluruhan, 2,3 kalinya genotipe VA. Genotipe VA pada perempuan 0,5 kalinya laki-laki, sedangkan genotipe VV pada perempuan sama dengan pada laki-laki.
4. Genotipe VV pada PDR, pada laki-laki 0,11 kalinya genotipe VA, pada perempuan 1,1 kalinya genotipe VA. Kalau keseluruhan 0,7 kalinya genotipe VA. Genotipe VA pada perempuan 1,44 kalinya laki-laki, sedangkan genotipe VV pada perempuan 14 kalinya laki-laki.

Acuan

- Abhary, S. & Burdon K.P., 2009, Diabetic retinopathy is not associated with carbonic anhydrase gene polymorphisms. *Journal of Molecular Vision* 15, 1179-84.
- Adler, S.G., Pahl, M. & Seldin, M.F., 2000, Deciphering diabetic nephropathy: progress using genetic strategies. *Journal of Curr Opin Nephrol Hypertensi* 9, 99–106
- Aiello, L.P. & Wong, J.S., 2000, Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. *Journal of Kidney International* 58 [Suppl 77], S113–S119
- Awata, T., Inoue, K., Kurihara, S., Ohkubo, T., Watanabe, M., Inukai, K., Inoue, I. & Katayama S., 2002, *Brief Genetics Report*. A Common Polymorphism in the 5'-Untranslated Region of the VEGF Gene Is Associated With Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes. *Journal of Diabetes* 51, 1635–9.
- Buraczynska, M., Ksiazek, P., Baranowicz-Gaszczyk, I. & Jozwiak, L., 2006, Association of the VEGF gene polymorphism with diabetic retinopathy in type 2 diabetes patients. *Journal of Nephrology Dialysis Transplant*, 1-6.
- De Vriese, A.S., Verbeuren, T.J., Van de Voorde, J., Lameire, N.H. & Vanhoutte, P.M., 2000, Endothelial dysfunction in diabetes. *Journal of Pharmacology* 130, 963–974
- Fong, D.S., Aiello, L., Gardner, T.W., King, G.L., Blankenship, G., Cavallerano, J.D., Ferris, F.L. & Klein, R., 2003, Reviews. Diabetic Retinopathy. *Journal of Diabetes Care* 26(1), 226-229.
- Guidot, D.M., McCord, J.M. & Wright, R.M., 1993, Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia: evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo. *Journal of Biology Chemistry* 268, 26699-703.
- Kiritoshi, S., Nishikawa, T. & Sonoda, K., 2003, Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes* 52, 2570-7.

- Klein, R., Klein, B.E., Moss, S.E., Davis, M.D. & DeMets, D.L., 1984, The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Journal of Arch Ophthalmol* 102, 520–526.
- Lee, S.J., Choi, M.G., Kim, D.S. & Kim, T.W., 2006, Manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) is associated with stages of albuminuria in Korean type 2 diabetic patients. *Journal of Metabolism Clinical and Experimental* 55, 1–7.
- McIntyre, M., Bohr, D.F. & Dominiczak, A.F., 1999, Endothelial function in hypertension: the role of superoxide anion. *Journal of Hypertension* 34, 539-45.
- Sujianto & Eko, A., 2009, Aplikasi Statistik dengan SPSS 16.0. Jakarta : Penerbit Prestasi Pustaka Publisher