

**EFEK POLIMORFISME
GENA NITRIT OKSIDA SINTASE3 (NOS3) DAN
GENA MATRIKS METALOPROTEINASE-9 (MMP-9)
TERHADAP PENINGKATAN RESIKO ATEROSKLEROSIS
PADA PASIEN DENGAN HIPERTENSI**

**Laporan Akhir Penelitian
Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kesehatan**



**Oleh
dr. Fitranto Arjadi M.Kes
Saefuddin 'Aziz S.Si M.Si
dr. Alfi Muntafiah**

**KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JENDERAL SOEDIRMAN
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN
PURWOKERTO**

2012

Susunan tim peneliti :

- 1. dr. Fitranto Arjadi M.Kes**
- 2. Saefuddin 'Aziz S.Si M.Si**
- 3. dr. Alfi Muntafiah**

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, yang telah memberikan segala rahmat dan karunia-Nya sehingga laporan penelitian dengan judul “ EFEK POLIMORFISME GENA NITRIT OKSIDA SINTASE3 (NOS3) DAN GENA MATRIKS METALOPROTEINASE-9 (MMP-9) TERHADAP PENINGKATAN RESIKO ATEROSKLEROSIS PADA PASIEN DENGAN HIPERTENSI”.

Laporan penelitian ini dibuat dengan tujuan sebagai pertanggungjawaban ilmiah dan sebagai dokumen tertulis lengkap dari kegiatan penelitian yang dibiayai oleh Balitbang Kemenkes Republik Indonesia melalui program Risbin Iptekdok pada TA 2012. Penyusunan laporan penelitian tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu, peneliti menyampaikan terimakasih, penghargaan serta rasa hormat kepada :

1. Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kemenkes RI sebagai pemberi dana melalui program Risbin Iptekdok tahun 2012
2. Tim reviewer Pokja Penyakit Tidak Menular Risbin Iptekdok yang memperkenankan kami memperoleh dana tersebut.
3. dr. Hj. Retno Widiastuti, M.S., selaku dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Jenderal Soedirman
4. Lembaga Biologi Molekuler Eijkman sebagai tempat menimba ilmu khususnya dr. Alida Harahap SpPK PhD dan dr Iswari S. SpA (K)., PhD selaku supervisor.
5. Para pasien yang bersedia menjadi responden penelitian.
6. Seluruh pihak yang telah membantu baik secara moral, material, dan spiritual yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

Terdapat hal-hal yang ingin peneliti berikan kepada masyarakat sehingga peneliti berharap semoga hasil laporan penelitian ini dapat menjadi sesuatu yang

berguna bagi kita bersama. Peneliti menyadari bahwa hasil laporan penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu peneliti mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun untuk lebih menyempurnakannya. Akhir kata peneliti ucapkan terima kasih dan semoga hasil laporan penelitian ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Purwokerto, 12 Februari 2013

Peneliti

RINGKASAN EKSEKUTIF

Hipertensi berhubungan dengan gangguan vasodilatasi yang tergantung endotel, akibat penurunan kesediaan nitrit oksida (NO) dan terjadinya aktivasi angiotensin II (Ang II) yang berlebihan. Kadar NO yang rendah mengaktivasi matrik metaloproteinase-9 dan sitokin pro-inflamasi serta menurunkan kadar inhibitor MMP-9 sehingga hipertensi berkembang menjadi aterosklerosis.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui efek polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 pada pasien etnik Jawa dengan hipertensi. Metode penelitian menggunakan metode survai dengan rancangan penelitian kasus kontrol. Subyek kasus penelitian adalah penderita PROLANIS dokter keluarga Kabupaten Banyumas sebanyak 45 orang, yang memenuhi kriteria inklusi. Parameter yang diamati adalah kadar NO, Ang II dan tekanan darah sistolik dan diastolik). Data dianalisis dengan anova satu arah untuk mengetahui adanya perbedaan antara individu pembawa polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 dengan non polimorfisme terhadap kadar NO, angiotensin II, tekanan darah serta rasio MMP-9.

Kesimpulan penelitian adalah penderita hipertensi memiliki rasio genotip heterozigot gena NOS3 (3 pita) 2 X lebih besar dibandingkan genotipe mutan (1 pita). Responden kontrol memiliki rasio genotipe mutan gena NOS3 (1 pita) 2 X lebih besar dibandingkan genotipe heterozigot (3 pita). Pada gena MMP-9, kasus hipertensi memiliki rasio heterozigot (3 pita) 3 X lebih besar dibandingkan genotipe normal (2 pita). Responden kontrol memiliki rasio genotipe heterozigot dan genotipe normal yang seimbang. Pada polimorfisme gena NOS3, penderita hipertensi kemungkinan memiliki genotip heterozigot GT, 2,945 kali lebih besar daripada genotip GG ($p\text{-value}=0.014$) . dan pada polimorfisme gena MMP-9, penderita hipertensi kemungkinan memiliki genotipe heterozigot GA, 3,198 kali lebih besar daripada genotip GG ($p\text{-value}=0,008$) dan memiliki genotip AA, 1,548 kali lebih besar daripada memiliki genotip GG walaupun secara statistik tidak berhubungan ($p\text{-value}=0,726$) Uji statistik menunjukkan pada etnis Jawa tidak ada hubungan antara polimorfisme gena NOS3 dengan kadar NO ($p = 0,072$) dan Angiotensin II ($p=0,297$) dan antara polimorfisme gena MMP9 terhadap kadar Angiotensin II ($p=0,300$), tetapi ada hubungan antara polimorfisme gena MMP-9 terhadap kadar NO ($p=0,01$).

Diversitas frekuensi polimorfisme NOS3 dan MMP9 pada etnik Jawa berbeda dapat dijadikan rujukan penegakan hipotesia untuk mengetahui secara dini kemungkinan seseorang dapat menderita hipertensi di kemudian hari. Prediksi yang akurat memungkinkan dilakukan upaya untuk mencegah atau pun menghambat ekspresi penyakit hipertensi yang terkait genetis. Penelitian bisa dilanjutkan dengan meneliti efek polimorfisme gena MMP-9 terhadap kadar MMP-9 dan TIMP untuk mengetahui adanya ketidak seimbangan antara MMP dengan inhibornya yaitu *tissue inhibitor proteinase* (TIMP) dan peningkatan

sitokin proinflamasi seperti *tumor nekrosis faktor α* (TNF- α) dan *C- reactive protein* (CRP) pada penderita hipertensi.

ABSTRAK

Latar belakang. Hipertensi berhubungan dengan gangguan vasodilatasi yang tergantung endotel, akibat penurunan kesediaan nitrit oksida (NO) dan terjadinya aktivasi angiotensin II (Ang II), yang berlebihan.

Tujuan penelitian. Mengetahui efek polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 pada pasien etnik Jawa dengan hipertensi.

Metode penelitian. Metode survai dengan rancangan penelitian kasus kontrol, kasus adalah penderita PROLANIS dokter keluarga Kabupaten Banyumas 45 orang, yang memenuhi kriteria inklusi. Parameter yang diamati adalah NO dan Ang II. Data dianalisis dengan anova satu arah untuk mengetahui adanya perbedaan antara individu pembawa polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP

Hasil penelitian. Rasio genotip penderita hipertensi heterozigot gena NOS3 (3 pita) 2 X lebih besar dibandingkan genotipe mutan (1 pita). Responden kontrol memiliki rasio genotipe mutan gena NOS3 (1 pita) 2 X lebih besar dibandingkan genotipe heterozigot (3 pita). Pada gena MMP-9, kasus hipertensi memiliki rasio heterozigot (3 pita) 3 X lebih besar dibandingkan genotipe normal (2 pita). Responden kontrol memiliki rasio genotipe heterozigot dan genotipe normal yang seimbang. Pada polimorfisme gena NOS3, penderita hipertensi kemungkinan memiliki genotip heterozigot GT, 2,945 kali lebih besar daripada genotip GG ($p\text{-value}=0,014$) dan pada polimorfisme gena MMP-9, penderita hipertensi kemungkinan memiliki genotipe heterozigot GA, 3,198 kali lebih besar daripada genotip GG ($p\text{-value}=0,008$) dan memiliki genotip AA, 1,548 kali lebih besar daripada memiliki genotip GG walaupun secara statistik tidak berhubungan ($p\text{-value}=0,726$) Uji statistik menunjukkan pada etnis Jawa tidak ada hubungan antara polimorfisme gena NOS3 dengan kadar NO ($p = 0,072$) dan Angiotensin II ($p=0,297$) dan antara polimorfisme gena MMP9 terhadap kadar Angiotensin II ($p=0,300$), tetapi ada hubungan antara polimorfisme gena MMP-9 terhadap kadar NO ($p=0,01$).

Kesimpulan. Terdapat polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 pada pasien etnik Jawa dengan hipertensi. Tidak ada hubungan antara polimorfisme gena NOS3 dengan kadar NO dan Ang II dan antara polimorfisme gena MMP9 terhadap kadar Ang II tetapi ada hubungan antara polimorfisme gena MMP-9 terhadap kadar NO.

Kata kunci : polimorfisme gena NOS3, polimorfisme promoter gena MMP-9, nitrit oksida, angiotensin II

DAFTAR ISI

DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii

1. Pendahuluan	1
2. Tinjauan Pustaka	5
A. Hipertensi	5
B. Faktor-faktor yang menyebabkan hipertensi.	5
C. Polimorfisme gena NOS3 dan MMP-9	8
D. Nitrit Oksida.....	10
E. Angiotensin II	11
F. Etnis Jawa	12
3. Tujuan Penelitian	12.
4. Metode Penelitian.....	13
A. Metode dan Rancangan Penelitian.....	13
B. Lokasi dan Waktu penelitiann	13
C. Cara Pengumpulan Data	13
D. Analisis Data.....	18
5. Hasil dan Pembahasan.....	19
7. Kesimpulan dan Saran.....	30
8. Ucapan Terimakasih.....	30
9. Daftar Pustaka.....	30

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Klasifikasi Tekanan Darah JNC VII	5
Tabel 2. Larutan standar untuk NO	14
Tabel 3. Konsentrasi larutan standar untuk pemeriksaan Angiotensin II	17
Tabel 4. Sebaran usia responden antara penderita hipertensi dengan kontrol	19
Tabel 5. Rerata parameter biokimia antara kasus dan kontrol.....	19
Tabel 6. Variasi genotipe NOS3 dan MMP9 berdasarkan jumlah pita hasil restriksi.....	25
Tabel 7 Hubungan polimorfisme gena NOS3 dan MMP-9 dengan hipertensi.	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Lokasi polimorfisme gena NOS3	9
Gambar 2. Lokasi polimorfisme gena MMP-9	10
Gambar 3. Rantai ikatan protein angiotensin II	11
Gambar 4. Hasil elektroforesis Produk PCR untuk mendeteksi keberadaan gena.....	21
Gambar 5. Hasil elektroforesis Produk PCR-RFLP untuk mendeteksi variasi genotip gena NOS3.....	22
Gambar 6. Hasil elektroforesis produk PCR-RFLP untuk mendeteksi variasi genotip gena MMP9.....	23
Gambar 7 Hasil sekuensing produk PCR fragmen gena NOS3.....	24
Gambar 8 Hasil sekuensing produk PCR fragmen gena MMP-9.....	25
Gambar 9 Box Plot kadar NO antara pasien hipertensi dan kontrol pada berbagai variasi genotipe gena NOS3.....	26
Gambar 10 Box Plot kadar Angiotensin antara pasien hipertensi dan kontrol pada berbagai variasi genotipe gena NOS3.	27
Gambar 11. Mekanisme NO pada endotel pembuluh darah	32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Urutan nukleotida hasil sekuen produk PCR gena NOS3 dan MMP9

Lampiran 2. *Ethical clearance*

Lampiran 3. Data Responden

Lampiran 4. Data gena NOS3

Lampiran 5. Data gena MMP-9

Lampiran 6. Data Kadar Angiotensin

Lampiran 7. Data Hasil Analisis

Lampiran 8. Definisi Operasional Variabel

Lampiran 9. Realisasi Anggaran Penelitian

Lampiran 10. Draft Naskah Publikasi

1. Pendahuluan

Hipertensi adalah penyakit yang disebabkan karena terjadinya peningkatan tekanan darah sistolik atau diastolik ataupun keduanya. Diagnosis hipertensi ditegakkan apabila didapatkan tekanan darah sistolik (TDS) ≥ 140 mmHg dan tekanan darah diastolik (TDD) ≥ 90 mmHg pada dua kali pengukuran yang berbeda (1). Berdasarkan berat ringannya, hipertensi digolongkan menjadi 2 yaitu hipertensi stage I (tekanan darah sistolik ≥ 140 -159 mmHg, diastolik ≥ 90 -99 mmHg) dan hipertensi stage II (sistolik ≥ 160 mmHg, diastolik ≥ 100 mmHg). Rata-rata prevalensi hipertensi di Indonesia sekitar 8,3%, di kota besar seperti Jakarta lebih tinggi yaitu sekitar 14,2%, diikuti Bandung 10,2% dan Surabaya 12,5%. Hipertensi diklasifikasikan menjadi 2 jenis yaitu hipertensi primer atau esensial yang penyebabnya tidak diketahui dan hipertensi sekunder yang dapat disebabkan oleh penyakit ginjal, penyakit endokrin, penyakit jantung, gangguan anak ginjal, dll (2-5). Mayoritas hipertensi sebanyak 90% adalah hipertensi esensial yang tidak diketahui penyebabnya dan 10% adalah hipertensi sekunder akibat suatu penyakit. Permulaan hipertensi esensial biasanya timbul pada umur 25 tahun, namun pada usia ≥ 40 tahun seluruh kriteria hipertensi esensial baru bisa terpenuhi (6,7).

Terjadinya hipertensi disebabkan oleh interaksi berbagai faktor lingkungan maupun genetik (8-11). Abnormalitas pengaturan volume cairan garam, peningkatan irama vaskuler serta remodeling dinding vaskuler terlibat dalam perkembangan hipertensi. Salah satu faktor penyebab hipertensi adalah terjadinya stress oksidatif dan disfungsi endotel akibat mutasi titik pada gena NOS3 (12). Mutasi titik tersebut menyebabkan produksi nitrit oksida (NO) yang berfungsi sebagai vasodilator berkurang. Penurunan NO menyebabkan respon abnormal terhadap asetilkolin pada pembuluh darah atau meningkatkan resistensi vaskuler pada hipertensi (13).

Nitrit oksida (NO) disintesis dari L-arginin dan superoksida oleh nitrit oksida sintase endotel (eNOS) yang dikode oleh gena NOS3 dan lokasinya terdapat pada kromosom 7q35-36. Salah satu polimorfisme gena NOS3 ada pada ekson 7 pada nukleotida ke 894 karena adanya substitusi basa nukleotida

guanin menjadi timin (894G/T) (14). Perubahan satu nukleotida tersebut menyebabkan terjadinya perubahan asam amino glutamat menjadi asparagin pada posisi asam amino ke 298. Adanya polimorfisme gena NOS3 (894G/T) dapat dideteksi dengan PCR-RFLP menggunakan primer G894TF: 5'-CAT GAG CGT CAG CCC CAG AAC-3 dan primer G894TR: 5'-AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C-3' dan dilanjutkan dengan pemotongan menggunakan enzim restriksi *MboI*. Hasil elektroforesis apabila GG akan diperoleh pita berukuran 206 bp yang utuh, apabila TT terpotong menjadi 2 fragmen sepanjang 119 dan 87 bp, sedangkan GT menjadi 3 fragmen 206, 119 dan 87 bp (15).

Polimorfisme (894G/T) menyebabkan aktivitas enzim eNOS menurun, sehingga produksi NO berkurang. Polimorfisme tersebut merupakan faktor resiko untuk penyakit arteri koroner dan atherosklerosis (26-29). Prevalensi insiden stroke pada wanita kulit hitam di Afrika berusia antara 15-44 tahun, umumnya karena polimorfisme NOS3 tersebut dan sebesar 40% dari insiden stroke berkembang menjadi *stroke ischemia* (16,17). Pada populasi remaja yang terkena hipertensi di Ukraina, ada sebanyak 63% disebabkan oleh polimorfisme gena NOS3 (14). Pada populasi Turki variant 894G/T menyebabkan hipertensi akibat penurunan produksi NO, selain itu juga ditemukan sebanyak 41,3% yang terkena penyakit arteri koroner akibat mutasi 894G/T tersebut (15,18). Namun demikian sekalipun polimorfisme 894G/T telah dilaporkan berkaitan erat dengan kasus hipertensi dari berbagai ras, penelitian untuk ras India dan ras Minangkabau menunjukkan adanya perbedaan hasil (19,20).

Patofisiologi hipertensi melibatkan pula sistem Renin-Angiotensin. Angiotensin II (Ang II) dan NO berfungsi dalam mekanisme regulasi tekanan darah. Mekanisme umpan balik antara Angiotensin II dan NO dengan cara Ang II mengatur ekspresi nitrit oksida sintase sel endotel (eNOS) yang memproduksi NO dan mempengaruhi vasokonstriksi sel otot polos. Sebaliknya NO menurunkan ekspresi reseptor Ang II pada endotel dan melakukan vasodilatasi terhadap sel otot polos vaskuler (21).

Penurunan produksi NO pada sel endotel mengaktivasi matrik ekstra seluler tubulus ginjal yaitu matriks metaloproteinase 2 (MMP-2) dan matriks metaloproteinase-9 (MMP-9). Adapun tujuannya adalah untuk melakukan proses dilatasi pembuluh darah mikro pada glomerulus dan tubulus ginjal. Usaha ini dilakukan untuk meningkatkan filtrasi pada ginjal dan menurunkan tekanan darah. Tetapi tubulus mengalami kompensasi berupa hipertropi dan remodelling MMP. Semula pembuluh darah bagian tengah dan membran dasar endotel kapiler mengandung elastin dan kolagena ultrastruktural sebagai penghubung interstisial, tetapi karena terjadi ketidak seimbangan antara MMP dengan inhibitornya yaitu tissue inhibitor proteinase (TIMP), akan menyebabkan ekspresi MMP-2 dan MMP-9 meningkat. Proses berikutnya MMP-2 dan MMP-9 akan mendegradasi elastin dan kolagena tersebut serta menggantikan dengan kolagena teroksidasi yang lebih kaku. Sebagai akibatnya terjadi fibrosis pada ginjal disertai hipertropi ginjal dan ventrikel kiri jantung (22).

Hal ini diperparah apabila terjadi mutasi titik atau polimorfisme pada gena MMP-9 pada jarak nukleotida ke 277, dimana terjadi substitusi basa nukleotida Guanin menjadi Adenin. Mutasi titik tersebut mengakibatkan aktivasi MMP-9 secara terus menerus. Sebagai akibatnya terjadi peningkatan sitokin proinflamasi seperti tumor nekrosis faktor α (TNF α) dan C- reactive protein (CRP). Di antara sejumlah penanda proses inflamasi, CRP paling stabil dan penanda yang kuat untuk resiko kardiovaskuler. Peningkatan kadar CRP sejalan dengan disfungsi endotel pada pasien dengan hipertensi (23).

Polimorfisme pada promotor gena MMP-9 pada nukleotida 279 bp dapat dideteksi dengan metode PCR-RFLP menggunakan primer R279Q F: 5'- ATG GGT CAA AGA ACA GGA-3' dan primer R279Q R: 5'- GGT AGA CAG GGT GGA GG-3' dan dilanjutkan dengan pemotongan menggunakan enzim restriksi *SmaI*. Hasil elektroforesis apabila AA tidak terpotong dan menghasilkan pita berukuran 277 bp, apabila GG terpotong menjadi 2 fragmen 181 bp dan 96 bp dan GA menjadi 3 fragmen 276 bp, 181 bp dan 96 bp (24).

Polimorfisme (894G/T) menyebabkan aktivitas enzim eNOS menurun, sehingga produksi NO berkurang. Polimorfisme tersebut merupakan faktor resiko untuk penyakit arteri koroner dan atherosklerosis (25,26). Prevalensi insiden stroke pada wanita kulit hitam di Afrika berusia antara 15-44 tahun, umumnya karena polimorfisme NOS3 tersebut dan sebesar 40% dari insiden stroke berkembang menjadi *stroke ischemia* (16,17). Pada populasi remaja yang terkena hipertensi di Ukraina, ada sebanyak 63% disebabkan oleh polimorfisme gena NOS3 (14). Pada populasi Turki ditemukan sebanyak 41,3% variant 894G/T menyebabkan penyakit arteri koroner akibat penurunan produksi NO. 894G/T berhubungan erat dengan kejadian disfungsi endotel (15,18). Namun demikian sekalipun polimorfisme 894G/T telah dilaporkan berkaitan erat dengan kasus hipertensi dari berbagai ras, penelitian untuk ras Asia yang baru dilakukan untuk ras India menunjukkan adanya perbedaan hasil (19).

Perbedaan frekuensi polimorfisme gena NOS3 dan polimorfisme gena MMP-9 dengan kejadian hipertensi pada beberapa etnik manusia menarik untuk dikaji lebih lanjut. Hal ini mengingat Indonesia memiliki banyak etnik dan salah satunya adalah etnik Jawa yang terbesar. Disamping itu, analisis dasar molekuler polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 pada penderita hipertensi etnik jawa belum dilakukan, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian ini.

Rumusan masalah yang timbul adalah seberapa besar efek yang ditimbulkan oleh adanya polimorfisme gena NOS3 terhadap penderita hipertensi melalui pemeriksaan parameter NO, Ang II dan tekanan darah serta seberapa besar efek yang ditimbulkan oleh adanya polimorfisme gena MMP-9 terhadap resiko hipertensi melalui pemeriksaan MMP-9

Manfaat penelitian adalah untuk mengetahui kemungkinan diversitas frekuensi polimorfisme NOS3 dan MMP9 pada etnik yang berbeda sehingga dapat dijadikan rujukan penegakan hipotesa untuk mengetahui secara dini kemungkinan seseorang dapat menderita hipertensi di kemudian hari. Prediksi yang akurat memungkinkan dilakukan upaya untuk mencegah atau pun menghambat ekspresi penyakit hipertensi yang terkait genetis.

2. Tinjauan Pustaka

A. Hipertensi

Hipertensi adalah salah satu penyakit kardiovaskuler yang disebabkan oleh banyak faktor, baik faktor genetik maupun lingkungan (21) dengan klasifikasi terlihat pada Tabel.2.1. Hipertensi yang tidak diketahui penyebabnya disebut hipertensi esensial atau hipertensi primer dengan prevalensi sebesar 95% sedangkan 5-10% sisanya adalah hipertensi sekunder akibat adanya penyakit sebelumnya (27).

Tabel 1. Klasifikasi Tekanan Darah menurut JNC VII (28)

Kategori	Sistolik (mmHg)	Diastolik (mmHg)
Normal	< 120	< 80
Pre Hipertensi	130-139	80-89
Hipertensi		
Stage I	140-159	90-99
Stage II	≥ 160	≥ 100

B. Faktor-faktor yang menyebabkan Hipertensi

Faktor-faktor yang mempengaruhi hipertensi, yaitu :

1. Genetik

Hipertensi esensial melibatkan banyak faktor genetik, misalnya karena polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP9 sehingga sulit menghubungkan gena penyebab hipertensi, tetapi diduga menyumbang 30% pada variasi tekanan darah. Individu dengan orang tua hipertensi, berisiko terkena hipertensi sebanyak dua kali lipat dari individu normal (29).

2. Usia

Usia individu lebih dari 35 tahun sudah mulai berisiko hipertensi yang mulai terjadi penebalan dinding pembuluh darah, baik tunika intima maupun tunika media karena adalah peningkatan kolagena, penurunan elastin, dan juga kalsifikasi (30).

3. Etnik

Peran etnis belum jelas, tetapi diduga factor endotelin karena endotelin merupakan salah satu zat yang berperan sebagai vasoaktif, dalam regulasi tonus vaskuler dan homeostasis (31).

4. Jenis Kelamin

Angka kejadian hipertensi menunjukkan dominasi pada laki-laki hingga usia 45 tahun. Pada wanita, hormon estrogena berperan meningkatkan kadar *High Density Lipoprotein* (HDL) yang menjadi pelindung terjadinya aterosklerosis. Jumlah hormon estrogena menurun secara alami mulai terjadi pada wanita umur 45-55 tahun, sehingga angka kejadian hipertensi mulai terjadi pada wanita usia > 45 tahun (32).

5. Gaya Hidup

Individu yang rajin berolahraga untuk menghindari obesitas, mengikuti pola makan *dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH), mengurangi konsumsi rokok dan alkohol sama hasilnya dengan konsumsi *single-drug therapy* untuk hipertensi sehingga modifikasi gaya hidup sangat penting untuk pengelolaan hipertensi (29).

6. Zat-zat vasoaktif

Sel endotel pembuluh darah memiliki peran penting pada sistem regulasi kardiovaskuler karena mampu menghasilkan zat-zat vasoaktif seperti molekul *nitric oxide* sebagai vasodilator dan *endothelin peptide vasoconstrictor* sehingga gangguan sistem endotel berpengaruh pada hipertensi (30).

7. Saraf Simpatik

Sistem saraf simpatik berfungsi untuk vasokonstriksi dan vasodilatasi arteriol sehingga berperan mempertahankan tekanan darah pada kondisi normal, stres dan peningkatan aktivitas fisik (30).

8. Sistem Renin Angiotensin

Sistem Renin Angiotensin adalah sistem enzimatik yang berperan dalam proses pengaturan tekanan darah sistemik,

keseimbangan cairan dan elektrolit. Apparatus jukstaglomerulum menghasilkan renin apabila dirangsang oleh kondisi kehilangan natrium dan berkurangnya perfusi ginjal, dan restriksi sodium yang mengubah angiotensinogena yang dihasilkan oleh hati menjadi angiotensin I yang merupakan dekaeptidase inaktif. Angiotensin I akan diubah menjadi Angiotensin II oleh *angiotensin-converting enzyme*. Angiotensin II sebagai vasokonstriktor kuat berikatan dengan membran sel pada pembuluh darah, ginjal, kelenjar adrenal, otak sehingga menyebabkan vasokonstriksi dan hipertensi (34).

9. Merokok

Carbon monoxide (CO) sebagai salah satu komponen rokok berperan dalam aterosklerosis dan pembentukan trombus. *Polycyclic aromatic hydrocarbon* yang ada pada tar mempercepat terjadinya aterosklerosis dan nikotin meningkatkan *cardiac output*, *heart rate*, dan tekanan darah. Radikal bebas muncul karena fase gas atau tar yang masuk saat merokok mengaktivasi makrofag, netrofil, dan sumber radikal bebas endogen yang menurunkan kadar nitrit oksida (NO), dan menghasilkan *peroxynitrite* yang meningkatkan stres oksidatif, menyebabkan disfungsi endotel dan efek proinflamasi pada dinding pembuluh darah (35).

10. Asupan Garam

Hipertensi esensial tidak terjadi pada seseorang dengan konsumsi garam 50 mmol/hari dan konsumsi NaCl per hari yang disarankan adalah 9,9 gram. Makanan dengan kandungan Na Cl tinggi mengakibatkan kenaikan volume cairan ekstrasel yang selanjutnya melepaskan *digitalis like factor* yang menimbulkan kontraksi otot polos pembuluh darah sehingga resistensi perifer meningkat dan kenaikan tekanan darah (36).

11. Obesitas

Lemak berlebihan dalam tubuh terutama di hati adalah sumber angiotensinogena tambahan yang bisa mengaktivasi *Renin Angiotensinogena System* (RAS). Angiotensin II juga meningkatkan

adiposit disfungsional dalam jumlah besar sehingga meningkatkan jumlah leptin dan *Free Fatty Acid (FFA)* dan menurunkan adiponektin yang berakibat pada aktivasi sistem saraf pusat untuk respon hipertensi (37).

12. Alkohol

Alkohol meningkatkan sistem saraf simpatis yang akan mengakibatkan vasokonstriksi pembuluh darah dan meningkatkan kontraktilitas jantung. Alkohol juga menurunkan sensitivitas baroreseptor pada dinding arteri sehingga mengurangi sinyal ke sistem saraf pusat untuk mengendalikankan tekanan darah (38).

13. Kafein

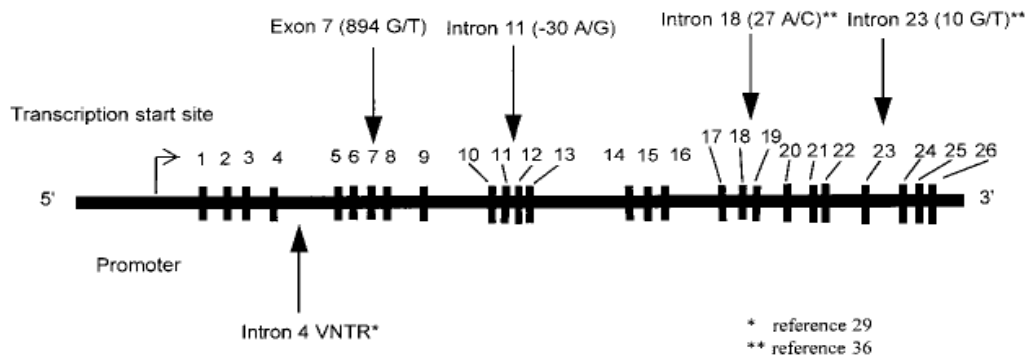
Kafein adalah substansi yang biasanya terdapat pada kopi, teh, dan minuman bersoda memiliki efek pada peningkatan tekanan darah (Terry *et al.*, 2000). Penelitian meta-analisis pada 11 *clinical trial* dengan lama konsumsi kafein 56 hari dan dosis 5 cangkir/hari, tekanan darah meningkat baik sistol yaitu sekitar 2,4 mmHg dan maupun diastol yaitu 1,2 mmHg jika dibandingkan dengan kelompok kontrol (39).

C. Polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9

Polimorfisme adalah keberadaan lebih dari satu alel dalam suatu lokus genetik dengan frekuensi alel-jarang $\geq 1\%$ di dalam suatu populasi (40). *Single nucleotide polymorphism* (SNP) terjadi karena substitusi basa nitrogen dalam satu nukleotida dan terdapat dua jenis substitusi basa nukleotida yang menghasilkan SNP yaitu, substitusi transisi terjadi antara purin (A, G) atau antara pirimidin (C, T). Jenis substitusi ini merupakan 2/3 dari semua SNP. Substitusi transversi terjadi antara purin dan pirimidin dan transversi merupakan fenomena variasi biologis yang alami (41).

Polimorfisme gena NOS3 terdapat di lima lokasi (**gambar 1**), meliputi empat daerah intron dan satu daerah ekson. Daerah ekson yang mengalami polimorfisme terletak pada ekson ke tujuh. Polimorfisme pada ekson ini terjadi karena adanya substitusi transversi basa Timin menjadi

Guanin (894G/T) yang mengakibatkan perubahan asam amino aspartat yang bermuatan positif menjadi glutamat yang bermuatan lebih netral pada posisi asam amino 298, sehingga mengakibatkan aktivitas enzim eNOS terganggu (42).



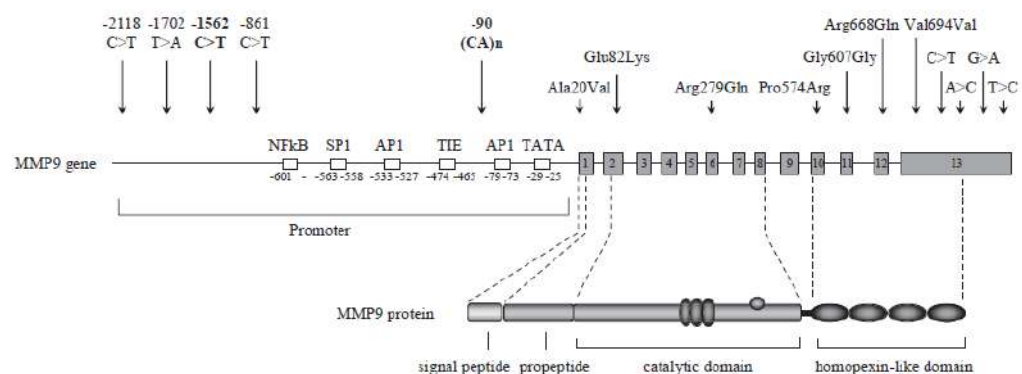
Gambar 1. Lokasi polimorfisme gena NOS3 (43)

Polimorfisme gena NOS3 jika didapatkan variasi susunan nukleotida pada urutan ke 894 bp dari gena NOS3 yang dideteksi dengan PCR-RFLP menggunakan primer G894TF: 5'-CAT GAG CGT CAG CCC CAG AAC-3 dan primer G894TR: 5'-AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C-3' dan dilanjutkan dengan pemotongan menggunakan enzim restriksi *MboI*. Hasil elektroforesis apabila GG akan diperoleh pita berukuran 206 bp yang utuh, apabila TT terpotong menjadi 2 fragmen sepanjang 119 dan 87 bp, sedangkan GT menjadi 3 fragmen 206, 119 dan 87 bp (15).

Polimorfisme gena Matriks Metaloproteinase-9 (MMP-9) ditemukan daerah promoter, *coding*, dan *untranslated regions*. Polimorfisme pada daerah promoter dan *coding*, akan meningkatkan risiko penyakit arteri koroner yang cukup signifikan (44). Gena MMP-9 terletak pada kromosom 20q12.2-13.1 (**gambar 2**). Polimorfisme pada gena MMP-9 telah dilaporkan berhubungan dengan adanya penyakit kardiovaskuler dan tingkat keparahannya itu sendiri (25). Polimorfisme gena Matriks Metaloproteinase-9 (MMP-9) terdapat di 16 lokasi yang terdiri atas 5 lokasi di daerah promoter dan lainnya di daerah ekson. Salah satu polimorfisme gena MMP-9 yang diamati dalam penelitian ini yaitu

polimorfisme pada ekson ke 6 pada urutan asam amino ke 279. Polimorfisme tersebut menyebabkan terjadinya perubahan asam amino arginin menjadi glutamin. Perubahan satu asam amino tersebut disebabkan oleh perubahan satu nukleotida dari Guanin menjadi Adenin.

Polimorfisme pada gena MMP-9 pada ekson ke 6 dapat dideteksi dengan metode RFLP yang mengkombinasikan tehnik PCR dengan restriksi DNA. Penggunaan primer R279Q F dan R279Q R dalam tehnik PCR dapat mengamplifikasi sebagian wilayah ekson 6 gena MMP-9 sebesar 277 bp. Urutan primer R279Q F dan R279Q R adalah sebagai berikut 5'- ATG GGT CAA AGA ACA GGA-3' untuk primer R279Q F dan 5'- GGT AGA CAG GGT GGA GG-3' untuk primer R279Q R. Produk PCR dapat dideteksi polimorfismenya secara cepat dengan cara pemotongan menggunakan enzim restriksi *SmaI*. Hasil elektroforesis apabila AA tidak terpotong dan menghasilkan pita berukuran 277 bp, apabila GG terpotong menjadi 2 fragmen 181 bp dan 96 bp dan GA menjadi 3 fragmen 277 bp, 181 bp dan 96 bp (44).



Gambar 2. Lokasi polimorfisme gena MMP-9 (44)

D. Nitrit Oksida

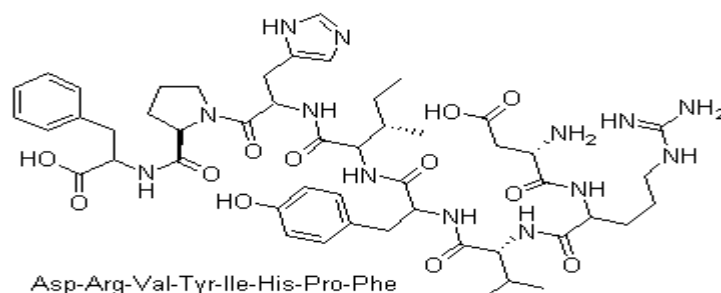
Nitrit oksida (NO) adalah radikal bebas yang disintesa oleh enzim *nitric oxide synthase* (NOS) yang mempunyai 3 bentuk, yaitu *neuronal nitric oxide synthase* (nNOS/NOS-1) pada sel saraf, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS/NOS-2) pada makrofag, dan *endothelial nitric oxide* (eNOS atau NOS-3) pada sel endotel pembuluh darah. Kadar nNOS dan

eNOS dalam tubuh relatif stabil, sedangkan kadar iNOS dipengaruhi oleh rangsangan (misalnya infeksi parasit) (39). Semua tipe NOS dapat membentuk NO dari arginin dengan bantuan oksigen molekuler dan *nikotiamid adenine dinukleotida fosfat* (NADPH) dengan hasil lain dari reaksi adalah sitrulin (45).

Nitrit oksida dalam aliran darah menyebabkan relaksasi otot polos sehingga berfungsi sebagai regulator aliran, tekanan darah, mencegah agregasi dan adhesi platelet, membantu transport oksigen dengan vasodilatasi dinding pembuluh darah serta menghambat proses peradangan pembuluh darah dengan menghambat eksositosis dari mediator peradangan (46). Sintesis NO terjadi di endotel vaskuler, berasal dari L-arginin dengan bantuan enzim NOS. Nitrit Oksida terus menerus dihasilkan dan ditransfer ke sel otot polos vaskuler, selanjutnya mengikat dan mengaktifkan guanil siklase (GC) yang menyebabkan guanosin trifosfat (GTP) berubah menjadi siklik guanosin monofosfat (cGMP) yang berfungsi mempertahankan tonus otot vaskuler (47).

E. Angiotensin II

Renin yang dihasilkan oleh sel jukstaglomelular memotong rantai antara leusin-leusin sehingga terbentuklah proangiotensin II dengan susunan rantai : aspartat-arginin-valin-tyrosin-isoleusin-histidin-pro-phenilalanin-histidin-leusin. *Angiotensin-converting enzyme* yang dihasilkan oleh paru-paru, sel endotel dan plasma darah selanjutnya memotong ikatan antara phenilalanin dan histidin sehingga terbentuk angiotensin II yang memiliki rantai : aspartat-arginin-valin-tyrosin-isoleusin-histidin- pro-phenilalanin (48).



Gambar 3. Rantai ikatan protein angiotensin II

Angiotensin II memiliki beberapa fungsi penting untuk memelihara homeostasis sirkulasi, yaitu merangsang konstriksi arteriol pada ginjal dan sirkulasi sistemis, reabsorpsi natrium pada proksimal nefron dan menstimulasi sekresi aldosteron dari korteks adrenal (49). Angiotensin II menyebabkan vasokonstriksi pada arteriol-arteriol pembuluh darah seluruh tubuh, termasuk ginjal dan menyebabkan peningkatan tekanan darah karena renin semakin banyak dilepaskan sebagai respon terhadap penurunan volume darah yang masuk ke pembuluh darah di ginjal. Angiotensin II juga merangsang sekresi aldosteron dari korteks adrenal yang selanjutnya meningkatkan penyerapan kembali NaCl dan air pada tubulus distal nefron sehingga tekanan darah semakin meningkat (50).

E. Etnis Jawa

Etnis adalah suatu golongan manusia yang diidentifikasi dari garis keturunan yang dianggap sama dan memiliki kesamaan budaya, bahasa, agama, perilaku dan ciri-ciri biologis (51). Etnis Jawa adalah suku terbesar di Indonesia (41,7%) dan merupakan sekumpulan manusia yang memakai Bahasa Jawa dan merupakan keturunan Jawa asli yang ditarik dari garis keturunan ayah dan ibu (52).

3. Tujuan Penelitian

- a. Mendeteksi polimorfisme gena NOS3 pada penderita hipertensi
- b. Mendeteksi polimorfisme gena MMP-9 pada penderita hipertensi
- c. Mengetahui efek polimorfisme gena NOS3 terhadap kadar NO dan Ang II penderita hipertensi
- d. Mengetahui efek polimorfisme gena NOS3 terhadap kadar NO dan Ang II penderita hipertensi

4. Metode Penelitian

A. Metode dan Rancangan Penelitian

Metode penelitian menggunakan **metode survai** dengan **rancangan penelitian kasus kontrol**. Sebagai subyek kasus adalah penderita hipertensi di wilayah Banyumas sejumlah 45 orang (19), yang memenuhi kriteria inklusi, laki-laki atau perempuan yang merupakan etnik Jawa (3 keturunan) berusia ≥ 40 tahun, tekanan sistolik atau diastolik $\geq 140/90$ dan tidak meminum obat hipertensi sedangkan sebagai subyek kontrol adalah 45 orang yang memenuhi kriteria inklusi, laki-laki atau perempuan yang merupakan etnik Jawa (3 keturunan) usia ≥ 40 tahun dengan kadar kolesterol, trigliserida, Indeks Massa Tubuh (IMT) dan kadar glukosa darah normal. Kriteria selanjutnya yaitu subyek penelitian baik subyek kasus maupun kontrol bersedia menandatangani *Inform Consent*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Waktu penelitian dimulai pada bulan Juli 2012-Desember 2012. Sampel diperoleh dari responden yang merupakan pasien klinik dokter keluarga di wilayah Kabupaten Banyumas. yaitu Klinik Mitra Sehat, Klinik Vira Medika dan Klinik dr. Catur Yuni. Analisis polimorfisme gena NOS3 dan MMP-9 di Laboratorium Terpadu Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. Analisis NO dan MMP-9 di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unsoed Purwokerto.

C. Cara Pengumpulan Data

1) Pengambilan darah subyek kasus dan subyek kontrol

- a) Setelah menandatangani *Informed consent*, responden diambil darahnya pada bagian vena mediana cubiti dengan venoject.
- b) Darah sebanyak 6 ml dibagi menjadi 2 bagian yaitu 3 ml darah ditampung pada tabung EDTA untuk isolasi DNA, 3 ml darah ditampung pada tabung plain tanpa antikoagulan untuk diambil serumnya guna analisis kadar MMP-9NO dan Ang II.

- c) Selanjutnya darah untuk pemeriksaan NO dan MMP-9, ditampung pada tabung Ependorf dan disentrifuse dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit
- d) Supernatan yang berwarna kuning berupa serum dipisahkan dari eritrosit dan digunakan untuk analisis NO dan MMP-9,

2) Pemeriksaan Kadar Nitrit oksida dengan metode Griess

a) Preparasi bufer untuk uji NO:

1. Bufer uji NO diencerkan 50x dengan aquabides kemudian disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan untuk melarutkan sampel.
2. Ke dalam satu vial kofaktor enzim ditambah 1,2 ml bufer uji NO kemudian disimpan pada -20°C sampai digunakan.
3. Ke dalam satu vial enzim nitrat reduktase ditambah 1,2 ml bufer uji NO kemudian disimpan pada -20°C sampai digunakan
4. Ke dalam vial standar nitrat ditambah 1,0 ml bufer uji NO, vortek dan campur dengan baik kemudian disimpan pada 4°C sampai digunakan
5. Reagen Griess R1 dan R2 yang telah siap pakai disimpan pada suhu 4°C

b) Pembuatan kurva larutan standar

1. Sebanyak 0,9 ml bufer ditambah 0,1 ml larutan nitrat standar standar yang disiapkan sebelumnya kemudian dicampur dan vortex
2. Konsentrasi akhir larutan standar NO dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Larutan standar untuk NO

Sumuran	Standar nitrat (L)	Bufer Uji (L)	Konsentrasi akhir (L)
A1	0	80	0
B1	5	75	5
C1	10	70	10
D1	15	65	15
E1	20	60	20
F1	25	55	25
G1	30	50	30
H1	35	45	35

c) Prosedur uji

1. Sebanyak 200 µl bufer uji dipipet ke dalam sumuran blanko
2. Sebanyak 80 µl plasma dipipet ke dalam sumuran sampel
3. Tiap sumuran sampel atau standar ditambah 10 µl campuran enzim kofaktor
4. Tiap sumuran sampel atau standar ditambah 10 µl campuran nitrat reduktase
5. Plate ditutup dan diinkubasi selama 1-4 jam pada suhu kamar
6. Tiap sumuran sampel atau standar ditambah 50 µl reagent Griess R1
7. Tiap sumuran sampel atau standar segera ditambah 50 µl reagent Griess R2.
8. Biarkan larutan menjadi berwarna selama 10 menit pada suhu kamar.
9. Larutan dibaca pada 540 nm dengan *plate reader*.

d) Perhitungan kadar NO

- 1.. Absorbansi sampel dan standar dikurangi absorbansi blanko
2. .Dibuat kurva standar dari absorbansi standar terhadap konsentrasi nitrat
3. Konsentrasi nitrat dan nitrit ditentukan sebagai berikut:

$$[\text{Nitrat} + \text{nitrit}] [\mu\text{M}] = \frac{[A_{540-y}] \times \{ 200 \mu\text{L} \} \times \text{pengenceran}}{\text{slope} \quad \text{volume sampel}}$$

3) Pemeriksaan tekanan darah

- a) Alat tensimeter digital dipasang kira-kira 2 cm di bawah tangan kiri kemudian dikencangkan.
- b) Alat tensimeter dihidupkan dengan menekan tombol on. Setelah 2 menit akan keluar angka yang menunjukkan tekanan sistolik (angka bagian atas) dan tekanan diastolik (angka bagian bawah). Hasil dicatat dalam satuan mmHg.

4) Isolasi DNA dengan Metode Guanidin (25)

- a) Darah EDTA 3 ml, diberi eritrosit lysing buffer 8-12 ml, dikocok ringan bolak balik. lalu diletakkan dalam lemari es selama 20 menit
- b) Selanjutnya diputar dengan alat sentrifuse 750 g kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit.
- c) Supernatan dibuang diberi 100 μ L SE bufer, dipindah ke tabung ependorf ukuran 1,5 mL, lalu ditambah 100 μ L guanidin, 700 μ L kloroform dan 400 μ L NaCl 4 M, dikocok kuat.
- d) Disentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, lalu bagian atas dari 3 lapisan diambil, dimasukkan ke dalam tabung Ependorf.
- e) Ditambahkan 1 vol isopropanol, dikocok dan muncul kabut.
- f) Disentrifuse 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm.
- g) Tampak pellet kemudian supernatan dibuang, sisa ditiriskan dengan kertas tisu.
- h) Ditambahkan etanol 70% sebanyak 500 μ L, kocok kuat dan disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 10.000 rpm.
- i) Supernatan dibuang, sisa diusap dengan kertas tissue dikeringkan selama 15 menit.
- j) Ditambahkan TE bufer 100-400 μ L dan disimpan pada suhu 4⁰C .

5) Pemeriksaan PCR-RFLP untuk polimorfisme 894G/T gena NOS3

Amplifikasi gena dengan PCR (15).

Primer forward G894TF: 5'-CAT GAG CGT CAG CCC CAG AAC-3' dan primer reverse G894TR: 5'-AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C-3', menghasilkan produk sepanjang 206 bp. Kondisi PCR meliputi denaturasi awal 94⁰C 5 menit, 35 siklus terdiri dari denaturasi 94⁰C 1 menit, annealing 59⁰C 1 menit, elongasi 72⁰C 1 menit dan elongasi akhir 72⁰C 7 menit. Pemotongan produk PCR dengan enzim endonuklease *Mbo*I. Hasil digesti dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa dan divisualisasikan dengan etidium bromide di bawah sinar UV. Hasil elektroforesis adalah : GG

tidak terpotong, TT terpotong menjadi 2 fragmen sepanjang 119 dan 87 bp, GT menjadi 3 fragmen 206, 119 dan 87 bp.

6) Pemeriksaan PCR-RFLP untuk polimorfisme gena MMP-9 (24)

Amplifikasi gena MMP-9 dengan PCR

Primer forward R279Q F: 5'- ATG GGT CAA AGA ACA GGA-3' dan primer R279Q R: 5'- GGT AGA CAG GGT GGA GG-3' , menghasilkan produk sepanjang 277 bp. Kondisi PCR meliputi denaturasi awal 95°C 5 menit, 35 siklus terdiri dari denaturasi 94°C 30 detik, annealing 58°C 30 detik, elongasi 72 °C 45 detik dan elongasi akhir 72°C 10 menit. Pemotongan produk PCR dengan enzim *Sma*I. Hasil digesti dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 5 % dan divisualisasikan dengan etidium bromid di bawah sinar UV. Hasil elektroforesis AA tidak terpotong, GG terpotong menjadi 2 fragmen 181 bp dan 96 bp dan CA menjadi 3 fragmen 277 bp, 181 bp dan 96 bp

7) Pemeriksaan Angiotensin II (metode ELISA Sandwich)

- a) Larutan EIA diluent konsentrat diencerkan dengan aquabidest perbandingan 1 : 10. Penyimpanan pada suhu 2⁰-4⁰C tahan 1 bulan
- b) Diencerkan 16 ng/ml Ang II standard dengan 4 ml EIA diluen untuk mendapatkan stok standar 4 ng/ml. Konsentrasi larutan standar dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Konsentrasi larutan standar untuk pemeriksaan Angiotensin II

Standard Point	Pengenceran	Kadar Ang II (ng/ml)
P1	Standard 4 ng/ml + 3 bagian EIA diluent	1
P2	1 bagian P1+ 1 bagian EIA diluent	0,5
P3	1 bagian P2+ 1 bagian EIA diluent	0,25
P4	1 bagian P3+ 1 bagian EIA diluent	0,125
P5	1 bagian P4+ 1 bagian EIA diluent	0,063
P6	1 bagian EIA diluents	0

b). Prosedur uji

- 1) Semua reagen, standard dan sampel (serum) diinkubasi pada suhu kamar sebelum digunakan
- 2) Ditambahkan 50 μ L standar atau sampel pada tiap *well*, kemudian *well* ditutup dengan mikropate cover dan diinkubasi selama 2 jam
- 3) Cuci 5 kali dengan 200 μ L wash buffer, kemudian Mikropate dibalik dikeringkan dengan diberi bantalan kertas tissue
- 4) Ditambahkan 50 μ L biotinylated Ang II antibodi pada tiap *well*, lalu diinkubasi selama 2 jam.
- 5) Cuci 5 kali dengan 200 μ L wash buffer lalu ditambahkan 50 μ L streptavidin peroksidase konjugat pada tiap *well*, kemudian inkubasi selama 30 menit.
- 6) Cuci 5 kali dengan 200 μ L wash buffer lalu ditambahkan 50 μ L substrat kromogenaik pada tiap *well*, kemudian inkubasi selama 15 menit
- 7) Ditambahkan 50 μ L asam hidroklorid untuk menghentikan reaksi. Larutan selanjutnya akan terjadi perubahan warna dari biru menjadi kuning
- 8) Larutan dibaca pada 540 nm dengan *plate reader*.
- 9) Konsentrasi Ang II diperoleh dari persamaan $y = ax + b$ dengan sumbu x = konsentrasi standard dan sumbu y = absorbansi

D. Analisis data

Seluruh data dianalisis dengan perangkat software statistik dan untuk mengetahui adanya perbedaan antara individu pembawa polimorfisme gena NOS3 dan MMP-9 dengan non polimorfisme digunakan **Anova satu arah** dan jika distribusi tidak normal dilanjutkan ke uji **Mann Whitney**.

5. Hasil dan Pembahasan

a) Identitas responden

Diperoleh data 49 responden yang termasuk dalam responden kasus hipertensi yaitu memiliki tekanan sistolik / diastolik $\geq 140/90$ mmHg berdasarkan kriteria JNC VII terdiri dari 13 laki-laki dan 36 perempuan yang berusia diatas 40 tahun dan kontrol sebanyak 49 responden yang terdiri atas 12 laki-laki dan 37 perempuan yang berusia diatas 40 tahun serta tidak memiliki riwayat hipertensi, sehingga rasio antara laki-laki dan perempuan pada subyek kasus dan kontrol adalah 1 : 3 (**tabel 4**).

Tabel 4. Sebaran usia responden antara penderita hipertensi dengan kontrol

No	Variabel	Kasus (n=50)	Kontrol (n=50)
1	Jenis kelamin		
	Laki-laki	16 (32%)	16 (32%)
	Perempuan	34 (68%)	34 (68%)
2	Usia (tahun)	60,64 $\pm$ 9,555	56,72 $\pm$ 9,051
	45-54	17 (34%)	24 (48%)
	55-64	14 (28%)	13 (26%)
	65-74	16 (32%)	11 (22%)
	75-80	3 (6%)	2 (4%)

Responden kemudian diambil darahnya pada bagian vena mediana cubiti untuk diperiksa secara biokimia dan molekuler. Pemeriksaan biokimia meliputi kadar NO, Angiotensin II, glukosa dan kolesterol. Pemeriksaan molekuler meliputi deteksi polimorfisme gena NOS 3 dan MMP-9 menggunakan metode PCR. Hasil rerata parameter biokimia dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Rerata parameter biokimia antara kasus dan kontrol

	Kontrol	Kasus
1	GDS	106,1 $\pm$ 42
2	Kolesterol Total	112,2 $\pm$ 46
3	Trigliserida	184,6 $\pm$ 33
4	NO	154 $\pm$ 117
5	Angiotensin	160,9 $\pm$ 89
6	Sistolik	32,5 $\pm$ 16
7.	Diastolik	34,53 $\pm$ 9,69
		5,9 $\pm$ 3,4
		14,53 $\pm$ 22
		124,0 $\pm$ 6
		152,2 $\pm$ 17
		79,0 $\pm$ 5
		88,9 $\pm$ 10

Rerata kadar NO plasma pada kelompok kasus adalah $34,53 \pm 9,69$ $\mu\text{mol/L}$ dan kelompok kontrol adalah $32,5 \pm 16$ $\mu\text{mol/L}$ yang termasuk kadar NO plasma normal ($25-45$ $\mu\text{mol/L}$) (20). Uji *Paired T-test* menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kadar NO antara kelompok hipertensi dan kelompok non hipertensi etnis Jawa ($p=0,002$, $p>0,05$). Nitrit oksida adalah suatu substansi dalam tubuh yang diproduksi oleh sel endotel dan berperan dalam regulasi tonus otot vaskuler yang jika menurun kadarnya dalam darah dapat meningkatkan resistensi perifer pembuluh darah yang menimbulkan hipertensi (47).

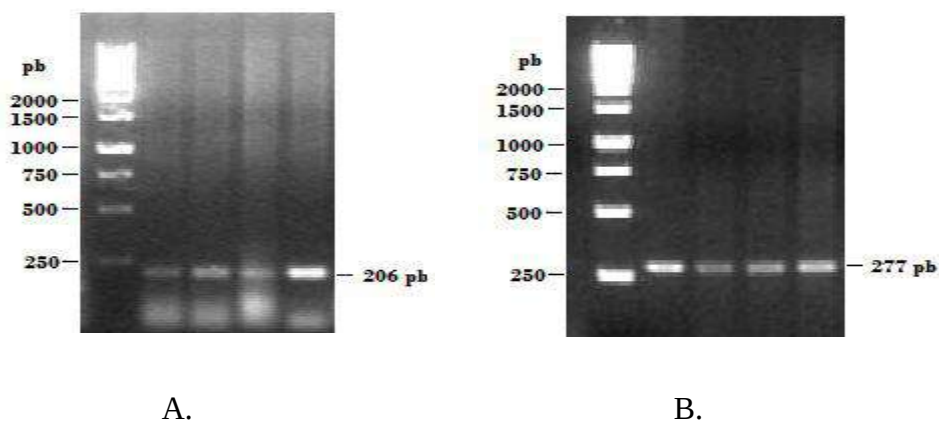
Kadar NO rendah adalah penanda kerusakan endotel vaskuler Joshi *et al.* 2007), dan dapat diakibatkan adanya reaksi biokimia akibat polimorfisme gen NOS3 pada Exon 7 Glu298Asp. Hernayanti (53) menemukan pada subyek yang teridentifikasi adanya polimorfisme gen NOS3 menunjukkan kadar NO yang lebih rendah ($5,8 \pm 1,29$ $\mu\text{mol/L}$) dibandingkan kontrol ($10,57 \pm 1,93$ $\mu\text{mol/L}$). Gen NOS3 adalah gen dengan kode genetik berperan memproduksi enzim eNOS, enzim yang berpengaruh dalam proses katalisis asam amino esensial arginin menjadi NO pada endotel. Polimorfisme gena NOS3 menurunkan aktivitas enzim eNOS sebesar 20-30% yang mengganggu sintesis NO (54).

Hasil analisis bivariat NO menunjukkan nilai CI 95% ($-7,148 - -1,754$) < 1 , yang berarti NO merupakan faktor protektif pada penyakit hipertensi. Penurunan bioaktivitas NO yang dapat meningkatkan risiko terjadinya hipertensi dapat terjadi melalui 3 mekanisme, yaitu perubahan substansi intraseluler transportasi L-arginin, perubahan aktivitas NOS akibat polimorfisme dan mutasi gen NOS3, peningkatan metabolisme NO akibat radikal bebas menjadi produk yang tidak dapat digunakan, misal nitrit (NO_2) dan nitrat (NO_3). Nitrit (NO_2) (56).

b) Deteksi polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 pada penderita hipertensi

Penggunaan metode PCR yang diikuti dengan restriksi/PCR-RFLP untuk mendeteksi keragaman genotip gena penyandi NOS3 dan MMP-9

telah dilakukan baik pada subyek kasus maupun kontrol. Secara umum gambaran produk PCR gena NOS3 menggunakan primer G894T dan produk PCR gena MMP-9 menggunakan primer R279Q sebelum dilakukan restriksi tersaji pada gambar berikut :



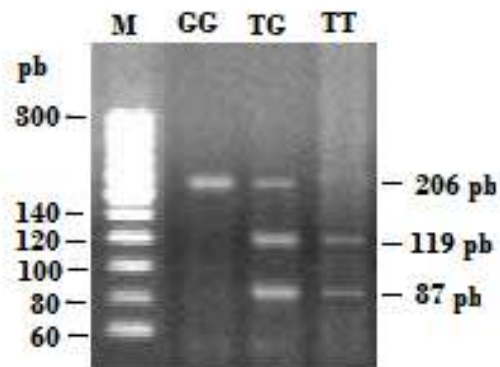
Gambar 4. Hasil elektroforesis Produk PCR untuk mendeteksi keberadaan gena.

A. Gena NOS3 dengan ukuran 206 pb.

B. Gena MMP-9 dengan ukuran 277 pb

Primer G894T yang digunakan dalam PCR mengamplifikasi bagian dari wilayah gena NOS3 dengan ukuran 206 pb sehingga adanya hasil amplicon seukuran 206 pb tersebut membuktikan bahwa dalam sampel DNA yang diambil dari darah responden menunjukkan dengan tepat keberadaan gena NOS3 tersebut. Demikian pula primer R279Q yang digunakan dalam penelitian ini untuk mendeteksi keberadaan gena MMP9. Adanya pita seukuran 277 pb menunjukkan dengan tepat bahwa dalam sampel DNA yang diambil dari darah responden terdapat gena MMP9. Produk PCR yang berupa satu pita tegas menunjukkan bahwa primer yang digunakan sangat spesifik. Hal ini karena kemunculan pita menunjukkan daerah dimana saja yang komplemen dengan primer dan makin sedikit daerah yang komplemen menunjukkan tingkat spesifitas primer.

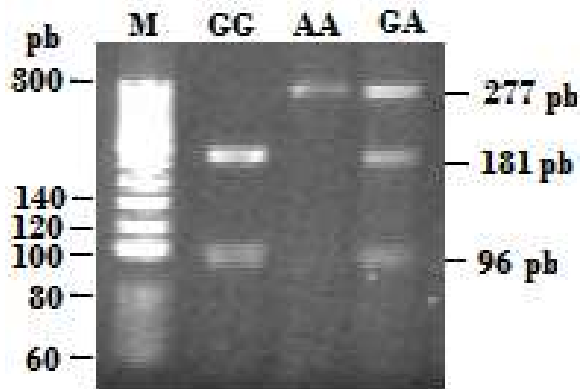
Penggunaan enzim restriksi untuk mendeteksi keragaman genotip gena NOS3 tersaji pada gambar berikut :



Gambar 5. Hasil elektroforesis produk PCR-RFLP untuk mendeteksi variasi genotip gena NOS3. M marker REF-20, GG tidak terpotong enzim restriksi ukuran pita 206 pb, TT terpotong enzim restriksi jadi dua pita 119 pb dan 87 pb, TG kombinasi dua pita yang terpotong dan tidak terpotong menghasilkan tiga pita ukuran 206 pb, 119 pb dan 87 pb.

Hasil PCR-RFLP dari fragmen gena NOS3 yang dipotong dengan enzim *MboI* (Gambar 5) mendapatkan pola pita yang bervariasi. Penggunaan enzim *MboI* akan mengenali urutan basa GATC dari arah 5' ke 3' dan akan memotong diantara basa A dan T. Proses terjadinya perubahan urutan basa akibat mutasi menyebabkan enzim restriksi tidak mampu mengenali lagi daerah tersebut, sehingga tidak dapat dipotong. Sampel yang menunjukkan satu pita dengan ukuran 206 pb menunjukkan bahwa genotipe sampel tersebut adalah GG. Adapun sampel yang menunjukkan dua pita dengan ukuran 119 pb dan 87 pb menandakan bahwa genotipe sampel tersebut adalah TT sedangkan sampel yang menunjukkan tiga pita dengan ukuran 206 pb, 119 pb dan 87 pb menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki genotipe GT.

Penggunaan enzim restriksi untuk mendeteksi keragaman genotip gena MMP-9 tersaji pada gambar berikut :



Gambar 6. Hasil elektroforesis produk PCR-RFLP untuk mendeteksi variasi genotip gena MMP9. M marker REF-20, AA tidak terpotong enzim restriksi ukuran pita 277 pb, GG terpotong enzim restriksi jadi dua pita 181 pb dan 96 pb, TG kombinasi dua pita yang terpotong dan tidak terpotong menghasilkan tiga pita ukuran 277 pb, 181 pb dan 96 pb.

Hasil PCR-RFLP dari fragmen gena MMP9 yang dipotong dengan enzim *SmaI* (Gambar 6) mendapatkan pola pita yang bervariasi. Penggunaan enzim *SmaI* akan mengenali urutan basa CC CGGG dari arah 5' ke 3' dan akan memotong diantara basa C dan G. Proses terjadinya perubahan urutan basa akibat mutasi menyebabkan enzim restriksi tidak mampu mengenali lagi daerah tersebut, sehingga tidak dapat dipotong. Sampel yang menunjukkan satu pita dengan ukuran 277 pb menunjukkan bahwa genotipe sampel tersebut adalah AA. Adapun sampel yang menunjukkan dua pita dengan ukuran 181 pb dan 96 pb menandakan bahwa genotipe sampel tersebut adalah GG sedangkan sampel yang menunjukkan tiga pita dengan ukuran 277 pb, 181 pb dan 96 pb menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki genotipe GA.

Sekuensing terhadap sampel produk PCR gena NOS3 yang menunjukkan perbedaan jumlah dan ukuran pita hasil pemotongan dengan enzim *MboI* tersaji pada gambar berikut :

	
	110 120 130 140 150
gi 2315713	GCTGCAGGCC CCAGATGATC CCCCAGAACT CTCCTTCTG CCCCCGAGC
gi 2315713	GCTGCAGGCC CCAGATGATC CCCCAGAACT CTCCTTCTG CCCCCGAGC
sample 19	GCTGCAGGCC CCAGATGAGC CCCCAGAACT CTCCTTCTG CCCCCGAGC
sample N2	GCTGCAGGCC CCAGATGATC CCCCAGAACT CTCCTTCTG CCCCCGAGC

Gambar 7. Hasil sekuensing produk PCR fragmen gen NOS3. Produk PCR sampel 19 berupa satu pita yang tidak terpotong, sedangkan sampel N2 berupa dua pita karena terpotong enzim *MboI*. Sekuan gi2315713 merupakan sekuen gen NOS3 dari manusia yang ada di gen bank. Nukleotida-nukleotida urutan ke 119 yang di cetak tebal menunjukkan adanya variasi diantara sekuen. Urutan nukleotida GATC bergaris bawah merupakan urutan yang dikenali enzim *MboI*

Perubahan satu nukleotida T menjadi G pada urutan ke 119 sekuen fragmen gen NOS3 menyebabkan terjadinya perubahan asam amino. Asam amino aspartat yang disandikan oleh triplet kodon GAT, berubah menjadi asam amino Glutamat yang disandikan oleh triplet kodon GAG. Perubahan tersebut menyebabkan perubahan kimia pada protein yang dibentuk. Asam amino aspartat memiliki titik isoelektrik 2,77 dan asam amino glutamat memiliki titik isoelektrik 3,22. Sekalipun dua asam amino tersebut bersifat asam, namun aspartat lebih mudah menangkap elektron daripada glutamat dikarenakan lebih rendahnya titik isoelektrik.

Sekuensing terhadap sampel produk PCR gena MMP-9 yang menunjukkan perbedaan jumlah dan ukuran pita hasil pemotongan dengan enzim *Sma*I tersaji pada gambar berikut :

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              60          70          80          90          100
gi|7427228  CCGACGACCG GTTTGGCTTC TGCCCCAGCG AGAGACTCTA CACCCAGGAC
sample m1   CCGACGACCG GTTTGGCTTC TGCCCCAGCG AGAGACTCTA CACCCAGGAC
sample k11   CCGACGACCG GTTTGGCTTC TGCCCCAGCG AGAGACTCTA CACCCGGGAC

```

Gambar 8. Hasil sekuensing produk PCR fragmen gen MMP9. Produk PCR sampel m1 berupa satu pita yang tidak terpotong. Sampel k11 berupa dua pita karena terpotong enzim *Sma*I. Sekuan gi7427228 merupakan sekuen gen MMP9 dari manusia yang ada di gen bank. Nukleotida-nukleotida urutan ke 96 yang di cetak tebal menunjukkan adanya variasi diantara sekuen. Urutan nukleotida CCCGGG bergaris bawah merupakan urutan yang dikenali enzim *Sma*I

Perubahan satu nukleotida G menjadi A pada urutan ke 96 sekuen fragmen gen MMP9 menyebabkan terjadinya perubahan asam amino. Asam amino arginin yang disandikan oleh triplet kodon CGG, berubah menjadi asam amino Glutamin yang disandikan oleh triplet kodon CAG. Perubahan tersebut menyebabkan perubahan kimia pada protein yang dibentuk. Asam amino arginin memiliki titik isoelektrik 10,76 dan asam amino glutamin memiliki titik isoelektrik 5,65. Oleh karenanya asam amino arginin bersifat basa sedangkan asam amino glutamin cenderung bersifat asam, sehingga glutamin lebih mudah menangkap elektron.

Penggunaan metode PCR-RFLP untuk mendeteksi variasi genotip dari gena NOS3 dan MMP9 terhadap sampel penderita hipertensi dan kontrol dari etnis jawa dapat dilihat pada tabel berikut :

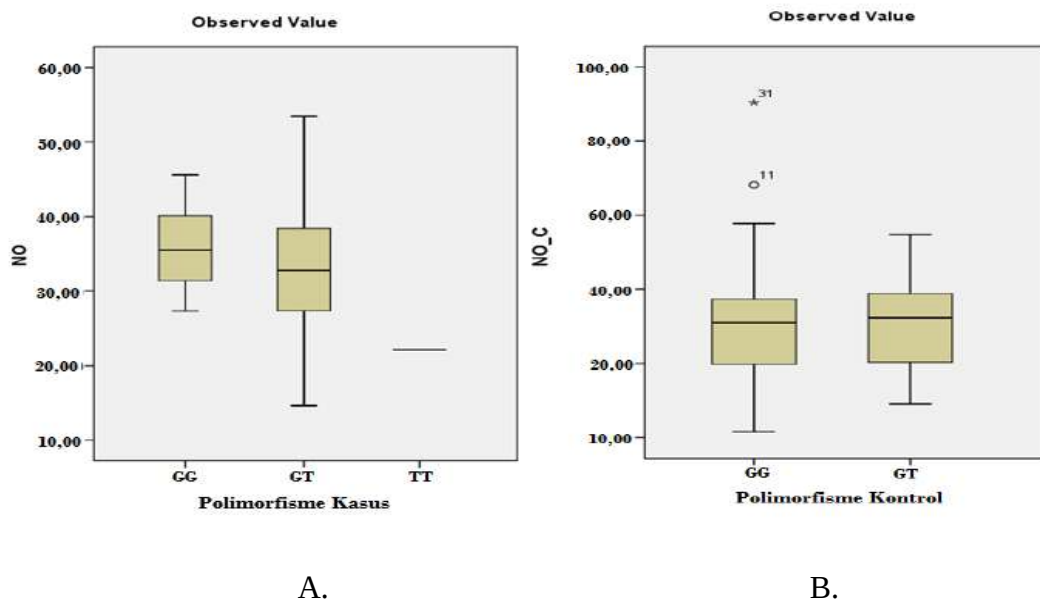
Tabel 6. Variasi genotipe NOS3 dan MMP9 pada etnis jawa berdasarkan jumlah pita hasil restriksi

Jumlah pita	Kasus				Kontrol			
	NOS3	%	MMP9	%	NOS3	%	MMP9	%
1	16	38,1	0	0	29	64,4	2	4
2	1	2,4	10	20,4	0	0	24	49
3	25	59,5	39	79,6	16	35,6	23	47
Jumlah	42	100	49	100	45	100	49	100

Tabel 6 menunjukkan sebaran genotipe gena NOS3 dan MMP9 antara responden penderita hipertensi dengan kontrol. Hasil tabel menunjukkan adanya kecenderungan bahwa pada penderita hipertensi memiliki rasio genotipe heterozigot gena NOS3 (tiga pita) lebih tinggi sekitar dua kali lipat lebih besar dibandingkan genotipe mutan (satu pita). Nilai persentase individu hipertensi bergenotipe normal 2,4%, sedangkan untuk genotipe mutan 38,1%, sedangkan nilai persentase genotipe heterozigot gena NOS3 pada penderita hipertensi mencapai 59,5%.

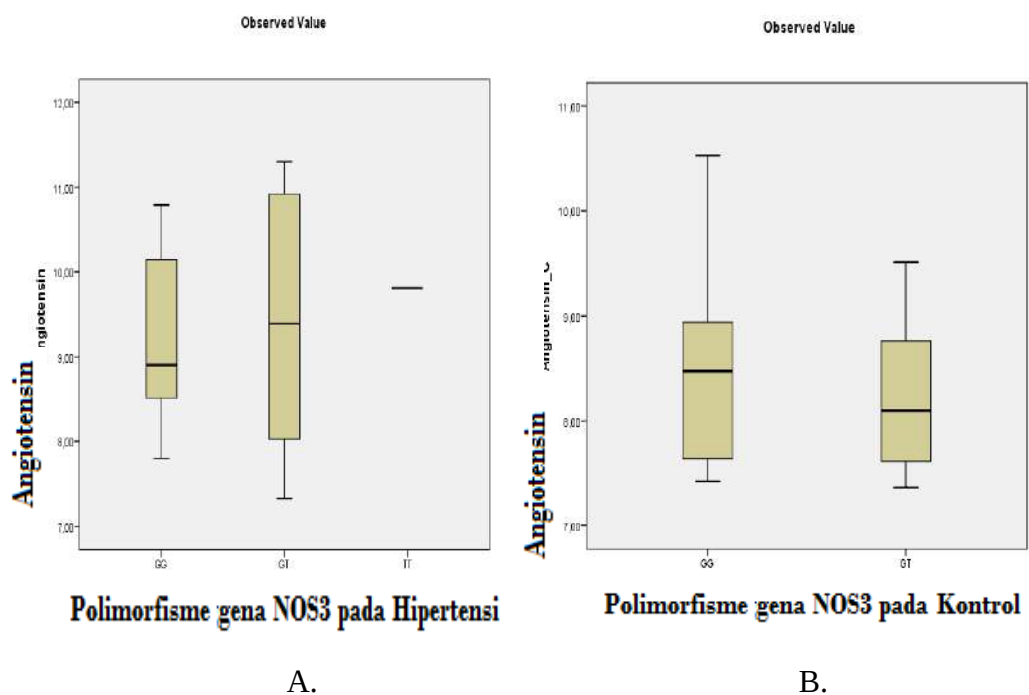
Bila dibandingkan dengan individu yang tidak hipertensi, proporsi genotipe heterozigot dengan mutan berbanding terbalik pada kasus pasien hipertensi. Responden tidak hipertensi memiliki persentase genotipe gena NOS3 heterozigot (16%) yang lebih rendah hingga mendekati setengah dari proporsi genotipe mutan (29%). Polimorfisme gena MMP9 pada kasus hipertensi memiliki rasio heterozigot (tiga pita) tiga kali lipat lebih besar dibandingkan genotipe normal (dua pita) yaitu 39% : 10%, sedangkan responden kontrol memiliki rasio genotipe heterozigot dan genotipe normal yang seimbang (23% : 24%).

Kadar NO antara subyek kasus dengan kontrol berdasarkan variasi genotipe gena NOS3 dan gena MMP9 tersaji pada box plot berikut :



Gambar 9. Box Plot kadar NO antara pasien hipertensi dan kontrol pada berbagai variasi genotipe gena NOS3. A Pasien Hipertensi, B. Kontrol.

Hasil box plot gambar 9. menunjukkan bahwa kadar NO pada penderita hipertensi dan kontrol tidak menunjukkan perbedaan yang nyata pada rerata bila dilihat berdasarkan polimorfisme gena NOS3. Hal ini menunjukkan bahwa pada etnis Jawa kadar NO tidak terkait dengan adanya polimorfisme gena NOS3. Tinggi rendahnya kadar NO disumbangkan oleh berbagai faktor. Pada penelitian ini polimorfisme gena NOS3 juga menyumbangkan peningkatan kadar NO namun tidak secara mutlak, sehingga variasi gena NOS3 antara kasus pasien hipertensi dengan kontrol tidak mempengaruhi tinggi rendahnya kadar NO.



Gambar 10. Box Plot kadar Angiotensin antara pasien hipertensi dan kontrol pada berbagai variasi genotipe gena NOS3.

A Pasien Hipertensi,

B. Kontrol.

Berdasarkan grafik box plot menunjukkan bahwa ada perbedaan nyata antara pasien hipertensi dengan non hipertensi pada tingkatan kadar angiotensin II. Pasien hipertensi memiliki nilai tengah kadar angiotensin lebih tinggi dari pada kontrol. Sebaran genotipe NOS3 pada kontrol jika dilihat dari kadar angiotensinII-nya menunjukkan pola yang seragam antara genotipe GG dan genotipe GT. Namun demikian sebaran genotipe NOS3 pada pasien hipertensi cenderung beragam. Sekalipun nilai tengah

kadar Angiotensin pada masing masing genotipe NOS3 cenderung makin meningkat dengan adanya mutasi (GG<GT<TT) namun demikian data menunjukkan bahwa genotipe GT cenderung memiliki kadar Angiotensin yang sangat beragam. Beragamnya kadar angiotensin pada genotipe GT masih menjadi pertanyaan yang belum terjawab.

2. Analisis statistik hubungan polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP9 terhadap hipertensi etnis Jawa

Tabel 7. Hubungan Polimorfisme Gen NOS3 dan MMP-9 dengan Hipertensi

Variabel	Tekanan Darah		OR (95% CI)	p= <i>value</i>
	Hipertensi	Nonhipertensi		
Gena NOS3				
GT+TT	26 (61,9%)	16 (35,6)	2,945	0,014
GG	16 (38,1%)	29 (64,4)		
Gena MMP-9				
AA	5 (10%)	6 (12%)	1,548 (0,4-5,988)	0,726
GA	31 (62%)	18 (36%)	3,198(1,338-7,646)	0,008
GG	14 (28%)	26 (52%)	1	
Total	50 (100%)	50 (100%)		

Sumber : Data terolah, 2013.

Hasil identifikasi polimorfisme gena NOS3 pada penelitian ini menunjukkan bahwa proporsi genotip GG memiliki proporsi 38,1%, GT 59,5% dan TT 2,4% pada kelompok kasus dan pada kelompok kontrol didapatkan proporsi genotip GG 64,4%, GT 35,6% dan TT 0% dan uji statistik menunjukkan hubungan yang bermakna antara polimorfisme gena NOS3 dengan pasien hipertensi etnis Jawa dengan nilai signifikansi $p=0.014$ ($P<0.05$). Pada polimorfisme gena NOS3, penderita hipertensi kemungkinan memiliki genotip heterozigot GT, 2,945 kali lebih besar daripada genotip GG ($p\text{-value}=0.014$)

Gena NOS3 merupakan gena yang membentuk enzim eNOS, enzim yang bekerja sebagai katalisator pembentukan NO dari asam amino arginin

menjadi sitrulin. Pada polimorfisme genotipe GT terjadi perubahan susunan basa pada gena NOS3 yang dapat menurunkan aktivitas enzim eNOS sehingga bioavailabilitas NO menjadi rendah (15) dikarenakan setiap kehadiran alel T pada gen NOS3 akan menurunkan aktivitas dari eNOS dan pada alel GT aktivitas dari eNOS sebesar 63% sedangkan pada alel TT aktifitas eNOS sebesar 22% (55). Penurunan kadar NO dalam sel endotel menurunkan reaksi cGMP yang menyebabkan peningkatan influks Ca^{2+} intrasel otot polos sehingga tunika muskularis pembuluh darah berkontraksi. Penurunan kadar NO juga memacu sintesis substansi vasokonstriktor dalam sel endotel seperti endothelin, angiotensin II dan tromboxan. Mekanisme kedua terjadinya hipertensi adalah terjadinya proses agregasi trombosit dan monosit yang menyebabkan kekakuan di sel endotel yang diakibatkan karena penurunan reaksi cGMP (56).

Pada polimorfisme gena MMP-9, penderita hipertensi kemungkinan memiliki genotipe heterozigot GA, 3,198 kali lebih besar daripada genotip GG ($p\text{-value}=0,008$) dan memiliki genotip AA, 1,548 kali lebih besar daripada memiliki genotip GG walaupun secara statistik tidak berhubungan ($p\text{-value}=0,726$). Genotip AA merupakan faktor genetik penyebab hipertensi karena perubahan basa yang pada awalnya adalah basa guanin menjadi adenine dan pada subyek sehat (kontrol) genotip AA belum tampak efek klinisnya karena enzim MMP-9 mampu berfungsi sebagai vasodilator dan vasokonstriktor. Enzim MMP-9 mampu mendegradasi matriks ekstraseluler yang menimbulkan vasodilatasi pembuluh darah tetapi pada fase awal tidak menyebabkan kekakuan pembuluh darah. Kerja enzim MMP-9 berlebihan akhirnya dapat menimbulkan kekakuan pembuluh darah yang selanjutnya menyebabkan hipertensi sehingga genotip AA bukan merupakan faktor risiko pada tahap awal tapi apabila aktivitas terjadi terus menerus dapat menjadikan MMP-9 sebagai faktor risiko penyakit kardiovaskular (57).

Polimorfisme gena MMP-9 pada jarak 279 bp yang merupakan domain dari tipe II spesifik fibronektin gelatinase mampu mengubah asam amino arginin (R) menjadi glutamin (Q) dapat meningkatkan pengikatan

substrat sehingga bisa mempengaruhi aktivitas enzim MMP-9. Matriks metalloproteinase-9 sebagai kolagenase 92 kDa tipe IV, gelatinase 92 kDa, atau gelatinase B (GELB), memiliki peran penting dalam pembentukan kembali dinding pembuluh darah, pembentukan lesi aterosklerosis, dan berperan dalam rupturnya plak pada pembuluh darah arteri (43).

Eksresi dari MMPs dengan kadar rendah terdapat pada pembuluh darah yang normal dan peningkatan kadar MMPs terjadi pada proses fisiologis dan patologis di dalam tubuh. Interaksi dari monosit yang berubah menjadi makrofag dengan kolagen tipe I dan laminin menyebabkan terkumpulnya lemak sehingga muncul sel busa atau *foam cells* yang selanjutnya mengeluarkan sitokin dan superoksida yang mengakibatkan produksi MMP-1, MMP-3, MMP-9, dan aktivasi dari MMP-2 dan MMP-9. MMP-9 yang berlebihan akibat polimorfisme gena MMP-9 dan kurangnya inhibitor yang dihasilkan yaitu *tissue inhibitor proteinase (TIMP)* menyebabkan MMP-9 berlebihan sehingga akan menggantikan elastin dan kolagena tadi menjadi lebih kaku (22).

Polimorfisme gena MMP-9 berperan dalam peningkatan kadar MMP-9 karena menyebabkan migrasi dan proliferasi sel otot polos, penebalan tunika intima, pertumbuhan plak ateroma, infiltrasi sel leukosit, penundaan stenosis pembuluh darah, dan *remodeling* plak ateroma sehingga mampu menyebabkan instabilitas plak, ruptur plak dan aneurisma (58). Aktivitas MMP-9 diatur oleh transkripsi gen, sintesis zimogen yang inaktif, postranslasi zimogen, dan *tissue inhibitor matrix metalloproteinase (TIMP)*. Aktivasi dimulai dari pembuangan prodomain melalui degradasi dari protease lain seperti plasmin, *membrane type-matrix metalloproteinase (MT-MMP)* atau aktivasi penuh dari autolisis pada situs katalitiknya. Aktivitas MMP distimulasi oleh semua hal yang berkaitan dengan *remodeling* pembuluh darah, hemodinamika, kerusakan pembuluh darah, proses inflamasi, dan stress oksidatif (57).

Polimorfisme MMP-9 pada bagian promoter dan *coding* mempengaruhi peningkatan kadar dan aktivitas MMP-9 sehingga mampu menyebabkan kekakuan arteri baik pada laki-laki maupun perempuan (59)

dan gena MMP-9 berpengaruh pada mortalitas penyakit kardiovaskuler terutama pada pasien dengan 279 Gln allele (60). Perbedaan usia dan jenis kelamin juga mempengaruhi respon dari MMP-9 ini (59).

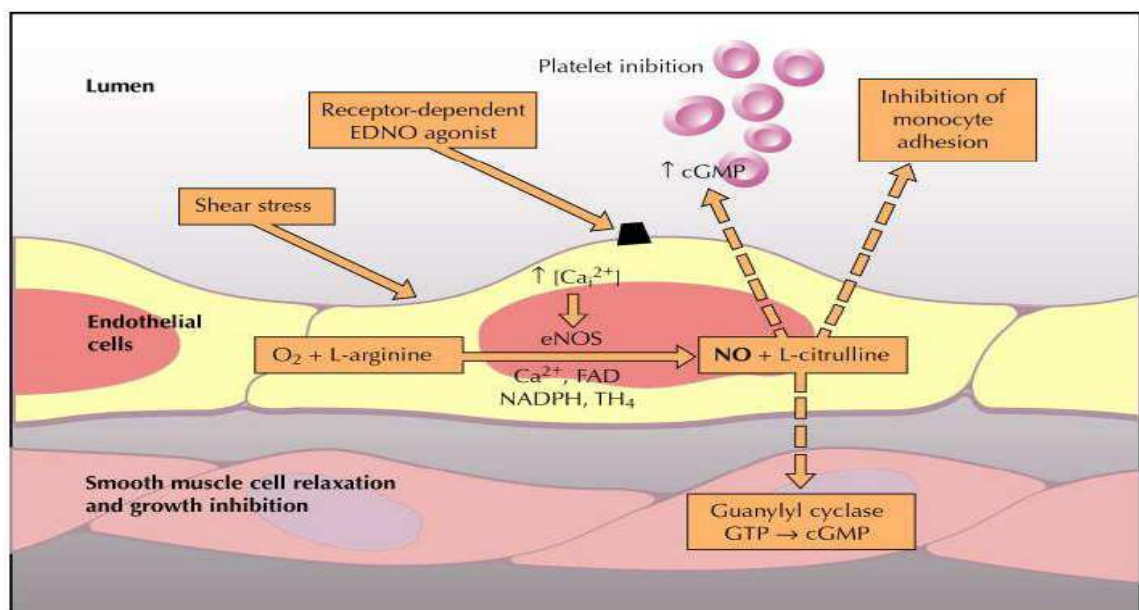
3. Analisis statistik hubungan polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP9 terhadap kadar NO dan Angiotensin II etnis Jawa

Analisis statistik efek polimorfisme gena NOS3 terhadap kadar NO penderita hipertensi menggunakan uji ANOVA *one way* tetapi karena pada uji normalitas data kadar NO tidak menunjukkan distribusi yang normal, setelah dilakukan transformasi maka dilanjutkan menjadi Uji *Mann-Whitney*. Hasil uji menunjukkan bahwa $p = 0,072$ ($p > 0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan kadar NO yang bermakna dengan polimorfisme gena NOS3.

Pada sel endotel, enzim NO-sintase (eNOS) mengkatalisa perubahan asam amino L-arginin menjadi NO dan L-sitrullin. Kofaktor eNOS termasuk FAD (*flavin adenine dinucleotide*), NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), TH4 (tetrahydrobiopterin) dan kalsium. Sintesis endotel pada NO dikontrol dan berhubungan dengan kadar Ca terionisasi. Beberapa agonis, seperti asetilkolin, bradikinin, substansi P dan trombosit dari serotonin, bertindak sebagai reseptor membran yang memicu pengeluaran kalsium sitosol dan aktivasi eNOS. Peningkatan tekanan dari peningkatan aliran darah juga mampu meningkatkan produksi NO. Nitrit oksida mengatur tonus vaskuler dan meningkatkan efek dilatasi pembuluh darah melalui aktivasi guanil siklase yang selanjutnya meningkatkan siklus t3',5'-guanosine monofosfat (cGMP) intrasel, yang juga menghambat aktivasi trombosit. Kerja lain dari NO adalah menghambat adesi monosit dan proliferasi sel otot polos (61).

Mekanisme vasodilator NO adalah dengan cara menurunkan influx Ca^{2+} intrasel otot polos dan meningkatkan reaksi siklus t3',5'-guanosine monofosfat (cGMP) sehingga tunika muskularis pembuluh darah mengalami relaksasi. Adanya NO juga memacu sintesis substansi lain

yang bersifat vasodilator seperti prostasiklin, adenosin dan menghambat substansi yang bersifat vasokonstriktor seperti endothelin, angiotensin II, tromboxan (62). Polimorfisme gena NOS3 (849G/T) menyebabkan aktivitas enzim nitrit oksidase sintase (eNOS) menurun, sehingga produksi NO berkurang sehingga polimorfisme tersebut merupakan faktor resiko untuk penyakit hipertensi (63).



Gambar 11. Mekanisme NO pada endotel pembuluh darah (61)

Nitric oxidesynthase (NOS) pada manusia (dan tikus) mempunyai tiga macam bentuk, yaitu *neuronal nitric oxide sythase* (nNOS atau NOS-1) yang ditemukan pada sel saraf, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS atau NOS-2) yang ditemukan pada makrofag, dan *endothelial nitric oxide* (eNOS atau NOS-3) yang ditemukan pada sel endotel pembuluh darah. Kadar nNOS dan eNOS dalam tubuh relatif stabil, sedangkan untuk kadar iNOS dipengaruhi oleh rangsangan (misalnya infeksi parasit) (45). Pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan kadar NO yang bermakna dengan polimorfisme gena NOS3 diduga karena reagent berasal dari iNOS berarti jika meningkat berarti keadaan pembuluh darah sudah dalam keadaan inflamasi atau sebagai tanda adanya plak aterosklerosis (64).

Analisa statistik hubungan polimorfisme gena NOS3 terhadap kadar angiotensin II menggunakan uji ANOVA *one way* tetapi karena pada uji normalitas data kadar angiotensin II tidak menunjukkan distribusi yang normal (setelah dilakukan transformasi) maka dilanjutkan menjadi Uji Mann-Whitney. Hasil uji menunjukkan bahwa $p=0,297$ ($P>0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan kadar Angiotensin 2 yang bermakna dengan polimorfisme gena NOS3. Angiotensin II merangsang produksi NO sedangkan NO diproduksi oleh NO synthase type 3 (NOS3). Angiotensin II menekan ekspresi NOS3 melalui NO dan NO menghambat ekspresi NOS3 (65).

Analisa statistik hubungan polimorfisme gena MMP9 dengan NO dilakukan uji ANOVA *one way* tetapi karena pada uji normalitas data kadar NO tidak menunjukkan distribusi yang normal (setelah dilakukan transformasi) maka dilanjutkan menjadi Uji Mann-Whitney. Hasil uji menunjukkan bahwa $P=0,01$ ($P<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan kadar NO yang bermakna antara kelompok polimorfisme gena MMP9.

Matriks metaloproteinase (MMPs) merupakan keluarga dari enzim yang di dalamnya terdapat lebih dari 30 *zinc* (66) yang bertanggung jawab pada keseimbangan matriks jaringan dan berfungsi dalam aktivitas proteolisis melawan komponen matriks ekstraseluler seperti elastin, proteoglikan dan kolagena yang memiliki peran penting dalam *remodelling* pembuluh darah secara fisiologis. Enzim ini aktif pada pH netral dan bisa mengkatalisasi perubahan matriks ekstraseluler termasuk jaringan intersisial dan membran basalis (67). Matriks metaloproteinase-9 (MMP-9) merupakan anggota penting dari keluarga MMPs dan mampu mendegradasi gelatin, fragmen kolagena yang telah didegradasi sebelumnya oleh kolagenase dan kolagena tipe IV, yang membentuk membran basal pembuluh darah (68).

MMP-9 yang diketahui sebagai kolagenase 92 kDa tipe IV, gelatinase 92 kDa, atau gelatinase B (GELB), memiliki peran penting dalam pembentukan kembali dinding pembuluh darah, pembentukan lesi aterosklerosis, dan berperan dalam rupturnya plak pada pembuluh darah

arteri. MMP-9 merupakan enzim yang dikode oleh gena MMP-9. Polimorfisme pada gena MMP-9 pada jarak 279 bp yang merupakan domain dari tipe II spesifik fibronectin gelatinase dan mampu mengubah asam amino arginin (R) menjadi glutamin (Q) dapat meningkatkan pengikatan substrat sehingga bisa meningkatkan aktivitas enzim MMP-9 (69). Aktivitas enzim MMP-9 meningkatkan menyebabkan vasodilatasi dan jika aktivitasnya berlebihan menyebabkan perubahan jaringan elastin dalam pembuluh darah sehingga menyebabkan vasokonstriksi (70).

Pada penelitian ini, terdapat hubungan antara polimorfisme gena MMP-9 dengan NO, karena NO juga mampu mengatur aktivitas MMP-9 melalui jalur guanilil-siklase dependen dan independen, secara kimiawi dengan modifikasi *reactive nitrogene species-mediated protein*, secara biologi melalui modulasi keseimbangan MMP-9/TIMP-1 via *soluble guanylyl-cyclase-dependent* dan secara proteolitik melalui pengaturan MMP-1 dan MMP-13 yang dapat memecah prodomain MMP-9 (71). Penghambatan Nitric Oxide Synthase dapat meningkatkan ekspresi MMP-9 sehingga jika kadar NO meningkat akan terjadi penurunan MMP-9 (72).

Analisa statistik hubungan polimorfisme gena MMP9 dengan angiotensin II dilakukan uji ANOVA *one way* tetapi karena pada uji normalitas data kadar angiotensin II tidak menunjukkan distribusi yang normal (setelah dilakukan transformasi) maka dilanjutkan menjadi Uji Mann-Whitney. Hasil uji menunjukkan bahwa $P = 0,3$ ($P > 0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan kadar angiotensin II yang bermakna dengan polimorfisme gena MMP9. Angiotensin meningkatkan ekspresi gena MMP-9 selain menginduksi monosit, melalui jalur protein G/non G, mobilisasi Ca^{2+} , *mitogena activated protein kinase* (MAPK), reseptor dan non reseptor tirosin kinase, *Janus family kinases-signal*, transduser dan *activated* transkripsi (JAK-STAT-S), protein G kecil (Ras, Rho, Rac, dan lain lain), aktivasi NADPH oksidase yang selanjutnya meningkatkan MMP-9. Kadar MMP-9 yang meningkat menyebabkan degradasi matriks di tunika intima pembuluh darah sehingga menimbulkan vasodilatasi.

Keadaan MMP9 yang berlebihan mengubah jaringan elastin pembuluh darah sehingga menjadi kaku sehingga menimbulkan vasokonstriksi (73). Pada penelitian ini, polimorfisme MMP9 bertindak secara sinergis pada proses vasokonstriksi pembuluh darah sehingga pengaruhnya belum jelas benar dan dipengaruhi oleh faktor lain (70).

7. Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Terdapat polimorfisme gena NOS3 pada penderita hipertensi etnis Jawa
- b. Terdapat polimorfisme gena MMP-9 pada penderita hipertensi etnis Jawa
- c. Tidak ada hubungan antara polimorfisme gena NOS3 dengan kadar NO dan Angiotensin II pada penderita hipertensi etnis Jawa.
- d. Tidak ada hubungan antara polimorfisme gena MMP9 terhadap kadar Angiotensin II tetapi ada hubungan antara polimorfisme gena MMP-9 terhadap kadar NO pada penderita hipertensi etnis Jawa.

Penelitian ini disarankan untuk diteruskan dengan melihat efek polimorfisme gena MMP-9 terhadap kadar MMP-9 dan TIMP untuk mengetahui adanya ketidak seimbangan antara MMP dengan inhibitornya yaitu *tissue inhibitor proteinase* (TIMP) dan peningkatan sitokin proinflamasi seperti *tumor nekrosis faktor α* (TNF- α) dan *C- reactive protein* (CRP) pada penderita hipertensi.

8. Ucapan Terimakasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kemenkes RI melalui program Risbin Iptekdok tahun 2012 sebagai pemberi dana penelitian bersama dengan Lembaga Biologi Molekuler Eijkman sebagai *supervisor* penelitian. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada para pasien yang bersedia menjadi responden penelitian ini.

Daftar Pustaka

- (1) J.N.C. The seventh report of the joint national committee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure, JAMA 289: 2560-2572. 2003;
- (2) Sidabutar, R. P., Wiguno P. Hipertensi Essensial. In: *Ilmu Penyakit Dalam* Jilid II. Soeparman, Sarwono Waspadji Eds.. Balai Penerbit FK-UI:205-222, 1999
- (3) Susalit E. Hipertensi Primer. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jilid II. Edisi Ketiga. Balai Penerbit FK-UI, Jakarta.: 453-72. 2001
- (4) National Institutes of Health: The Seventh Report of The Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, NIH Publication, November . 2003
- (5) Noer MS. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Edisi Ketiga, Jilid Kedua, Balai Penerbit FKUI, 2003
- (6) Gantini L. dan Wijaya A. Peran stres oksidatif dan inflamasi vaskuler pada hipertensi esensial. *Forum Diagnosticum*. 4 :1-7. 2005;
- (7) Sunarti. Interaksi polimorfisme genaetic metilentetrahidrofolat reduktase dan metabolisme folat pada hipertensi esensial. Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan.Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta; h. 51-52. 2007.
- (8) Sugiharto, A. Faktor-Faktor Risiko Hipertensi Grade II Pada Masyarakat (Studi Kasus di Kabupaten Karanganyar). Tesis. Program Studi Magister Epidemiologi. Program Pasca Sarjana. Universitas Diponegoro, Semarang 2007
- (9) Qiu, C., Williams, M.A., Leisenring, W.M., Sorensen, T.K., Frederick, I.O., Dempsey, J.C., Luthy, D.A. Family History of Hypertension and Type 2 Diabetes in Relation to Preeclampsia Risk. *Hypertension: Journal of The American Heart Association* ; 41: 408-413. 2003
- (10) Sigarlaki, H. J. O. 1995. Faktor-faktor resiko penderita hipertensi di RSU FK-UKI. [Tesis] Program Studi Pascasarjana Ilmu Kesehatan Masyarakat, Jakarta. : 52 – 53. 1995

- (11) Mansjoer A, Suprohalita, Wardhani WL, Setiowulan W.: *Kapita Selekta Kedokteran*, Jakarta, Media Aesculapius FKUI. 2001
- (12) Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M. Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene is Positively Associated With Essential Hypertension. *Hypertension* ; 32: 3-8. 1998
- (13) Panza, J.A. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin Cardiol.* 20 (suppl.II); II-26-II-33. 1997
- (14) Dosenko, V.E., Zagoriy, V.Y., Haytovich, N.V., Gordok O.A., Moibenko, A.A. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase gene and its functional manifestations. *Acta Biochimica Polonica*; 53: 299–302. 2006
- (15) Joshi, M.S., C., Mineo, P.W., Shaul, J.A., Baurer. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variations in human endothelium altered caveolar localizations and impaired response to shear. *The FASEB Journal* ; 21: 2655-2663. 2007
- (16) Wu. MT, K., Kelsey, J., Schwartz., D., Sparrow, S., Weiss, H., Hu. A – aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) Polymorphism. may modify the relationship of low -level lead exposure to uricemia and renal function: The Normative Aging Study. *J Environ Health Perspect*; 111: 335-340. 2003
- (17) Howard T,D., W,H.,Giles, J.,Xu, M.A.,Woznaik, A.M., Malarcher, L.A. Lange,R.F.,Macko,M.J.,Basehore,D.A.,Meyers,J.W.,Cole,S.J.,Kittner. Promoters polymorphisms in the nitric oxide synthase 3 gene are associated with ischemic stroke susceptibility in young black woman. *Stroke Journal*; 10: 1848-1853. 2005
- (18) Afrasyap. L and G. Osturk. NO Synthase Gene Polymorphism (Glu 298 Asp) in the patients with coronary artery disease from Turki Population. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 36: 661-666. 2004
- (19) Arora, S., Das, N., Srivastava, K. Nitric Oxide and eNOS Gene in Essential Hypertension. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*; 1: 56-71. 2009
- (20) Sulastri, D., Rahmatini, Lipoeto, N.I., Edwar, Z. Pengaruh Asupan Antioksidan terhadap Ekspresi Gen eNOS3 pada Penderita Hipertensi Etnik

- Minangkabau. Artikel Penelitian. Majalah Kedokteran Indonesia, Desember; 60: 564-570. 2010
- (21) Endemann, D.H. and Schiffrin, E.L. Endothelial dysfunction. J Am Soc. Nephrol; 15 : 1983-1992. 2004
 - (22) Min, L.J., Mogi, M., Li J.M. Aldosterone and Angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. Circ Res., ; 97 : 434- 442. 2005
 - (23) Venugopal, S.K., S. Devaraj., L. Jialal. Effect of C- Reactive Protein on vascular cells : Evidence for proinflammatory, proatherogenic role, Curr Opin Nephrol Hypertens.; 14 : 33-37. 2005
 - (24) Wang, L., Ma, Y., Xie, X., Yang, Y., Fu, Z., Liu F., Li, X., Chen, B. Association of MMP-9 gene polymorphisms with acute coronary syndrome in the Uygur population of China. World J Emerg Med; 2:104-110. 2011
 - (25) Hingorani D.A., C.F., Liang, J., Fatibene, A., Lyon., S., Monteith., A., Parsons, S., Haydock., R.V., Hooper, N.G., Stephens, K.M O'Saughnessy, M.J. Brown. A Common Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu²⁹⁸ → Asp) Is A major Risk Factor for Coronary Artery Disease in the UK. Circulation; 10:1515-1520. 1999.
 - (26) Napoli and Ignaro. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and carotid artery atherosclerosis. J. Clin. Pathol ; 10: 1136-1140. 2006
 - (27) Yogiartoro M. Hipertensi Esensial dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam edisi V jilid II. Jakarta : Interna Publishing, p. 1079. 2009.
 - (28) Babatsikou F. and Zavitsinou A. Epidemiology of Hypertension in Elderly. Health Science Journal,. vol.4(1): 24-30. 2010
 - (29) Chobanian A.V. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. United States : National Institute of Health,.p. 19. 2003
 - (30) Beevers G., Lip G.Y.H., and O'Brien E. ABC of Hypertension The Pathophysiology of Hypertension. British Medical Journal,. vol. 322: 912-916. 2001
 - (31) Webb R.C. and Inscho E.W. Age Related Changes in the Cardiovascular System. Humana Press Totowa NJ..p. 11-20. 2005

- (32) Ergul A.. Hypertension in Black Patients An Emerging Role of the Endothelin System in Salt-Sensitive Hypertension. Hypertension Journal American Heart Association., vol. 36: 62-67. 2000
- (33) Kumar V., Abbas A.K., and Fausto N. Robbins and Cotran . *Pathologic Basic of Disease* . 7th.. China: Elsevier Inc. 2005
- (34) Prodjosudjadi W. Hipertensi : Mekanisme dan Penatalaksanaannya. Berkala Neurosains.. Jakarta : FKUI, vol. 3(1): 133. 2000
- (35) Ambrose J.A. and Barua R.S.. The Pathophysiology of Cigarettes Smoking and Cardiovascular Disease. Journal of the American College of Cardiology, vol. 43(10): 1731-1737. 2004.
- (36) Adrogué H.J. and Madias N.E. Sodium and Potassium in the Pathogenesis of Hypertension. The New England Journal of Medicine,..vol. 356: 1966-1978. 2007
- (37) Mathieu P., Poirier P., Pibarot, P., Lemieux I., and Despres J.P. Visceral Obesity : The Link Among Inflammation, Hypertension, and Cardiovascular Disease. Journal of The American Heart Association.. vol. 53: 577-584. 2009
- (38) Miller P.M., Anton R.F., Egan B.M., Basile J., and Nguyen S.A. Excessive Alcohol Consumption and Hypertension: Clinical Implications of Current Research. The Journal of Clinical Hypertension.. vol. 7(6): 346-351. 2005
- (39) Jee, S.H., He J., Whelton P.K., Suh Il., and Klag M.J. A Meta-Analysis of Controlled Clinical Trials. The American Heart Journal.. vol. 33: 647-652. 1999
- (40) Elrod, S, Wiliam S. *Genetika*. Edisi 4, Ed: Safitri A, Erlangga, . Jakarta. h. 2892007.
- (41) Smith, K. Polimorfisme dan SNP. Diakses tanggal 1/11/2012. Available at URL : http://www.cs.mcgill.ca/~kaleigh/compbio/snp/snp_summary.pdf 2002..
- (42) Joshi, Mineo, Shaul,. Biochemical consequencqsofthe NOS3 Glu298Asp variations in human endothelium altered caveolar localizations and impaired response to share. The Faseb Journal ; 21: 2655-2663. 2007

- (43) Lei W., Yi-tong M., Xiang X., Yi-ning Y., Zhen-yan F., Fen L., Xiao M.L., and Bang-dang C.. Association of MMP-9 Gene Polymorphisms with Acute Coronary Syndrome in the Uygur Population of China. *World Journal Emerg Med*, vol. 2(2): 104. 2011
- (44) Ye Shu. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovascular Research* 69. 636 – 645. .2006
- (45) Devlin, T.M. *Text Book of Biochemistry with Clinical Correlation*, 5th ed. . Canada: Wiley- Liss : 407-88. 2002.
- (46) Manukhina, E.B. , Downey, H.F. and Mallet, R.T. Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Adaptation to Intermitten Hypoxia. *Exper Biol Med*. 231 : 343-365. 2006.
- (47) Vallence, P.and Chan, NGeneral Cardiology : Endothelial Function and Nitric Oxide. *Clinical Relevance Heart*. 85 : 342 – 350. 2001.
- (48) Murray, R.K., D.K. Granner dan V.W. Rodwell.. *Biokimia Harper* : Edisi 27. EGC, Jakarta. 2009
- (49) Muttaqin, A.. Pengantar Asuhan Keperawatan Klien dengan Gangguan Sisten Kardiovaskuler. Salemba Medika, Jakarta. Pp.18-19. 2009
- (50) Campbell, N. A., J. B. Reece dan L. G. Mitchell.. *Biologi* Jilid 3. Penerbit Erlangga, Jakarta. Pp. 122-124. 2004
- (51) Mifflin, H. The American Heritage Dictionary of the English Language 4th eds. Amerika : Houghton Mifflin Company. 2000.
- (52) Suryadinata, L., Arifin, E.N., dan Anata, A.. *Indonesia's Population : Ethnicity & Religion in a Changing Political Landscape*. Singapore : Institute of Southeast Asian Studies. 2003
- (53) Hernayanti.. Efek Ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) terhadap Gambaran Hematologi, Kadar NO, Aktivitas GPx pada Individu dengan Polimorfisme Gena NOS3 dan Alad yang Terpapar Plumbum.Disertasi. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2012

- (54) Rudd, M.A., Troillet, M.R., Loscalzo, J. Nitric Oxide and Hypertension editor: Joseph Loscalzo and Joseph A. Vita. Contemporary Cardiology Vol.4. 2000
- (55) Wang, X. L., Sim, A. S., Wang, M. X., Murrell, G. A., Trudinger, B., and Wang, J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. FEBS Lett. 471, 45–50. 2000
- (56) Gerard, A. 2000. *Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction: Nitric Oxide and Cardiovascular System*. Totowa, New Jersey :Humana Press,Inc.2000
- (57) Galis Z. S and Khatri J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis : The Good, the Bad, and the Ugly. The Journal of American Heart Association.; 90: 251-262. 2002
- (58) Abilleira S., Began S., and Markus H. S. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. Journal of Medical Genetics.; 43: 897-901. 2011
- (59) Yasmin., McEinery C.M., O'Shaughnessy K.M., Harnett P., Arshad A., Wallace S., Maki-Petaja K., McDonnell B., Ashby M.J., Brown J., Cockcroft J.R., and Wilkinson I.B. Variation in the human matrix metalloproteinase- 9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. Journal of American Heart Association.; 26: 1799-1805. 2006
- (60) Blankenberg S., Rupprecht H. J., Poirier O., Bickel C., Smieja M., Hafner G., Meyer J., Tiret L., and Cambien F. Plasma Concentrations and Genetic Variation of Matrix Metalloproteinase 9 and Prognosis of Patients with Cardiovascular Disease. Journal of American Heart Association. 107: 1579-1585. 2003;
- (61) Viklund, A. 2009. Endothelial derived Nitric Oxide Synthase and Action. Diakses 19 Desember 2012. Available at URL : <http://medicalmyths.wordpress.com/atherosclerosis/>
- (62) Gerard, A. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction: Nitric Oxide and Cardiovascular System. Totowa, New Jersey :Humana Press,Inc. 2000.

- (63) Arora, S., Das, N., Srivastava, K. Nitric Oxide and eNOS Genae in Essential Hypertension. Intern Journ of Coll Res on Intern Med & Pub Health; 1: 56-71. 2009
- (64) Lafond -Walker A, Chen CL, Augustine S, Wu TC, Hruban RH, Lowenstein CJ.. Inducible nitric oxide synthase expression in coronary arteries of transplanted human hearts with accelerated graft arteriosclerosis. Am J Pathol. 151:919–25. 1997
- (65) Ramseyer V.D., Garvin J.L. Angiotensin II Decreases Nitric Oxide Synthase 3 Expression via Nitric Oxide and Superoxide in the Thick Ascending Limb. Hypertension. 53:313-318. 2009
- (66) Newby A.C. and Johnson J.L. Genaetic Strategies to Elucidate the Roles of Matrix Metalloproteinases in Atherosclerotic Plaque Growth and Stability. Journal of The American Heart Association.Research, vol. 97: 958-960. 2005
- (67) Karthikeyan V.J. and Lip G.Y.H., Matrix Metalloproteinases and Hypertension: A Link between Left Ventricular Hypertrophy and Diastolic Dysfunction. Tohoku Journ. Exp. Med, vol. 28: 93-97. 2006.
- (68) Zhou S., Feely J., Spiers J.P., and Mahmud A.. Matrix Metalloproteinase-9 Polymorphism Contributes to Blood Pressure and Arterial Stiffness in Essential Hypertension. Journ of Human Hypertension, vol. 21: 861-867. 2007
- (69) Lei W., Yi-tong M., Xiang X., Yi-ning Y., Zhen-yan F., Fen L., Xiao M.L., and Bang-dang C. Association of MMP-9 Genae Polymorphisms with Acute Coronary Syndrome in the Uygur Population of China. World Journal Emerg Med, vol. 2(2): 104. 2011.
- (70) Min L.J., Mogi M., and Li J.M., Aldosteron and Angiotensin II Sinergistically Induce Mitogenaic response in Vascular Smooth Muscle Cells. Circul Res Journ of The Am Heart Assoc. Vol. 97: 434-442. 2005.
- (71) Ridnour LA, Windhausen AN, Isenberg JS, Yeung N, Thomas DD, Vitek MP, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. Proc Natl Acad Sci U A. 23; 104 (43):16898-903. 2007.

- (72) Knipp, M.S., Gorav Ailawadi, M.D., John W. Ford, B.A., David A. Peterson, B.A., Matthew J. Eagleton, M.D., Karen J. Roelofs, D.V.M., Kevin K. Hannawa, Michael P. Deogracias, Baoan Ji, M.D., Ph.D., Craig Logsdon, Ph.D., Kathleen D. Graziano, M.D., Diane M. Simeone, M.D., Robert W. Thompson, M.D., Peter K. Henke, M.D., James C. Stanley, M.D., and Gilbert R. Upchurch, Jr., M.D., Increased MMP-9 Expression and Activity by Aortic Smooth Muscle Cells after Nitric Oxide Synthase Inhibition Is Associated With Increased Nuclear Factor- κ B and Activator Protein-1 Activity *Journ of Surgic Res* 116, 70–80 . 2004.
- (73) Yaghooti H., M. Firoozrai, S. Fallah and M.R. Khorramizadeh. Angiotensin II induces NF- κ B, JNK and p38 MAPK activation in monocytic cells and increases matrix metalloproteinase-9 expression in a PKC- and Rho kinase-dependent manner. *Braz J Med Biol Res*. Vol. 44(3) 193-199. 2011.

Lampiran 1.

Urutan nukleotida hasil sekuen produk PCR gena NOS3 dan MMP9

>sample 19 NOS3

CATGAGCGTCAGCCCCAGAACCCCAACGTGGAGATCACCGAGCTCTGC
ATTCAGCACGGCTGGACCCCAGGAAACGGTCGCTTCGACGTGCTGCCC
CTGCTGCTGCAGGCCCCAGATGAGCCCCCAGAACTCTTCCTTCTGCCCC
CCGAGCTGGTTCCTTGAGGTGCCCTGGAGCACCCACGTGAGCACCAA
AGGGATTGACT

>sample n2 NOS3

CATGAGCGTCAGCCCCAGAACCCCAACGTGGAGATCACCGAGCTCTGC
ATTCAGCACGGCTGGACCCCAGGAAACGGTCGCTTCGACGTGCTGCCC
CTGCTGCTGCAGGCCCCAGATGATCCCCCAGAACTCTTCCTTCTGCCCC
CCGAGCTGGTTCCTTGAGGTGCCCTGGAGCACCCACGTGAGCACCAA
AGGGATTGACT

>sample m1 MMP9

CGGTCGCTCCGACGGCTTGCCCTGGTGCAGTACCACGGCCAACTACGA
CACCGACGACCGGTTTGGCTTCTGCCCCAGCGAGAGACTCTACACCCA
GGACGGCAATGCTGATGGGAAACCCTGCCAGTTTCCATTTCATCTTCCA
AGGCCAATCCTACTCCGCCTGCACCACGGACGGTCGCTCCGACGGCTA
CCGCTGGTGCGCCACCACCGCCAACTACGACCGGGACAAGCTCTTCGG
CTTCTGCCCCGACCCGAGGTACCTCCACCCTGTCTACCA

>sample k11 MMP9

CGGTCGCTCCGACGGCTTGCCCTGGTGCAGTACCACGGCCAACTACGA
CACCGACGACCGGTTTGGCTTCTGCCCCAGCGAGAGACTCTACACCCG
GGACGGCAATGCTGATGGGAAACCCTGCCAGTTTCCATTTCATCTTCCA
AGGCCAATCCTACTCCGCCTGCACCACGGACGGTCGCTCCGACGGCTA
CCGCTGGTGCGCCACCACCGCCAACTACGACCGGGACAAGCTCTTCGG
CTTCTGCCCCGACCCGAGGTACCTCCACCCTGTCTACCA



MINISTRY OF NATIONAL EDUCATION
FACULTY OF MEDICINE GADJAH MADA UNIVERSITY
MEDICAL AND HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE (MHREC)

ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Ref : KE/FK/ 734 /EC

Title of the Research Protocol : Efek Polimorfisme Gena Nitrit Oksida Sintase3 (NOS3) dan Oromoter Matriks Metaloproteinase-9 terhadap Pasien Hipertensi

Documents Approved : 1. Study Protocol
2. Information for subjects
3. Informed consent form
4. Case report forms (CRF)

Principle Investigator : Fitranto Arjadi

Name of medically Responsible Physician(s) : Dr. dr. I Gede Arinto, Sp.PD

Date of Approval : 19 DEC 2011

Institution(s)/place(s) of research : Rumah Sakit Margono Soekarjo Purwokerto

The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) states that the above protocol meets the ethical principle outlined in the Declaration of Helsinki 1975 and therefore can be carried out.

The Medical and Health Research Ethics Committee (MHREC) has the right to monitor the research activities at any time.

Prof.dr.Mohammad Hakimi, Sp.OG (K),Ph.D
Chairman

dr. Madarina Julia, Sp.A(K), MPH., Ph.D
Secretary

Lampiran 3 Data Responden

No.		Kontrol	Kasus
1	Usia	55,7 ± 8	60,5 ± 9
2	GDS	106,1 ± 42	112,2 ± 46
3	Kolesterol Total	180,9 ± 34	184,6 ± 33
4	Trigliserida	154±117	160,9 ±89
5	NO	32,5±16	34,53±9,69
6	Angiotensin	5,9±3,4	14,53±22
7.	Sistolik	124,0±6	152,2±17
8.	diastolik	79,0±5	88,9±10

Lampiran 4. Data Gena NOS 3

Responden	Jenis Kelamin	Umur	Genotipe NOS3	Tekanan Darah
C2	perempuan	48.00	GG	Hipertensi
C3	laki-laki	68.00	GT	Hipertensi
C4	perempuan	70.00	GT	Hipertensi
C5	laki-laki	63.00	GG	Hipertensi
C6	laki-laki	60.00	GT	Hipertensi
C7	perempuan	73.00	GG	Hipertensi
C8	perempuan	61.00	GT	Hipertensi
C9	laki-laki	73.00	GT	Hipertensi
C10	laki-laki	68.00	GT	Hipertensi
C15	perempuan	63.00	GT	Hipertensi
C16	perempuan	52.00	GT	Hipertensi
C18	perempuan	70.00	GT	Hipertensi
C19	perempuan	80.00	GG	Hipertensi
C22	perempuan	52.00	GG	Hipertensi
C26	perempuan	52.00	GT	Hipertensi
C29	perempuan	50.00	GG	Hipertensi
C30	perempuan	45.00	GT	Hipertensi
C31	perempuan	47.00	GT	Hipertensi
C32	perempuan	50.00	GT	Hipertensi
C33	perempuan	67.00	GG	Hipertensi
C34	perempuan	53.00	GG	Hipertensi
C35	perempuan	56.00	GG	Hipertensi
C36	perempuan	60.00	GT	Hipertensi
C38	perempuan	45.00	GT	Hipertensi
C47	laki-laki	68.00	GG	Hipertensi
C48	perempuan	72.00	TT	Hipertensi
C49	perempuan	60.00	GT	Hipertensi
C50	perempuan	64.00	GT	Hipertensi
C53	perempuan	59.00	GT	Hipertensi
C54	perempuan	58.00	GG	Hipertensi
C55	perempuan	52.00	GG	Hipertensi
C56	laki-laki	69.00	GG	Hipertensi
C58	perempuan	75.00	GT	Hipertensi
C59	perempuan	67.00	GT	Hipertensi
C60	perempuan	68.00	GG	Hipertensi
C62	perempuan	63.00	GT	Hipertensi
C63	perempuan	48.00	GG	Hipertensi
C64	laki-laki	72.00	GT	Hipertensi
C65	perempuan	80.00	GT	Hipertensi
C68	laki-laki	70.00	GT	Hipertensi
C69	perempuan	70.00	GT	Hipertensi
C70	perempuan	64.00	GG	Hipertensi
K1	laki-laki	51.00	GG	Non Hipertensi
K2	perempuan	49.00	GG	Non Hipertensi
K3	perempuan	46.00	GG	Non Hipertensi
K5	perempuan	47.00	GG	Non Hipertensi
K6	perempuan	51.00	GG	Non Hipertensi

K7	perempuan	60.00	GG	Non Hipertensi
K8	perempuan	51.00	GG	Non Hipertensi
K9	perempuan	46.00	GT	Non Hipertensi
K10	perempuan	58.00	GG	Non Hipertensi
K11	perempuan	50.00	GT	Non Hipertensi
K12	perempuan	65.00	GT	Non Hipertensi
K13	perempuan	66.00	GG	Non Hipertensi
K14	perempuan	56.00	GG	Non Hipertensi
K16	perempuan	65.00	GT	Non Hipertensi
K17	perempuan	65.00	GT	Non Hipertensi
K18	perempuan	47.00	GG	Non Hipertensi
K19	laki-laki	48.00	GG	Non Hipertensi
K20	perempuan	48.00	GG	Non Hipertensi
K22	perempuan	53.00	GG	Non Hipertensi
K25	laki-laki	80.00	GT	Non Hipertensi
K27	perempuan	66.00	GT	Non Hipertensi
K28	laki-laki	56.00	GT	Non Hipertensi
K29	perempuan	55.00	GG	Non Hipertensi
K30	perempuan	49.00	GT	Non Hipertensi
K33	laki-laki	71.00	GG	Non Hipertensi
K34	laki-laki	47.00	GT	Non Hipertensi
K35	laki-laki	50.00	GG	Non Hipertensi
K36	laki-laki	53.00	GG	Non Hipertensi
K37	laki-laki	48.00	GT	Non Hipertensi
K38	laki-laki	58.00	GG	Non Hipertensi
K39	perempuan	54.00	GG	Non Hipertensi
K40	perempuan	46.00	GT	Non Hipertensi
K41	perempuan	60.00	GT	Non Hipertensi
K43	laki-laki	62.00	GG	Non Hipertensi
K44	perempuan	70.00	GG	Non Hipertensi
K46	perempuan	48.00	GG	Non Hipertensi
K48	perempuan	80.00	GT	Non Hipertensi
K49	laki-laki	54.00	GG	Non Hipertensi
K51	perempuan	64.00	GG	Non Hipertensi
K54	perempuan	66.00	GT	Non Hipertensi
K55	perempuan	60.00	GG	Non Hipertensi
K56	perempuan	60.00	GG	Non Hipertensi
K57	perempuan	51.00	GG	Non Hipertensi
K58	perempuan	53.00	GT	Non Hipertensi
K60	perempuan	45.00	GG	Non Hipertensi

Lampiran 5. Data gena MMP9

NO	KODE	JENIS KELAMIN	USIA	TEKANAN DARAH	GDS	KOL	MMP-9
1	C2	PEREMPUAN	48	160/90	123	174	AA
2	C3	LAKI-LAKI	68	160/90	91	141	GA
3	C5	LAKI-LAKI	63	140/75	105	184	GA
4	C6	LAKI-LAKI	60	140/90	147	178	GG
5	C7	PEREMPUAN	73	150/90	91	188	GA
6	C9	LAKI-LAKI	73	150/90	84	146	GA
7	C10	LAKI-LAKI	68	150/90	87	194	GA
8	C11	LAKI-LAKI	62	155/90	117	158	GA
9	C12	PEREMPUAN	49	150/95	76	202	GA
10	C13	LAKI-LAKI	65	145/85	84	203	GG
11	C14	LAKI-LAKI	49	140/85	73	225	GG
12	C16	PEREMPUAN	52	140/85	87	208	GA
13	C17	LAKI-LAKI	59	145/80	110	218	GG
14	C19	PEREMPUAN	80	170/85	90	177	GA
15	C20	LAKI-LAKI	70	150/80	123	203	AA
16	C21	PEREMPUAN	61	170/90	124	155	GG
17	C22	PEREMPUAN	52	165/90	94	206	GG
18	G23	LAKI-LAKI	51	210/140	77	173	GA
19	B26	PEREMPUAN	52	150/90	76	113	GG
20	B27	PEREMPUAN	49	175/90	101	127	GA
21	B28	PEREMPUAN	50	160/90	94	192	GG
22	B29	PEREMPUAN	50	175/105	102	174	GG
23	B30	PEREMPUAN	45	145/80	99	209	GG
24	B31	PEREMPUAN	47	150/100	60	193	GA
25	B32	PEREMPUAN	50	125/90	80	161	GA
26	B33	PEREMPUAN	67	160/95	87	224	GA
27	B34	PEREMPUAN	53	140/70	114	189	GA
28	B35	PEREMPUAN	56	140/90	80	182	GA
29	B36	PEREMPUAN	60	150/90	94	147	GA
30	B37	PEREMPUAN	67	140/80	80	200	AA
31	B38	PEREMPUAN	45	140/80	87	174	GA
32	H47	LAKI-LAKI	68	200/100	129	235	GA
33	H48	PEREMPUAN	72	140/80	98	204	GA
34	H49	PEREMPUAN	60	170/100	96	222	GA

35	H50	PEREMPUAN	64	160/100	98	141	AA
36	H53	PEREMPUAN	59	140/80	146	170	GG
37	H54	PEREMPUAN	58	140/90	98	190	GA
38	H55	PEREMPUAN	52	155/90	114	182	GA
39	H56	LAKI-LAKI	69	180/100	105	121	GA
40	H58	PEREMPUAN	75	180/90	108	168	GA
41	H59	PEREMPUAN	67	160/100	93	171	GA
42	H60	PEREMPUAN	68	160/100	84	210	GG
43	H62	PEREMPUAN	63	140/90	120	167	GA
44	H63	PEREMPUAN	48	140/80	89	186	AA
45	H64	LAKI-LAKI	72	140/80	99	230	GA
46	H65	PEREMPUAN	80	140/80	133	195	GG
47	H68	LAKI-LAKI	70	140/90	112	140	GA
48	H69	PEREMPUAN	70	160/90	93	207	GA
49	H70	PEREMPUAN	64	160/90	62	183	GA
50	H71	LAKI-LAKI	59	160/100	147	184	GG
51	K1	LAKI-LAKI	51	125/85	99	192	AA
52	K2	PEREMPUAN	49	125/90	68	165	GG
53	K3	PEREMPUAN	46	125/75	82	200	GG
54	K5	PEREMPUAN	47	120/80	89	148	GA
55	K6	PEREMPUAN	51	120/85	105	172	GA
56	K9	PEREMPUAN	46	130/80	94	96	GG
57	K10	PEREMPUAN	58	130/70	99	208	GA
58	K11	PEREMPUAN	50	120/80	132	151	GA
59	K12	PEREMPUAN	65	130/80	91	200	GG
60	K13	PEREMPUAN	66	130/70	101	135	GG
61	K14	PEREMPUAN	56	130/80	94	150	AA
62	K15	PEREMPUAN	60	110/80	94	196	GA
63	K16	PEREMPUAN	65	130/85	110	161	GA
64	K17	PEREMPUAN	65	125/80	105	177	GG
65	K18	PEREMPUAN	47	120/80	99	175	GA
66	K19	LAKI-LAKI	48	135/80	121	173	GA
67	K21	PEREMPUAN	48	125/70	105	197	GG
68	K22	PEREMPUAN	53	130/80	102	148	AA
69	K23	PEREMPUAN	55	120/85	110	189	GA
70	K24	PEREMPUAN	46	130/85	102	189	GG
71	K25	LAKI-LAKI	80	130/80	97	205	GA
72	K26	PEREMPUAN	62	130/80	161	148	GG
73	K27	PEREMPUAN	66	130/80	86	165	GG

74	K28	LAKI-LAKI	56	130/80	98	204	GA
75	K29	PEREMPUAN	55	130/80	114	208	GG
76	K30	PEREMPUAN	49	130/80	91	154	GA
77	K31	LAKI-LAKI	72	130/80	99	169	GG
78	K32	LAKI-LAKI	67	130/90	86	181	GG
79	K33	LAKI-LAKI	71	130/80	108	174	AA
80	K34	LAKI-LAKI	47	115/75	93	151	AA
81	K35	LAKI-LAKI	50	120/80	107	159	GA
82	K36	LAKI-LAKI	53	130/80	93	188	GG
83	K37	LAKI-LAKI	48	135/80	99	132	GG
84	K38	LAKI-LAKI	58	120/85	51	222	GA
85	K39	PEREMPUAN	54	120/85	93	221	GG
86	K40	PEREMPUAN	46	135/85	96	196	GG
87	K41	PEREMPUAN	60	120/85	138	128	GG
88	K43	LAKI-LAKI	62	120/75	97	200	GA
89	K44	LAKI-LAKI	70	125/80	112	186	GG
90	K46	PEREMPUAN	48	130/85	86	157	GG
91	K48	PEREMPUAN	80	130/80	114	223	GA
92	K49	LAKI-LAKI	54	125/80	59	149	GG
93	K51	PEREMPUAN	55	130/70	66	192	GG
94	K52	LAKI-LAKI	66	120/80	155	132	GG
95	K54	PEREMPUAN	66	115/80	97	197	AA
96	K55	PEREMPUAN	60	120/70	110	163	GG
97	K56	PEREMPUAN	60	120/80	109	188	GG
98	K57	PEREMPUAN	51	110/70	110	209	GG
99	K58	PEREMPUAN	53	120/70	141	192	GA
100	K60	PEREMPUAN	45	110/70	87	210	GA

Lampiran 6. Data Kadar Angiotensin

No.	Kode	Jenis Kelamin	Usia	GDS	ANGIOTENSIN
1	C1	laki-laki	65	233	95,667
2	C2	perempuan	48	123	10,629
3	C3	laki-laki	68	91	11,3
4	C4	perempuan	70	333	9,514
5	C5	laki-laki	63	105	10,786
6	C7	perempuan	73	91	7,8
7	C8	perempuan	61	193	10,757
8	C9	laki-laki	73	84	91,667
9	C10	laki-laki	68	87	102,667
10	C12	perempuan	49	76	10,514
11	C13	laki-laki	65	84	0,077
12	C14	laki-laki	49	73	8,029
13	C15	perempuan	63	124	91,111
14	C16	perempuan	52	87	11,071
15	C17	laki-laki	59	110	11,057
16	C18	perempuan	70	91	94,44
17	C19	perempuan	80	90	10
18	C20	laki-laki	70	123	7,914
19	C22	perempuan	52	94	10,286
20	H47	laki-laki	68	129	1,57
21	H48	perempuan	72	98	9,814
22	H49	perempuan	60	96	7,329
23	H50	perempuan	64	98	1,523
24	H53	perempuan	59	146	11,071
25	H54	perempuan	58	98	9,114
26	H55	perempuan	52	114	8,729
27	H56	laki-laki	69	105	8,9
28	H58	perempuan	75	108	7,629
29	H59	perempuan	67	93	9,271
30	H60	perempuan	68	84	8,829

Lampiran 7

Data Hasil Analisis

Frequencies

JENISKEL

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	LAKI-LAKI	11	36,7	36,7	36,7
	PEREMPUAN	19	63,3	63,3	100,0
	Total	30	100,0	100,0	

Frequencies

Statistics

		USIA	GDS	ANG2
N	Valid	30	30	30
	Missing	0	0	0
Mean		63,67	115,3667	22,9688
Std. Error of Mean		1,538	9,67346	6,02093
Median		65,00	98,0000	9,9070
Mode		68	84,00(a)	11,07
Std. Deviation		8,425	52,98372	32,97802
Variance		70,989	2807,275	1087,550
Skewness		-,375	2,994	1,865
Std. Error of Skewness		,427	,427	,427
Kurtosis		-,598	10,035	1,671
Std. Error of Kurtosis		,833	,833	,833
Minimum		48	73,00	,08
Maximum		80	333,00	102,67
Percentiles	10	49,30	84,0000	2,1459
	20	53,20	87,0000	7,8228
	25	58,75	89,2500	8,0003
	30	59,30	91,0000	8,7590
	40	63,00	93,4000	9,1768
	50	65,00	98,0000	9,9070
	60	68,00	105,0000	10,5830
	70	68,70	112,8000	10,9757
	75	70,00	123,0000	11,0710
	80	70,00	123,8000	11,2542
	90	73,00	188,3000	94,1627

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

Frequency Table

USIA

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	48	1	3,3	3,3	3,3
	49	2	6,7	6,7	10,0
	52	3	10,0	10,0	20,0
	58	1	3,3	3,3	23,3
	59	2	6,7	6,7	30,0
	60	1	3,3	3,3	33,3
	61	1	3,3	3,3	36,7
	63	2	6,7	6,7	43,3
	64	1	3,3	3,3	46,7
	65	2	6,7	6,7	53,3
	67	1	3,3	3,3	56,7
	68	4	13,3	13,3	70,0
	69	1	3,3	3,3	73,3
	70	3	10,0	10,0	83,3
	72	1	3,3	3,3	86,7
	73	2	6,7	6,7	93,3
	75	1	3,3	3,3	96,7
	80	1	3,3	3,3	100,0
	Total	30	100,0	100,0	

GDS

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	73,00	1	3,3	3,3	3,3
	76,00	1	3,3	3,3	6,7
	84,00	3	10,0	10,0	16,7
	87,00	2	6,7	6,7	23,3
	90,00	1	3,3	3,3	26,7
	91,00	3	10,0	10,0	36,7
	93,00	1	3,3	3,3	40,0
	94,00	1	3,3	3,3	43,3
	96,00	1	3,3	3,3	46,7
	98,00	3	10,0	10,0	56,7
	105,00	2	6,7	6,7	63,3
	108,00	1	3,3	3,3	66,7
	110,00	1	3,3	3,3	70,0
	114,00	1	3,3	3,3	73,3
	123,00	2	6,7	6,7	80,0

124,00	1	3,3	3,3	83,3
129,00	1	3,3	3,3	86,7
146,00	1	3,3	3,3	90,0
193,00	1	3,3	3,3	93,3
233,00	1	3,3	3,3	96,7
333,00	1	3,3	3,3	100,0
Total	30	100,0	100,0	

ANG2

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid ,08	1	3,3	3,3	3,3
1,52	1	3,3	3,3	6,7
1,57	1	3,3	3,3	10,0
7,33	1	3,3	3,3	13,3
7,63	1	3,3	3,3	16,7
7,80	1	3,3	3,3	20,0
7,91	1	3,3	3,3	23,3
8,03	1	3,3	3,3	26,7
8,73	1	3,3	3,3	30,0
8,83	1	3,3	3,3	33,3
8,90	1	3,3	3,3	36,7
9,11	1	3,3	3,3	40,0
9,27	1	3,3	3,3	43,3
9,51	1	3,3	3,3	46,7
9,81	1	3,3	3,3	50,0
10,00	1	3,3	3,3	53,3
10,29	1	3,3	3,3	56,7
10,51	1	3,3	3,3	60,0
10,63	1	3,3	3,3	63,3
10,76	1	3,3	3,3	66,7
10,79	1	3,3	3,3	70,0
11,06	1	3,3	3,3	73,3
11,07	2	6,7	6,7	80,0
11,30	1	3,3	3,3	83,3
91,11	1	3,3	3,3	86,7
91,67	1	3,3	3,3	90,0
94,44	1	3,3	3,3	93,3
95,67	1	3,3	3,3	96,7
102,67	1	3,3	3,3	100,0
Total	30	100,0	100,0	

Uji normalitas Explore

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
USIA	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%
GDS	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%
ANG2	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%

Descriptives

			Statistic	Std. Error
USIA	Mean		63,67	1,538
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	60,52	
		Upper Bound	66,81	
	5% Trimmed Mean		63,70	
	Median		65,00	
	Variance		70,989	
	Std. Deviation		8,425	
	Minimum		48	
	Maximum		80	
	Range		32	
	Interquartile Range		11	
	Skewness		-,375	,427
	Kurtosis		-,598	,833
GDS	Mean		115,3667	9,67346
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	95,5822	
		Upper Bound	135,1511	
	5% Trimmed Mean		107,4259	
	Median		98,0000	
	Variance		2807,275	
	Std. Deviation		52,98372	
	Minimum		73,00	
	Maximum		333,00	
	Range		260,00	
	Interquartile Range		33,75	

ANG2	Skewness		2,994	,427
	Kurtosis		10,035	,833
	Mean		22,9688	6,02093
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	10,6546	
		Upper Bound	35,2830	
	5% Trimmed Mean		19,9158	
	Median		9,9070	
	Variance		1087,550	
	Std. Deviation		32,97802	
	Minimum		,08	
	Maximum		102,67	
	Range		102,59	
	Interquartile Range		3,07	
	Skewness		1,865	,427
	Kurtosis		1,671	,833

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
USIA	,130	30	,200(*)	,952	30	,188
GDS	,269	30	,000	,629	30	,000
ANG2	,472	30	,000	,539	30	,000

* This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Data tidak tersebar dengan normal karena nilai signifikansi (p) dari Shapiro wilk < 0.05

Uji normalitas transformasi $Lg(x+1)$ Explore

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
GDSL	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%
ANGL	30	100,0%	0	,0%	30	100,0%

Descriptives

			Statistic	Std. Error
GDSL	Mean		2,0383	,02591
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,9853	
		Upper Bound	2,0912	
	5% Trimmed Mean		2,0232	
	Median		1,9956	
	Variance		,020	
	Std. Deviation		,14190	
	Minimum		1,87	
	Maximum		2,52	
	Range		,65	
	Interquartile Range		,14	
	Skewness		1,977	,427
	Kurtosis		4,391	,833
ANGL	Mean		1,1069	,08440
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,9343	
		Upper Bound	1,2796	
	5% Trimmed Mean		1,1099	
	Median		1,0377	
	Variance		,214	
	Std. Deviation		,46226	
	Minimum		,03	
	Maximum		2,02	
	Range		1,98	

Interquartile Range	,13	
Skewness	,523	,427
Kurtosis	1,091	,833

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
GDSL	,185	30	,010	,801	30	,000
ANGL	,348	30	,000	,782	30	,000

a. Lilliefors Significance Correction

Data tidak tersebar dengan normal karena nilai signifikansi (p) dari Shapiro wilk < 0.05

Uji korelasi jika data normal

Correlations

Correlations

		GDS	ANG2
GDS	Pearson Correlation	1	,080
	Sig. (2-tailed)		,676
	N	30	30
ANG2	Pearson Correlation	,080	1
	Sig. (2-tailed)	,676	
	N	30	30

Uji korelasi jika data tidak normal

Nonparametric Correlations

Correlations

			GDS	ANG2
Spearman's rho	GDS	Correlation Coefficient	1,000	,044
		Sig. (2-tailed)	.	,819
		N	30	30
	ANG2	Correlation Coefficient	,044	1,000
		Sig. (2-tailed)	,819	.
		N	30	30

Lampiran 8

Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Skala	Pengukuran	Sumber
1	Polimorfisme gena NOS3	Adanya variasi susunan nukleotida pada urutan ke 894 bp dari gena NOS3	Kategorikal-nominal (GG/GT/TT)	PCR-RFLP primer G894TF, (G894TF: 5'-CAT GAG CGT CAG CCC CAG AAC-3 dan primer G894TR: 5'-AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C-3', enzim restriksi <i>MboI</i> yang digunakan dalam PCR untuk mengamplifikasi bagian dari wilayah gena NOS3 dengan ukuran 206 pb dan mengenali urutan basa GATC dan memotong diantara basa A dan T. Hasil elektroforesis menunjukkan satu pita dengan ukuran 206 pb menunjukkan bahwa genotipe GG, dua pita dengan ukuran 119 pb dan 87 pb genotipe TT dan tiga pita dengan ukuran 206 pb, 119 pb dan 87 pb menunjukkan genotipe GT	(Hingorani, 1999)
2	Polimorfisme gena MMP-9	Polimorfisme Gena MMP-9 adalah urutan DNA pada individu, kelompok, atau populasi, yang berasal dari <i>single nucleotids polymorphism (SINPs)</i> pada bagian ekson atau <i>coding region</i> dari basa guanin menjadi adenin.	Kategorikal-nominal (AA, GG,GA)	PCR-RFLP, primer F: 5'-ATGGGTCAAAGAACAGGA-3 dan primer R: 5'-GGTAGACAGGGTGGAGG-3', enzim restriksi <i>SmaI</i> merek <i>Thermo Scientific Fermentes</i> dengan situs pengenalan pada CCCGGG dan akan memotong di antara basa C dan G. Hasil elektroforesis apabila AA tidak terpotong dan menghasilkan pita berukuran 277 bp, apabila GG terpotong menjadi 2 fragmen 96 bp dan 181 bp dan GA menjadi 3 fragmen 96 bp, 181 bp dan 277 bp	(Smith, 2002)
3	Tekanan darah	Tekanan darah yang diukur dengan <i>Sphygmomanometer</i> raksa.	Kategorikal-nominal	<i>Sphygmo manometer</i> raksa merek ABN <i>Precision</i> . Subjek dengan tekanan darah sistolik/ diastolik $\geq 140/90$ mmHg disebut hipertensi sedangkan $<140/90$ mmHg disebut non hipertensi	JNC VII (Chobanian, 2003)

4	Kadar NO	Senyawa biokimia yang diperiksa dengan menggunakan metode Griess	Numerik-rasio	Spektrofotometer	(Sungdaewon, 2002).
5	Kadar Angiotensin II	Kadar angiotensin II diperiksa dengan menggunakan metode <i>Enzym Immunoassay</i> dan diambil melalui darah vena	Numerik-rasio	Plate Reader dengan RayBio rat Angiotensin II Enzyme Immunoassay Kit	Skurk et al., 2001
6.	Etnis Jawa	Subjek merupakan genaerasi ketiga etnis Jawa	Kategorikal-nominal	Ditanyakan saat wawancara apakah termasuk etnis Jawa atau bukan etnis Jawa. Subjek yang diambil adalah etnis Jawa.	(Bernis, 2004)

Lampiran 9. Penyampaian Laporan Hasil

Penelitian Tahun 2012

Tanggal 14 Februari 2013

Lampiran Realisasi Anggaran Penelitian tahun 2012

Judul Penelitian : Efek polimorfisme gena Nitrit Oksida Sintase3 (NOS3) dan gena Matrik Metaloproteinase-9 (MMP-9) Terhadap pasien dengan hipertensi pada Etnis Jawa

Ketua Peneliti : dr. Fitranto Arjadi M.Kes

Biaya Penelitian : Rp. **118.221.850**

Anggaran	Jumlah (Rp)
Honor Tetap	24.840.000
Belanja Bahan Penelitian	67.501.600
Belanja sewa	2.880.000
Barang OTK dan penggandaan	4.300.250
Perjalanan Lainnya (DN)	5.700.000
Biaya seminar	500.000
Biaya ethical clearance	500.000
Biaya konsumsi, pengambilan sampel dan bahan kontak	6.000.000
Biaya pemeriksaan DNA	6.000.000
Realisasi Total	118.221.850

Lampiran 10. Draft Naskah Publikasi

Efek polimorfisme gena Nitrit Oksida Sintase3 (NOS3) dan gena Matrik Metaloproteinase-9 (MMP-9) Terhadap pasien dengan hipertensi pada Etnis Jawa

Fitranto Arjadi, Saefuddin 'Aziz, Alfi Muntafiah

ABSTRAK

Latar belakang. Hipertensi berhubungan dengan gangguan vasodilatasi yang tergantung endotel, akibat penurunan kesediaan nitrit oksida (NO) dan terjadinya aktivasi angiotensin II (Ang II), yang berlebihan.

Tujuan penelitian. Mengetahui efek polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 pada pasien etnik Jawa dengan hipertensi.

Metode penelitian. Metode survai dengan rancangan penelitian kasus kontrol, kasus adalah penderita PROLANIS dokter keluarga Kabupaten Banyumas 45 orang, yang memenuhi kriteria inklusi. Parameter yang diamati adalah NO dan Ang II. Data dianalisis dengan anova satu arah untuk mengetahui adanya perbedaan antara individu pembawa polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP

Hasil penelitian. Rasio genotip penderita hipertensi heterozigot gena NOS3 (3 pita) 2 X lebih besar dibandingkan genotipe mutan (1 pita). Responden kontrol memiliki rasio genotipe mutan gena NOS3 (1 pita) 2 X lebih besar dibandingkan genotipe heterozigot (3 pita). Pada gena MMP-9, kasus hipertensi memiliki rasio heterozigot (3 pita) 3 X lebih besar dibandingkan genotipe normal (2 pita). Responden kontrol memiliki rasio genotipe heterozigot dan genotipe normal yang seimbang. Pada polimorfisme gena NOS3, penderita hipertensi kemungkinan memiliki genotip heterozigot GT, 2,945 kali lebih besar daripada genotip GG ($p\text{-value}=0.014$) dan pada polimorfisme gena MMP-9, penderita hipertensi kemungkinan memiliki genotipe heterozigot GA, 3,198 kali lebih besar daripada genotip GG ($p\text{-value}=0,008$) dan memiliki genotip AA, 1,548 kali lebih besar daripada memiliki genotip GG walaupun secara statistik tidak berhubungan ($p\text{-value}=0,726$). Uji statistik menunjukkan pada etnis Jawa tidak ada hubungan antara polimorfisme gena NOS3 dengan kadar NO ($p = 0,072$) dan Angiotensin II ($p=0,297$) dan antara polimorfisme gena MMP9 terhadap kadar Angiotensin II ($p=0,300$), tetapi ada hubungan antara polimorfisme gena MMP-9 terhadap kadar NO ($p=0,01$).

Kesimpulan. Terdapat polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 pada pasien etnik Jawa dengan hipertensi. Tidak ada hubungan antara polimorfisme gena NOS3 dengan kadar NO dan Ang II dan antara polimorfisme gena MMP9 terhadap kadar Ang II tetapi ada hubungan antara polimorfisme gena MMP-9 terhadap kadar NO.

Kata kunci : polimorfisme gena NOS3, polimorfisme promoter gena MMP-9, hipertensi, etnis Jawa

Pendahuluan

Hipertensi adalah penyakit yang disebabkan karena terjadinya peningkatan tekanan darah sistolik atau diastolik ataupun keduanya. Rata-rata prevalensi hipertensi di Indonesia sekitar 8,3%, di kota besar seperti Jakarta lebih tinggi yaitu sekitar 14,2%, diikuti Bandung 10,2% dan Surabaya 12,5%. Mayoritas hipertensi sebanyak 95% adalah hipertensi esensial yang tidak diketahui penyebabnya dan 10% adalah hipertensi sekunder akibat suatu penyakit, tetapi diduga hasil interaksi berbagai faktor lingkungan maupun genetik (8-11). Abnormalitas pengaturan volume cairan garam, peningkatan irama vaskuler serta remodeling dinding vaskuler terlibat dalam perkembangan hipertensi. Salah satu faktor penyebab hipertensi adalah terjadinya stres oksidatif dan disfungsi endotel akibat mutasi titik pada gen NOS3 (12). Polimorfisme atau mutasi titik tersebut menyebabkan produksi nitrit oksida (NO) yang berfungsi sebagai vasodilator berkurang. Penurunan NO menyebabkan respon abnormal terhadap asetilkolin pada pembuluh darah atau meningkatkan resistensi vaskuler pada hipertensi (13).

Salah satu polimorfisme gen NOS3 ada pada ekson 7 pada nukleotida ke 894 karena adanya substitusi basa nukleotida guanin menjadi timin (894G/T) (14) yang menyebabkan aktivitas enzim eNOS menurun, sehingga produksi NO berkurang. Patofisiologi hipertensi melibatkan pula sistem Renin-Angiotensin. Angiotensin II (Ang II) dan NO sebagai pengatur mekanisme tekanan darah. Mekanisme umpan balik antara Angiotensin II dan NO dengan cara Ang II mengatur ekspresi nitrit oksida sintase sel endotel (eNOS) yang memproduksi NO dan mempengaruhi vasokonstriksi sel otot polos dan sebaliknya NO menurunkan ekspresi reseptor Ang II pada endotel dan melakukan vasodilatasi terhadap sel otot polos vaskuler (21).

Penurunan produksi NO pada sel endotel mengaktifasi matrik ekstra seluler tubulus ginjal yaitu matriks metaloproteinase 2 (MMP-2) dan matriks metaloproteinase-9 (MMP-9) untuk melakukan proses dilatasi pembuluh darah mikro pada glomerulus dan tubulus ginjal sehingga filtrasi meningkat dan tekanan darah menurun. Semula pembuluh darah bagian tengah dan

membran dasar endotel kapiler mengandung elastin dan kolagen ultrastruktural sebagai penghubung interstisial, tetapi karena terjadi ketidakseimbangan antara MMP dengan inhibitornya yaitu tissue inhibitor proteinase (TIMP), akan menyebabkan ekspresi MMP-2 dan MMP-9 meningkat. Proses berikutnya MMP-2 dan MMP-9 akan mendegradasi elastin dan kolagen tersebut serta menggantikan dengan kolagen teroksidasi yang lebih kaku. Hal ini diperparah apabila terjadi polimorfisme pada gena MMP-9 pada jarak nukleotida ke 277, dimana terjadi substitusi basa nukleotida Guanian menjadi Adenin sehingga terjadi aktivasi MMP-9 secara terus menerus.

Perbedaan frekuensi polimorfisme gena NOS3 dan polimorfisme gena MMP-9 dengan kejadian hipertensi pada beberapa etnik manusia menarik untuk dikaji lebih lanjut. Hal ini mengingat Indonesia memiliki banyak etnik dan salah satunya adalah etnik Jawa yang terbesar. Disamping itu, analisis dasar molekuler polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 pada penderita hipertensi etnik Jawa belum dilakukan, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian ini.

Metode Penelitian

Metode penelitian menggunakan **metode survai** dengan **rancangan penelitian kasus kontrol**. Subyek kasus adalah penderita hipertensi di wilayah Banyumas sejumlah 50 orang yang memenuhi kriteria inklusi, laki-laki atau perempuan, etnik Jawa (3 keturunan), berusia ≥ 40 tahun, tekanan sistolik atau diastolik $\geq 140/90$ dan tidak meminum obat hipertensi. Subyek kontrol adalah 45 orang yang memenuhi kriteria inklusi, laki-laki atau perempuan, etnik Jawa (3 keturunan) usia ≥ 40 tahun, kadar kolesterol, trigliserida, Indeks Massa Tubuh (IMT) dan kadar glukosa darah normal. Waktu penelitian pada bulan Juli 2012-Desember 2012.

Sampel darah 6 ml dibagi 2 bagian yaitu 3 ml darah ditampung pada tabung EDTA untuk isolasi DNA, 3 ml darah ditampung pada tabung plain tanpa antikoagulan untuk diambil serumnya guna analisis kadar MMP-9NO dan Ang II. Darah untuk pemeriksaan NO dan MMP-9, ditampung pada tabung Ependorf dan disentrifuse dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10

menit dan supernatan yang berwarna kuning berupa serum dipisahkan dari eritrosit dan digunakan untuk analisis NO dan MMP-9, Pemeriksaan Kadar Nitrit oksida dengan metode Griess dengan menghitung konsentrasi nitrat dan nitrit dengan rumus :

$$[\text{Nitrat} + \text{nitrit}] [\mu\text{M}] = \frac{[\text{A } 540\text{-y}] \times \{ \frac{200 \mu\text{L}}{\text{slope}} \} \times \text{pengenceran}}{\text{volume sampel}}$$

Pemeriksaan Angiotensin II dengan metode ELISA Sandwich dengan larutan dibaca pada 540 nm dengan *plate reader* dan konsentrasi Ang II diperoleh dari persamaan $y = ax + b$ dengan sumbu x = konsentrasi standard dan sumbu y = absorbansi

Untuk Isolasi DNA dengan Metode Guanidin (25) dan pemeriksaan PCR-RFLP untuk polimorfisme 894G/T gena NOS3 dimulai dengan amplifikasi gena dengan PCR (15) menggunakan primer forward G894TF: 5'-CAT GAG CGT CAG CCC CAG AAC-3' dan primer reverse G894TR: 5'-AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C-3', menghasilkan produk sepanjang 206 bp. Kondisi PCR meliputi denaturasi awal 94°C 5 menit, 35 siklus terdiri dari denaturasi 94°C 1 menit, annealing 59°C 1 menit, elongasi 72°C 1 menit dan elongasi akhir 72°C 7 menit. Pemotongan produk PCR dengan enzim endonuklease *MboI*. Hasil digesti dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa dan divisualisasikan dengan etidium bromide di bawah sinar UV. Hasil elektroforesis adalah : GG tidak terpotong, TT terpotong menjadi 2 fragmen sepanjang 119 dan 87 bp, GT menjadi 3 fragmen 206, 119 dan 87 bp.

Pemeriksaan PCR-RFLP untuk polimorfisme gena MMP-9 (24) dimulai dengan amplifikasi gena MMP-9 dengan PCR menggunakan primer forward R279Q F: 5'- ATG GGT CAA AGA ACA GGA-3' dan primer R279Q R: 5'- GGT AGA CAG GGT GGA GG-3' , menghasilkan produk sepanjang 277 bp. Kondisi PCR meliputi denaturasi awal 95°C 5 menit, 35 siklus terdiri dari denaturasi 94°C 30 detik, annealing 58°C 30 detik, elongasi 72 °C 45 detik dan elongasi akhir 72°C 10 menit. Pemotongan produk PCR dengan enzim *SmaI*. Hasil digesti dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 5 % dan divisualisasikan dengan etidium bromid di bawah sinar UV. Hasil

elektroforesis AA tidak terpotong, GG terpotong menjadi 2 fragmen 181 bp dan 96 bp dan CA menjadi 3 fragmen 277 bp, 181 bp dan 96 bp.

Data dianalisis dengan perangkat software statistik dan untuk mengetahui adanya perbedaan antara individu pembawa polimorfisme gena NOS3 dan MMP-9 pada pasien hipertensi etnis Jawa digunakan Anova satu arah dan jika distribusi tidak normal dilanjutkan ke uji Mann Whitney.

Hasil

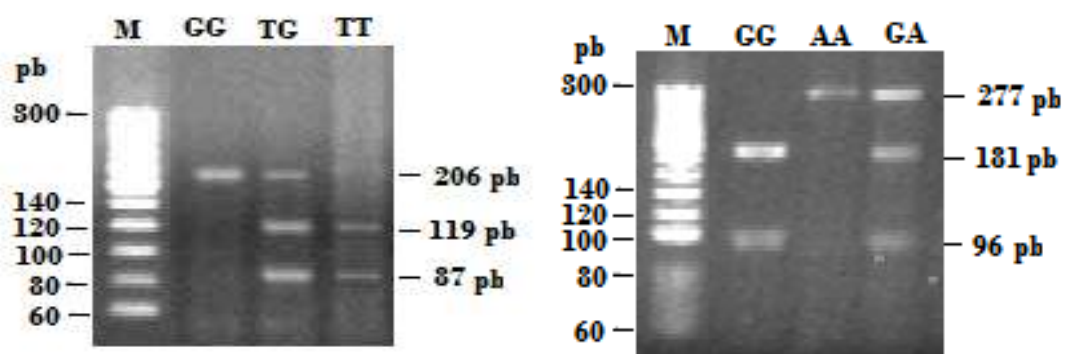
Hasil penelitian mengenai umur, jenis kelamin, parameter biokimia yang diperiksa adalah bias dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Sebaran usia responden antara penderita hipertensi dengan kontrol

No	Variabel	Kasus (n=50)	Kontrol (n=50)
1	Laki-laki	16 (32%)	16 (32%)
	Perempuan	34 (68%)	34 (68%)
2	Usia (tahun)	60,64±9,555	56,72±9,051
3	Trigliserida	154±117	160,9 ±89
4	NO	32,5±16	34,53±9,69
5	Angiotensin	5,9±3,4	14,53±22
6	Sistolik	124,0±6	152,2±17
7	Diastolik	79,0±5	88,9±10

Uji *paired T-test* menunjukkan perbedaan bermakna antara kadar NO antara kelompok hipertensi dan non hipertensi etnis Jawa ($p=0,002$, $p>0,05$). Hasil analisis bivariat menunjukkan CI 95% (-7,148 - -1,754) <1, yang berarti NO merupakan faktor protektif pada penyakit hipertensi. Polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 pada penderita hipertensi

Penggunaan enzim restriksi untuk mendeteksi keragaman genotip gena NOS3 tersaji pada gambar berikut :



Gambar 1

- A. Hasil elektroforesis produk PCR-RFLP untuk mendeteksi variasi genotip gena NOS3. M marker REF-20, GG tidak terpotong enzim restriksi ukuran pita 206 pb, TT terpotong enzim restriksi jadi dua pita 119 pb dan 87 pb, TG kombinasi dua pita yang terpotong dan tidak terpotong menghasilkan pita ukuran 206 pb, 119 pb dan 87 pb.
- B. Hasil elektroforesis produk PCR-RFLP untuk mendeteksi variasi genotip gena MMP9. M marker REF-20, AA tidak terpotong enzim restriksi ukuran pita 277 pb, GG terpotong enzim restriksi jadi dua pita 181 pb dan 96 pb, TG kombinasi dua pita yang terpotong dan tidak terpotong menghasilkan tiga pita ukuran 277 pb, 181 pb dan 96 pb.

Sekuensing terhadap sampel produk PCR gena NOS3 yang menunjukkan perbedaan jumlah dan ukuran pita hasil pemotongan dengan enzim *MboI* tersaji pada gambar berikut :

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      110      120      130      140      150
gi|2315713 GCTGCAGGCC CCAGATGATC CCCCAGAACT CTTCCCTTCTG CCCCCCGAGC
gi|2315713 GCTGCAGGCC CCAGATGATC CCCCAGAACT CTTCCCTTCTG CCCCCCGAGC
sample 19  GCTGCAGGCC CCAGATGAGC CCCCAGAACT CTTCCCTTCTG CCCCCCGAGC
sample N2  GCTGCAGGCC CCAGATGATC CCCCAGAACT CTTCCCTTCTG CCCCCCGAGC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      60      70      80      90      100
gi|7427228 CCGACGACCG GTTTGGCTTC TGCCCCAGCG AGAGACTCTA CACCCAGGAC
sample m1  CCGACGACCG GTTTGGCTTC TGCCCCAGCG AGAGACTCTA CACCCAGGAC
sample k11 CCGACGACCG GTTTGGCTTC TGCCCCAGCG AGAGACTCTA CACCCGGGAC
  
```

Gambar 2.

- A. Hasil sekuensing produk PCR fragmen gen NOS3. Produk PCR sampel 19 berupa satu pita yang tidak terpotong, sedangkan sampel N2 berupa dua pita karena terpotong enzim *MboI*. Sekuan gi2315713 merupakan sekuen gen NOS3 dari manusia yang ada di gen bank. Nukleotida-nukleotida urutan ke 119 yang di cetak tebal menunjukkan adanya variasi diantara sekuen. Urutan nukleotida GATC bergaris bawah merupakan urutan yang dikenali enzim *MboI*
- B. Hasil sekuensing produk PCR fragmen gen MMP9. Produk PCR sampel m1 berupa satu pita yang tidak terpotong. Sampel k11 berupa dua pita karena terpotong enzim *SmaI*. Sekuan gi7427228 merupakan sekuen gen MMP9 dari manusia yang ada di gen bank. Nukleotida-nukleotida urutan ke 96 yang di cetak tebal menunjukkan adanya variasi diantara sekuen. Urutan nukleotida CCCGGG bergaris bawah merupakan urutan yang dikenali enzim *SmaI*

Hasil identifikasi polimorfisme gena NOS3 pada penelitian ini menunjukkan bahwa proporsi genotip GG memiliki proporsi 38,1%, GT 59,5% dan TT 2,4% pada kelompok kasus dan pada kelompok kontrol

didapatkan proporsi genotip GG 64,4%, GT 35,6% dan TT 0% dan uji statistik menunjukkan hubungan yang bermakna antara polimorfisme gena NOS3 dengan pasien hipertensi etnis Jawa dengan nilai signifikansi $p=0.014$ ($P<0.05$). Pada polimorfisme gena NOS3, penderita hipertensi kemungkinan memiliki genotip heterozigot GT, 2,945 kali lebih besar daripada genotip GG ($p\text{-value}=0.014$)

Tabel 2. Hubungan Polimorfisme Gen NOS3 dan MMP-9 dengan Hipertensi

Variabel	Tekanan Darah		OR (95% CI)	p= <i>value</i>
	Hipertensi	Nonhipertensi		
Gena NOS3				
GT+TT	26 (61,9%)	16 (35,6)	2,945	0,014
GG	16 (38,1%)	29 (64,4)		
Gena MMP-9				
AA	5 (10%)	6 (12%)	1,548 (0,4-5,988)	0,726
GA	31 (62%)	18 (36%)	3,198(1,338-7,646)	0,008
GG	14 (28%)	26 (52%)	1	
Total	50 (100%)	50 (100%)		

Pembahasan

Analisis statistik efek polimorfisme gena NOS3 terhadap kadar NO penderita hipertensi menggunakan uji ANOVA *one way* tetapi pada uji normalitas data kadar NO tidak menunjukkan distribusi yang normal, setelah dilakukan transformasi maka dilanjutkan menjadi Uji *Mann-Whitney*. Hasil uji menunjukkan bahwa $p = 0,072$ ($p > 0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan kadar NO yang bermakna dengan polimorfisme gena NOS3. *Nitric oxidesynthase* (NOS) pada manusia (dan tikus) mempunyai tiga macam bentuk, yaitu *neuronal nitric oxide sythase* (nNOS atau NOS-1) yang ditemukan pada sel saraf, *inducible nitric oxide synthase* (iNOS atau NOS-2) yang ditemukan pada makrofag, dan *endothelial nitric oxide* (eNOS atau NOS-3) yang ditemukan pada sel endotel pembuluh darah. Kadar nNOS dan eNOS dalam tubuh relatif stabil, sedangkan untuk kadar iNOS dipengaruhi oleh rangsangan (misalnya infeksi parasit) (45). Pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan

kadar NO yang bermakna dengan polimorfisme gen NOS3 diduga karena reagen berasal dari iNOS berarti jika meningkat berarti keadaan pembuluh darah sudah dalam keadaan inflamasi atau sebagai tanda adanya plak aterosklerosis (64).

Gen NOS3 adalah gen dengan kode genetik berperan memproduksi enzim eNOS, enzim yang bekerja sebagai katalisator pembentukan NO dari asam amino arginin menjadi sitrulin pada endotel. Polimorfisme gen NOS3 menurunkan aktivitas enzim eNOS sebesar 20-30% yang mengganggu sintesis NO (54). Pada polimorfisme genotipe GT terjadi perubahan susunan basa pada gen NOS3 yang dapat menurunkan aktivitas enzim eNOS sehingga bioavailabilitas NO menjadi rendah (15) dikarenakan setiap kehadiran alel T pada gen NOS3 akan menurunkan aktivitas dari eNOS dan pada alel GT aktivitas dari eNOS sebesar 63% sedangkan pada alel TT aktivitas eNOS sebesar 22% (55). Penurunan kadar NO dalam sel endotel menurunkan reaksi cGMP yang menyebabkan peningkatan influks Ca^{2+} intrasel otot polos sehingga tunika muskularis pembuluh darah berkontraksi, memacu sintesis substansi vasokonstriktor dalam sel endotel seperti endothelin, angiotensin II dan tromboxan. (56).

Kadar NO rendah adalah penanda kerusakan endotel vaskuler (42) yang dapat diakibatkan adanya reaksi biokimia akibat polimorfisme gen NOS3 pada Exon 7 Glu298Asp. Hernayanti (53) menemukan pada subyek yang teridentifikasi adanya polimorfisme gen NOS3 menunjukkan kadar NO yang lebih rendah ($5,8 \pm 1,29 \mu\text{mol/L}$) dibandingkan kontrol ($10,57 \pm 1,93 \mu\text{mol/L}$). Penurunan bioaktivitas NO yang dapat meningkatkan risiko terjadinya hipertensi dapat terjadi melalui 3 mekanisme, yaitu perubahan substansi intraseluler transportasi L-arginin, perubahan aktivitas NOS akibat polimorfisme dan mutasi gen NOS3, peningkatan metabolisme NO akibat radikal bebas menjadi produk yang tidak dapat digunakan, misal nitrit (NO_2) dan nitrat (NO_3). Nitrit (NO_2) (56)

Pada polimorfisme gen MMP-9, penderita hipertensi kemungkinan memiliki genotipe heterozigot GA, 3,198 kali lebih besar daripada genotip

GG ($p\text{-value}=0,008$) dan memiliki genotip AA, 1,548 kali lebih besar daripada memiliki genotip GG walaupun secara statistik tidak berhubungan ($p\text{-value}=0,726$). Genotip AA merupakan faktor genetik penyebab hipertensi karena perubahan basa yang pada awalnya adalah basa guanin menjadi adenine dan pada subyek sehat (kontrol) genotip AA belum tampak efek klinisnya karena enzim MMP-9 mampu berfungsi sebagai vasodilator dan vasokonstriktor. Enzim MMP-9 mampu mendegradasi matriks ekstraseluler yang menimbulkan vasodilatasi pembuluh darah tetapi pada fase awal tidak menyebabkan kekakuan pembuluh darah.

Kerja enzim MMP-9 berlebihan akhirnya dapat menimbulkan kekakuan pembuluh darah yang selanjutnya menyebabkan hipertensi sehingga genotip AA bukan merupakan faktor risiko pada tahap awal tapi apabila aktivitas terjadi terus menerus dapat menjadikan MMP-9 sebagai faktor risiko penyakit kardiovaskular (57). MMP-9 yang berlebihan akibat polimorfisme gena MMP-9 dan kurangnya inhibitor yang dihasilkan yaitu *tissue inhibitor proteinase (TIMP)* menyebabkan MMP-9 berlebihan sehingga akan menggantikan elastin dan kolagena tadi menjadi lebih kaku (22). Polimorfisme MMP-9 pada bagian promoter dan *coding* mempengaruhi peningkatan kadar dan aktivitas MMP-9 sehingga mampu menyebabkan kekakuan arteri baik pada laki-laki maupun perempuan (59) dan gena MMP-9 berpengaruh pada mortalitas penyakit kardiovaskuler terutama pada pasien dengan 279 Gln allele (60). Perbedaan usia dan jenis kelamin juga mempengaruhi respon dari MMP-9 ini (59).

Analisa statistik hubungan polimorfisme gena NOS3 terhadap kadar angiotensin II menggunakan uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa $p=0,297$ ($P>0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan kadar Angiotensin 2 yang bermakna dengan polimorfisme gena NOS3. Angiotensin II merangsang produksi NO sedangkan NO diproduksi oleh NO synthase type 3 (NOS3). Angiotensin II menekan ekspresi NOS3 melalui NO dan NO menghambat ekspresi NOS3 (65).

Analisa statistik hubungan polimorfisme gena MMP9 dengan NO menggunakan uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa $P=0,01$ ($P<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan kadar NO yang bermakna antara kelompok polimorfisme gena MMP9. Pada penelitian ini, terdapat hubungan antara polimorfisme gena MMP-9 dengan NO, karena NO juga mampu mengatur aktivitas MMP-9 melalui jalur guanilil-siklase dependen dan independen, secara kimiawi dengan modifikasi *reactive nitrogene species-mediated protein*, secara biologi melalui modulasi keseimbangan MMP-9/TIMP-1 via *soluble guanylyl-cyclase-dependent* dan secara proteolitik melalui pengaturan MMP-1 dan MMP-13 yang dapat memecah prodomain MMP-9 (71). Penghambatan Nitric Oxide Synthase dapat meningkatkan ekspresi MMP-9 sehingga jika kadar NO menurun akan meningkatkan MMP-9 (72). Aktivitas enzim MMP-9 meningkatkan menyebabkan vasodilatasi dan jika aktivitasnya berlebihan menyebabkan perubahan jaringan elastin dalam pembuluh darah sehingga menyebabkan vasokonstriksi (70).

Analisa statistik hubungan polimorfisme gena MMP9 dengan angiotensin II menggunakan uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa $P = 0,3$ ($P > 0,05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan kadar angiotensin II yang bermakna dengan polimorfisme gena MMP9. Angiotensin meningkatkan ekspresi gena MMP-9 selain menginduksi monosit, melalui jalur protein G/non G, mobilisasi Ca^{2+} , *mitogena activated protein kinase* (MAPK), reseptor dan non reseptor tirosin kinase, *Janus family kinases-signal*, transduser dan *activated* transkripsi (JAK-STAT-S), protein G kecil (Ras, Rho, Rac, dan lain lain), aktivasi NADPH oksidase yang selanjutnya meningkatkan MMP-9. Kadar MMP-9 yang meningkat menyebabkan degradasi matriks di tunika intima pembuluh darah sehingga menimbulkan vasodilatasi. Keadaan MMP9 yang berlebihan mengubah jaringan elastin pembuluh darah sehingga menjadi kaku sehingga menimbulkan vasokonstriksi (73). Pada penelitian ini, polimorfisme MMP9 bertindak secara sinergis pada proses vasokonstriksi pembuluh darah sehingga pengaruhnya belum jelas benar dan dipengaruhi oleh faktor lain (70).

Kesimpulan

Kesimpulan penelitian ini adalah terdapat polimorfisme gena NOS3 dan gena MMP-9 pada penderita hipertensi etnis Jawa dan tidak ada hubungan antara polimorfisme gena NOS3 dengan kadar NO dan Angiotensin II, polimorfisme gena MMP9 terhadap kadar Angiotensin II tetapi ada hubungan antara polimorfisme gena MMP-9 terhadap kadar NO pada penderita hipertensi etnis Jawa.

Ucapan Terimakasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kemenkes RI melalui program Risbin Iptekdok tahun 2012 sebagai pemberi dana penelitian bersama dengan Lembaga Biologi Molekuler Eijkman sebagai *supervisor* penelitian. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada para pasien yang bersedia menjadi responden penelitian ini.

Daftar Pustaka

- (1) J.N.C. The seventh report of the joint national commitee on prevention, detection, evaluation and treatment of high blood pressure, JAMA 289: 2560-2572. 2003;
- (2) Sidabutar, R. P., Wiguno P. Hipertensi Essensial. In: *Ilmu Penyakit Dalam* Jilid II. Soeparman, Sarwono Waspadji Eds.. Balai Penerbit FK-UI:205-222, 1999
- (3) Susalit E. Hipertensi Primer. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jilid II. Edisi Ketiga. Balai Penerbit FK-UI, Jakarta.: 453-72. 2001
- (4) National Institutes of Health: The Seventh Report of The Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure, NIH Publication, November . 2003
- (5) Noer MS. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Edisi Ketiga, Jilid Kedua, Balai Penerbit FKUI, 2003
- (6) Gantini L. dan Wijaya A. Peran stres oksidatif dan inflamasi vaskuler pada hipertensi esensial. *Forum Diagnosticum*. 4 :1-7. 2005;
- (7) Sunarti. Interaksi polimorfisme genaetic metilentetrahidrofolat reduktase dan metabolisme folat pada hipertensi esensial. Program Doktor Ilmu Kedokteran dan Kesehatan.Fakultas Kedokteran UGM Yogyakarta; h. 51-52. 2007.
- (8) Sugiharto, A. Faktor-Faktor Risiko Hipertensi Grade II Pada Masyarakat (Studi Kasus di Kabupaten Karanganyar). Tesis. Program Studi Magister

Epidemiologi. Program Pasca Sarjana. Universitas Diponegoro, Semarang 2007

- (9) Qiu, C., Williams, M.A., Leisenring, W.M., Sorensen, T.K., Frederick, I.O., Dempsey, J.C., Luthy, D.A. Family History of Hypertension and Type 2 Diabetes in Relation to Preeclampsia Risk. *Hypertension: Journal of The American Heart Association* ; 41: 408-413. 2003
- (10) Sigarlaki, H. J. O. 1995. Faktor-faktor resiko penderita hipertensi di RSU FK-UKI. [Tesis] Program Studi Pascasarjana Ilmu Kesehatan Masyarakat, Jakarta. : 52 – 53. 1995
- (11) Mansjoer A, Suprohalita, Wardhani WL, Setiowulan W.: *Kapita Selekta Kedokteran*, Jakarta, Media Aesculapius FKUI. 2001
- (12) Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M. Endothelial Nitric Oxide Synthase Genae is Positively Associated With Essential Hypertension. *Hypertension* ; 32: 3-8. 1998
- (13) Panza, J.A. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin Cardiol.* 20 (suppl.II); II-26-II-33. 1997
- (14) Dosenko, V.E., Zagoriy, V.Y., Haytovich, N.V., Gordok O.A., Moibenko, A.A. Allelic polymorphism of endothelial NO-synthase genae and its functional manifestations. *Acta Biochimica Polonica*; 53: 299–302. 2006
- (15) Joshi, M.S., C., Mineo, P.W., Shaul, J.A., Baurer. Biochemical consequences of the NOS3 Glu298Asp variations in human endothelium altered caveolar localizations and impaired response to shear. *The FASEB Journal* ; 21: 2655-2663. 2007
- (16) Wu. MT, K., Kelsey, J., Schwartz., D., Sparrow, S., Weiss, H., Hu. A – aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) Polymorphism. may modify the relationship of low -level lead exposure to uricemia and renal function: The Normative Aging Study. *J Environ Health Perspect*; 111: 335-340. 2003
- (17) Howard T.D., W.H., Giles, J., Xu, M.A., Woznaik, A.M., Malarcher, L.A. Lange, R.F., Macko, M.J., Basehore, D.A., Meyers, J.W., Cole, S.J., Kittner. Promoters polymorphisms in the nitric oxide synthase 3 genae are associated with ischemic stroke susceptibility in young black woman. *Stroke Journal*; 10: 1848-1853. 2005
- (18) Afrasyap. L and G. Osturk. NO Synthase Genae Polymorphism (Glu 298 Asp) in the patients with coronary artery disease from Turki Population. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 36: 661-666. 2004
- (19) Arora, S., Das, N., Srivastava, K. Nitric Oxide and eNOS Genae in Essential Hypertension. *International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health*; 1: 56-71. 2009
- (20) Sulastri, D., Rahmatini, Lipoeto, N.I., Edwar, Z. Pengaruh Asupan Antioksidan terhadap Ekspresi Gena eNOS3 pada Penderita Hipertensi Etnik Minangkabau. *Artikel Penelitian. Majalah Kedokteran Indonesia*, Desember; 60: 564-570. 2010
- (21) Endemann, D.H. and Schiffrin, E.L. Endothelial dysfunction. *J Am Soc. Nephrol*; 15 : 1983-1992. 2004
- (22) Min, L.J., Mogi, M., Li J.M. Aldosterone and Angiotensin II synergistically induce mitogenic response in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* ; 97 : 434- 442. 2005

- (23) Venugopal, S.K., S. Devaraj., L. Jialal. Effect of C- Reactive Protein on vascular cells : Evidence for proinflammatory, proatherogenic role, *Curr Opin Nephrol Hypertens.*; 14 : 33-37. 2005
- (24) Wang, L., Ma, Y., Xie, X., Yang, Y., Fu, Z., Liu F., Li, X., Chen, B. Association of MMP-9 gene polymorphisms with acute coronary syndrome in the Uygur population of China. *World J Emerg Med*; 2:104-110. 2011
- (25) Hingorani D.A., C.F.,Liang, J.,Fatibene, A.,Lyon., S.,Monteith., A., Parsons, S., Haydock., R.V., Hooper, N.G., Stephens, K.M Osaughnessy, M.J. Brown. A Common Variant of the Endothelial Nitric Oxide Synthase (Glu²⁹⁸ → Asp) Is A mayor Risk Factor for Coronary Artery Disease in the UK. *Circulation*; 10:1515-1520. 1999.
- (26) Napoli and Ignaro. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase and carotid artery atherosclerosis. *J. Clin. Pathol* ; 10: 1136-1140. 2006
- (27) Yogiantoro M. Hipertensi Esensial dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam edisi V jilid II. Jakarta : Interna Publishing, p. 1079. 2009.
- (28) Babatsikou F. and Zavitsinou A. Epidemiology of Hypertension in Elderly. *Health Science Journal.*, vol.4(1): 24-30. 2010
- (29) Chobanian A.V. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. United States : National Institute of Health,.p. 19. 2003
- (30) Beevers G., Lip G.Y.H., and O'Brien E. ABC of Hypertension The Pathophysiology of Hypertension. *British Medical Journal.*, vol. 322: 912-916. 2001
- (31) Webb R.C. and Inscho E.W. Age Related Changes in the Cardiovascular System. Humana Press Totowa NJ..p. 11-20. 2005
- (32) Ergul A.. Hypertension in Black Patients An Emerging Role of the Endothelin System in Salt-Sensitive Hypertension. *Hypertension Journal American Heart Association.*, vol. 36: 62-67. 2000
- (33) Kumar V., Abbas A.K., and Fausto N. Robbins and Cotran . *Pathologic Basic of Disease* . 7th.. China: Elsevier Inc. 2005
- (34) Prodjosudjadi W. Hipertensi : Mekanisme dan Penatalaksanaannya. *Berkala Neurosains.* Jakarta : FKUI, vol. 3(1): 133. 2000
- (35) Ambrose J.A. and Barua R.S.. The Pathophysiology of Cigarettes Smoking and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 43(10): 1731-1737. 2004.
- (36) Adrogué H.J. and Madias N.E. Sodium and Potassium in the Pathogenesis of Hypertension. *The New England Journal of Medicine*..vol. 356: 1966-1978. 2007
- (37) Mathieu P., Poirier P., Pibarot, P., Lemieux I., and Despres J.P. Visceral Obesity : The Link Among Inflammation, Hypertension, and Cardiovascular Disease. *Journal of The American Heart Association.*.. vol. 53: 577-584. 2009
- (38) Miller P.M., Anton R.F., Egan B.M., Basile J., and Nguyen S.A. Excessive Alcohol Consumption and Hypertension: Clinical Implications of Current Research. *The Journal of Clinical Hypertension.*.. vol. 7(6): 346-351. 2005
- (39) Jee, S.H., He J., Whelton P.K., Suh Il., and Klag M.J. A Meta-Analysis of Controlled Clinical Trials. *The American Heart Journal.*.. vol. 33: 647-652. 1999

- (40) Elrod, S, Wiliam S. *Genetika*. Edisi 4, Ed: Safitri A, Erlangga, . Jakarta. h. 2892007.
- (41) Smith, K. Polimorfisme dan SNP. Diakses tanggal 1/11/2012. Available at URL : http://www.cs.mcgill.ca/~kaleigh/compbio/snp/snp_summary.pdf 2002..
- (42) Joshi, Mineo, Shaul,. Biochemical consequencqsofthe NOS3 Glu298Asp variations in human endothelium altered caveolar localizations and impaired response to share. *The Faseb Journal* ; 21: 2655-2663. 2007
- (43) Lei W., Yi-tong M., Xiang X., Yi-ning Y., Zhen-yan F., Fen L., Xiao M.L., and Bang-dang C.. Association of MMP-9 Gene Polymorphisms with Acute Coronary Syndrome in the Uygur Population of China. *World Journal Emerg Med*, vol. 2(2): 104. 2011
- (44) Ye Shu. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovascular Research* 69. 636 – 645. .2006
- (45) Devlin, T.M. *Text Book of Biochemistry with Clinical Correlation*, 5th ed. . Canada: Wiley- Liss : 407-88. 2002.
- (46) Manukhina, E.B. , Downey, H.F. and Mallet, R.T. Role of Nitric Oxide in Cardiovascular Adaptation to Intermitten Hypoxia. *Exper Biol Med*. 231 : 343-365. 2006.
- (47) Vallence, P.and Chan, NGeneral Cardiology : Endothelial Function and Nitric Oxide. *Clinical Relevance Heart*. 85 : 342 – 350. 2001.
- (48) Murray, R.K., D.K. Granner dan V.W. Rodwell.. *Biokimia Harper* : Edisi 27. EGC, Jakarta. 2009
- (49) Muttaqin, A.. Pengantar Asuhan Keperawatan Klien dengan Gangguan Sisten Kardiovaskuler. Salemba Medika, Jakarta. Pp.18-19. 2009
- (50) Campbell, N. A., J. B. Reece dan L. G. Mitchell.. *Biologi* Jilid 3. Penerbit Erlangga, Jakarta. Pp. 122-124. 2004
- (51) Mifflin, H. *The American Heritage Dictionary of the English Language* 4th eds. Amerika : Houghton Mifflin Company. 2000.
- (52) Suryadinata, L., Arifin, E.N., dan Anata, A.. *Indonesia's Population : Ethnicity & Religion in a Changing Political Landscape*. Singapore : Institute of Southeast Asian Studies. 2003
- (53) Hernayanti.. Efek Ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) terhadap Gambaran Hematologi, Kadar NO, Aktivitas GPx pada Individu dengan Polimorfisme Gena NOS3 dan Alad yang Terpapar Plumbum.Disertasi. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2012
- (54) Rudd, M.A., Troillet, M.R., Loscalzo, J. Nitric Oxide and Hypertension editor: Joseph Loscalzo and Joseph A. Vita. *Contemporary Cardiology* Vol.4. 2000
- (55) Wang, X. L., Sim, A. S., Wang, M. X., Murrell, G. A., Trudinger, B., and Wang, J. Genotype dependent and cigarette specific effects on endothelial nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *FEBS Lett*. 471, 45–50. 2000
- (56) Gerard, A. 2000. *Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction: Nitric Oxide and Cardiovascular System*. Totowa, New Jersey :Humana Press,Inc.2000

- (57) Galis Z. S and Khatri J. J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis : The Good, the Bad, and the Ugly. The Journal of American Heart Association.; 90: 251-262. 2002
- (58) Abilleira S., Began S., and Markus H. S. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. Journal of Medical Genetics.; 43: 897-901. 2011
- (59) Yasmin., McEinery C.M., O'Shaughnessy K.M., Harnett P., Arshad A., Wallace S., Maki-Petaja K., McDonnell B., Ashby M.J., Brown J., Cockcroft J.R., and Wilkinson I.B. Variation in the human matrix metalloproteinase- 9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. Journal of American Heart Association.; 26: 1799-1805. 2006
- (60) Blankenberg S., Rupprecht H. J., Poirier O., Bickel C., Smieja M., Hafner G., Meyer J., Tiret L., and Cambien F. Plasma Concentrations and Genetic Variation of Matrix Metalloproteinase 9 and Prognosis of Patients with Cardiovascular Disease. Journal of American Heart Association. 107: 1579-1585. 2003;
- (61) Viklund, A. 2009. Endothelial derived Nitric Oxide Synthase and Action. Diakses 19 Desember 2012. Available at URL : <http://medicalmyths.wordpress.com/atherosclerosis/>
- (62) Gerard, A. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction: Nitric Oxide and Cardiovascular System. Totowa, New Jersey :Humana Press,Inc. 2000.
- (63) Arora, S., Das, N., Srivastava, K. Nitric Oxide and eNOS Genae in Essential Hypertension. Intern Journ of Coll Res on Intern Med & Pub Health; 1: 56-71. 2009
- (64) Lafond -Walker A, Chen CL, Augustine S, Wu TC, Hruban RH, Lowenstein CJ.. Inducible nitric oxide synthase expression in coronary arteries of transplanted human hearts with accelerated graft arteriosclerosis. Am J Pathol. 151:919–25. 1997
- (65) Ramseyer V.D., Garvin J.L. Angiotensin II Decreases Nitric Oxide Synthase 3 Expression via Nitric Oxide and Superoxide in the Thick Ascending Limb. Hypertension. 53:313-318. 2009
- (66) Newby A.C. and Johnson J.L. Genaetic Strategies to Elucidate the Roles of Matrix Metalloproteinases in Atherosclerotic Plaque Growth and Stability. Journal of The American Heart Association.Research, vol. 97: 958-960. 2005
- (67) Karthikeyan V.J. and Lip G.Y.H., Matrix Metalloproteinases and Hypertension: A Link between Left Ventricular Hypertrophy and Diastolic Dysfunction. Tohoku Journ. Exp. Med, vol. 28: 93-97. 2006.
- (68) Zhou S., Feely J., Spiers J.P., and Mahmud A.. Matrix Metalloproteinase-9 Polymorphism Contributes to Blood Pressure and Arterial Stiffness in Essential Hypertension. Journ of Human Hypertension, vol. 21: 861-867. 2007
- (69) Lei W., Yi-tong M., Xiang X., Yi-ning Y., Zhen-yan F., Fen L., Xiao M.L., and Bang-dang C. Association of MMP-9 Genae Polymorphisms with Acute Coronary Syndrome in the Uygur Population of China. World Journal Emerg Med, vol. 2(2): 104. 2011.

- (70) Min L.J., Mogi M., and Li J.M., Aldosterone and Angiotensin II Sinergistically Induce Mitogenic response in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circul Res Journ of The Am Heart Assoc.* Vol. 97: 434-442. 2005.
- (71) Ridnour LA, Windhausen AN, Isenberg JS, Yeung N, Thomas DD, Vitek MP, Roberts DD, Wink DA. Nitric oxide regulates matrix metalloproteinase-9 activity by guanylyl-cyclase-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U A.* 23; 104 (43):16898-903. 2007.
- (72) Knipp, M.S., Gorav Ailawadi, M.D., John W. Ford, B.A., David A. Peterson, B.A., Matthew J. Eagleton, M.D., Karen J. Roelofs, D.V.M., Kevin K. Hannawa, Michael P. Deogracias, Baoan Ji, M.D., Ph.D., Craig Logsdon, Ph.D., Kathleen D. Graziano, M.D., Diane M. Simeone, M.D., Robert W. Thompson, M.D., Peter K. Henke, M.D., James C. Stanley, M.D., and Gilbert R. Upchurch, Jr., M.D., Increased MMP-9 Expression and Activity by Aortic Smooth Muscle Cells after Nitric Oxide Synthase Inhibition Is Associated With Increased Nuclear Factor- κ B and Activator Protein-1 Activity *Journ of Surgic Res* 116, 70–80 . 2004.
- (73) Yaghooti H., M. Firoozrai, S. Fallah and M.R. Khorramizadeh. Angiotensin II induces NF- κ B, JNK and p38 MAPK activation in monocytic cells and increases matrix metalloproteinase-9 expression in a PKC- and Rho kinase-dependent manner. *Braz J Med Biol Res.* Vol. 44(3) 193-199. 2011.