

Artikel Penelitian

Hubungan Polimorfisme *MTHFR* C.677c>T dengan Fungsi Kognitif pada Pasien Stroke Iskemik Akut Di RSUP Dr. Sardjito

THE ASSOCIATION OF *MTHFR* C.677C>T POLYMORPHISM WITH COGNITIVE FUNCTION IN ACUTE ISCHEMIC STROKE PATIENTS IN DR. SARDJITO GENERAL HOSPITAL YOGYAKARTA

Arinal Haq¹, Abdul Gofir², Mawaddah Ar Rochmah², Amelia Nur Vidyanti², Yogik Onky Silvana Wijaya³

¹PPDS Neurologi FK-KMK Universitas Gadjah Mada/RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta

²Staf Prodi Neurologi FK-KMK Universitas Gadjah Mada/RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta

³Staf Biokimia FK-KMK Universitas Gadjah Mada

Korespondensi ditujukan kepada Arinal Haq; arin.arinalhaq@gmail.com.

Dipublikasi 29-11-2024

Editor Akademik: Prof. Dr. dr. Kiking Ritarwan, Sp.S (K)

Hak Cipta © 2024 Arinal dkk. Ini adalah artikel akses terbuka yang didistribusikan di bawah Creative Commons Attribution License, yang mengizinkan penggunaan, distribusi, dan reproduksi tanpa batas dalam media apa pun, asalkan karya aslinya dikutip dengan benar.

ABSTRACT

Introduction: Ischemic stroke is an acute cerebrovascular event with cognitive impairment presents as its prevalent manifestation and complication. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) is an important enzyme in folate metabolism through an integral process of cellular metabolism in DNA, RNA and protein methylation. *MTHFR* c.677C>T polymorphism is considered an important genetic risk factor for stroke and cognitive dysfunction in some populations.

Aims: This study aimed to investigate the association between the *MTHFR* c.677C>T polymorphism and cognitive function in acute ischemic stroke patients in Dr. Sardjito General Hospital Yogyakarta.

Methods: We performed a cross-sectional study in 42 consecutive acute ischemic stroke patients. PCR R-FLP was used to examine *MTHFR* c.677C>T polymorphism. Cognitive function was determined using MoCA-Ina within 24 hours of each patient's admission, with score 24 is the cut off for cognitive impairment.

Results: Of 42 patients, 12 patients (28.6%) showed *MTHFR* c.677C>T variant. There were 3 patients (25%) with homozygous variant of *MTHFR* c.677C>T. Cognitive dysfunction was found in 7 patients (16.7%) with *MTHFR* c.677C>T variant and 18 patients (42.9%) with wild type *MTHFR*. However, no significant association was found between *MTHFR* c.677C>T with cognitive function in acute ischemic stroke patients ($p=0.921$).

Discussion: The frequency of *MTHFR* c.677C>T polymorphism in this study was 28.6% with a quarter of them showing homozygous variant. There was no association between *MTHFR* c.677C>T polymorphism with cognitive function in acute ischemic stroke patients.

Keyword: Acute ischemic stroke, cognitive function, *MTHFR* c.677C>T polymorphism

ABSTRAK

Pendahuluan: Stroke iskemik akut merupakan salah satu penyakit serebrovaskular dengan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Gangguan kognitif paska-stroke merupakan komplikasi yang banyak terjadi. Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) adalah enzim penting dalam metabolisme folat yang merupakan proses integral pada metabolisme DNA, RNA, dan metilasi protein. Polimorfisme gen *MTHFR* c.677C>T dianggap sebagai faktor risiko penting pada stroke dan berbagai bentuk disfungsi kognitif.

Tujuan: Studi ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara polimorfisme gen *MTHFR* c.677C>T dengan fungsi kognitif pada pasien stroke iskemik akut di RSUP Dr. Sardjito.

Metode: Kami melakukan studi pada 42 kasus stroke iskemik akut. Teknik PCR R-FLP digunakan untuk menentukan polimorfisme *MTHFR* c.677C>T. Fungsi kognitif pasien ditentukan dengan sistem skoring MoCA-INA.

Hasil: Dari 42 kasus stroke iskemik akut, didapatkan 12 kasus (28,6%) dengan mutasi pada gen *MTHFR* c.677C>T, dan 30 kasus (71,4%) tanpa mutasi. Disfungsi kognitif ditemukan pada 7 kasus dari kelompok mutasi (16,7%) dan 18 kasus dari kelompok tanpa mutasi (42,9%). Nilai odd ratio adalah 1,071 (0,275 – 4,176) dengan nilai signifikansi p sebesar 0,921.

Diskusi: Polimorfisme gen *MTHFR* c.677C>T tidak berhubungan secara signifikan dengan fungsi kognitif pada pasien stroke iskemik akut. Pasien dengan polimorfisme gen *MTHFR* c.677C>T berisiko 1,071 kali lipat mengalami gangguan kognitif.

Kata Kunci : stroke iskemik akut, fungsi kognitif, polimorfisme *MTHFR* c.677C>T

1. Pendahuluan

Stroke adalah manifestasi klinis akut akibat disfungsi neurologis pada otak, medulla spinalis, dan retina baik sebagian

atau menyeluruh yang menetap selama ≥ 24 jam atau menimbulkan kematian akibat gangguan pembuluh darah. Stroke dapat dibagi menjadi stroke iskemik dan stroke perdarahan. Stroke iskemik

adalah stroke yang disebabkan oleh infark yang dibuktikan melalui pemeriksaan radiologi, patologi, atau bukti lain yang menunjukkan iskemi otak, medulla spinalis, atau retina. Stroke perdarahan adalah stroke yang disebabkan oleh perdarahan intrakranial atau subaraknoid.^[1]

Stroke merupakan penyakit dengan prevalensi yang tinggi di seluruh dunia. Secara global lebih dari 7,6 juta kasus baru stroke dilaporkan setiap tahunnya. Sekitar 62% dari seluruh insidensi stroke adalah stroke iskemik.^[2] Berdasarkan riset kesehatan dasar (Rikesdas) pada tahun 2018, insidensi kasus stroke di Indonesia dilaporkan sebanyak 10,9 kasus per 1000 penduduk dan provinsi D.I. Yogyakarta menduduki peringkat ketiga dalam tingkat insidensi stroke.^[3] Stroke merupakan penyebab morbiditas dan mortalitas yang signifikan. Secara global, stroke merupakan penyebab kematian terbanyak kelima.^[4] Pada pasien yang bertahan hidup, pemulihan stroke akan memakan waktu yang lama dan risiko rekurensi stroke sangat tinggi. Sebagian besar pasien stroke akan memiliki defisit neurologis parsial sisa yang dapat menghambat aktivitas sehari-hari.^[5]

Gangguan kognitif dan disfungsi memori merupakan salah satu komplikasi yang terjadi pada pasien stroke. Sekitar 30% pasien stroke mengalami demensia dalam waktu 1 tahun setelah onset stroke. Serangan stroke menyebabkan gangguan pada domain kognitif, yang meliputi atensi, fungsi eksekutif, memori, bahasa, kontrol motor perseptual, dan kognisi sosial. Domain yang paling terdampak adalah atensi dan fungsi eksekutif, di mana masalah gangguan memori ini tampak jelas saat diagnosis stroke. Gangguan kognitif pasca stroke merupakan evolusi penyakit serebrovaskular yang menyebabkan spektrum gangguan kognitif vaskular.^[6] Terdapat beberapa alat skrining untuk menilai fungsi kognitif pada pasien, di antaranya mini-mental status exam (MMSE), Montreal Cognitive Assessment (MoCA), atau MoCA versi Indonesia (MoCA-Inda). Alat skrining tersebut penting untuk mengetahui ada tidaknya gangguan kognitif dan mengevaluasi domain kognitif multipel.^[7]

Beberapa studi telah menunjukkan bahwa kadar homosistein serum yang tinggi meningkatkan risiko gangguan fungsi kognitif.^[8-10] Kadar homosistein dan folat serum berkaitan dengan performa kognitif pasien.^[8] Studi telah menunjukkan bahwa polimorfisme pada gen metylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) c.677C>T berkaitan dengan konsentrasi homosistein.^[9] MTHFR adalah enzim kunci pada metabolisme folat dan homosistein, yang mengkatalisis reduksi metiltetrahydrofolat menjadi metiltetrahydrofolat, yang terlibat dalam metilasi homosistein untuk menghasilkan metionin yang menjaga kadar homosistein dalam serum. Varian gen MTHFR, di mana sitosin digantikan oleh timidin (C>T) pada posisi nukleotida 677, diketahui berkaitan dengan peningkatan kadar homosistein.^[10]

2. Tujuan

Studi ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara polimorfisme gen MTHFR c.677C>T dengan fungsi kognitif pada pasien stroke iskemik akut di RSUP Dr. Sardjito.

3. Metode

Rancangan dan subjek penelitian

Studi kasus kontrol ini melibatkan 42 pasien stroke iskemik akut yang dirawat di Unit Stroke RSUP Dr. Sardjito yang dirawat pada periode Juni – Agustus 2023. Diagnosis stroke iskemik akut ditentukan dengan adanya gambaran iskemi atau infark pada pemeriksaan CT scan kepala non-kontras. Kriteria inklusi pada sampel penelitian yaitu pasien dengan stroke iskemik. Kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah: (1) Pasien terdiagnosis stroke onset akut berdasarkan pemeriksaan fisik yang dikonfirmasi dengan CT-Scan kepala (2) Pasien tidak mengalami gejala gangguan kesadaran sebagai manifestasi klinis stroke, (3) Pasien dilakukan pemeriksaan fisik dan fungsi kognitif dalam waktu 24 jam setelah masuk rumah sakit. Kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah: (1) Memiliki kelainan bawaan, tumor, riwayat cedera

kepala sebelumnya, (2) Terdiagnosis dengan ensefalopati metabolik, sebagai contoh ensefalopati hepatikum atau uremikum. Seluruh subjek penelitian bersedia untuk berpartisipasi dalam penelitian dengan menandatangani lembar informed consent dan memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi penelitian.

Subjek penelitian terbagi menjadi kelompok dengan varian polimorfisme gen MTHFR c.677C>T dan kelompok wild type. Penilaian ada tidaknya gangguan kognitif dilakukan dengan menggunakan alat skrining MoCA INA. Hasil pemeriksaan MoCA INA diinterpretasikan dengan kategori terdapat gangguan fungsi kognitif jika nilai skor MoCA-INA <26 dan tidak terdapat gangguan jika nilai skor 26-30.

Genotyping variasi genetik

Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan sampel darah whole blood. Amplifikasi DNA dan identifikasi gen MTHFR c.677C>T dilakukan dengan metode Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Primer yang digunakan yaitu forward MTHFR-677 F = 5' – TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA – 3' dan reverse MTHFR-677R = 5' – AGGACGGTGCGGTGAGAGTG – 3'. Prosedur PCR dilakukan sebanyak 40 siklus dengan program sebagai berikut: 98oC selama 1 menit untuk initial denaturation, 98oC selama 10 detik untuk denaturation, 67oC selama 30 detik untuk proses annealing, 72oC selama 30 detik untuk proses elongation, 72oC selama 5 menit untuk final elongation, dan 10oC untuk storage. Produk PCR divisualisasikan dengan elektroforesis menggunakan agarose 3%. Hasil PCR-RFLP dikonfirmasi menggunakan sekuensing metode Sanger.

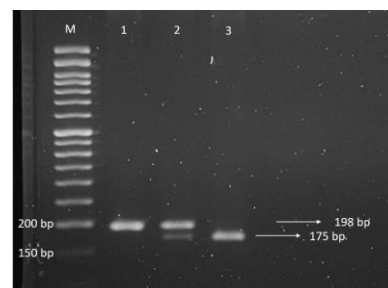
Analisis Statistik

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan aplikasi SPSS versi 25.0. Asosiasi antara mutasi polimorfisme gen MTHFR c.677C>T dengan gangguan kognitif dianalisis menggunakan analisis bivariat dengan Pearson Chi - square test. Nilai signifikansi yaitu p<0,05.

Penelitian ini sudah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran dan Kesehatan Masyarakat Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan RSUP Dr. Sardjito dengan nomor referensi KE/FK/0512/EC/2023. Penelitian ini tidak dipungut biaya apapun dan peneliti menjamin kerahasiaan data yang diperoleh dan hanya peneliti yang memiliki akses terhadap data mentah tersebut.

4. Hasil

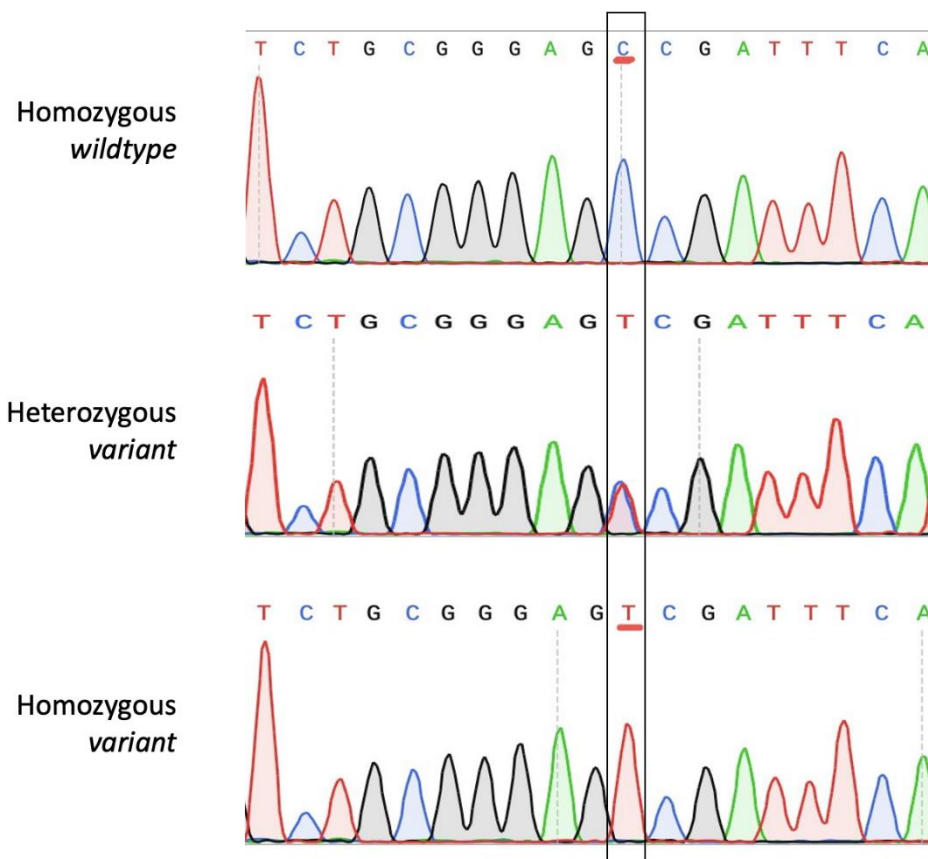
Hasil analisis pada 42 sampel pasien stroke iskemik akut didapatkan 12 (28,6%) pasien dengan varian gen MTHFR c.677C>T, baik homozygous maupun heterozygous, dan 30 pasien (71,4%) tidak bermutasi. Dari keseluruhan kasus, disfungsi kognitif ditemukan pada 25 (59,5%) pasien, yaitu 7 (16,7%) pasien dari kelompok varian gen MTHFR c.677C>T, dan 18 (42,9%) pasien dari kelompok gen MTHFR varian wild type. Hasil analisis tidak menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara polimorfisme gen MTHFR c.677C>T dengan gangguan kognitif pada pasien stroke iskemik akut (p=0,921).



Gambar 1. Elektroforesis PCR-RFLP MTHFR c.677C>T. Lane 1: marker; Lane 2: homozygous varian wild type; Lane 3 : varian heterozygous 677 C>T; Lane 4: varian homozygous 677 C>T

Tabel 1. Hasil analisis hubungan polimorfisme gen *MTHFR* c.677C>T dan gangguan kognitif

			Gangguan Kognitif		Total	Nilai p^2	OR (95% CI)
			Tidak	Ya			
Polimorfisme gen <i>MTHFR</i> c.677C>T	CT dan TT	Jumlah	5	7	12	0,921	1,071 (0,275 – 4,176)
		%	11.9%	16.7%	28.6%		
	CC	Jumlah	12	18	30		
		%	28.6%	42.9%	71.4%		
Total		Jumlah	17	25	42		
		%	40.5%	59.5%	100.0%		



Gambar 2. Sekuensing Metode Sanger.

Tiga sample dengan hasil PCR-RFLP masing-masing *homozygous wildtype*, *heterozygous variant*, dan *homozygous variant* dipilih untuk dilakukan sekuensing dengan metode Sanger. Pada sample *homozygous wildtype* terbukti adanya puncak nukleotida C saja pada c.677. Pada sample *heterozygous variant* terdapat nukleotida C dan T saja pada c.677. Pada sample *homozygous variant* terbukti adanya puncak nukleotida T saja pada c.677

5. Diskusi

Prevalensi varian gen *MTHFR* c.677C>T berbeda-beda di berbagai populasi, menurun dari belahan bumi timur ke barat. Prevalensi tertinggi dilaporkan pada populasi Jepang (59,8%), menurun ke arah barat Asia dan Eropa, yaitu 43,3% di Cina, 42% di Azerbaijan, 39,4% di Turki, 35,3% di Yunani, 21% di Italia, dan 8,3% di Denmark.^[11]

MTHFR adalah enzim penting dalam metabolisme folat yang merupakan proses integral pada metabolisme DNA, RNA, dan metilasi protein. Enzim ini mengkatalisis reduksi metilentetrahidrofolat menjadi metiltetrahidrofolat, yang terlibat dalam metilasi homosistein untuk menghasilkan metionin yang menjaga kadar homosistein dalam serum. Varian gen *MTHFR*, di mana sitosin digantikan oleh timidin (C>T) pada posisi nukleotida 677, diketahui berkaitan dengan peningkatan kadar homosistein dalam darah.^[10]

Polimorfisme gen *MTHFR* c.677C>T dianggap sebagai faktor risiko penting pada stroke dan berbagai bentuk disfungsi kognitif.

Varian gen *MTHFR* c.677C>T diketahui berkaitan dengan sebab hereditas trombotik vena.^[11] Akan tetapi, peran gen *MTHFR* pada penyakit vaskular arterial dan penyakit serebrovaskular pada beberapa studi dilaporkan kontradiktif. Homozigositas varian gen *MTHFR* c.677C>T dilaporkan tidak berkaitan dengan risiko stroke iskemik.^[12] Studi tersebut juga didukung oleh penelitian oleh Ucar et al. dengan simpulan yang serupa.^[11] Pada studi ini didapatkan hasil bahwa polimorfisme gen *MTHFR* c.677C>T tidak berhubungan dengan kejadian gangguan kognitif pada pasien stroke iskemik akut.

Meskipun secara teori gen *MTHFR* c.677C>T dilaporkan berkaitan dengan tingginya kadar homosistein serum, beberapa studi menunjukkan bahwa polimorfisme gen *MTHFR* c.677C>T tidak berkaitan dengan perubahan fungsi kognitif pada individu.^[13,14] Studi menunjukkan bahwa varian gen *MTHFR* c.677C>T berkaitan dengan risiko berkembangnya penyakit Alzheimer. Dilaporkan bahwa one-carbon cycle-derived methyl donor S-adenosylmethionine mempengaruhi ekspresi gen kunci yang berperan dalam fungsi kognitif. Pertama, peningkatan

konsentrasi homosistein serum karena defisiensi MTHFR menurunkan ekspresi dan metilasi Ser/Thr protein phosphatase 2A dan leucine carboxymethyltransferase 1 yang menyebabkan defosforilasi tau, proses penting pada penyakit Alzheimer. Kedua, dilaporkan adanya korelasi kuat antara kadar homosistein serum dengan konsentrasi beta amyloid 40 plasma yang dapat menyebabkan penyakit Alzheimer.^[8] Selain itu, peningkatan kadar homosistein plasma diketahui dapat menyebabkan penebalan tunika intima dan media pada pasien dengan gangguan kognitif, yang mana dapat memperburuk fungsi kognitif.^[15]

Dari studi ini dapat disimpulkan bahwa polimorfisme gen MTHFR c.677C>T tidak berhubungan dengan gangguan kognitif pada pasien stroke iskemik akut. Namun, mengingat besar sampel yang kecil dengan pengambilan subjek pada satu senter dalam studi ini, maka diperlukan studi multisenter dalam skala yang lebih besar untuk mengkonfirmasi temuan kami. Studi masa depan mengenai interaksi gen-gen dan gen-lingkungan juga diperlukan.

6. Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah polimorfisme gen MTHFR c.677C>T tidak berhubungan dengan gangguan kognitif pada pasien stroke iskemik akut. Namun, mengingat besar sampel yang kecil dan limitasi lain dalam studi ini, maka diperlukan studi prospektif dengan skala besar dan uji kontrol acak untuk mengkonfirmasi temuan kami. Studi masa depan mengenai interaksi gen-gen dan gen-lingkungan juga diperlukan.

7. Daftar Pustaka

1. Kemenkes. 2019. KMK No HK.01.07/Menkes/394/2019 tentang Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata laksana Stroke.
2. World Stroke Organization. Global Stroke Fact Sheet 2022. 2022. [Diakses 23 September 2023] Tersedia dari: https://www.world-stroke.org/assets/downloads/WSO_Global_Stroke_Fact_Sheet.pdf.
3. Kementerian Kesehatan RI. 2019. Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar 2018. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
4. Hui C, Tadi P, Patti L. Ischemic Stroke. [Updated 2022 Jun 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499997/>.
5. Khaku AS, Tadi P. Cerebrovascular Disease. [Updated 2022 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430927/>.
6. Al-Qazzaz NK, Ali SH, Ahmad SA, Islam S, Mohamad K. Cognitive impairment and memory dysfunction after a stroke diagnosis: a post-stroke memory assessment. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2014 Sep 9;10:1677-91.
7. Gonzalez Kelso I, Tadi P. Cognitive Assessment. [Updated 2022 Nov 7]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Tersedia dari: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556049/>.
8. Sun J, Jiang X, Zhao M, Ma L, Pei H, Liu N, Li H. Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Gene Polymorphisms with Mild Cognitive Impairment Susceptibility: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Behav Neurol*. 2021 Sep 18;2021:2962792.
9. de Lau L. M., van Meurs J. B., Uitterlinden A. G., et al. Genetic variation in homocysteine metabolism, cognition, and white matter lesions. *Neurobiology of Aging*. 2010;31(11):2020–2022.
10. Chen N. Y., Liu C. W., Du L. L., et al. Enrichment of MTHFR 677 T in a Chinese long-lived cohort and its association with lipid modulation. *Lipids in Health and Disease*. 2014;13(1):p. 104.
11. Uçar F, Sönmez M, Ovalı E, Özmenoğlu M, Kartı SS, Yılmaz M et al. MTHFR C677T polymorphism and its relation to ischemic stroke in the Black Sea Turkish population: MTHFR Polymorphism and Ischemic Stroke. *Am J Hematol* 2004; 76: 40–43.
12. Lopaciuk S, Bykowska K, Kwiecinski H, et al. Factor V Leiden, prothrombin gene G20210A variant, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype in young adults with ischemic stroke. *Clin Appl Thromb Hemost* 2001;7:346–350.
13. Polito L., Poloni T. E., Vaccaro R., et al. High homocysteine and epistasis between _MTHFR_ and _APOE_: association with cognitive performance in the elderly. *Experimental Gerontology*. 2016;76:9–16.
14. Moorthy D., Peter I., Scott T. M., et al. Status of vitamins B-12 and B-6 but not of folate, homocysteine, and the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism are associated with impaired cognition and depression in adults. *The Journal of Nutrition*. 2012;142(8):1554–1560.
15. Gorgone G., Ursini F., Altamura C., et al. Hyperhomocysteinemia, intima-media thickness and C677T MTHFR gene polymorphism: a correlation study in patients with cognitive impairment. *Atherosclerosis*. 2009;206(1):309–313.