



Polimorfisme P2Y12 Terhadap Agregasi Platelet Pada Pasien Penyakit Jantung Koroner

Oktaviarika Dewi Hermawatiningsih¹

¹STIKES Bhakti Husada Mulia Madiun Jl. Taman Praja No.25, Mojorejo, Jawa Timur 63139

¹ Prodi S1 Farmasi, STIKES Bhakti Husada Mulia Madiun, Indonesia

email: oktaviarika1717@gmail.com

Article Info

Article history:

Received March

2019 Received

in revised form

April 2019

Accepted June 2019

Available online June
2019

Kata kunci— agregasi
platelet; antiplatelet;
clopidogrel; polimorfisme
P2Y12

Abstrak

Polimorfisme genetik pada reseptor P2Y12 menjadi salah satu faktor penyebab variasi respon terhadap terapi antiplatelet. Variasi respon pada reseptor P2Y12 dapat menimbulkan Coronary Artheri Disease (CAD) pada pasien PJK. Penelitian ini dilakukan di RSUD Sidoarjo Jawa Timur dari bulan November sampai Desember 2017 yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh polimorfisme P2Y12 terhadap agregasi platelet pada pasien PJK. Metode penelitian yang digunakan adalah metode Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk pemeriksaan polimorfisme genetik P2Y12 dan metode Light Transmittance Aggregometry (LTA) untuk pengukuran agregasi platelet. Dari 30 sampel diperoleh data bahwa seluruh sampel memiliki jenis polimorfisme P2Y12 homozygot (wild type) dengan nilai bp sekitar 156 bp. Analisis inferensial yang dilakukan untuk mengetahui hubungan antara polimorfisme genetik P2Y12 dengan agregasi platelet diperoleh nilai $p = 0,130$. Dari hasil tersebut dapat dikatakan bahwa antara polimorfisme genetik P2Y12 dengan agregasi platelet tidak memiliki hubungan yang signifikan.

Keywords—

antiplatelet;

clopidogrel;

aggregation;

polymorphism P2Y12

Abstract

Genetic polymorphism of P2Y12 receptor is one of the factors responsible for the variation in response to antiplatelet therapy. Variations in response to P2Y12 receptors can cause Coronary Artheri Disease (CAD) in CHD patients. This research was conducted in RSUD Sidoarjo East Java from November to December 2017 which aims to determine the effect of P2Y12 polymorphism on platelet aggregation in CHD patients. The research method used is Polymerase Chain Reaction (PCR) for P2Y12 genetic polymorphism and Light Transmittance Aggregometry (LTA) method for platelet aggregation measurement. From 30 samples, it was found that all samples had homozygot (wild type) type P2Y12 polymorphism with bp value of about 156 bp. Inferential analysis was conducted to determine the relationship between polymorphism of P2Y12 with platelet aggregation obtained p value = 0,130. From these results it can be said that between the genetic polymorphism of P2Y12 and platelet aggregation has no significant relationship.

©2019PoliteknikHarapanBersamaTegal

Alamat korespondensi:

Prodi DIII Farmasi Politeknik Harapan Bersama Tegal

Gedung A Lt.3. Kampus 1

Jl. Mataram No. 09 Kota Tegal, Kodepos 52122 Telp.

(0283) 352000

E-mail: parapemikir_poltek@yahoo.com

p-ISSN:2089-5313
e-ISSN:2549-5062

I. PENDAHULUAN

Salah satu pengobatan yang digunakan pada pasien Penyakit Jantung Koroner (PJK) adalah antiplatelet. Antiplatelet merupakan golongan obat yang menghambat agregasi trombosit sehingga dapat menyebabkan terhambatnya pembentukan trombus. Terdapat berbagai jenis antiplatelet yang dapat digunakan, seperti cyclo-oxygenase-1 (COX-1) inhibitor (aspirin), antagonis reseptor P2Y₁₂ dengan ADP (thienopyridine seperti ticlopidine, clopidogrel, prasugrel dan ticagrelor), antagonis glycoprotein IIb/IIIa (abciximab, eptifibatide dan tirofiban) ^[1]. Antiplatelet golongan thienopyridine bekerja dengan menghambat ikatan ADP dengan reseptor P2Y₁₂ yang akan menghasilkan hambatan terhadap agregasi platelet ^[2]. Terdapat fakta bahwa beberapa pasien memiliki kondisi yang tidak baik terhadap hambatan agregasi platelet atau mengalami respon yang rendah terhadap terapi antiplatelet ^[2]. Beberapa faktor yang mempengaruhi variasi dari efektivitas clopidogrel antara lain polimorfisme reseptor P2Y₁₂, ketidakpatuhan, diet, status merokok, usia dan pengobatan lain (interaksi antar obat) ^[3]. Reseptor P2Y₁₂ merupakan reseptor yang mempengaruhi aktivitas platelet jika terjadi stimulasi ^[4].

Pada reseptor P2Y₁₂ diketahui memiliki variasi genetik yang dapat meningkatkan agregasi platelet dan juga memiliki peran dalam menimbulkan Coronary Artheri Disease (CAD) ^[5]. Polimorfisme genetik yang terjadi pada reseptor P2Y₁₂ menjadi salah satu faktor penyebab variasi respon terhadap clopidogrel ^[1]. Pada suatu penelitian yang dilakukan oleh Zoheir N, et al disebutkan bahwa polimorfisme genetik pada T744C yang terjadi di reseptor P2Y₁₂ memiliki keterkaitan dengan peningkatan agregasi platelet yang menunjukkan kemungkinan penyebab variasi respon terhadap terapi clopidogrel ^[6]. Polimorfisme P2Y₁₂ dapat menimbulkan penurunan respon terhadap pemberian terapi clopidogrel, sehingga hambatan terhadap agregasi platelet terganggu dan hal ini dapat menimbulkan peningkatan resiko terjadinya

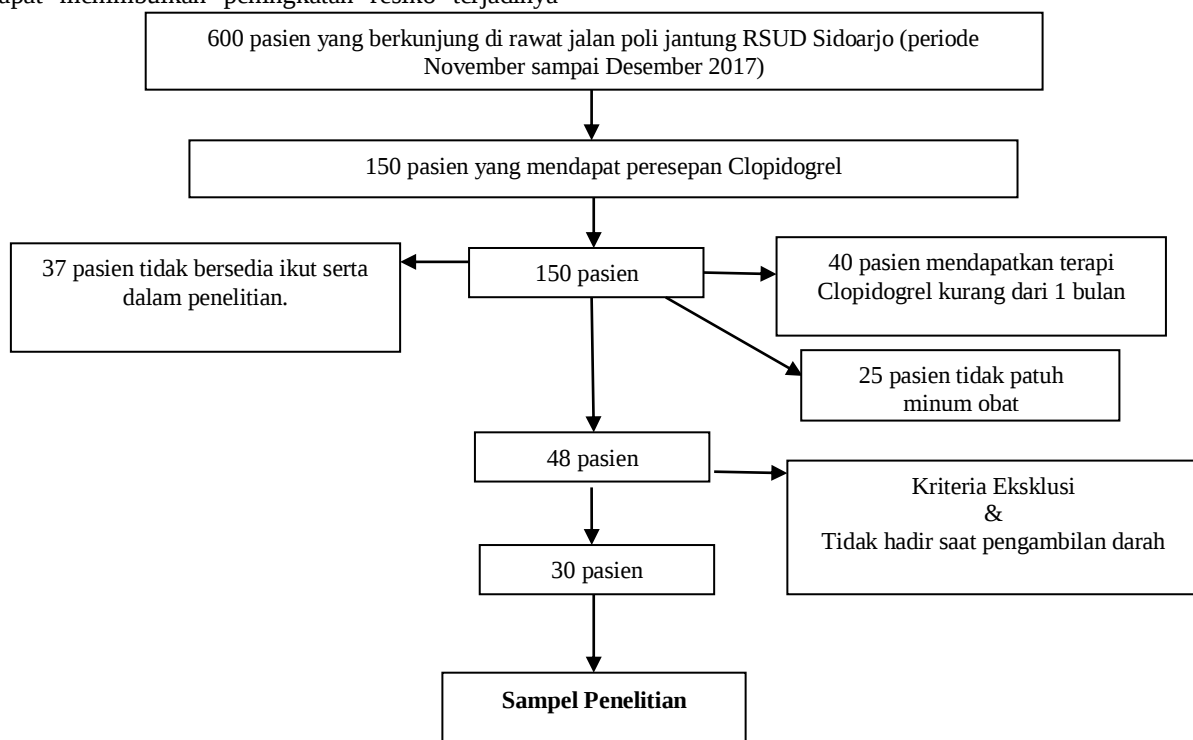
serangan CVD event yang berulang ^[7]. Selain itu penelitian lain menyatakan bahwa platelet memiliki peran yang penting terhadap perkembangan dari pembentukan arterosklerosis dan memiliki keterkaitan dengan kejadian cardiovascular event ^[8]. Tujuan dari penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh polimorfisme genetik P2Y₁₂ terhadap agregasi platelet pada pasien Penyakit Jantung Koroner (PJK). Pada penelitian ini sudah dilakukan pengujian kelayakan etik. Pada pengujian tersebut telah diberikan izin dengan no surat izin/laik etik (014/KE/III/2018), Institutional Ethical Committee University of Surabaya.

II METODOLOGI PENELITIAN

a. Pengumpulan Sampel

Tahapan awal dalam penelitian ini adalah orientasi lapangan secara on site di poli jantung rawat jalan RSUD Sidoarjo. Dari tahap tersebut didapatkan 600 pasien yang berkunjung dalam periode November sampai Desember 2017. Setelah itu dilakukan pemilihan calon sampel dengan memberikan Informed Consent. Pasien yang menjadi sampel penelitian merupakan pasien yang telah setuju dengan menandatangani Informed Consent dan masuk dalam kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi dalam penelitian ini terdiri dari telah menggunakan terapi clopidogrel minimal 1 bulan, patuh minum obat dengan penilaian menggunakan kuisioner Morisky-8 yang menunjukkan nilai 0, sedangkan kriteria eksklusi terdiri dari pasien tidak melakukan uji laboratorium, sedang menjalani kemoterapi, memiliki gangguan ginjal maupun gangguan liver. Dari tahap pemilihan sampel tersebut diperoleh

Jumlah sampel sebanyak 30 sampel. Semua sampel tersebut akan dilakukan pemeriksaan Platelet Function Test dan Polimorfisme P2Y₁₂. Hasil yang diperoleh akan dilakukan analisis dengan menggunakan metode statistik IBM SPSS versi 23.



Gambar 1 Alur Mendapatkan Sampel Penelitian

b. Alat dan Bahan

1) Pengambilan darah sampel

Sampel diharuskan berpuasa selama 10-12 jam sebelumnya. Darah diambil sebanyak 12 cc dengan menggunakan jarum dan vacutainer. Darah yang digunakan untuk pemeriksaan TAT dimasukkan ke dalam tabung citrat sebanyak 3 tabung yang masing-masing berisi 3 cc darah dan darah yang digunakan untuk pemeriksaan polimorfisme P2Y12 dimasukkan ke dalam tabung EDTA sebanyak 3 cc.

2) Pemeriksaan Platelet Function Test

Dilakukan pada whole blood yang ditambahkan dengan platelet agonis seperti arakhidonat atau ADP atau kolagen atau epinephrin. Sampel tersebut dilakukan pemeriksaan Light Transmittance Aggregometry (LTA) dengan metode turbidimetri.

3) Pemeriksaan polimorfisme P2Y12

i) Purifikasi DNA

Dilakukan dengan menggunakan Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Volume sampel sebanyak 300 µl ditambah 900 µl Lysis Solution untuk mensuspensikan sel darah putih. Setelah itu ditambah dengan Nuclei Lysis Solution sebanyak 300 µl. Jika gumpalan sudah tidak terlihat ditambah dengan RNase Solution sebanyak 1,5 µl dan Protein Precipitation Solution sebanyak 100 µl. DNA dicuci dengan ditambah 300 µl isopropanol dan etanol 70% sebanyak volume sampel DNA. Tahap terakhir ditambah dengan DNA Rehydrate Solution sebanyak 100 µl.

ii) Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA template 2,5 µl ditambahkan primer F dan primer R5' tttagagggtgtgtccaa3'/5' AATAATgttaccagcgcagagtgaa3' (34OC>Tpolymorphism) masing-masing sebanyak 2 µl, GoTaq® Green Master Mix, 2X sebanyak 12,5 µl dan Nuclease-Free Water sebanyak 6µl lalu di vortex selama 20 detik dan disentrifugasi. Setelah siap dimasukkan ke dalam mesin PCR dilakukan running dengan tahap awal denaturasi pada suhu 94°C selama 3 menit. Setelah itu dilakukan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94°C selama 20 menit, annealing pada suhu 53°C selama 20 detik, polymerasi pada suhu 72 °C selama 25 detik dan final extension pada suhu 72 °C selama 3 menit. Setelah diperoleh aplikon DNA dilakukan digesti dengan ditambahkan enzim restriksi TspRI sebanyak 1 µl dan buffer TAE 1X sebanyak 5 µl pada suhu 65°C selama 15 menit [19].

iii) Elektroforesis

Gel agarosa 0,8 gram dalam 40 ml TAE 1x dilarutkan dengan microwave setelah hangat dimasukkan dalam cetakan gel agarosa. Setelah gel agarosa membeku dimasukkan ke dalam chamber elektroforesis ditambah running buffer (TAE 1x) sampai terendam. Tiap sampel disuntikkan ke dalam lubang-lubang sumur sebanyak 3 µl. Proses elektroforesis dimulai dengan tegangan 70 volt. Setelah proses selesai dilanjutkan dengan visualisasi hasil elektroforesis melalui proses staining dalam larutan ethidium bromide (5mg/ml) selama 20 menit, kemudian dilanjutkan proses destaining dengan membenamkan didalam larutan air selama 15 menit. Setelah itu diamati migrasi DNA pada lampu UV transiluminator dan difoto [19].

c. Analisis Data

Dari hasil data yang diperoleh dilakukan analisis deskriptif dan inferensial. Dalam analisis deskriptif hasil polimorfisme dan agregasi platelet akan dinyatakan dalam proporsi (%) dan ditampilkan dalam diagram. Untuk analisis inferensial dilakukan dengan uji statistik dengan menggunakan IBM SPSS versi 23. Analisis diawali dengan menghitung nilai normalitas, jika nilai $p < 0,05$ maka sebaran data adalah tidak normal, sehingga uji yang digunakan adalah uji non parametrik. Namun jika nilai $p > 0,05$ maka sebaran data adalah normal, sehingga uji yang digunakan adalah uji parametrik.

III HASIL DAN PEMBAHASAN

a. HASIL

Dari 30 sampel didapatkan data pasien seperti pada (tabel 2). Hasil pemeriksaan agregasi platelet diperoleh bahwa 4 pasien (13,33%) memiliki kategori agregasi platelet sebagai hipoadregasi, 25 pasien (83,33%) termasuk dalam kategori normoadregasi dan 1 pasien (3,33%) termasuk dalam kategori hiperagregasi (gambar 2). Untuk data pemeriksaan polimorfisme P2Y12 diperoleh data pasien yang memiliki polimorfisme P2Y12 dengan jenis homozgot (wild type) sebanyak 30 sampel. Pada pemeriksaan polimorfisme P2Y12 akan diperoleh nilai base pairs (bp) dari masing-masing sampel, dari nilai (bp) tersebut akan dapat ditentukan jenis polimorfismenya (Gambar 3,4,5). Semua sampel sebanyak 30 akan diperoleh nilai (bp) seperti pada tabel 3.

Tabel 1 Ukuran fragmen DNA polimorfisme P2Y12

Polimorfisme	W	R
52G > T	129 + 23	152
34C > T	156	126 + 30

W = "wild-type allele", R = "rarer allele"

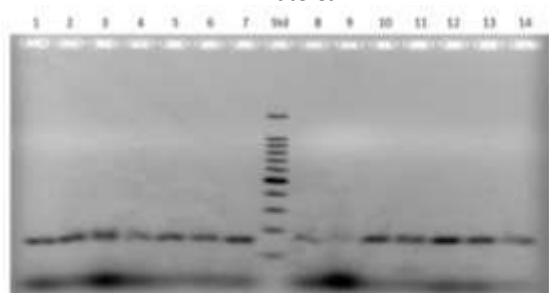
Analisis inferensial yang dilakukan pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui hubungan antara pengaruh polimorfisme P2Y12 dengan agregasi platelet. Untuk uji normalitas diperoleh nilai $p = 0,000$, nilai tersebut lebih kecil dari 0,05 sehingga sebaran data yang diperoleh adalah tidak normal. Data yang diperoleh bersifat kategorial sehingga uji yang digunakan adalah uji non parametrik. Uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji Mann-Whitney dan diperoleh nilai $p = 0,130$, nilai tersebut $> 0,05$, sehingga dapat dikatakan bahwa antara polimorfisme P2Y12 dengan agregasi platelet tidak memiliki hubungan yang signifikan. Hal ini dimungkinkan disebabkan karena sebaran data yang diperoleh dalam penelitian ini kurang bervariasi. Namun berdasarkan suatu penelitian lain menyebutkan bahwa polimorfisme P2Y12 dapat menimbulkan penurunan respon terhadap pemberian terapi clopidogrel, sehingga hambatan terhadap agregasi platelet terganggu dan hal ini dapat menimbulkan peningkatan resiko terjadinya serangan CVD event yang berulang [7].

Tabel 2 Data Demografi Sampel Penelitian

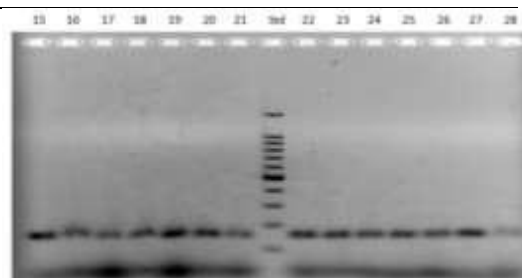
Demografi pasien	Jumlah pasien/ persentase (%)	Agregasi Platelet		
		Hipo agregasi	Normo agregasi	Hiper agregasi
Usia				
Awal masa dewasa (22-44 tahun)	1 (6,67)	-	1	-
Pertengahan masa dewasa (45-64 tahun)	28 (90,00)	4	23	1
Lansia (≥ 65 tahun)	1 (3,33)	-	1	-
Jenis Kelamin				
Laki-laki	16 (53,33)	4	12	-
Perempuan	14 (46,67)	-	13	1
Body Mass Indeks (BMI)				
Berat badan kurang (<18,5)	2 (6,67%)	-	1	1
Normal (18,5-22,9)	2 (6,67%)	1	1	-
Berat badan lebih (≥ 23)				
Beresiko (23-24,9)	6 (20,00%)	1	5	-
Obesitas tingkat I (25-29,9)	14 (46,67%)	2	12	-
Obesitas tingkat II (≥ 30)	6 (20,00%)	-	6	-
Sindrom Metabolik				
Ya	10 (33,33)	1	8	1
Tidak	20 (66,67)	3	17	-
Polimorfisme P2Y ₁₂				
Homozygot (<i>wild type</i>)	30 (100)	4	25	1



Gambar 2 Diagram Persentase Distribusi Frekuensi Agregasi Platelet



Gambar 3 Hasil elektroforesis setelah proses digesti oleh enzim restriksi TspRI. Sampel 1 sampai 14 menunjukkan pita dengan nilai bp antara 100-200 bp. Pita yang dihasilkan menunjukkan pita tunggal (homozygot wild type).



Gambar 4 Hasil elektroforesis setelah proses digesti oleh enzim restriksi TspRI. Sampel 15 sampai 28 menunjukkan pita dengan nilai bp antara 100-200 bp. Pita yang dihasilkan menunjukkan pita tunggal (homozygot wild type).



Gambar 5 Hasil elektroforesis setelah proses digesti oleh enzim restriksi TspRI. Sampel 29 dan 30 menunjukkan pita dengan nilai bp antara 100-200 bp. Pita yang dihasilkan menunjukkan pita tunggal (homozygot wild type).

Tabel 3 Nilai Bp dan Jenis Polimorfisme Sebelum dan

Sesudah Proses Digesti

No Sampel	Nilai Bp		Jenis Polimorfisme
	Sebelum Digesti	Sesudah Digesti	
1	165, 214	148	Homozygot (wild type)
2	168, 211	161	Homozygot (wild type)
3	164, 208	174	Homozygot (wild type)
4	161, 209	169	Homozygot (wild type)
5	160, 202	165	Homozygot (wild type)
6	160, 201	162	Homozygot (wild type)
7	-	154	Homozygot (wild type)
8	152, 206	158	Homozygot (wild type)
9	151, 205	162	Homozygot (wild type)
10	153, 208	156	Homozygot (wild type)
11	156, 204	154	Homozygot (wild type)
12	153, 211	151	Homozygot (wild type)
13	154, 202	151	Homozygot (wild type)
14	151, 206	150	Homozygot (wild type)
15	156	148	Homozygot (wild type)
16	152	164	Homozygot (wild type)
17	182	155	Homozygot (wild type)
18	173	161	Homozygot (wild type)
19	169	159	Homozygot (wild type)
20	157	161	Homozygot (wild type)
21	157	156	Homozygot (wild type)
22	153	155	Homozygot (wild type)
23	150	155	Homozygot (wild type)
24	147	156	Homozygot (wild type)
25	144	155	Homozygot (wild type)
26	143	159	Homozygot (wild type)
27	-	161	Homozygot (wild type)
28	146	165	Homozygot (wild type)
29	172	169	Homozygot (wild type)
30	168	162	Homozygot (wild type)

b. PEMBAHASAN

Pemilihan sampel pasien yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan dengan purposive sampling, pasien yang dipilih sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi penelitian. Sampel dilakukan uji normalitas dengan metode Mann-Whitney dan metode pengujian dilakukan dengan uji non parametrik yaitu uji hipotesis komparatif kategorik tidak berpasangan. Berdasarkan tabel 1 diperoleh usia sampel paling banyak pada usia pertengahan masa dewasa (45-64 tahun) dan hanya 1 pasien yang memiliki nilai agregasi platelet hiperagregasi dan 1 pasien dengan polimorfisme P2Y12 homozygot (wild type) memiliki nilai agregasi platelet hiperagregasi. Namun sebagian besar sampel pasien memiliki nilai agregasi platelet normoagregasi dengan presentase 83% (Gambar 2).

Polimorfisme genetik P2Y12 diteliti untuk mengetahui jenis polimorfismenya, pada penelitian ini dilakukan dua tahap pengecekan, Pertama sebelum dilakukan digesti yang akan menghasilkan 2 macam pita DNA dengan nilai base pairs (bp) antara 150 sampai 214, namun ada juga yang hanya menghasilkan satu pita DNA. Kedua setelah proses digesti, yang menghasilkan nilai base pairs (bp) antara 150 sampai 174.

Dari nilai base pairs (bp) tersebut diketahui jenis polimorfisme 30 sampel adalah homozygot (wild type) (Tabel 3). Selain diketahui jenis polimorfisme, 30 sampel juga diukur nilai agregasi plateletnya, terdapat 3,33% sampel yang memiliki nilai agregasi platelet hiperagregasi, 13,33% memiliki nilai agregasi platelet hipoagregasi dan 83,33%

memiliki nilai agregasi normoagregasi (Gambar 2). Berdasarkan suatu penelitian menyebutkan bahwa polimorfisme P2Y12 dapat menimbulkan penurunan respon terhadap pemberian terapi clopidogrel, sehingga hambatan terhadap agregasi platelet dari clopidogrel akan terganggu dan hal ini dapat menimbulkan peningkatan resiko terjadinya serangan CVD event yang berulang.⁷ Aktivitas dari jumlah platelet yang lebih besar pada pasien yang telah menggunakan terapi antiplatelet dapat digunakan sebagai tanda dari peningkatan resiko cardiovascular events (CVE) ^[10].

IV KESIMPULAN

Adanya polimorfisme genetik P2Y12 pada setiap sampel pasien dengan PJK tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap agregasi plateletnya. Namun perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih besar dan bervariasi untuk dapat diperoleh hasil yang lebih akurat.

V. UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada pihak RSUD Sidoarjo yang memberikan izin dalam pengambilan sampel penelitian ini serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penelitian ini

VI DAFTAR PUSTAKA

- [1] Saraf S, Bensalha I, Gorog DA. *Antiplatelet Resistance — Does it Exist and How to Measure it?*. Clinical Medicine : Cardiology 2009 : 3 77–91.
- [2] Ba C, Ma A, Moldovan V, Scridon A, Maier S, Mariana T. *The Impact of CYP2C19 Loss-of-Function Polymorphisms , Clinical , and Demographic Variables on Platelet Response to Clopidogrel Evaluated Using Impedance Aggregometry*. Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 2016.
- [3] Lampa M, Brooks JK, Barnard MR, Michelson AD. *Clopidogrel Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Vary Widely Despite Exclusion or Noncompliance , Diet , Smoking , Co-Medications (Including Proton Pump Inhibitors), and Pre-Existent Variability in Platelet Function*. 2013;61(8).
- [4] Yi X, Zhou Q, Wang C, Lin J, Liu P, Fu C. *Platelet receptor Gene (P2Y12 , P2Y1) and platelet glycoprotein Gene (GPIIb) polymorphisms are associated with antiplatelet drug responsiveness and clinical outcomes after acute minor ischemic stroke*. Eur J Clin Pharmacol. 2017.
- [5] Priyadharsini R, Umamaheswaran G, Raja TAR, Kumar ASA. *Frequency of single nucleotide platelet receptor gene polymorphism (P2Y12-i744T > C) in coronary artery disease patients among Tamilian population*. J Community Genet. 2017;3–8.
- [6] Zoheir N, Abd S, Abulata N, El M. *P2Y12 receptor gene polymorphism and antiplatelet effect of clopidogrel in patients with coronary artery disease after coronary stenting*. Blood Coagulation and Fibrinolysis. 2013.

- [7] Li M, Wang H, Xuan L, Shi X, Zhou T, Zhang N, et al. *Associations between P2RY12 gene polymorphisms and risks of clopidogrel resistance and adverse cardiovascular events after PCI in patients with acute coronary syndrome*. Medicine. 2017. 96:14.
- [8] Wisman PP, Roest M, Asselbergs FW, de Groot PG, Moll FL, van der Graaf Y, et al. *Platelet-reactivity tests identify patients at risk of secondary cardiovascular events: A systematic review and meta- analysis*. J Thromb Haemost. 2014;12(5):736–47.
- [9] Corporation P. *Wizard ® Genomic DNA Purification Kit* Wizard ® Genomic DNA. Solutions. 2009;1123–6.
- [10] Disease I, Sansanayudh N, Numthavaj P, Muntham D, Yamwong S, Mcevoy M, et al. *Prognostic effect of mean platelet volume in patients with coronary artery disease*. 2015;i:1299–309.