

## Prevalensi Polimorfisme Gen CYP2B6\*9 pada Populasi Jawa

*The Prevalence of CYP2B6\*9 Gene Polymorphisms in Javanese Population*

Faisal Rahman<sup>1</sup>, Zullies Ikawati<sup>1\*</sup>, Viren Ramadhan<sup>1</sup>, Ahmad Hamim Sadewa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Magister Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

<sup>2</sup> Program Studi Magister Ilmu Biomedik, FKKMK, Universitas Gadjah Mada

Corresponding author: Zullies Ikawati; Email: Zullies Ikawati

Submitted: 15-10-2020

Revised: 10-11-2020

Accepted: 10-11-2020

### ABSTRAK

Polimorfisme enzim mempengaruhi respon obat baik secara langsung maupun tidak langsung. Varian genetik *CYP2B6* berkontribusi pada perubahan metabolisme obat dan konsentrasi plasma. Polimorfisme nukleotida tunggal *CYP2B6* yang diketahui, *CYP2B6\*9* (c.516G> T, g.15631, Q172H, rs 3745274) di ekson 4 menunjukkan variabilitas antar-etnis yang cukup besar. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui frekuensi polimorfisme *CYP2B6\*9* pada populasi suku Jawa di Indonesia. Sebanyak 89 subjek sehat berpartisipasi dalam penelitian ini. Polimorfisme *CYP2B6\*9* dianalisis dengan metode modifikasi alel-spesifik PCR untuk mengkonfirmasi prevalensi SNP dari 516G> T di ekson 4. Analisis ini melibatkan 89 orang subjek uji. Distribusi genotipe 516G/T *CYP2B6* pada populasi Jawa teridentifikasi sebagai berikut: GG - 4,5%, GT - 88,8% dan TT - 6,7%. Frekuensi alel 516G/T dari gen *CYP2B6* dalam populasi adalah G = 48,92% dan T = 51,08%. Tidak ada perbedaan signifikan yang diamati antara jenis kelamin ( $p>0,05$ , OR = 1,473, 95% CI [0,809-2,684]). Urutan berbasis populasi dianalisis dengan metode Hardy-Weinberg. Polimorfisme gen *CYP2B6\*9* ditemukan pada populasi suku Jawa. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengeksplorasi dampak varian ini pada respons klinis obat.

**Kata kunci:** *CYP2B6\*9*; polimorfisme gen; *nested PCR*

### ABSTRACT

Enzyme polymorphisms influence drug response either directly or indirectly. The genetic variant *CYP2B6* contributes to changes in drug metabolism and plasma concentrations. Known polymorphisms of the *CYP2B6* single nucleotide, *CYP2B6\*9* (c.516G> T, g.15631, Q172H, rs 3745274) in exon 4 show considerable inter-ethnic variability. This study aims to determine the frequency of *CYP2B6\*9* polymorphisms in the Javanese population in Indonesia. A total of 89 healthy subjects participated in this study. *CYP2B6\*9* polymorphisms were analyzed by the allele-specific PCR modification method to confirm the SNP prevalence of 516G> T in exon 4. This analysis included 89 test subjects. The distribution of genotype 516G / T *CYP2B6* in the Java population was identified as follows: GG - 4.5%, GT - 88.8%, and TT - 6.7%. The 516G / T allele frequencies of the *CYP2B6* gene in the population were G = 48.92% and T = 51.08%. No significant differences were observed between the sexes ( $p>0.05$ ; OR = 1.473; 95% CI [0.809-2.684]). Population-based sequences were analyzed by the Hardy-Weinberg method. *CYP2B6\*9* gene polymorphism was found in the Javanese population. Further research is needed to explore the impact of this variant on the clinical response of drugs.

**Keywords:** *CYP2B6\*9*; gene polymorphism; nested PCR

### PENDAHULUAN

*CYP2B6* adalah enzim metabolik utama untuk sejumlah obat. Obat-obatan yang dimetabolisme terutama oleh *CYP2B6* meliputi artemisinin, bupropion, siklofosamid, efavirenz, ketamin, dan metadon (Zanger dan Klein, 2013). Beberapa polimorfisme nukleotida tunggal (SNP) telah diidentifikasi di *CYPs* dan dikaitkan dengan perubahan aktivitas enzimatik

sehingga menyebabkan kegagalan pengobatan (Zanger dan Schwab, 2013).

*CYP2B6* merupakan enzim yang sangat polimorfik dengan lebih dari 100 SNP yang dijelaskan, banyak haplotipe kompleks dan frekuensi etnis dan ras yang berbeda (Turpeinen dan Zanger, 2012, Zanger dan Klein, 2013). Varian genetik *CYP2B6* yang dikarakterisasi secara fungsional berkontribusi

pada perubahan metabolisme obat dan konsentrasi plasma yang berbeda, sehingga individu diklasifikasikan sebagai pemetabolisme yang buruk atau cepat (Telenti dan Zanger, 2008). Varian genetik *CYP2B6* didokumentasikan sebagai prediktor yang berguna dari farmakokinetik dan respon obat (Rakhmanina dan Anker, 2010). Analisis SNP ini dapat berguna untuk meningkatkan kemanjuran obat dan dapat mengurangi potensi toksisitas obat sebelum pengobatan (Peko *et al.*, 2019).

Polimorfisme *CYP2B6* telah dibuktikan mempengaruhi respon farmakologis dan toksikologi terhadap obat yang bermakna secara klinis (Hananta *et al.*, 2018). Alel defisiensi fungsional yang paling umum adalah G15631T (*CYP2B6\*9*) yang merupakan bagian dari haplotipe *CYP2B6\*6* [Q172H, K262R]. Ini mempengaruhi proses penyambungan dan menyebabkan ekspresi enzim yang lebih rendah di hati (Hassani Idrissi *et al.*, 2018).

Dalam penelitian sebelumnya, frekuensi *CYP2B6\*6* pada orang Melayu sehat, Cina dan India masing-masing adalah 25,4%, 13,9% dan 18,5%, sedangkan frekuensi *CYP2B6\*6* pada pasien etnis Melayu dengan ketergantungan opioid yang menerima MMT adalah 19,3% (Musa *et al.*, 2012). Prevalensi polimorfisme *CYP2B6* juga telah diteliti pada penduduk Timor endemik malaria di Nusa Tenggara Timur, Indonesia. Frekuensi *CYP2B6\*9* (516G> T), *CYP2B6\*4* (785A> G) dan *CYP2B6\*6* (516G> T dan 785A> G) adalah 40,6%, 29,2% dan 22,9%, masing-masing. Prevalensi polimorfisme gen *CYP2B6* lebih tinggi dibandingkan pada populasi Melayu, Cina Han, India, dan Mesir (Hananta *et al.*, 2018).

Data sebaran *CYP2B6\*9* khususnya pada penduduk Jawa di Indonesia sangat terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui frekuensi *CYP2B6\*9* pada penduduk Jawa di Indonesia.

## METODOLOGI

### Rancangan dan Subjek Penelitian

Studi ini adalah studi cross sectional yang dilakukan pada penduduk asli Jawa di wilayah Yogyakarta. Total ada 89 relawan sehat yang terdiri dari 37 laki-laki dan 52 perempuan. Kriteria inklusi subjek adalah subjek yang dinyatakan sehat oleh tim dokter dan subjek merupakan generasi ketiga suku asli Jawa (memiliki ayah, ibu, kakek, nenek dari suku asli

Jawa), yang diperoleh melalui wawancara lisan maupun tertulis mengenai riwayat keluarga. Usia subjek berkisar antara 22 sampai dengan 55 tahun. Teknik pengambilan sampel adalah dengan cara konsekutif sampling yaitu mencari subjek penelitian yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi sampai terpenuhi jumlah sampel yang diperlukan. Pengambilan data dilakukan selama periode April-Mei 2019. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari komite etik FKKMK UGM No KE/FK/0558/EC/2018.

### Pengumpulan sampel dan ekstraksi DNA

Pengambilan sampel darah utuh sebanyak 3 mL untuk masing-masing partisipan, dikumpulkan dengan menggunakan tabung antikoagulan EDTA. DNA genom diekstraksi dari leukosit darah dan dimurnikan menggunakan *QIAamp® DNA Blood Mini purification Kit* (Qiagen, Hilden, Jerman). Konsentrasi DNA ditentukan menggunakan spektrofotometer Biochrom (NanoVue Plus™) sebelum amplifikasi reaksi rantai polimerase (PCR).

### Genotipe *CYP2B6\*9* (516G> T)

Genotipe alel *CYP2B6\*9* dilakukan dengan metode *nested PCR* dan analisis spesifik alel yang dimodifikasi. Alel *CYP2B6\*9* (516G> T) dihasilkan dari mutasi G> T pada posisi 516-nukleotida di ekson 4. Primer khusus untuk PCR pertama: *forward* primer (5'-TAA-ACT-GGA-GCT -AAT-AAT-CAA-3 ') dan *reverse* primer (5'-CTC-AGT-CTC-TCT-CTG-ACT-CTA-3').

Amplikonnya berukuran 616 pasang basa (bp). Untuk amplifikasi PCR kedua, urutan *forward* primer adalah 5'- GAC-CCC-ACC-TTC-CTC-TTC-CAG-3 ' dan 5'- GAC-CCC-ACC-TTC-CTC-TTC-CAT-3 ' untuk alel G dan T masing-masing, sedangkan urutan *reverse* primer sama dengan untuk PCR pertama. Kedua alel menghasilkan ukuran fragmen 388 bp dan ditampilkan di dua sumur gel berbeda dari sistem elektroforesis. Campuran reaksi memiliki volume total 25 µL, terdiri dari 1 µL gDNA sebagai template, 12,5 µL Campuran Merah MyTaq HS, 2 × (Bioline), primer (konsentrasi akhir 0,3 µM), dan air suling ganda (ddH<sub>2</sub>O). Kondisi siklus ditunjukkan pada Tabel I. Produk reaksi PCR pertama kemudian dianalisis dengan 1,5% elektroforesis gel agarosa dalam buffer 1 × TBE (Tris, Borate, EDTA).



Gambar 1. Hasil analisis genotipe CYP2B6\*9 pada subjek Jawa

Tabel I. Kondisi siklus PCR untuk genotipe gen CYP2B6\*9

Kondisi siklus	Waktu	1st PCR	2nd PCR
Pre-denaturasi	02:00 menit		94°C
Denaturasi	00:30 menit		94°C
Penempelan	00:30 menit	52°C	66°C
Pemanjangan	-	72°C – 01:00 menit	72°C – 00:45 menit
Final extention	07:00 menit		72°C
Total siklus	-	28	20

Prosedur untuk PCR kedua sama dengan prosedur PCR pertama, dengan produk PCR pertama sebagai cetakan DNA dan primer spesifik alel (konsentrasi akhir 0,25µM).

**Analisis statistik**

Peserta dibagi menjadi dua kelompok, laki-laki dan perempuan. Frekuensi alel dan genotipe untuk SNP ditentukan dengan penghitungan langsung. Analisis prevalensi polimorfisme gen CYP2B6\*9 dilakukan dengan menghitung proporsi frekuensi alel dan memeriksa deviasi dari Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). Analisis statistik dilakukan dengan uji chi-square dan rasio peluang menggunakan paket statistik SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0). Data ditunjukkan dalam distribusi prevalensi dalam bentuk tabel dengan confidence interval (CI) 95%.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Analisis Nested PCR dengan amplicon 388 bp menghasilkan dua fragmen untuk genotipe GT dan satu fragmen untuk genotipe GG atau TT. Gambar 1 menunjukkan hasil elektroforesis dalam gel agarosa 1,5% yang diamplifikasi pada PCR.

Prosedur genotipe untuk polimorfisme 516G>T dari gen CYP2B6 menunjukkan jumlah pemetabolisme yang buruk (TT, 6 dari 89), sedangkan jumlah cepat (GG, 4 dari 89). Secara umum, dalam populasi yang diteliti, persentase distribusi genotipe adalah sebagai berikut: GG - 4,5%, GT- 88,8% dan TT - 6,7%. Distribusi genotipe dan alel polimorfisme 516G> T pada penduduk Indonesia, baik laki-laki maupun perempuan dalam penelitian ini, serta hasil analisis statistik datanya dapat dilihat secara berurutan pada Tabel II dan Tabel III.

Dari seluruh partisipan, heterozigot (G/T) merupakan genotipe yang paling banyak ditemukan pada populasi ini yaitu sebanyak 79 (88,8%). Tidak ada perbedaan signifikan yang ditemukan antara jenis kelamin dalam frekuensi polimorfisme 516G> T, nilai p> 0,05 (p = 0,205), (OR = 1,473; CI 95% [0,809-2,684]). Semua distribusi frekuensi polimorfisme CYP2B6\*9 pada penelitian ini tidak memiliki deviasi yang signifikan dari HWE.

Penelitian ini menggunakan metode Nested Allele-Specific untuk menganalisis variasi genetik dari gen CYP2B6\*9 varian CYP2B6. Penggunaan dua pasang oligonukleotida dalam Nested Allele-Specific memungkinkan penghitungan siklus yang lebih

**Tabel II. Distribusi frekuensi genotipe CYP2B6\*9 pada pria dan wanita pada populasi Jawa**

Genotipe	Pria	Wanita	Total	<i>p-value</i>
	n (%)			
Mutan homozigot (T/T)	5 (13,5)	1 (1,9)	6 (6,7)	0,000
Heterozigot (G/T)	32 (86,5)	47 (90,4)	79 (88,8)	
Wildtype (G/G)	0 (0)	4 (7,7)	4 (4,5)	
Total	37 (100)	52 (100)	89 (100)	
HWE ( $\chi^2$ value)	21,48 ( $p > 0,05$ )	34,43 ( $p > 0,05$ )	53,62 ( $p > 0,05$ )	

**Tabel III. Distribusi frekuensi genotipe CYP2B6\*9 pada pria dan wanita pada populasi Jawa**

Genotypes	Ethnic groups		<i>p-value</i>
	Javanese (%)	Timorian (%)	
Wildtype (G/G)	4 (4,5)	39 (40,6)	0.000
Heterozygous (G/T)	79 (88,8)	31 (32,3)	
Homozygous mutant (T/T)	6 (6,7)	26 (27,1)	
TOTAL	89 (100)	96 (100)	
HWE ( $\chi^2$ value)	53,62 ( $p > 0,05$ )	0,56 ( $p > 0,05$ )	

tinggi, sehingga meningkatkan sensitivitas PCR. Peningkatan spesifisitas reaksi berasal dari pengikatan dua set primer terpisah pada template target yang sama (Green dan Sambrook, 2019).

Penelitian tentang frekuensi genotipe *CYP2B6\*9* di Indonesia telah dilakukan pada etnis Timor di daerah endemis Malaria, Kabupaten Amanatun Selatan, Provinsi Nusa Tenggara Timur. Berdasarkan data pada Tabel III, frekuensi genotipe *wild type* pada populasi Jawa 4,5% sedangkan pada populasi Timor sebesar 40,6%. Frekuensi genotipe mutan homozigot pada populasi Jawa sebesar 6,7%, sedangkan pada populasi Timor sebesar 27,1%. Frekuensi genotipe heterozigot merupakan genotipe yang paling dominan pada penduduk Jawa yaitu 88,8% dibandingkan dengan penduduk Timor yaitu 27,1% (Hananta dkk., 2018). Melalui analisis  $\chi^2$  didapatkan *p-value* antara frekuensi genotipe *CYP2B6\*9* pada penduduk Jawa dan penduduk Timor adalah 0,000, sehingga  $p < 0,05$ . Dengan demikian frekuensi genotipe *CYP2B6\*9* pada populasi Jawa dan Timor berbeda signifikan. Frekuensi alel yang berbeda antar populasi disebabkan oleh proses demografi yang netral seperti fenomena selancar dan adaptasi lokal (Hofer *et al.*, 2009). Alel T cenderung lebih tinggi pada wanita, tetapi tidak signifikan secara statistik

( $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa sebaran polimorfisme gen *CYP2B6\*9* antara jantan dan betina di Jawa hampir sama.

G15631T (*CYP2B6\*9*) adalah alel defisiensi fungsional yang paling umum yang merupakan bagian dari haplotipe *CYP2B6\*6* [Q172H, K262R] (Zanger dan Klein, 2013). Secara fenotip, homozigot TT adalah pemetabolisme yang buruk. Pada golongan TT homozigot, obat dalam bentuk bebas lebih banyak karena tidak dimetabolisme dengan baik oleh hati sehingga menjadi sangat toksik. Ketika individu ini diberikan obat dalam prodrug, efek obat menurun yang menyebabkan kegagalan pengobatan dan akumulasi prodrug dalam darah. Kondisi ini dapat meningkatkan efek samping obat. Ketika obat diberikan dalam bentuk aktif, laju sekresi menurun, dan konsentrasi obat aktif dalam darah meningkat seiring dengan potensi efek samping, oleh karena itu, dosis yang lebih rendah mungkin diperlukan pada individu ini untuk mengurangi efek samping (Hananta dkk., 2018). GT heterozigot dicirikan oleh aktivitas perantara dari enzim *CYP2B6* (dosis terapeutik yang dianjurkan dari obat), dan GG homozigot adalah pemetabolisme cepat. Pada kelompok homozigot, GG dianjurkan untuk meningkatkan dosis obat (Scibona dkk., 2015). Data farmakogenetik untuk *CYP2B6\*9* sangat

Tabel IV. Distribusi frekuensi alel CYP2B6\*9 pada pria dan wanita populasi Jawa

Allele	Male n (%)	Female n (%)	Total n (%)	p-value	OR*
T	42 (46.2)	49 (53.8)	91 (100)	0.205	1.473
G	32 (36.8)	55 (63.2)	87 (100)		
Total	74 (41.6)	104 (58.4)	178 (100)		

\*Odds Ratio (OR), 95% CI (confidence interval) [0.809–2.684]

terbatas. Diperlukan studi tentang pengaruh polimorfisme gen *CYP2B6* pada respon farmakologis dan toksikologi terhadap obat.

### KESIMPULAN

Kesimpulannya, penelitian ini telah mengidentifikasi varian alel *CYP2B6\*9* pada populasi di Jawa. Studi ini memberikan kerangka kerja untuk studi masa depan tentang peran varian polimorfik gen *CYP2B6\*9* dalam genesis berbagai penyakit atau desain studi farmakogenetik dan farmakokinetik masa depan dari substrat *CYP2B6\*9* pada populasi Jawa.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Fakultas Farmasi UGM dan Laboratorium Riset Terpadu FKMK UGM.

### DAFTAR PUSTAKA

- Green, M. R. and Sambrook, J. 2019, *Nested Polymerase Chain Reaction (PCR)*, United States of America, John Inglis.
- Hananta, L., Astuti, I., Sadewa, A. H., Alice, J., Hutagalung, J. and Mustofa 2018, The Prevalence of *CYP2B6* Gene Polymorphisms in Malaria-endemic Population of Timor in East Nusa Tenggara Indonesia, *Osong public health and research perspectives*, **9**, 192-196.
- Hassani Idrissi, H., El Khorb, N., Akoudad, A., Habbal, R. and Nadifi, S. 2018, Association of *CYP2B6* (G15631T) polymorphism with Clopidogrel resistance and genetic predisposition to Acute Coronary Syndromes (ACSs) in Morocco, *Gene Reports*, **11**, 244-249.
- Hofer, T., Ray, N., Wegmann, D. and Excoffier, L. 2009, Large allele frequency differences

between human continental groups are more likely to have occurred by drift during range expansions than by selection, *Ann Hum Genet*, **73**, 95-108.

- Musa, N., Zulkafli, M. I., Talib, N., Mohamad, N., Fauzi, H. and Ismail, R. 2012, Haplotypes frequencies of *CYP2B6* in Malaysia, *J Postgrad Med*, **58**, 235-41.
- Peko, S. M., Gueye, N. S. G., Vouvongui, C., Koukouikila-Koussounda, F., Kobawila, S. C., Nderu, D., et al. 2019, Cytochrome P450 *CYP2B6\*6* distribution among Congolese individuals with HIV, Tuberculosis and Malaria infection, *Int J Infect Dis*, **82**, 111-116.
- Rakhmanina, N. Y. and Anker, J. N. V. D. 2010, Efavirenz in the therapy of HIV infection, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **6**.
- Scibona, P., Vazquez, C., Cajal, A. R., Argibay, P. F. and Belloso, W. H. 2015, Prevalence of *CYP2B6* polymorphisms in Argentinians: the role of genetic testing, *Genet Mol Res*, **14**, 16594-9.
- Telenti, A. and Zanger, U. M. 2008, Pharmacogenetics of anti-HIV drugs, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **48**, 227-56.
- Turpeinen, M. and Zanger, U. M. 2012, Cytochrome P450 2B6: function, genetics, and clinical relevance, *Drug Metabol Drug Interact*, **27**, 185-97.
- Zanger, U. M. and Klein, K. 2013, Pharmacogenetics of cytochrome P450 2B6 (*CYP2B6*): advances on polymorphisms, mechanisms, and clinical relevance, *Front Genet*, **4**, 24.
- Zanger, U. M. and Schwab, M. 2013, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacol Ther*, **138**, 103-41.